



Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Universidad del Perú. Decana de América

Dirección General de Estudios de Posgrado

Facultad de Medicina Veterinaria

Unidad de Posgrado

Evaluación espacio-temporal de la concentración de copias genómicas de SARS-CoV-2, HAdV, NoV GII y RV en muestras de aguas residuales urbanas no tratadas y su relación con la población de infectados en la provincia de Huancayo, región Junín

TESIS

Para optar el Grado Académico de Magíster en Ciencias Veterinarias con mención en Salud Animal

AUTOR

César Arturo VALDIVIA CARRERA

ASESOR

Dr. Eloy Anibal GONZALES GUSTAVSON

Lima, Perú

2023



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

Referencia bibliográfica

Valdivia C. Evaluación espacio-temporal de la concentración de copias genómicas de SARS-CoV-2, HAdV, NoV GII y RV en muestras de aguas residuales urbanas no tratadas y su relación con la población de infectados en la provincia de Huancayo, región Junín [Tesis de maestría]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Medicina Veterinaria, Unidad de Posgrado; 2023.

Metadatos complementarios

Datos de autor	
Nombres y apellidos	César Arturo VALDIVIA CARRERA
Tipo de documento de identidad	DNI
Número de documento de identidad	47572753
URL de ORCID	https://orcid.org/0009-0002-2606-1891
Datos de asesor	
Nombres y apellidos	Eloy Anibal GONZALES GUSTAVSON
Tipo de documento de identidad	DNI
Número de documento de identidad	41630020
URL de ORCID	https://orcid.org/0000-0001-7328-2983
Datos del jurado	
Presidente del jurado	
Nombres y apellidos	Mercy Gisela RAMIREZ VELASQUEZ
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	10713781
Miembro del jurado 1	
Nombres y apellidos	Mónica Jehnny PAJUELO TRAVEZAÑO
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	10518111
Miembro del jurado 2	
Nombres y apellidos	Juan Anderson MORE BAYONA
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	43316819
Miembro del jurado 3	
Nombres y apellidos	
Tipo de documento	DNI

Número de documento de identidad	
Datos de investigación	
Línea de investigación	B.4.1.9. Patología Clínica y Biología Molecular. B.4.1.5. Microbiología y Parasitología Veterinaria. B.4.3.1. Gestión de Calidad. B.4.4.1. Medicina Veterinaria Preventiva.
Grupo de investigación	Ateneo Abocado a Responder Amenazas y Oportunidades del Sector Pecuario – ATENEO
Agencia de financiamiento	Perú. PROCIENCIA/CONCYTEC. Proyectos de Investigación en Biotecnología Perú-Chile: COVID-19. 164-2020.
Ubicación geográfica de la investigación	Edificio: Laboratorio de Salud Animal y Salud Pública (Instituto Veterinario de Investigaciones Tropicales y de Altura, El Mantaro). País: Perú. Departamento: Junín. Provincia: Huancayo. Distritos: Huancayo – El Tambo. Latitud: -12.07619 (Huancayo), -12.050364 (El Tambo) Longitud: -75.20691 (Huancayo), -75.221319 (El Tambo)
Año o rango de años en que se realizó la investigación	Junio 2021 - Abril 2023
URL de disciplinas OCDE	Salud pública, Salud ambiental https://purl.org/pe-repo/ocde/ford#3.03.05 Enfermedades infecciosas https://purl.org/pe-repo/ocde/ford#3.03.08 Epidemiología https://purl.org/pe-repo/ocde/ford#3.03.09



ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS PARA OPTAR EL GRADO ACADÉMICO DE MAGÍSTER EN CIENCIAS VETERINARIAS CON MENCIÓN EN SALUD ANIMAL

En la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, siendo las 14:00 horas del día viernes 24 de noviembre del 2023, el Jurado Examinador de Tesis de Grado presidido por la Mg. Mercy Gisela Ramírez Velásquez y conformado por los siguientes miembros docentes: Ph.D. Juan Anderson More Bayona, Ph.D. Mónica Jehnny Pajuelo Travezaño y Dr. Eloy Anibal Gonzales Gustavson (**Asesor**), se dio inicio a la sustentación oral y pública de la Tesis intitulada:

“Evaluación espacio-temporal de la concentración de copias genómicas de SARS-CoV-2, HAdV, NoV GII y RV en muestras de aguas residuales urbanas no tratadas y su relación con la población de infectados en la provincia de Huancayo, región Junín”,
presentado por el Bachiller:

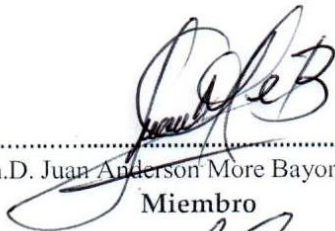
CÉSAR ARTURO VALDIVIA CARRERA


Quien sustentó la Tesis para obtener el Grado Académico de Magíster en Ciencias Veterinarias con mención en Salud Animal y absolvió satisfactoriamente las preguntas y objeciones formuladas por el Jurado y practicada la votación obtuvo la calificación de: _____
MUY BUENO, (18) DIECIOCHO

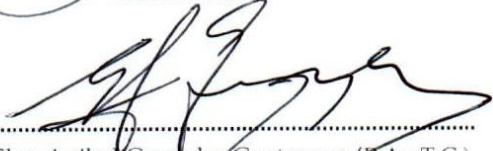
A continuación, el Jurado por intermedio de su Presidente recomendó a la Unidad de Posgrado de la Facultad de Medicina Veterinaria, proponga el otorgamiento del Grado Académico de Magíster en Ciencias Veterinarias con mención en Salud Animal, al Bachiller César Arturo Valdivia Carrera.

Siendo las 16:09 horas del día viernes 24 de noviembre de 2023, se dio por concluido el acto académico, suscribiéndose la presente Acta.


.....
Mg. Mercy Gisela Ramírez Velásquez (P.A.D.E.)
Presidente


.....
Ph.D. Juan Anderson More Bayona (P.Au. T.C.)
Miembro


.....
Ph.D. Mónica Jehnny Pajuelo Travezaño
Miembro (Externo)


.....
Dr. Eloy Anibal Gonzales Gustavson (P.Au.T.C.)
Miembro (Asesor)


.....
Dr. César Miguel Gavidia Chucán (P.P.D.E.)
Director de la Unidad de Posgrado UNMSM





CERTIFICADO DE SIMILITUD

Yo, Eloy Anibal Gonzales Gustavson en mi condición de asesor acreditado con la Resolución Directoral N°063–UPG–FMV-2022 de la tesis, cuyo título es **Evaluación espacio-temporal de la concentración de copias genómicas de SARS-CoV-2, HAdV, NoV GII y RV en muestras de aguas residuales urbanas no tratadas y su relación con la población de infectados en la provincia de Huancayo, región Junín** presentado por el bachiller Cesar Arturo Valdivia Carrera para optar el grado académico de Magister en Ciencias Veterinarias con mención en Salud Animal. CERTIFICO que se ha cumplido con lo establecido en la Directiva de Originalidad y de Similitud de Trabajos Académicos, de Investigación y Producción Intelectual. Según la revisión, análisis y evaluación mediante el software de similitud textual, el documento evaluado cuenta con el porcentaje de 16% de similitud, nivel **PERMITIDO** para continuar con los trámites correspondientes y para su **publicación en el repositorio institucional.**

Se emite el presente certificado en cumplimiento de lo establecido en las normas vigentes, como uno de los requisitos para la obtención del grado/ título/ especialidad correspondiente.

Firma del Asesor

DNI: 41630020

Nombres y apellidos del asesor: ELOY ANIBAL GONZALES GUSTAVSON



DEDICATORIA

A mis padres, Martha y César por ser los artífices de cada uno de mis logros, entre los que se incluye este trabajo, y por representar el principal cimiento en la construcción de mi vida profesional.

A mis hermanos, Irma, Karil, Kevin y Manuel por brindarme su apoyo incondicional en aquellos difíciles momentos y por alentarme a conseguir mis ideales.

A cada uno de ellos, mi más profundo amor, agradecimiento y eterna admiración.

AGRADECIMIENTO

Al Dr. Eloy Anibal Gonzales Gustavson, asesor de la tesis, por brindarme la valiosa oportunidad de llevar a cabo el presente trabajo de investigación, por su constante orientación en el campo académico y por siempre exigirme mi máximo desempeño.

A la Dra. Ana Cecilia Ho Palma por absolver cada una de mis dudas y por su enorme contribución en la finalización de este estudio.

Al Dr. Luis Antonio Gómez Puerta, Dra. María Teresa López Urbina y Dra. Ana Miluska Vargas Calla por contribuir enormemente en mi formación profesional.

A la Sra. Eliana Bibiana Ortega Cárdenas Vda. De Barientos por su completa disposición y colaboración en el trabajo técnico de este estudio.

A los compañeros Astrid Sherey Munguia Mercado, Brenda Lucero Gonzales Juárez y Daniel Aarón Andrade Mogrovejo por los gratos momentos y por el apoyo en la culminación de este trabajo tan relevante para mi persona.

A todos ellos, mi total agradecimiento y estima.

ÍNDICE

DEDICATORIA.....	I
AGRADECIMIENTO.....	II
ÍNDICE.....	III
RESUMEN.....	VI
ABSTRACT.....	VII
LISTA DE CUADROS.....	VIII
LISTA DE FIGURAS.....	IX
LISTA DE APÉNDICE.....	X
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	4
2.1. Características genéticas y taxonómicas.....	4
2.1.1. Síndrome respiratorio agudo severo coronavirus 2.....	4
2.1.2. Rotavirus.....	6
2.1.3. Norovirus.....	7
2.1.4. Adenovirus humano.....	7
2.2. Características epidemiológicas.....	8
2.2.1. Síndrome respiratorio agudo severo coronavirus 2.....	8
2.2.2. Rotavirus.....	9
2.2.3. Norovirus.....	12
2.2.4. Adenovirus humano.....	13
2.3. Epidemiología Basada en Aguas Residuales.....	14
2.3.1. Generalidades.....	14
2.3.2. WBE en el monitoreo de microorganismos patógenos humanos.....	16
2.3.2.1. Síndrome respiratorio agudo severo coronavirus 2.....	17
2.3.2.1.1. Sudamérica.....	18
2.3.2.1.2. Norteamérica.....	19
2.3.2.1.3. Europa.....	19
2.3.2.1.4. Asia.....	21

2.3.2.1.5. Oceanía.....	22
2.3.2.2. Rotavirus.....	22
2.3.2.3. Norovirus.....	23
2.3.2.4. Adenovirus humano.....	24
2.4. Métodos de concentración viral.....	25
2.4.1. Flocculación con leche desnatada.....	26
2.4.2. Flocculación con hidróxido de aluminio.....	27
2.4.3. Ultrafiltración.....	28
2.4.4. Ultracentrifugación.....	29
2.4.5. Absorción-extracción con membrana electronegativa.....	29
2.4.6. Precipitación con polietilenglicol.....	30
III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	32
3.1. Lugar de ejecución y periodo de duración.....	32
3.2. Descripción del material experimental.....	32
3.2.1. Muestras de aguas residuales.....	32
3.2.2. Reactivos para el procesamiento de las muestras de aguas residuales.....	33
3.2.3. Reactivos para la extracción de ácidos nucleicos virales.....	33
3.2.4. Reactivos para el análisis molecular.....	33
3.2.5. Material genético sintético.....	33
3.2.6. Cebadores y sondas.....	34
3.2.7. Registro del número de casos clínicos.....	35
3.2.8. Herramientas para el análisis de los resultados.....	35
3.2.9. Reactivos, materiales y equipos.....	35
3.3. Diseño experimental.....	36
3.3.1. Colecta y transporte de las muestras de aguas residuales.....	36
3.3.2. Evaluación de la eficacia de recuperación.....	38
3.3.3. Elaboración de la curva estándar.....	39
3.3.4. Procesamiento de las muestras de aguas residuales.....	39
3.3.4.1. Análisis directo.....	39

3.3.4.2. Métodos de concentración viral.....	39
3.3.4.2.1. Floculación con leche desnatada.....	40
3.3.4.2.2. Ultrafiltración.....	40
3.3.5. Extracción de ácidos nucleicos.....	41
3.3.6. Análisis molecular.....	41
3.3.6.1. RT-qPCR.....	42
3.3.6.2. qPCR.....	44
3.3.7. Registro del número de casos clínicos.....	45
3.3.8. Tamaño de muestra.....	45
3.3.9. Análisis de datos.....	46
3.3.9.1. Evaluación del rendimiento del análisis molecular.....	46
3.3.9.2. Evaluación entre la relación entre la concentración viral en las aguas residuales y el número de casos registrados en la población.....	47
IV. RESULTADOS.....	49
4.1. Eficacia de recuperación para SARS-CoV-2 inoculado en muestras de aguas residuales.....	49
4.2. Detección y cuantificación viral.....	49
4.3. Casos de COVID-19 y gastroenteritis aguda.....	51
4.4. Relación entre la concentración de SARS-CoV-2 en las aguas residuales y el número de casos de COVID-19.....	52
4.5. Relación entre la concentración de RV, NoV GGII y HAdV en las aguas residuales y el número de casos de gastroenteritis aguda.....	54
4.6. Parámetros físico-químicos de las aguas residuales.....	57
V. DISCUSIÓN.....	59
VI. CONCLUSIONES.....	65
VII. RECOMENDACIONES.....	66
VIII. BIBLIOGRAFÍA CITADA.....	67
IX. APÉNDICE.....	85

RESUMEN

La pandemia de la enfermedad por coronavirus 2019 (COVID-19) ha demostrado que la Epidemiología Basada en Aguas Residuales es una alternativa rápida y económica para monitorear al virus del síndrome respiratorio agudo severo coronavirus 2 (SARS-CoV-2) a nivel comunitario en países desarrollados. En el presente estudio, se monitorearon las aguas residuales de una ciudad de la sierra central del Perú sin planta de tratamiento de aguas residuales durante un año para evaluar la relación entre la concentración de SARS-CoV-2 y los casos reportados de COVID-19 en la comunidad. También se evaluó la relación entre rotavirus (RV), norovirus genogrupo II (NoV GII) y adenovirus humano (HAdV) con los casos reportados de gastroenteritis aguda. Antes de iniciar el muestreo, se analizó la eficacia de recuperación de tres métodos de procesamiento en muestras de aguas residuales inoculadas con SARS-CoV-2: análisis directo, ultrafiltración y floculación con leche desnatada. El mayor rendimiento lo obtuvo el análisis directo en comparación con la ultrafiltración y la floculación con leche desnatada. El monitoreo de las aguas residuales reveló que el 72% (36/50) de las muestras fueron positivas a SARS-CoV-2 y el análisis directo alcanzó los mejores resultados. Además, se observó un fuerte nivel de correlación entre la concentración del SARS-CoV-2 en las aguas residuales y los casos de COVID-19, que permitió anticipar, en dos semanas, el inicio de la cuarta y quinta de la pandemia en la ciudad de Huancayo. Todas las muestras procesadas por floculación con leche desnatada fueron positivas y mostraron elevadas concentraciones de RV, NoV GGII y HAdV. Las mayores concentraciones de RV se registraron cuatro semanas antes del inicio de brotes de gastroenteritis aguda en niños menores de cuatro años. En conclusión, este estudio sugiere que el monitoreo de las aguas residuales es una excelente herramienta de vigilancia y podría anticipar brotes de enfermedades infecciosas, como la COVID-19, en países en vías de desarrollo.

Keywords: SARS-CoV-2, rotavirus, análisis directo, floculación con leche desnatada, sierra central del Perú, Epidemiología Basada en Aguas Residuales

ABSTRACT

The pandemic of coronavirus disease 2019 (COVID-19) has shown that Wastewater Based Epidemiology is a fast and economical alternative for monitoring severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) at the community level in high-income countries. In the present study, wastewater from a city in the Peruvian Central Highlands without a wastewater treatment plant was monitored for one year to evaluate the relationship between the concentration of SARS-CoV-2 and the reported cases of COVID-19 in the community. The relationship between rotavirus (RV), norovirus genogroup II (NoV GGII), and human adenovirus (HAdV) were also compared to the number of reported cases of acute gastroenteritis. Before starting the analysis of the samples, the viral recovery efficacy of three processing methods was tested in spiked wastewater with SARS-CoV-2: direct analysis, ultrafiltration, and skimmed milk flocculation. The results demonstrated a higher performance of direct analysis compared to ultrafiltration and skimmed milk flocculation. Wastewater monitoring showed that 72.0% (36/50) of the samples were positive for SARS-CoV-2 and the direct analysis obtained the highest detection frequency and the highest quantifications of SARS-CoV-2. In addition, a strong level of correlation was observed between the concentration of SARS-CoV-2 in wastewater and the reported cases of COVID-19, which made it possible to anticipate, by up to 2 weeks, the start of the fourth and fifth waves of the pandemic in Huancayo City. All the samples processed by skimmed milk flocculation method were positive and showed high concentrations for RV, NoV GGII, and HAdV. In fact, the highest RV concentrations were registered up to 4 weeks before outbreaks of acute gastroenteritis reported in children under 4 years of age. In conclusion, this study suggest that periodic monitoring of wastewater is an excellent epidemiological tool to surveillance and would anticipate outbreaks of infectious diseases, such as COVID-19, in low- and middle-income countries or in regions with scarce resources.

Keywords: SARS-CoV-2, rotavirus, direct analysis, skimmed milk flocculation, Peruvian Highlands, Wastewater Based Epidemiology

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Volúmenes y concentraciones de cada reactivo en el volumen de reacción final de la RT-qPCR para SARS-CoV-2.....	42
Cuadro 2. Condiciones de temperatura y tiempo de la RT-qPCR para SARS-CoV-2.....	43
Cuadro 3. Volúmenes y concentraciones de cada reactivo en el volumen de reacción final de la RT-qPCR para rotavirus (RV).....	43
Cuadro 4. Condiciones de temperatura y tiempo de la RT-qPCR para rotavirus (RV)...	43
Cuadro 5. Volúmenes y concentraciones de cada reactivo en el volumen de reacción final de la RT-qPCR para norovirus genogrupo II (NoV GGII).....	44
Cuadro 6. Condiciones de temperatura y tiempo de la RT-qPCR para norovirus genogrupo II (NoV GGII).....	44
Cuadro 7. Volúmenes y concentraciones de cada reactivo en el volumen de reacción final de la qPCR para adenovirus humano (HAdV).....	45
Cuadro 8. Condiciones de temperatura y tiempo de la qPCR para adenovirus humano (HAdV).....	45
Cuadro 9. Eficacia de recuperación para SARS-CoV-2 inoculado en muestras de aguas residuales por cada método de procesamiento.....	49
Cuadro 10. Detecciones y cuantificaciones en copias genómicas (CG) por 100 mL de muestra de agua residual para SARS-CoV-2 por cada método de procesamiento en ambos distritos.....	51
Cuadro 11. Valores de la mediana, mínimos y máximos en copias genómicas (CG) por 100 mL de muestra de agua residual para rotavirus (RV), norovirus genogrupo II (NoV GGII) y adenovirus humano (HAdV) concentrados por el método de floculación con leche desnatada en ambos distritos.....	51
Cuadro 12. Coeficientes de correlación de Spearman entre las concentraciones de copias genómicas de SARS-CoV-2, rotavirus (RV), norovirus genogrupo II (NoV GGII) y adenovirus humano (HAdV) en las aguas residuales y los casos totales de COVID-19 y gastroenteritis aguda reportados en ambos distritos.....	57
Cuadro 13. Valores de la media, mínimos y máximos de cada parámetro físico-químico de las aguas residuales de cada distrito: pH, temperatura, conductividad eléctrica (CE) y sólidos disueltos totales (SDT).....	58

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Esquema de muestreo para el análisis de SARS-CoV-2, rotavirus (RV), norovirus genogrupo II (NoV GGII) y adenovirus humano (HAdV) en las aguas residuales de ambos distritos por cada semana epidemiológica (SE). Las muestras recolectadas desde la SE 1/2022 hasta la SE 49/2022 fueron analizadas y procesadas por análisis directo y floculación con leche desnatada para SARS-CoV-2. Además, las muestras recolectadas entre las SE 5/2022 y 49/2022 también fueron procesadas por ultrafiltración para SARS-CoV-2. Las muestras recolectadas desde la SE 37/2021 hasta la SE 37/2022 fueron analizadas y procesadas por floculación con leche desnatada para RV, NoV GGII y HAdV. El casillero en blanco de la SE 37/2021 representa una muestra que no fue recolectada en el distrito de Huancayo.....37
- Figura 2. Mapa de los distritos de Huancayo (amarillo pálido) y El Tambo (verde pálido). Además, se muestran los puntos colectores de ambos distritos donde se recolectaron las muestras de aguas residuales, así como el río Mantaro (punto anaranjado) y los dos hospitales (puntos morados) más importantes de la ciudad de Huancayo.....38
- Figura 3. Esquema para el cálculo del coeficiente de correlación de Spearman entre las copias genómicas (CG) virales en las aguas residuales y los casos clínicos reportados en la comunidad. Las figuras A, B y C indican la evaluación de ambas variables en la misma semana epidemiológica (sin retraso), considerando dos semanas de retraso de las CG virales respecto a los casos clínicos y considerando cuatro semanas de retraso de las CG virales respecto a los casos clínicos, respectivamente.....48
- Figura 4. Monitoreo de las concentraciones de SARS-CoV-2 en las aguas residuales y registro semanal de los casos de COVID-19. Las barras azules representan los casos de COVID-19 notificados por la autoridad sanitaria del Perú, mientras que la línea roja representa la concentración de copias genómicas (CG) por 100 mL de muestra de agua residual evaluada en este estudio, a lo largo de las semanas epidemiológicas para los distritos de Huancayo (A) y El Tambo (B).....53
- Figura 5. Monitoreo de las concentraciones de rotavirus (RV) y adenovirus humano (HAdV) en las aguas residuales y registro semanal de los casos de gastroenteritis aguda. Las barras azules representan los casos de gastroenteritis aguda notificados por la autoridad sanitaria de Perú, mientras que la línea roja representa la concentración de copias genómicas (GC) por 100 mL de muestra de agua residual evaluada en este estudio. En las Figuras A y B se muestran las concentraciones de RV y el número de casos en niños menores de 1 año para el Distrito de El Tambo (A) y el número de casos en niños de 1 a 4 años para el Distrito de Huancayo (B). La figura C muestra las concentraciones de HAdV y el número de casos en niños de 1 a 4 años para el distrito de Huancayo.....56
- Figura 6. Monitoreo de las concentraciones de rotavirus (RV) y registro semanal (37-51) de los casos de gastroenteritis aguda. A mayor detalle, se observa que en las semanas epidemiológicas 43 y 47 se producen dos incrementos en las concentraciones de copias genómicas (CG) de RV (línea roja) en las aguas residuales que anticipan en dos semanas el aumento del número de casos de gastroenteritis aguda (barras azules) en niños menores de un año de edad en las semanas epidemiológicas 45 y 49.....57

LISTA DE APÉNDICE

Anexo 1. Imágenes del punto colector “Daniel Alcides Carrión” del distrito de Huancayo y áreas aledañas.....	86
Anexo 2. Imágenes del punto colector “Parra del Riego” del distrito de El Tambo y áreas aledañas.....	87
Anexo 3. Protocolo de extracción de ácidos nucleicos “MagMAX™ Viral/Pathogen Nucleid Acid Isolation Kit”.....	88
Anexo 4. Registro semanal del número de casos de COVID-19 en los distritos de Huancayo y El Tambo por la Dirección Regional de Salud (DIRESA), Junín.....	92
Anexo 5. Registro del número de casos de gastroenteritis aguda por cada semana epidemiológica (SE) realizado por la Dirección Regional de Salud (DIRESA), Junín, en los distritos de Huancayo y El Tambo.....	94
Anexo 6. Monitoreo de las concentraciones de rotavirus (RV) en las aguas residuales y registro semanal de los casos de gastroenteritis aguda en el distrito de Huancayo. Las barras azules representan los casos notificados de gastroenteritis aguda en total (A), en niños menores de 1 año (B) y en personas mayores de 5 años (C), mientras que la línea roja representa las concentraciones de copias genómicas (CG) de RV por 100 mL de muestra de agua residual evaluadas a lo largo de las semanas epidemiológicas.....	96
Anexo 7. Monitoreo de las concentraciones de rotavirus (RV) en las aguas residuales y registro semanal de los casos de gastroenteritis aguda en el distrito de El Tambo. Las barras azules representan el total de casos notificados de gastroenteritis aguda (A), en niños de 1 a 4 años (B) y en personas mayores de 5 años (C), mientras que la línea roja representa las concentraciones de copias genómicas (CG) de RV por 100 mL de muestra de agua residual evaluadas a lo largo de las semanas epidemiológicas.....	97
Anexo 8. Monitoreo de las concentraciones de norovirus genogrupo II (NoV GGII) en las aguas residuales y registro semanal de los casos de gastroenteritis aguda en el distrito de Huancayo. Las barras azules representan los casos notificados de gastroenteritis aguda en total (A), en niños menores de 1 año (B), en niños de 1 a 4 años (C) y en personas mayores 5 años de edad (D), mientras que la línea roja representa las concentraciones de copias genómicas (CG) de NoV GGII por 100 mL de muestra de agua residual evaluadas a lo largo de las semanas epidemiológicas.....	98
Anexo 9. Monitoreo de las concentraciones de norovirus genogrupo II (NoV GGII) en las aguas residuales y registro semanal de los casos de gastroenteritis aguda en el distrito de El Tambo. Las barras azules representan los casos notificados de gastroenteritis aguda en total (A), en niños menores de 1 año (B), en niños de 1 a 4 años (C) y en personas mayores 5 años de edad (D), mientras que la línea roja representa las concentraciones de copias genómicas (CG) de NoV GGII por 100 mL de muestra de agua residual evaluadas a lo largo de las semanas epidemiológicas.....	99
Anexo 10. Monitoreo de las concentraciones de adenovirus humano (HAdV) en las aguas residuales y registro semanal de los casos de gastroenteritis aguda en el distrito de Huancayo. . Las barras azules representan los casos notificados de gastroenteritis aguda en total (A), en niños menores de 1 año (B) y en personas mayores de 5 años (C), mientras	

que la línea roja representa las concentraciones de copias genómicas (CG) de HAdV por 100 mL de muestra de agua residual evaluadas a lo largo de las semanas epidemiológicas.....	100
Anexo 11. Monitoreo de las concentraciones de adenovirus humano (HAdV) en las aguas residuales y registro semanal de casos de gastroenteritis aguda en el distrito de El Tambo. Las barras azules representan los casos notificados de gastroenteritis aguda en total (A), en niños menores de 1 año (B), en niños de 1 a 4 años (C) y en personas mayores 5 años de edad (Fig. C), mientras que la línea roja representa las concentraciones de copias genómicas (CG) de HAdV por 100 mL de muestra de agua residual evaluadas a lo largo de las semanas epidemiológicas.....	101
Anexo 12. Detecciones y concentraciones de copias genómicas (CG) en el volumen de reacción final para SARS-CoV-2 por cada método de procesamiento, a lo largo de las semanas epidemiológicas (SE), en el distrito de Huancayo. Se presentan las cuantificaciones y el ciclo de cuantificación (Cq) obtenidos de las réplicas técnicas (RT) de la dilución 1:100.....	102
Anexo 13. Detecciones y concentraciones de copias genómicas (CG) en el volumen de reacción final para SARS-CoV-2 por cada método de procesamiento, a lo largo de las semanas epidemiológicas (SE), en el distrito de El Tambo. Se presentan las cuantificaciones y el ciclo de cuantificación (Cq) obtenidos de las réplicas técnicas (RT) de la dilución 1:100.....	104
Anexo 14. Concentraciones de copias genómicas (CG) en el volumen de reacción final para rotavirus concentrado por floculación con leche desnatada, a lo largo de las semanas epidemiológicas (SE), en el distrito de Huancayo. Se presentan las cuantificaciones y el ciclo de cuantificación (Cq) obtenidos de las réplicas técnicas (RT) de la dilución 1:100.....	106
Anexo 15. Concentraciones de copias genómicas (CG) en el volumen de reacción final para rotavirus concentrado por floculación con leche desnatada, a lo largo de las semanas epidemiológicas (SE), en el distrito de El Tambo. Se presentan las cuantificaciones y el ciclo de cuantificación (Cq) obtenidos de las réplicas técnicas (RT) de la dilución 1:100.....	107
Anexo 16. Concentraciones de copias genómicas (CG) en el volumen de reacción final para norovirus genogrupo II concentrado por floculación con leche desnatada, a lo largo de las semanas epidemiológicas (SE), en el distrito de Huancayo. Se presentan las cuantificaciones y el ciclo de cuantificación (Cq) obtenidos de las réplicas técnicas (RT) de la dilución 1:100.....	108
Anexo 17. Concentraciones de copias genómicas (CG) en el volumen de reacción final para norovirus genogrupo II concentrado por floculación con leche desnatada, a lo largo de las semanas epidemiológicas (SE), en el distrito de El Tambo. Se presentan las cuantificaciones y el ciclo de cuantificación (Cq) obtenidos de las réplicas técnicas (RT) de la dilución 1:100.....	109
Anexo 18. Concentraciones de copias genómicas (CG) en el volumen de reacción final para adenovirus humano concentrado por floculación con leche desnatada, a lo largo de las semanas epidemiológicas (SE), en el distrito de Huancayo. Se presentan las cuantificaciones y el ciclo de cuantificación (Cq) obtenidos de las réplicas técnicas (RT) de la dilución 1:100.....	110

Anexo 19. Concentraciones de copias genómicas (CG) en el volumen de reacción final para adenovirus humano concentrado por floculación con leche desnatada, a lo largo de las semanas epidemiológicas (SE), en el distrito de El Tambo. Se presentan las cuantificaciones y el ciclo de cuantificación (Cq) obtenidos de las réplicas técnicas (RT) de la dilución 1:100.....	111
Anexo 20. Coeficientes de correlación de Spearman entre las concentraciones de copias genómicas de SARS-CoV-2, rotavirus (RV), norovirus genogrupo II (NoV GGII) y adenovirus humano (HAdV) en las aguas residuales con los casos de COVID-19 y gastroenteritis aguda reportados en los distritos de Huancayo y El Tambo.....	112
Anexo 21. Valores de los parámetros fisico-químicos de las aguas residuales, a lo largo de las semanas epidemiológicas (SE), en los distritos de Huancayo y El Tambo.....	113
Anexo 22. Variaciones en los valores de los parámetros físico-químicos de las aguas residuales, a lo largo de las semanas epidemiológicas, en los distritos de Huancayo (línea azul) y El Tambo (línea roja).....	114
Anexo 23. Rendimientos de los ensayos RT-qPCR y qPCR.....	115

I. INTRODUCCIÓN

Al inicio de la pandemia de la enfermedad por coronavirus 2019 (COVID-19, por sus siglas en inglés: coronavirus disease 2019), ocasionado por el síndrome respiratorio agudo severo coronavirus 2 (SARS-CoV-2, por sus siglas en inglés: severe acute respiratory syndrome coronavirus 2), las autoridades sanitarias aplicaron masivamente pruebas de diagnóstico clínicos individual con el objetivo de determinar la prevalencia en la población (Rusiñol *et al.*, 2021; Guerrero-Latorre *et al.*, 2022). Sin embargo, este enfoque era económicamente insostenible a largo plazo para la mayoría de los países (Polo *et al.*, 2020; Tandukar *et al.*, 2022). Además, la alta demanda de insumos médicos y la limitada capacidad de producción de los proveedores provocaron rápidamente la escasez de pruebas clínicas. Por lo tanto, sólo fue posible realizar pruebas a personas con manifestaciones clínicas compatibles con COVID-19, lo que a su vez generó un considerable subregistro del número de casos notificados en la comunidad (Rusiñol *et al.*, 2021). Todos estos hechos agudizaron la crisis sanitaria mundial y evidenciaron la necesidad de contar con una herramienta que permita una vigilancia epidemiológica rápida y económica a nivel comunitario (Daughton, 2020).

Durante el transcurso de la pandemia, muchos estudios informaron la presencia del ARN del SARS-CoV-2 en muestras fecales de personas infectadas (Wölfel *et al.*, 2020; Tang *et al.*, 2020) y en aguas residuales de comunidades afectadas en varios países (Medema *et al.*, 2020; Claro *et al.*, 2021; Rusiñol *et al.*, 2021). Estos hallazgos evidenciaron la posibilidad de utilizar las aguas residuales como una herramienta de vigilancia epidemiológica para estimar la magnitud y distribución del SARS-CoV-2 en la comunidad bajo un enfoque denominado Epidemiología Basada en Aguas Residuales

(WBE, por sus siglas en inglés: Wastewater Based Epidemiology) (Kitajima *et al.*, 2020; Polo *et al.*, 2020). La WBE es una herramienta de la ciencia ambiental que permite la vigilancia de múltiples enfermedades infecciosas, a nivel comunitario, a través del monitoreo periódico de las aguas residuales (Ahmed, *et al.*, 2020a). Su aplicación en la pandemia logró importantes resultados que permitieron anticipar el aumento de casos clínicos de COVID-19 (Medema *et al.*, 2020; Claro *et al.*, 2021; Rusiñol *et al.*, 2021), evaluar el efecto de las intervenciones de salud pública (Rusiñol *et al.*, 2021), optimizar y focalizar pruebas de diagnóstico clínico individual (Randazzo *et al.*, 2020), complementar la vigilancia clínica epidemiológica (Randazzo *et al.*, 2020; Tandukar *et al.*, 2022) e identificar asintomáticos, paucisintomáticos e individuos presintomáticos (Hart y Halden, 2020; Polo *et al.*, 2020). En base en estos precedentes, la aplicación de la WBE surge como una alternativa para la vigilancia epidemiológica de los principales virus entéricos humanos, como rotavirus (RV), norovirus genogrupo II (NoV GGII) y adenovirus humano (HAdV), que representan una preocupación constante para la salud pública en países en vías de desarrollo (OPS, 2007; Dey *et al.*, 2011; Mans, 2019). Además, es importante considerar que investigaciones previas han monitoreado exitosamente a virus entéricos en diferentes matrices ambientales (Hellmér *et al.*, 2014; Kazama *et al.*, 2017; Gonçalves *et al.*, 2018) y sugieren que una persona con gastroenteritis aguda puede excretar de 10^7 a 10^{12} partículas virales por gramo de heces al día (Rusiñol y Girones, 2017).

En América Latina se estima que el 65% de las aguas residuales no recibe ningún tratamiento y que su disposición en el medio ambiente provoca el deterioro de la calidad microbiológica de los ríos y permite la introducción de diferentes microorganismos patógenos a la comunidad (Rodríguez *et al.*, 2018; Guerrero-Latorre *et al.*, 2018). Esta situación se observa en la ciudad de Huancayo, considerada una de las principales regiones agrícolas de la sierra central del Perú. Asimismo, la pobreza, la falta de agua potable y la ausencia de plantas de tratamiento de aguas residuales obligan a los agricultores a reutilizar ampliamente las aguas residuales para el riego de productos agrícolas destinados al consumo humano y animal. Por lo tanto, la salud pública y la salud ambiental en la ciudad de Huancayo se ven muy afectadas por la ausencia de una planta de tratamiento de aguas residuales.

En el presente estudio se monitorearon las aguas residuales de los principales distritos de la ciudad de Huancayo durante un año para evaluar la relación entre la concentración del SARS-CoV-2 y los casos reportados de COVID-19 en la comunidad y también la relación entre RV, NoV GGII y HAdV con el número de casos notificados de gastroenteritis aguda para determinar la factibilidad de monitorear los brotes de enfermedades infecciosas en países en vías de desarrollo y en regiones que carecen de una planta de tratamiento de aguas residuales.

II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. Características genéticas y taxonómicas:

2.1.1. Síndrome respiratorio agudo severo coronavirus 2:

El SARS-CoV-2 pertenece al género Betacoronavirus y a la familia *Coronaviridae*, tiene un diámetro de 60 a 140 nanómetros, presenta envoltura lipídica y el genoma es de ARN monocatenario lineal de polaridad positiva y está formado aproximadamente por 30 000 pares de bases. El SARS-CoV-2 comparte un 79% y 50% de identidad genómica con el coronavirus del síndrome respiratorio agudo severo (SARS-CoV) y el coronavirus del síndrome de Oriente Medio (MERS-CoV), respectivamente (Wu *et al.*, 2022).

En la organización genómica del SARS-CoV-2 se aprecian seis marcos de lectura abierta (ORF, por sus siglas en inglés: Open Reading Frame): replicasa (ORF1a/ORF1b), espiga (S), envoltura (E), membrana (M) y nucleocápside (N). El gen de la replicasa abarca casi dos tercios del genoma y codifica una poliproteína de gran tamaño, la cual origina a 16 proteínas no estructurales encargadas de la transcripción y replicación viral. Además, existen otros siete ORF putativos encargados de codificar proteínas accesorias (Hu *et al.*, 2021).

Los análisis filogenéticos de todo el genoma evidenciaron que el SARS-CoV-2 está agrupado con el SARS-CoV y otros coronavirus relacionados a murciélagos y pangolines. Las secuencias genéticas de la proteína S del SARS-CoV-2 muestra una similitud del 77% con el SARS-CoV de humanos, 75% a 97.7% con coronavirus de

murciélagos y 90.7% a 92.6% con coronavirus del pangolín (Hu *et al.*, 2021; Wu *et al.*, 2022). Una diferencia adicional del SARS-CoV-2 es el gen ORF8, que codifica una proteína con sólo un 40% de identidad genética con el gen ORF8 del SARS-CoV. Además, existe una variante del SARS-CoV-2 que presenta una delección de 382 nucleótidos que abarca la totalidad del ORF8. Este mismo hecho se ha observado anterior para el SARS-CoV y podría ser un indicativo de una adaptación humana después de la transmisión entre especies a partir de un hospedador animal (Hu *et al.*, 2021).

El “2019 Novel Coronavirus Resource of China National Center for Bioinformation” utilizó 77 801 secuencias genómicas detectadas a nivel mundial para evaluar la variación genética de diferentes cepas de SARS-CoV-2. Se identificaron 15 018 mutaciones, incluyendo 14 824 de un solo nucleótido polimórfico. En la proteína S se encontraron cuatro alteraciones en los aminoácidos cerca de la región de interacción con su receptor (Hu *et al.*, 2021; Wu *et al.*, 2022).

Se conoce que los murciélagos son hospedadores naturales de una amplia variedad de Alfacoronavirus y Betacoronavirus. El pariente más próximo del SARS-CoV-2 es un coronavirus de murciélago de la provincia de Yunnan, China, denominado “RaTG13” y comparten hasta un 96.2% de identidad genómica. Asimismo, la identidad genética de todos los ORF entre ambos virus alcanza el 90% (P. Zhou *et al.*, 2020). Otro coronavirus denominado “RmYN02”, aislado de una especie diferente de murciélago y encontrado también en Yunnan, muestra un 93.3% de identidad genómica (H. Zhou *et al.*, 2020). Estas evidencias respaldan las sospechas de que el SARS-CoV-2 tuvo su origen en los murciélagos. Sin embargo, la divergencia genómica entre el SARS-CoV-2 y los coronavirus de murciélagos sugiere más de 20 años de evolución, por lo tanto, los coronavirus de murciélagos pueden ser potenciales precursores del SARS-CoV-2 pero no progenitores directos. Otro animal vinculado con el SARS-CoV-2 es el pangolín. Se han detectado varios virus relacionados al SARS-CoV-2 en tejidos de pangolines de Malasia introducidos por contrabando hacia el sur de China. Los virus del linaje Guangdong muestran una similitud genómica del 92.4%, mientras que el linaje Guangxi expone una identidad genómica del 85.5% (Hu *et al.*, 2021).

2.1.2. Rotavirus:

El género RV pertenece a la familia *Reoviridae*, tiene un diámetro de 100 nanómetros, carece de envoltura lipídica, se caracteriza por presentar una morfología en forma de rueda (del latín *rota*) y su cápside proteica icosaédrica está formada por tres capas. El genoma es de ARN bicatenario compuesto por 11 segmentos y por aproximadamente 18 500 pares de bases. Los 11 segmentos codifican la formación de seis proteínas estructurales, denominadas viroplasma (VP) (VP1 hasta VP4, VP6 y VP7), y cinco o seis proteínas no estructurales dependiendo de la cepa (NSP1 hasta NSP5/6) (Tohmé y Delgui, 2021).

Los segmentos genéticos tienen una longitud que varía de 667 a 3302 pares de bases y son monocistrónicos, con excepción del segmento 11 en algunos genotipos, que puede ser bicistrónico y codificar dos proteínas: NSP5 y NSP6 (Sadiq *et al.*, 2018). Cada uno de los 11 segmentos se encuentra asociado a una copia de la enzima ARN polimerasa dependiente de ARN (RdRp, por sus siglas en inglés: RNA-dependent RNA polymerase). La cápside presenta tres capas dispuestas concéntricamente. La capa interna está conformada por VP2 y no se desarma durante la fase de replicación viral. La capa intermedia presenta en su estructura a la VP6, la cual tiene características antigénicas e inmunogénicas. La capa externa, formada por VP4 y VP7, contiene las principales estructuras antigénicas que median el ingreso viral a la célula hospedadora (Tohmé y Delgui, 2021).

En base al análisis de la proteína VP6, el género RV se ha clasificado en ocho especies (RVA hasta RVH) y dos especies propuestas, RVI y RVJ, identificados en cánidos de Hungría y en murciélagos de Serbia, respectivamente. Entre estas especies, RVA, RVB, RVC, RVE, RVH y RVI infectan a los mamíferos, y RVA es la principal causa de gastroenteritis aguda en niños y la especie más extendida en la mayoría de los mamíferos. Además, RVA se clasifica en cuatro subgrupos (SGI, SGII, SGI+II y SG nonI/nonII) y dos genogrupos (Sadiq *et al.*, 2018; Kiulia *et al.*, 2021).

Debido al genoma segmentado de RV, es frecuente la aparición de nuevos genotipos por reordenamiento genético durante las coinfecciones. Los genotipos inusuales están relacionadas con el 4.9% de la totalidad de infecciones por RV en todo el mundo. A nivel regional, son responsables del 27% de los casos en África, 14% en Asia,

11% en Sudamérica, 5% en Norteamérica, 1.4% en Europa y 0.1% en Australia (Sadiq *et al.*, 2018).

2.1.3. Norovirus:

El género norovirus (NoV) de la familia *Caliciviridae* se caracteriza por carecer de una envoltura lipídica y presentar un genoma de ARN monocatenario no segmentado de polaridad positiva conformado por aproximadamente 7 500 pares de bases de longitud. El genoma está constituido por tres ORF, a excepción de los norovirus murinos, que contienen un cuarto ORF. El ORF1 codifica una poliproteína encargada de sintetizar seis proteínas no estructurales (NSP1/2 hasta NSP7) después de la escisión postraducciona por la proteasa viral. El ORF2 codifica la proteína estructural de mayor importancia: VP1. La VP1 se encarga de rodear el genoma viral, alberga importantes epítomos de neutralización e interactúa con diversos antígenos. El ORF3 codifica una proteína estructural menor (VP2), la cual se localiza en el interior del virus y se sospecha que interviene en el ensamblaje de la cápside y en la encapsidación del genoma. Además, es probable que la VP2 sirva de intermediario en el ingreso viral hacia la célula hospedadora (Chhabra *et al.*, 2019).

Las secuencias completas de aminoácidos de la VP1 y la región ORF1 NSP7, encargado de codificar la enzima RdRp, sean utilizado recientemente en la clasificación taxonómica de NoV. Esta reconoce 10 genogrupos (GGI-GGX), así como a dos genogrupos tentativos, que aún deben confirmarse cuando se complete el análisis del VP1. Además, los norovirus incluidos en estos 10 genogrupos se pueden sub-clasificar en 49 genotipos (Chhabra *et al.*, 2019).

2.1.4. Adenovirus humano:

HAdV pertenece al género Mastadenovirus y a la familia *Adenoviridae*, tiene un diámetro de 70 a 100 nanómetros, carece de envoltura lipídica, presenta una morfología icosaédrica y tiene un genoma de ADN bicatenario lineal compuesto por aproximadamente 36 000 pares de bases. El genoma codifica al menos proteínas diferentes: proteínas principales y secundarias de la cápside, proteínas centrales, proteasa de maduración y maquinaria de empaquetamiento (Gallardo *et al.*, 2021). Dentro de estas, la proteína es una de las más importante porque es el principal componente viral y representa aproximadamente el 60% de la masa total de HAdV (Kim *et al.*, 2017). Las

proteínas de la base de pentón y fibras también forman parte de la cápside y cumplen un papel fundamental en la interacción con el receptor antes de la internalización celular. Además, la proteína VI de la cápside es un factor clave para el ingreso de HAdV a la célula hospedadora (Gallardo *et al.*, 2021). Internamente, se observa una gran cantidad de proteínas asociadas al genoma, como las proteínas centrales que se encargan de la condensación del ADN, la proteína terminal que permite la replicación genómica, la proteína IVa2 que media el empaquetamiento genómico y la proteína AVP que facilita la maduración de la progenie viral (Gallardo *et al.*, 2021).

En la actualidad, se han identificado 7 especies (A-G) y más de 69 genotipos de HAdV según las variantes antigénicas y el análisis molecular del gen hexon. La especie F es la que se relaciona frecuentemente con casos de gastroenteritis aguda en niños en todo el mundo (Kim *et al.*, 2017; Gallardo *et al.*, 2021).

2.2. Características epidemiológicas:

2.2.1. Síndrome respiratorio agudo severo coronavirus 2:

A finales de diciembre del 2019, múltiples centros de salud en Wuhan (Hubei, China), reportaron numerosos casos de pacientes con neumonía de etiología desconocida. Estos pacientes presentaban cuadros compatibles con neumonía viral, como la ocasionada por SARS-CoV y MERS-CoV, y los signos clínicos incluían fiebre, tos, malestar torácico, y en casos graves se observaba disnea y compromiso pulmonar bilateral (Hu *et al.*, 2021; Wu *et al.*, 2022). Dentro de los primeros pacientes hospitalizados, la mayoría se encontraba relacionado a un mercado mayorista caracterizado por la comercialización de una gran variedad de animales vivos (domésticos y silvestres). Las investigaciones retrospectivas indican que el primer caso de COVID-19 ocurrió el 8 de diciembre del 2019. El 31 de diciembre, las autoridades sanitarias de China notifican a la Organización Mundial de la Salud y públicamente sobre un brote de neumonía de causa desconocida (Hu *et al.*, 2021).

La elevada tasa de transmisión del SARS-CoV-2 ocasionó rápidamente su propagación comunitario en China y, posteriormente, a todo el mundo. Se observó que la transmisión del SARS-CoV-2 ocurrió principalmente después del inicio de las manifestaciones clínicas y alcanzó su mayor nivel después de la etapa crítica de la enfermedad. Sin embargo, se ha detectado una alta carga viral en secreciones respiratorias

durante la primera semana de la infección, por lo tanto, el riesgo de diseminación al inicio de la enfermedad era muy elevado. Los individuos con COVID-19 propagan al SARS-CoV-2 a través de pequeñas gotas cuando hablan, incluso cuando estornudan o tosen pueden generar pequeñas gotas que persisten por mayor tiempo en el aire y que podrían ingresar a los pulmones de otras personas (Hu *et al.*, 2021; Wu *et al.*, 2022).

El SARS-CoV-2 es capaz de infectar a toda la población de diferentes edades, aunque se observa un mayor número de casos en personas mayores de 50 años. La gravedad de los signos clínicos se relaciona con la edad del individuo (Hu *et al.*, 2021). La mayoría de personas jóvenes y niños desarrollan un cuadro leve o son asintomáticos, mientras que los hombres mayores de 60 años, con alguna condición médica preexistente, tienen un mayor riesgo de padecer una neumonía grave que requiera hospitalización y atención médica especializada. Las manifestaciones clínicas más frecuentes son fiebre, tos seca y fatiga, y los menos comunes son producción de secreción respiratoria, cefalalgia, dolor de garganta, dolor torácico, escalofríos, náuseas, vómitos, pérdida de apetito y diarrea. También se ha informado de la pérdida del gusto y olfato. Los signos clínicos suelen aparecer alrededor de los cinco días (periodo de incubación de 1 a 14 días). La aparición de disnea y neumonía se podría dar casi a los 8 días del inicio de la enfermedad (Hu *et al.*, 2021; Wu *et al.*, 2022).

2.2.2. Rotavirus:

RV es el principal agente etiológico de la gastroenteritis aguda en niños menores de cinco años de edad a nivel mundial y es responsable del 20% a 30% de todos los casos de gastroenteritis aguda grave. Esto ha sido corroborado por un estudio llevado a cabo en conjunto con la “Red Mundial de Vigilancia de Rotavirus”, que encontró que RV es la principal causa de gastroenteritis aguda en niños de 16 países (Operario *et al.*, 2017). Según una estimación de la Organización Mundial de la Salud, RV ocasiona 450 000 muertes, más de 2 000 000 de hospitalizaciones y 25 000 000 de casos asintomáticos al año. Lamentablemente, el 90% de las muertes ocurren en países en vías de desarrollo de Asia y África y, en el año 2013, se reportó que la mitad de las muertes registradas a nivel mundial ocurrieron sólo en cuatro países: India, Pakistán, Nigeria y República Democrática del Congo (Sadiq *et al.*, 2018).

La enfermedad por RV se caracteriza clínicamente por fiebre, oliguria, resequeidad en la boca y garganta, mareos, dolor abdominal y vómitos durante dos a tres días. Posteriormente, continúa la mayor expresión de la enfermedad: diarrea intensa aguda acompañada de deshidratación durante tres a ocho días que, en caso de no ser tratada, podría conducir a la muerte. Además, es frecuente observar signos respiratorios durante el desarrollo de la infección por RV. La aparición de los signos clínicos es repentino lo que corresponde a un periodo de incubación de uno a tres días. Los individuos infectados actúan como importantes focos de diseminación de la infección debido a que eliminan una elevada carga viral a través de las heces (Rusiñol and Girones, 2017; Sadiq *et al.*, 2018).

Diversos estudios han demostrado que las infecciones por RV siguen un patrón estacional. Se ha informado que la mayor cantidad de casos ocurren en los meses de invierno, mientras que en regiones endémicas es probable que los brotes o casos esporádicos también ocurran en otros meses. En regiones templadas, la mayor carga de la enfermedad se produce en los meses fríos y secos. En las regiones tropicales, las infecciones ocurren a lo largo de todo el año. En Estados Unidos, Europa, Asia, Corea del Sur y Japón, el número de casos se incrementa en los meses más fríos del invierno, mientras que en África el riesgo de infección aumenta en la temporada seca (Operario *et al.*, 2017; Sadiq *et al.*, 2018). En el caso del Perú, también se ha observado un comportamiento estacional con incrementos en el número de casos en las temporadas de invierno y primavera, que corresponde a los meses desde agosto hasta diciembre (MINSa, 2022).

Las vacunas contra RV han demostrado ser una herramienta eficaz y han logrado reducir la carga de la enfermedad en todo el mundo, principalmente en los países en vías de desarrollo. El resultado de múltiples ensayos clínicos, realizados en Asia y África, permitió identificar a dos vacunas, Rotarix y RotaTeq, capaces de reducir hasta el 85% de la carga de la infección por RV en países de ingresos altos y medios. Asimismo, ambas vacunas han demostrado ser eficaces frente a diferentes genotipos. Sin embargo, estas vacunas no lograron cambiar la variación en los genotipos debido a la presión selectiva (Sadiq *et al.*, 2018).

A partir de las recomendaciones de la Organización Mundial de la Salud, se han implementado diversos programas de inmunización en infantes de todo el mundo, con

mayor énfasis en países en vías de desarrollo. Como resultado, las autoridades sanitarias de 86 países han autorizado la vacunación contra RV y se ha alcanzado un nivel de vacunación mundial del 44%. El grado de protección de la vacuna en países desarrollados es del 72% al 98% en comparación con el 42% al 63% en los países en vías de desarrollo de Asia y África. Aunque se desconocen los factores exactos que expliquen esta menor eficacia, se sospecha de la interferencia de los anticuerpos maternos frente a las cepas vacunales, las coinfecciones de diferentes genotipos de RV y de otros enteropatógenos, la deficiencia nutricional y la disbiosis de la microbiota intestinal (Operario *et al.*, 2017; Sadiq *et al.*, 2018). Asimismo, es importante considerar que la menor eficacia de las vacunaciones en países en vías de desarrollo podría deberse a la circulación simultánea de una gran variedad de genotipos que no están considerados dentro de la protección de las vacunas (Operario *et al.*, 2017).

En el Perú, el porcentaje de cobertura de vacunación en niños menores de un año de edad es del 45.5% (2022). Además, el Centro Nacional de Epidemiología, Prevención y Control de Enfermedades reportó en el 2022 que el 60.9% de los casos confirmados para RV tenían dos dosis de la vacuna, 8% sólo tenía una dosis y el 31.1% no tenía registro de vacunación. Esto hace sospechar que la protección proporcionada por las vacunas no abarca los genotipos que circulan en el territorio nacional. En este sentido, la vigilancia epidemiológica es clave para determinar la eficacia de los programas de vacunación frente a diferentes genotipos, así como para comprender la variación genética, evolución y cambios temporales y geográficos de los genotipos circulantes de RV (MINSA, 2022).

La transmisión viral entre diferentes especies hospedadoras es un mecanismo importante de evolución y aporta a la diversidad genética de RV. Los análisis filogenéticos y la presencia de genotipos de RVA de animales en humanos sugieren una potencial transmisión zoonótica. La posible transmisión zoonótica es particularmente relevante en países en vías de desarrollo donde existe una mayor exposición a los animales domésticos y silvestres y el acceso a servicios básicos, como agua potable y alcantarillado, son limitados (Rojas *et al.*, 2019). Se presume que el RVA animal es capaz de cruzar las barreras entre especies pero no puede infectar o diseminarse adecuadamente en el nuevo hospedador. No obstante, si los genotipos de RVA logran acoplar segmentos genéticos de origen humano a su genoma, podrían aumentar sus posibilidades de infectar eficazmente a los humanos (Silva-Sales *et al.*, 2020).

2.2.3. Norovirus:

NoV es una importante amenaza para la salud pública global porque es una de las principales causas de casos esporádicos y brotes de gastroenteritis aguda en todos los grupos de edad. Estos brotes se registran frecuentemente en ambientes cerrados, como hospitales, centros de atención a infantes y ancianos, escuelas, cruceros y cárceles. NoV ocasiona aproximadamente más de 699 millones de infectados y 212 000 muertes en todo el mundo cada año (Fumian *et al.*, 2019). La mayoría de estas muertes ocurren en países en vías de desarrollo y la población más afectada está representada por niños menores de cinco años de edad, ancianos e individuos inmunosuprimidos con condiciones médicas preexistentes. Las manifestaciones clínicas son muy similares a la infección por RV, aunque usualmente los cuadros diarreicos por NoV son menos severos y de menor duración (dos a tres días). Además, se observan vómitos, fiebre, dolor abdominal y deshidratación en diferentes niveles (Mans, 2019).

Se ha reportado que los genogrupos GGI, GGII y GGIV infectan a humanos, y el GGII se detecta con mayor frecuencia en los estudios de vigilancia epidemiológica clínica en todo el mundo. NoV GGI ocasiona frecuentemente infecciones leves o asintomáticas, mientras que NoV GGIV es más difícil detectar en muestras clínicas y aún se desconocen sus mecanismos de transmisión y mutación (Huang *et al.*, 2022). Por otra parte, se ha identificado que sólo el genotipo GGII.4 ha sido la causa más prevalente de infecciones a nivel mundial. El genotipo GGII.4 evidencia una evolución similar a la del virus de la influenza estacional, lo que resulta en el reemplazo de la variante dominante cada 2 a 5 años. Hasta la fecha, han surgido por lo menos seis variantes mutantes del genotipo GGII.4, que debido a su diversidad genética y complejidad evolutiva, han causado pandemias en los últimos 20 años (Fumian *et al.*, 2019; Huang *et al.*, 2022). La variante pandémica más reciente es Sídney 2012 y ha estado circulando en la población desde su aparición en el año 2012. También se ha notificado un genotipo poco común, GGII.17 (variante Kawasaki 2015), que surgió en China y se extendió a otros países del sudeste asiático, ocasionando un mayor número de casos de gastroenteritis aguda en esta región. El genotipo GGII.17 también se ha detectado ocasionalmente fuera de Asia, como en países de América, Europa y Oceanía (Fumian *et al.*, 2019). Revisiones sistemáticas han informado sobre prevalencias de NoV en varias regiones geográficas, como América

Latina (15%), China (19.8%), Medio Oriente (15.3%) y África del Norte (15.3%) (Mans, 2019).

Un estudio de cohorte evaluó la etiología de la diarrea en niños menores de dos años de edad procedentes de ocho regiones de bajos recursos. Se encontró que la diarrea viral era más frecuente que la diarrea bacteriana y que NoV era uno de los principales enteropatógenos involucrados (Platts-Mills *et al.*, 2015). En otro trabajo realizado en 16 países y que evaluó molecularmente 878 muestras diarreicas de niños menores de cinco años, identificó a NoV GGII como el tercer enteropatógeno más frecuente (Operario *et al.*, 2017). Además, se ha informado que el 73.5% casos donde se detectó a NoV correspondieron a infecciones únicas, mientras que 26.5% fueron coinfecciones. De estas, la mayoría fueron causadas en conjunto por NoV y RV (Mans, 2019).

En el Perú, una investigación llevada a cabo en una zona periurbana de Lima estimó que al menos el 80% y el 71% de los niños menores de uno y dos años de edad evaluados experimentaron un cuadro de gastroenteritis aguda asociado a NoV, respectivamente. Además, se encontró que la excreción fecal de NoV GGII se extendió hasta los 34.5 días en comparación a los 8.5 días del NoV GGI (Saito *et al.*, 2014). Por otra parte, una investigación identificó un brote de 13 casos de gastroenteritis aguda por NoV GGII en un centro de instrucción militar. Las evidencias epidemiológicas sugirieron que NoV GGII fue propagado de persona a persona por el hecho de haber compartido la misma habitación. Asimismo, se identificaron 164 casos sospechosos (Ramos *et al.*, 2015).

2.2.4. Adenovirus humano:

La infección por HAdV es autolimitante y rara vez causa una enfermedad grave o fatal en personas inmunocompetentes. No obstante, se ha observado que la infección puede ocasionar un cuadro grave o fatal en recién nacidos, ancianos y personas inmunocomprometidas. La mayoría de las infecciones se mantienen asintomáticas y la excreción de partículas virales puede persistir durante semanas o meses (Lynch and Kajon, 2016). El periodo de incubación oscila entre 2 a 14 días y el espectro de la enfermedad clínica es amplio e incluye gastroenteritis aguda, fiebre, rinorrea, tos, faringitis, bronquitis, neumonía, disnea, conjuntivitis, cistitis hemorrágica aguda, meningoencefalitis y, ocasionalmente, se puede desarrollar una infección generalizada

potencialmente mortal. De hecho, la infección generalizada o las neumonías graves no tratadas pueden alcanzar una tasa de mortalidad superior al 50% (Dey *et al.*, 2011).

Los serotipos HAdV-40 y HAdV-41, del subgrupo F, ocurren en cualquier época del año y son detectados frecuentemente en niños menores de dos años de edad con cuadros de gastroenteritis aguda, y representan del 1% hasta 31% de todos los casos de diarreas en niños. Las diarreas pueden persistir por 12.2 días y suelen estar acompañadas por una ligera deshidratación (Dey *et al.*, 2011; Kim *et al.*, 2017).

HAdV representa el 8% y 3% de las infecciones respiratorias pediátricas y en adultos, respectivamente, y los signos clínicos gastrointestinales pueden estar presentes de manera concomitante. Los brotes de enfermedades respiratorias agudas ocasionadas por HAdV suelen ocurrir en ambientes cerrados o hacinados, particularmente en viviendas comunitarias, hogares de ancianos, guarderías y centros de instrucción militar. Las fuerzas armadas de Estados Unidos utilizan de forma rutinaria vacunas orales en los reclutas. Estas vacunas han logrado reducir el riesgo de infección respiratoria por HAdV, sin embargo, su aplicación a la población civil está restringida (Lynch y Kajon, 2016).

En el Perú, sólo existe un estudio a gran escala que evaluó las características de las manifestaciones clínicas, filogenéticas y epidemiológicas de sujetos infectados por HAdV en 38 hospitales de 11 regiones desde el 2000 hasta el 2010. Las infecciones por HAdV representaron el 2.5% y 6.2% de todos los individuos analizados y de las infecciones diagnosticadas, respectivamente. También se observó que los pacientes infectados por HAdV presentaban frecuentemente fiebre, dolor de cabeza, tos, rinorrea, dolor de garganta y malestar general. La genotipificación del gen hexon identificó como predominante al subgrupo C (75.7%), seguido por los subgrupos B y E (Ampuero *et al.*, 2012).

2.3. Epidemiología Basada en Aguas Residuales

2.3.1. Generalidades:

En los últimos 20 años, la ciencia ambiental ha desarrollado una amplia variedad de herramientas de vigilancia epidemiológica capaces de estimar las actividades colectivas o el estado de salud de poblaciones enteras. Una de estas herramientas es la Epidemiología Basada en Aguas Residuales (WBE, por sus siglas en inglés: Wastewater Based Epidemiology). La WBE es una herramienta no invasiva que permite obtener

información biológica (circulación de microorganismos patógenos) o química (consumo de medicamentos o de drogas ilícitas), a partir del monitoreo de las aguas residuales, y relacionarla al estado de salud y estilo de vida de la comunidad (Daughton, 2020).

La conceptualización de la WBE se realizó por primera vez en el libro titulado “Productos Farmacéuticos y de Cuidado Personal en el Medio Ambiente: Cuestiones Científicas y Reglamentarias” y fue concebida por Christian G. Daughton, quien planteo la hipótesis de que el análisis de los residuos de productos farmacéuticos en las aguas residuales podría reflejar su consumo en la población (Daughton, 2001). Esta hipótesis se materializó por primera vez en un estudio realizado en Italia, en donde se observó que las concentraciones del principal metabolito urinario de la cocaína, la benzoilecgonina, tanto en las aguas residuales como en las aguas superficiales superaron ampliamente el consumo poblacional registrado en los informes oficiales (Zuccato *et al.*, 2005). Sin embargo, en el Perú ya existía un estudio que aplicó monitoreo periódico de las aguas residuales durante cuatro años (1993-1996) para anticipar brotes de cólera en la ciudad de Lima (Madico *et al.*, 1996).

Posteriormente, diversos trabajos de investigación, en conjunto con iniciativas internacionales, aplicaron exitosamente la WBE en el monitoreo a largo plazo del consumo de drogas ilegales, como cocaína, heroína y anfetaminas. El monitoreo también se extendió a biomarcadores endógenos relacionados al estilo de vida, como el consumo de alcohol, tabaco y sustancias psicoactivas. En otros estudios se evaluó el estado de salud poblacional a través de la identificación de biomarcadores de estrés oxidativo y compuestos químicos. Las aguas residuales revelaron la presencia de metabolitos relacionados a productos químicos de uso cotidiano capaces de alterar la regulación hormonal, como pesticidas, plastificantes y protectores solares. Además, se observó una alarmante exposición poblacional a carcinogénicos ligados al tabaco y micotoxinas (Sims y Kasprzyk-Hordern, 2020)

La WBE presenta importantes ventajas sobre los enfoques tradicionales de salud pública. La evaluación sistemática de las aguas residuales permite detectar, casi en tiempo real, cambios mínimos en las tendencias espaciales y temporales de microorganismos patógenos o productos químicos. La identificación temprana de estos cambios podría ser utilizada como una herramienta para alertar a la población y orientar las intervenciones de las autoridades sanitarias en salud pública. Además, la WBE es un excelente

complemento de las estadísticas epidemiológicas, principalmente en aquellos lugares donde existen limitaciones logísticas y económicas (Sims y Kasprzyk-Hordern, 2020; Daughton, 2020).

2.3.2. WBE en el monitoreo de microorganismos patógenos humanos:

Las aguas residuales representan una importante fuente para detectar y cuantificar la diversidad genética de los microorganismos patógenos que circulan en la población humana. Por esta razón, una importante proporción de investigaciones se han orientado en monitorear a los principales virus patógenos debido a sus altas tasas de mutación y su capacidad para adaptarse a nuevos hospedadores, incluyendo los humanos (Sims y Kasprzyk-Hordern, 2020). Debido a que los virus no son capaces de completar su ciclo de replicación fuera del hospedador y pueden permanecer estables en el medio ambiente durante periodos de tiempo prolongados, la WBE se puede aplicar para estimar, con mayor precisión, la proporción de infectados en la población. Los virus pueden ingresar a las aguas residuales a través de múltiples rutas, como las heces, orina, saliva, piel y sangre. Esto abre la posibilidad de utilizar las aguas residuales para monitorear a virus no entéricos, como coronavirus, influenza, herpesvirus, zika, fiebre amarilla, dengue, entre otros (McCall *et al.*, 2020).

La vigilancia epidemiológica de la poliomielitis a partir de las aguas residuales se ha realizado desde la década de 1980, muchos años antes de la definición de la WBE (Sims y Kasprzyk-Hordern, 2020). La Organización Mundial de la Salud implementó la WBE como método complementario de la “Iniciativa de Erradicación Global de la Poliomielitis”. Este hecho ha permitido establecer un sistema de vigilancia sensible, complementar las estadísticas epidemiológicas clínicas y alertar sobre la ocurrencia de brotes, principalmente en los países endémicos, como Pakistán, India y Nigeria. Incluso, la WBE ha facilitado identificar cepas muy raras de poliovirus derivadas de las vacunas orales en regiones con una deficiente cobertura de vacunación. Este hecho ha demostrado que la combinación de la vigilancia epidemiológica clínica y ambiental puede alcanzar resultados satisfactorios (Asghar *et al.*, 2014).

Por otra parte, durante la pandemia del virus de la influenza AH1N1 no fue posible detectar a este virus en las aguas residuales (Sims y Kasprzyk-Hordern, 2020). Un estudio realizado en Oxfordshire, Reino Unido, evaluó la tasa de cumplimiento del tratamiento con

oseltamivir en pacientes infectados con el virus de la influenza AH1N1 durante la pandemia (2009-2010). El análisis de las aguas residuales logró detectar al carboxilato de oseltamivir, el metabolito activo del oseltamivir, y se estimó una tasa de cumplimiento del 45-60% (Singer *et al.*, 2013). No fue posible detectar al virus de la influenza AH1N1 en las aguas residuales de los Países Bajos (Sims y Kasprzyk-Hordern, 2020).

2.3.2.1. Virus del Síndrome respiratorio agudo severo coronavirus 2:

Una de las herramientas de mayor importancia en la contención y mitigación de una emergencia sanitaria mundial, aparte de las medidas profilácticas y los tratamientos terapéuticos, es contar con la capacidad de identificar rápidamente la distribución y la magnitud de las poblaciones infectadas (Daughton, 2020). Al inicio de la pandemia de la COVID-19, las autoridades sanitarias de la mayoría de los países aplicaron masivamente pruebas de diagnóstico clínico individual con el objetivo de determinar la prevalencia del SARS-CoV-2 en la población (Rusiñol *et al.*, 2021; Guerrero-Latorre *et al.*, 2022). Sin embargo, la vigilancia epidemiológica clínica no es un enfoque aplicable a nivel comunitario y es económicamente insostenible a largo plazo para la mayoría de los países por el hecho que requiere una elevada inversión de dinero, tiempo y recursos humanos y, además, representa un elevado riesgo de contagio para el personal médico que lo administra (Polo *et al.*, 2020; Tandukar *et al.*, 2022). Además, la elevada demanda de insumos médicos junto a la limitada capacidad productiva de los proveedores ocasionó rápidamente la escasez de pruebas clínicas. Como consecuencia, sólo fue posible analizar a aquellas personas con manifestaciones clínicas compatibles con la COVID-19, lo que ocasionó un considerable subregistro del número de casos reportados en la población (Rusiñol *et al.*, 2021). Todos estos hechos exacerbaron la crisis sanitaria mundial y demostraron la necesidad de contar con una herramienta que permita una vigilancia epidemiológica a nivel comunitaria de forma rápida y económica (Daughton, 2020).

Con el transcurso de la pandemia, muchos estudios reportaron la presencia del ARN del SARS-CoV-2 en muestras fecales de personas infectadas (Wölfel *et al.*, 2020; Tang *et al.*, 2020) y en las aguas residuales de las comunidades afectadas en varios países (Aguiar-Oliveira *et al.*, 2020). Estos hallazgos evidenciaron la posibilidad de utilizar las aguas residuales como una herramienta de vigilancia epidemiológica para estimar, casi en tiempo real, la propagación y las tendencias del SARS-CoV-2 a escala poblacional a través de la WBE (Kitajima *et al.*, 2020; Polo *et al.*, 2020). La aplicación de la WBE en

la pandemia logró importantes resultados que permitieron anticipar el aumento de casos clínicos de COVID-19 (Medema *et al.*, 2020; Claro *et al.*, 2021; Rusiñol *et al.*, 2021), evaluar el efecto de las intervenciones de las autoridades sanitarias en la salud pública (Prado *et al.*, 2021; Wurtzer *et al.*, 2022), complementar la vigilancia epidemiológica clínica (Peccia *et al.*, 2020) e identificar a individuos asintomáticos, paucisintomáticos y presintomáticos (Wu *et al.*, 2020).

2.3.2.1.1. Sudamérica:

En Sudamérica, la primera detección del SARS-CoV-2 en las aguas residuales se reportó el 15 de abril del 2020 en Río de Janeiro, Brasil (Prado *et al.*, 2020). Sin embargo, un estudio en Florianópolis, Brasil, reveló la presencia del SARS-CoV-2 en muestras de aguas residuales de noviembre del 2019, antes del reporte oficial de los primeros casos de COVID-19 en la región (Fongaro *et al.*, 2021). Posteriormente, los estudios realizados en Sao Paulo y Río de Janeiro demostraron que el monitoreo del SARS-CoV-2 en las aguas residuales era una excelente herramienta de vigilancia epidemiológica capaz de anticipar, hasta en dos semanas, un brote de COVID-19 en la comunidad y orientar las intervenciones de las autoridades sanitarias en la salud pública (Prado *et al.*, 2021; Claro *et al.*, 2021).

En Chile, se detectó por primera vez al SARS-CoV-2 en mayo del 2020 en las aguas residuales de dos plantas de tratamiento, encargadas de procesar el 85% de las aguas residuales generadas en Santiago (Ampuero *et al.*, 2020). Además, la evaluación de las aguas residuales de regiones rurales permitió la detección de la variante Ómicron del SARS-CoV-2 antes de la notificación oficial por la autoridad sanitaria local (Plaza-Garrido *et al.*, 2023).

En Argentina, diferentes trabajos realizados en Buenos Aires, Mendoza y Córdoba han descrito como las concentraciones del SARS-CoV-2 en las aguas residuales han reflejado el aumento exponencial y la disminución del número de casos de COVID-19 reportados en la población (Giraud-Billoud *et al.*, 2021; Barrios *et al.*, 2021; Masachessi *et al.*, 2022).

En el Perú, el Ministerio de Vivienda, Construcción y Saneamiento, bajo el financiamiento de la Cooperación Suiza y a través del “Programa de Apoyo al Fortalecimiento del Sector Agua y Saneamiento del Perú”, implementó un sistema de

monitoreo por ocho meses en Lima Metropolitana y Arequipa Metropolitana para la detección del SARS-CoV-2 en las aguas residuales. En enero del 2022, los resultados del análisis de las aguas residuales revelaron elevadas concentraciones del ARN del SARS-CoV-2 que coincidieron con el desarrollo de la tercera ola de la pandemia de la COVID-19 (Ministerio de Vivienda, Construcción y Saneamiento, 2022).

2.3.2.1.2. Norteamérica:

La primera identificación del SARS-CoV-2 en aguas residuales de Norteamérica fue realizada el 29 de abril del 2020 en Luisiana, Estados Unidos. No obstante, este hallazgo no fue capaz de anticipar el reporte del primer en la región (9 de marzo del 2020) (Sherchan *et al.*, 2020). Una investigación rastreó, a través de la vigilancia del SARS-CoV-2 en lodos de aguas residuales en Connecticut, el aumento y la disminución del número de casos de COVID-19 registrados por la autoridad sanitaria y el número de admisiones hospitalarias por COVID-19. Se observó que los hallazgos en los lodos de aguas residuales anticiparon en 0-2 días los resultados positivos para SARS-CoV-2 en las pruebas clínicas según la fecha de recolección, en 1-4 días la admisión hospitalaria de pacientes con COVID-19 y en 6-8 días los resultados positivos para SARS-CoV-2 en las pruebas clínicas según la fecha de notificación por la autoridad sanitaria (Peccia *et al.*, 2020). En Montana, un estudio indicó que las fluctuaciones en las concentraciones del SARS-CoV-2 en las aguas residuales se producen casi de forma paralela con el inicio de los signos clínicos en pacientes con COVID-19, pero preceden en 2-4 días los resultados de las pruebas clínicas (Nemudryi *et al.*, 2020). En Massachusetts, se indicó que probablemente las estadísticas epidemiológicas subestimaban considerablemente la cantidad de real de casos de COVID-19 en la comunidad. Las elevadas concentraciones del SARS-CoV-2 en las aguas residuales sugirieron valores de prevalencia muy superiores (0.1-5%) a los informados por las autoridad sanitaria (0.026%) (Wu *et al.*, 2020).

2.3.2.1.3. Europa:

En Europa, la primera detección del SARS-CoV-2 en aguas residuales se reportó en un estudio de los Países Bajos, en donde se analizaron las aguas residuales de seis ciudades desde febrero hasta marzo del 2020. Incluso, fue posible anticipar, en seis días, el inicio de la primera ola de la pandemia en la ciudad de Amersfoort (Medema *et al.*,

2020). Además, se detectó al SARS-CoV-2 en las aguas residuales del aeropuerto de Schiphol, Ámsterdam, tan sólo cuatro días después de la identificación de los primeros de casos de COVID-19 en los Países Bajos (27 de febrero del 2020) (Lodder y de Roda Husman, 2020).

En España, un estudio en 10 plantas de tratamiento de aguas residuales de Cataluña indicó que las concentraciones de SARS-CoV-2 representaban una adecuada herramienta predictiva del número de casos de COVID-19 hasta una semana después del muestreo. Además, se sugirió que el monitoreo de las aguas residuales en ciudades pequeñas plantea mayores desafíos porque se requiere una mayor prevalencia, en comparación a las grandes ciudades, para obtener concentraciones del ARN del SARS-CoV-2 por encima del límite de detección (Rusiñol *et al.*, 2021). En Murcia, fue posible identificar al SARS-CoV-2 en las aguas residuales entre 12-16 días antes del inicio de la primera ola en tres municipios con baja prevalencia (Randazzo *et al.*, 2020).

En Francia, se realizó un estudio que monitoreó las aguas residuales de París desde el 5 de marzo del 2020 hasta el 6 de junio del 2021. Las concentraciones del SARS-CoV-2 en las aguas residuales permitieron anticipar en tres días el incremento de casos clínicos en la población y coincidieron estrechamente con la tasa de incidencia, es decir, el número de pacientes recién infectados durante siete días consecutivos. Además, la vigilancia de las aguas residuales permitió apreciar el efecto del confinamiento domiciliario obligatorio aplicado por las autoridades gubernamentales. Los valores del ARN viral cayeron por debajo del límite de detección después de esta medida y, con la posterior flexibilización de las restricciones, se observó un incremento lento y constante en la carga del SARS-CoV-2 en las aguas residuales. También, se detectó a la variante Alfa del SARS-CoV-2 en las aguas residuales antes del inicio de la tercera ola en París (Wurtzer *et al.*, 2022).

En Italia, las variaciones en las concentraciones del SARS-CoV-2 en las aguas residuales de Roma y Milán fueron similares al escenario epidemiológico. Además, fue posible detectar al SARS-CoV-2 en el 50% de las muestras analizadas y tres días después de la primera notificación de un caso de COVID-19 en el país (21 de febrero del 2020) (La Rosa *et al.*, 2020b). Sin embargo, y al igual que el trabajo de Fongaro *et al.* (2021) en Brasil, un estudio reveló la circulación simultánea del SARS-CoV-2 en varias regiones del norte de Italia mucho antes de la declaración oficial de la pandemia de la COVID-19.

La primera detección en las aguas residuales se remonta al 18 de diciembre del 2019 en Milán y Turín y al 29 de enero del 2020 en Bolonia (La Rosa *et al.*, 2021).

En Alemania, el monitoreo simultáneo de nueve plantas de tratamiento de aguas residuales de Westfalia demostró que el comportamiento del SARS-CoV-2 en las aguas residuales coincidió con el número casos nuevos y acumulados de COVID-19. Además, no se obtuvo evidencia de la infectividad de las partículas virales del SARS-CoV-2 aisladas en las aguas residuales (Westhaus *et al.*, 2021). Posteriormente, y en la misma región de Alemania, el monitoreo de las aguas residuales permitió la detección temprana de la variante Ómicron del SARS-CoV-2 antes que esta se volviera la variante dominante en la población (Wilhelm *et al.*, 2022).

En Suecia, la evaluación diaria de las aguas residuales de Gotemburgo reveló que los picos en las concentraciones del SARS-CoV-2 precedieron en 19-21 días a las variaciones en el número de pacientes hospitalizados por COVID-19. Este estudio demostró la importancia de la WBE tanto en la planificación de la atención hospitalaria como en la identificación e intervención rápida contra la propagación local del SARS-CoV-2 (Saguti *et al.*, 2021).

2.3.2.1.4. Asia:

En Japón, el 14 de abril del 2020 se detectó por primera vez la presencia del SARS-CoV-2 en el 20% de las muestras de aguas residuales tratadas de una región con baja prevalencia. Este hecho reveló que, probablemente, los sistemas de tratamiento de aguas residuales convencionales no son capaces de eliminar por completo las partículas virales o el material genético del SARS-CoV-2 (Haramoto *et al.*, 2020). En otro estudio, se detectó de forma consistente al SARS-CoV-2 en el 47% de las muestras de aguas residuales no tratadas, incluso cuando la frecuencia era inferior a 1 caso de COVID-19 por cada 100 000 habitantes (Hata *et al.*, 2021).

En China, un conjunto de estudios se centraron en investigar las aguas residuales de hospitales y ambientes relacionados. En Wuhan, la evaluación de tres hospitales, designados para pacientes con COVID-19, reveló la presencia del ARN del SARS-CoV-2 en muestras de aerosoles y de suelos circundantes al área de tratamiento de aguas residuales (Zhang *et al.*, 2021). Además, el análisis de los pozos sépticos hospitalarios después de la desinfección con hipoclorito de sodio demostró concentraciones de SARS-

COV-2 sorprendentemente altas. Esto sugiere que las estrategias actuales de desinfección recomendadas por la Organización Mundial de la Salud y las autoridades sanitarias locales deben de reevaluarse con el objetivo de identificar un protocolo que elimine eficazmente al SARS-CoV-2. Las aguas residuales mostraron resultados negativos cuando se sobredosificaron con hipoclorito de sodio. Sin embargo, esta estrategia representa un riesgo para el medio ambiente (Zhang *et al.*, 2020).

En India, la primera detección de SARS-CoV-2 se produjo en una planta de tratamiento responsable de recibir las aguas residuales generadas por uno de los principales hospitales encargados de atender a pacientes con COVID-19. La detección ocurrió el 8 de marzo del 2020 y coincidió con el aumento de casos de COVID-19 en la ciudad (Kumar *et al.*, 2020).

2.3.2.1.5. Oceanía:

En Oceanía, el primer reporte del SARS-CoV-2 en aguas residuales se produjo el 27 de marzo del 2020 en Queensland, Australia. A partir de las concentraciones detectadas en las aguas residuales, fue posible estimar un rango de personas infectadas en la región, lo que coincidió razonablemente con las estadísticas epidemiológicas (Ahmed *et al.*, 2020a). En Australia, se detectó al SARS-CoV-2 en muestras de aguas residuales de tres plantas de tratamiento en Brisbane hasta tres semanas antes del reporte del primer caso clínico de COVID-19. También se observó que la mayor cantidad de muestras positivas coincidió con el periodo de mayor registro de casos clínicos (Ahmed *et al.*, 2021).

2.3.2.2. Rotavirus:

RV es uno de los virus que más se ha investigado en las aguas residuales debido a su relevancia epidemiológica e impacto en la salud pública global. RV es muy estable y resistente a diferentes métodos de tratamiento de aguas residuales. Esto le permite persistir en el medio ambiente por extensos periodos de tiempo sirviendo como una constante fuente de infección para humanos y animales (Rojas *et al.*, 2019; Silva-Sales *et al.*, 2020).

La mayoría de los estudios ambientales resaltan las altas cantidades de RV en las aguas residuales, lo que sugiere su constante circulación y diseminación en la población. Un estudio retrospectivo, realizado en Argentina, indicó que las fluctuaciones en las

concentraciones de RV en las aguas residuales siguió un comportamiento similar al patrón epidemiológico local de los niños con gastroenteritis aguda por RV (Barril *et al.*, 2015). En una investigación llevada a cabo en Sao Paulo, Brasil, se encontraron concentraciones considerablemente elevadas de RV en las aguas residuales a pesar de los programas nacionales de inmunización. Probablemente, los resultados de las aguas residuales reflejen la susceptibilidad de la población adulta frente a RV o el reducido porcentaje de vacunación en la población, principalmente en las zonas periféricas donde el acceso a los servicios de salud y saneamiento son limitados (Prado *et al.*, 2019). En Cataluña, España, se evaluaron las aguas residuales de tres plantas de tratamiento y las heces de lechones y terneros de granjas aledañas. A pesar que se detectaron elevadas concentración de RV tanto en las aguas residuales como en los animales, el análisis filogenético no estableció una relación entre los genotipos de ambos tipos de muestra (Silva-Sales *et al.*, 2020).

Otros estudios se han centrado en evaluar las aguas residuales tratadas y plantas de tratamiento, debido a la importancia de estas últimas como la barrera sanitaria final frente a la introducción de microorganismos patógenos al medio ambiente (Elmahdy *et al.*, 2020). En Uruguay, Lizasoain *et al.* (2018) también detectaron altas concentraciones de RV en aguas residuales no tratadas y revelaron que el tratamiento de estas con radiación ultravioleta no era suficiente para eliminar por completo al virus. En Egipto, se encontró que el volumen de aguas residuales generadas en la comunidad superaba ampliamente la capacidad de procesamiento de la principal planta de tratamiento de Giza. Por lo tanto, gran parte de las aguas residuales eran descargadas directamente al río Nilo. Además, esta planta de tratamiento sólo aplicaba tratamientos primario y secundario de las aguas residuales y no tratamiento terciario, el cual es necesario para potabilizar el agua y garantizar la eliminación de partículas virales. El análisis de las muestras de las aguas residuales y del río Nilo demostraron elevadas concentraciones de RV (Elmahdy *et al.*, 2020).

2.3.2.3. Norovirus:

En general, los estudios ambientales realizados en diferentes países han arrojado una tasa de detección de NoV en aguas residuales del 82.1%, lo que sugiere una elevada prevalencia del virus en la población (Huang *et al.*, 2022). Un trabajo llevado a cabo en regiones rurales de Chile, encontró NoV GGI y NoV GGII en plantas de tratamiento de aguas residuales. Además, se demostró que algunos sistemas de tratamiento de aguas

residuales no son capaces de eliminar por completo a NoV e incluso favorecen la acumulación viral en las aguas residuales tratadas (Plaza-Garrido *et al.*, 2023). En Río de Janeiro, Brasil, un estudio evaluó la concentración y diversidad de NoV en aguas residuales y muestras fecales de pacientes con gastroenteritis aguda. Se detectaron elevadas concentraciones de NoV GGI y NoV GGII en el 26.9% y 66% de las muestras de aguas residuales, respectivamente. El análisis de las aguas residuales por Secuenciamiento de Nueva Generación determinó la presencia de 13 genotipos, siendo el más prevalente el genotipo pandémico GGII.4 seguido por el GGII.17. El 27.5% de las muestras fecales analizadas fueron positivas a NoV. NoV GGII se detectó 86.2% de las muestras positivas, mientras que NoV GGI sólo en 10.3%. El Secuenciamiento de Nueva Generación reveló la presencia del genotipo GGII.4 en el 71% de muestras genotipadas (Fumian *et al.*, 2019). Por otra parte, el monitoreo de NoV GGII en las aguas residuales en dos estudios realizados en Gotemburgo, Suecia, permitió anticipar, entre dos a cuatro semanas, el incremento del número de casos de gastroenteritis aguda (Hellmér *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2020). En investigaciones anteriores, se ha observado que las concentraciones de NoV GGII se correlacionaron positivamente con el número de casos de gastroenteritis aguda registrados en la población (Huang *et al.*, 2022). Este hecho es respaldado por la vigilancia molecular de NoroNet, una red europea conformada por virólogos y epidemiólogos, que indicó que NoV GGII fue responsable del 91.7% de todos los brotes y casos esporádicos de NoV entre 2005 y 2016 en Europa (van Beek *et al.*, 2018).

Es importante resaltar que algunas investigaciones indican una reducida tasa de detección de NoV en aguas residuales de países en vías de desarrollo que reportan una elevada mortalidad por enfermedades diarreicas. Esto debe ser analizado a profundidad y con cautela porque podría revelar a agentes bacterianos o parasitarios como enteropatógenos dominantes en dichas regiones (Huang *et al.*, 2022).

2.3.2.4. Adenovirus humano:

Debido a que los indicadores bacterianos de contaminación fecal no se correlacionan consistentemente con las concentraciones de virus patógenos humanos en las aguas residuales no tratadas y tratadas, cada vez existen más investigaciones que utilizan al HAdV como indicador de contaminación fecal humana. Esto se debe a que la concentración de HAdV en las aguas residuales es elevada, constante y no muestra

variaciones estacionales considerables (Prado *et al.*, 2019; Rusiñol *et al.*, 2021). Además, sus propiedades estructurales y genómicas le proporcionan una mayor resistencia a factores ambientales, como radiación ultravioleta, temperatura y pH, así como a varios procesos de tratamiento físicos y químicos del agua residual (Elmahdy *et al.*, 2020).

HAdV también es utilizado como parámetro para evaluar la eliminación viral de los sistemas de tratamiento de aguas residuales. Un estudio realizado en Sao Paulo, Brasil, encontró HAdV en el 100% y 62.2% de las muestras de aguas residuales no tratadas y tratadas, respectivamente. Además, se observó que HAdV obtuvo una viabilidad de hasta el 44% en las muestras analizadas (Prado *et al.*, 2019). Otro trabajo llevado a cabo en Brasil, demostró que los tratamientos convencionales de las aguas residuales no eran adecuados para eliminar por completo a HAdV (Espinosa *et al.*, 2022). En Uruguay, se obtuvieron resultados similares. Todas las muestras de aguas residuales no tratadas y el 63% de las muestras de aguas residuales tratadas con radiación ultravioleta fueron positivas para HAdV (Lizasoain *et al.*, 2018).

2.4. Métodos de concentración viral:

A nivel mundial, diversas autoridades sanitarias, con el apoyo de grupos de investigación, han implementado la WBE dentro sus programas de vigilancia epidemiológica con el objetivo de monitorear la circulación del SARS-CoV-2 a nivel comunitario. Para ello, es necesario respaldar los resultados del monitoreo periódico de las aguas residuales a través de metodologías complementarias, como el método de concentración viral (Ahmed *et al.*, 2020b; Philo *et al.*, 2021).

El método de concentración representa una etapa muy importante dentro del análisis de las aguas residuales porque permite concentrar las partículas virales en un volumen considerablemente menor y, de esta manera, es posible aumentar los límites de detección y cuantificación del material genético (Salvo *et al.*, 2021). Inicialmente, los métodos de concentración se desarrollaron y estandarizaron para la recuperación de virus entéricos sin envoltura lipídica a partir de diversas matrices ambientales. Sin embargo, y a raíz de la pandemia de la COVID-19, se han utilizado diferentes métodos de concentración en la vigilancia epidemiológica del SARS-CoV-2, un virus con envoltura lipídica, en las aguas residuales. Probablemente, las considerables diferencias estructurales, entre los virus sin y con envoltura lipídica, generen grandes variaciones en la eficacia de recuperación del método de concentración (Ahmed *et al.*, 2020b; Philo *et*

al., 2021). Además, es importante considerar que las particularidades geográficas y poblacionales del lugar en estudio y las características biológicas y químicas de las aguas residuales pueden afectar, en conjunto, el rendimiento del método de concentración y generar resultados muy variables y poco reproducibles (Barril *et al.*, 2021; Jafferli *et al.*, 2021; Salvo *et al.*, 2021). Por lo tanto, antes de implementar la WBE, es imperativo evaluar y comparar diferentes métodos de concentración con la finalidad de identificar la mejor alternativa que permita realizar una evaluación más precisa de la concentración viral en las aguas residuales y desarrollar una vigilancia epidemiológica efectiva del SARS-CoV-2 (La Rosa *et al.*, 2020a).

Con la evidencia de la excreción del SARS-CoV-2 en las heces de personas infectadas y la presencia de ARN viral en las comunidades más afectadas, muchos grupos de investigación intentaron evaluar y comparar la eficacia de recuperación para el SARS-CoV-2 de diferentes métodos de concentración. Sin embargo, las estrictas medidas de bioseguridad requeridas para trabajar con el SARS-CoV-2, bajo condiciones de laboratorio, limitaron las investigaciones relacionadas a la WBE. Frente a esta situación, los grupos de investigación optaron por utilizar virus sustitutos y la selección de estos priorizó las similitudes genéticas y estructurales con el SARS-CoV-2 (Ahmed *et al.*, 2020b; Barril *et al.*, 2021). Dentro de los virus sustitutos seleccionados resaltan los siguientes: virus de la hepatitis murina (Ahmed *et al.*, 2020b), coronavirus bovino (Jafferli *et al.*, 2021; Salvo *et al.*, 2021), coronavirus humano OC43 (Philo *et al.*, 2021), virus de la diarrea epidémica porcina (Randazzo *et al.*, 2020; Pérez-Cataluña *et al.*, 2021), calicivirus felino (Barril *et al.*, 2021), mengovirus (Randazzo *et al.*, 2020; Pérez-Cataluña *et al.*, 2021). No obstante, es importante considerar que el uso virus entéricos sin envoltura lipídica, como sustitutos, podría sobrestimar el rendimiento de recuperación de los virus con envoltura lipídica (Ye *et al.*, 2016).

2.4.1. Floculación con leche desnatada:

La floculación con leche desnatada es un método eficaz en la concentración de virus entéricos sin envoltura lipídica a partir de muestras de agua de diferentes matrices ambientales. Asimismo, permite evaluar las fracciones sólida (materia orgánica) y líquida de las aguas residuales, lo que reduce considerablemente la pérdida de partículas virales relacionadas a la eliminación de la fracción sólida (Philo *et al.*, 2021). Un estudio realizado en aguas residuales de Barcelona, España, informó que la floculación con leche

desnatada alcanzó porcentajes de recuperación del 30-95%, 55-90% y 45-90% para adenovirus humano (HAdV), poliomavirus JC (JCPyV) y norovirus genogrupo II (NoV GGII), respectivamente (Calgua *et al.*, 2013). Por otra parte, la floculación con leche desnatada ha demostrado ser un método económico, reproducible bajo diferentes contextos, fácil de estandarizar en los laboratorios y no requiere equipos ni personal especializado (Calgua *et al.*, 2008; Calgua *et al.*, 2013).

Frente a la pandemia de la COVID-19, se ha evaluado el rendimiento de la floculación con leche desnatada en la recuperación del SARS-CoV-2 en las aguas residuales. Un estudio realizado en Seattle, Estado Unidos, demostró que la floculación con leche desnatada, en comparación con la ultrafiltración y la precipitación con polietilenglicol, obtuvo el mayor porcentaje de recuperación (aproximadamente del 6%) y la mayor frecuencia de detección del SARS-CoV-2 (48.8% de las muestras analizadas) en las aguas residuales (Philo *et al.*, 2021). En otro estudio, llevado a cabo en Uruguay, se obtuvieron resultados similares. La floculación con leche desnatada alcanzó una eficacia de recuperación de aproximadamente el 5%. Sin embargo, en este trabajo se evaluó al coronavirus bovino (BCoV) como sustituto del SARS-CoV-2 (Salvo *et al.*, 2021). Los resultados de ambos estudios evidenciaron un rendimiento considerablemente menor que el descrito para virus entéricos sin envoltura lipídica (Calgua *et al.*, 2013). Esto podría deberse a la acidificación de la muestra de agua residual durante la floculación con leche desnatada. Se ha informado que la acidificación es capaz de alterar la integridad estructural y la viabilidad viral. Por ende, y a diferencia de los virus sin envoltura lipídica, los coronavirus podrían exponer una mayor susceptibilidad a un pH bajo, lo que evitaría una absorción efectiva de las partículas virales hacia los flóculos de leche. Como consecuencia, se reduciría la eficacia de recuperación de la floculación con leche desnatada (Ahmed *et al.*, 2020b).

2.4.2. Floculación con hidróxido de aluminio:

La floculación con hidróxido de aluminio es un método sencillo, rápido y no necesita equipos ni personal especializado. Aunque permite la concentración de las partículas virales de las fracciones sólida y líquida del agua residual, esto aumenta el riesgo de co-concentrar sustancias inhibitorias que pueden dificultar o interferir en la identificación molecular (Randazzo *et al.*, 2020; Barril *et al.*, 2021).

La floculación con hidróxido de aluminio se ha aplicado exitosamente en la concentración de diferentes virus patógenos humanos en aguas residuales, como rotavirus (RV), NoV, virus de la hepatitis A (HAV), virus de la hepatitis E (HEV) y astrovirus (HAstV) (Cuevas-Ferrando *et al.*, 2019; Randazzo *et al.*, 2019). Además, y al igual que otros métodos de concentración, se ha evaluado su rendimiento en la recuperación de virus sustitutos del SARS-CoV-2. En Murcia, España, un estudio determinó rendimientos de recuperación del 11.0% para mengovirus (MgV) y virus de la diarrea epidémica porcina (PEDV), ambos inoculados en muestras de aguas residuales (Randazzo *et al.*, 2020). Otro trabajo realizado en España, informó el mismo porcentaje de recuperación para MgV, pero el rendimiento para PEDV fue considerablemente mayor (73.0%) (Pérez-Cataluña *et al.*, 2021). En Neuquén, Argentina, un estudio identificó a la floculación con hidróxido de aluminio como uno de los métodos de concentración con el mayor rendimiento de recuperación (45.0%) para el calicivirus felino (FCV) (Barril *et al.*, 2021). No obstante, la interpretación de los resultados de estos estudios se debe realizar con cautela y considerar que las particularidades de cada virus es un factor determinante en la eficacia de recuperación del método de concentración (Ye *et al.*, 2016).

2.4.3. Ultrafiltración:

La ultrafiltración es un método que permite la concentración de las partículas virales por exclusión de tamaño. Para ello, se utilizan diferentes dispositivos de ultrafiltración que presentan membranas formadas por poros con un determinado diámetro. La centrifugación de la muestra de agua residual facilita la retención de las moléculas de mayor tamaño en la cámara de concentración, mientras que las moléculas de menor tamaño atraviesan las membranas de filtración. Dentro de las ventajas de la ultrafiltración, se pueden incluir la rapidez del procesamiento de la muestra y no requiere equipos ni personal especializado. Sin embargo, este método presenta inconvenientes que limitan su aplicación, como el elevado costo y la disponibilidad limitada de los dispositivos (Ahmed *et al.*, 2020b). Además, la eliminación de la fracción sólida de las aguas residuales durante la etapa de pre-centrifugación y la co-concentración de sustancias inhibitorias puede interferir o reducir la detección y cuantificación viral (Ye *et al.*, 2016; Ahmed *et al.*, 2020b).

La ultrafiltración se ha utilizado anteriormente en la evaluación de NoV y HAdV como indicadores de contaminación fecal humana (Symonds *et al.*, 2009) y, durante la

pandemia de la COVID-19, fue uno de los métodos que se utilizó con mayor frecuencia en la vigilancia epidemiológica del SARS-CoV-2 en aguas residuales. Sin embargo, diversos estudios han evidenciado resultados muy variables, lo que sugiere que la eficacia de recuperación depende mucho del diseño del dispositivo. En Australia, se ha reportado un porcentaje de recuperación, utilizando el dispositivo Amicon® Ultra-15, de hasta el 56.0% para el virus de la hepatitis murina (MHV) inoculado en muestras de aguas residuales y utilizado como sustituto del SARS-CoV-2 (Ahmed *et al.*, 2020b). En contraste, los estudios realizados por Philo *et al.* (2021) y Jafferli *et al.* (2021) informaron rendimientos de recuperación del 1.0% para el coronavirus humano OC43 con el dispositivo Centricon Plus-70 y del 10.0% para el coronavirus bovino utilizando el dispositivo Sartorius 10 KDa, respectivamente. Incluso, un trabajo en Argentina no fue capaz de concentrar al calicivirus felino por ultrafiltración con el dispositivo Centriprep YM-50 (Barril *et al.*, 2021).

2.4.4. Ultracentrifugación:

Al igual que los métodos anteriores, la ultracentrifugación se ha utilizado en la concentración de virus entéricos sin envoltura lipídica en aguas residuales (Calgua *et al.*, 2013). Por ejemplo, se ha informado una eficacia de recuperación del 34-60% para RV en aguas residuales (Fumian *et al.*, 2010). En el caso de los coronavirus, como el virus de la hepatitis murina, se ha reportado un rendimiento aproximado del 5% (Ye *et al.*, 2016). Durante la pandemia del SARS-CoV-2, un estudio ubicó a la ultracentrifugación en la cuarta posición con un rendimiento de recuperación del 33.5% para el MHV, dentro de la comparación con otros seis métodos de concentración viral (Ahmed *et al.*, 2020b).

La ultracentrifugación necesita de una potente fuerza de gravedad (100 000 g) para lograr sedimentar la mayoría de macromoléculas y partículas virales. Esta característica representa su principal limitación porque requiere de equipos especializados muy costosos que por lo general no se encuentran disponibles en la mayoría de laboratorios de investigación. Dentro de las ventajas, se puede indicar que la ultracentrifugación permite la concentración viral de las fracciones sólida y líquida de las aguas residuales y el costo por procesar cada muestra es relativamente bajo (Ahmed *et al.*, 2020b).

2.4.5. Absorción-extracción con membrana electronegativa:

La absorción-extracción con membrana electronegativa se ha utilizado ampliamente en la recuperación de virus patógenos humanos en diversas matrices ambientales, incluyendo las aguas residuales. De hecho, se ha utilizado frente a la pandemia del SARS-CoV-2 (Ahmed *et al.*, 2020b; Tandukar *et al.*, 2022). Este método es rápido y permite procesar varias muestras a la vez y concentrar las partículas virales de las fracciones sólida y líquida del agua residual. Sin embargo, es necesario tener en cuenta que las membranas electronegativas son costosas y que estas se pueden obstruir en caso que se procesen muestras con una elevada turbidez (Ahmed *et al.*, 2020b).

En un estudio realizado por Ahmed *et al.* (2020b), en donde se utilizó un sustituto al virus de la hepatitis murina, se comparó y evaluó el rendimiento de la absorción-extracción con membrana electronegativa frente a otras metodologías. Asimismo, se analizaron tres variaciones del método: sin tratamiento previo, adición previa de cloruro de magnesio y acidificación de la muestra. La variación del método que requería de la adición previa de cloruro de magnesio logró el mayor rendimiento de recuperación (65.7%), mientras que la variación que no necesitó de ningún tratamiento previo obtuvo la segunda recuperación más alta (60.5%). Se ha informado que la adición de cloruro de magnesio estimula la formación de puentes salinos, lo que favorece la absorción de partículas virales a la membrana electronegativa. Además, algunas investigaciones sugieren que los virus con envoltura lipídica tienen una mayor eficacia de absorción a las membranas electronegativas en comparación a los virus sin envoltura lipídica (Haramoto *et al.*, 2009; Ye *et al.*, 2016). Contradictoriamente, la variación que necesitó acidificar la muestra hasta un pH de 4, produjo el menor rendimiento de recuperación (26.7%). Como se indicó anteriormente para la floculación con leche desnatada, es probable que la acidificación de la muestra altere la integridad de la envoltura lipídica y, por ende, se reduciría el porcentaje de recuperación viral.

2.4.6. Precipitación con polietilenglicol:

La precipitación con polietilenglicol es uno de los métodos que se ha utilizado con mayor frecuencia en la concentración de virus entéricos, como NoV GGII, HAdV y virus de la hepatitis E (Masclaux *et al.*, 2013). De la misma manera, este método se ha aplicado, en sus diferentes variaciones, para la detección del SARS-CoV-2 en aguas residuales (Wu *et al.*, 2020; Zhang *et al.*, 2020) y se ha reportado una eficacia de recuperación del 52.8% (Pérez-Cataluña *et al.*, 2021). La precipitación con polietilenglicol necesita de equipos

básicos de laboratorio, es relativamente barato, permite concentrar las partículas virales de ambas fracciones del agua residual y es capaz de procesar volúmenes elevados de muestra. En relación a sus limitaciones, requiere una elevada inversión de tiempo, manejar reactivos peligrosos y sólo permite analizar una parte del concentrado lo que reduce considerablemente su rendimiento de recuperación (Ahmed *et al.*, 2020b).

La evaluación de la precipitación con polietilenglicol ha arrojado resultados muy variables. Los estudios de Ye *et al.* (2016) y Ahmed *et al.* (2020b) reportaron que los rendimientos de recuperación de la precipitación con polietilenglicol fueron 5% y 44% para el virus de la hepatitis murina, respectivamente. Tal diferencia en los resultados podría deberse a que el primer estudio sólo consideró analizar la fracción líquida del agua residual, mientras que en el segundo se concentró ambas fracciones (Ahmed *et al.*, 2020a). Por su parte, Salvo *et al.* (2021) determinaron que la precipitación con polietilenglicol logró mejores resultados que la floculación con leche desnatada. A pesar que ambos métodos lograron la misma eficacia de recuperación (5%), la precipitación con polietilenglicol demostró una mayor sensibilidad porque fue capaz de concentrar las partículas virales en un mayor volumen de agua residual. Además, una investigación en Argentina ha informado que la precipitación con polietilenglicol obtuvo un rendimiento del 62.2% en la concentración del calicivirus felino y se ubicó entre los más altos dentro de los 11 métodos analizados (Barril *et al.*, 2021).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Lugar de ejecución y periodo de duración:

El trabajo de investigación se realizó en los distritos de Huancayo y El Tambo, ubicados en la provincia de Huancayo, región Junín. Ambos distritos concentran el 65% de la población en la provincia de Huancayo, es decir, 286,352 personas de un total de 438,369 habitantes. La provincia de Huancayo se encuentra a 3200 metros sobre el nivel del mar, presenta un clima templado (5 - 20°C), con escasa humedad relativa (75%) y es considerada una de las principales zonas agrícolas de la Sierra Central del Perú (CENEPRED, 2021). El procesamiento y análisis de las muestras de aguas residuales se realizó en el Laboratorio de Microbiología y Biología Molecular del Instituto Veterinario de Investigaciones Tropicales y de Altura - El Mantaro (IVITA - El Mantaro) ubicado en la provincia de Jauja, región Junín (Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional Mayor de San Marcos). El estudio inició en agosto del 2021 y finalizó en marzo del 2022.

3.2. Descripción del material experimental:

3.2.1. Muestras de aguas residuales:

Se recolectaron un total de 65 muestras de aguas residuales urbanas no tratadas: 32 muestras del distrito de Huancayo y 33 del distrito de El Tambo. Es importante considerar que la provincia de Huancayo carece de una planta de tratamiento de aguas residuales, por lo tanto, las aguas residuales generadas por la población son descargadas, sin ningún tratamiento previo, al río Mantaro. En el Anexo 1 y Anexo 2 se proporcionan

imágenes de los puntos colectores donde se recolectaron las muestras de aguas residuales de los distritos de Huancayo y El Tambo, respectivamente.

3.2.2. Reactivos para el procesamiento de las muestras de aguas residuales:

- **Método de floculación con leche desnatada:** leche desnatada en polvo (Difco, Le Pont de Claix, Francia) 1% (P/V), sal de mar artificial (Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, Estados Unidos), ácido clorhídrico 1N, hidróxido de sodio (1M/4%), tampón de fosfato (1:2, V/V de Na₂HPO₄ 0.2 M y NaH₂PO₄ 0.2 M).
- **Método de ultrafiltración:** dispositivo de ultrafiltración centrífuga Amicon® Ultra-15 de 30 KDa (Merck Millipore Ltd., Irlanda).

3.2.3. Reactivos para la extracción de ácidos nucleicos virales:

MagMAX™ Viral/Pathogen Nucleic Acid Isolation Kit (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, TX, Estados Unidos).

3.2.4. Reactivos para el análisis molecular:

- **PCR en tiempo real con transcripción inversa (RT-qPCR):** RNA UltraSense™ One-Step Quantitative RT-PCR System (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, MD, USA).
- **PCR en tiempo real (qPCR):** TaqMan® Environmental Master Mix 2.0 (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, WA, UK).

3.2.5. Material genético sintético:

- **ADN insertado en plásmido bacteriano (Integrated DNA Technologies, Inc., Coralville, IA, Estados Unidos):**

SARS-CoV-2 (acceso GenBank: MZ393560.1):

Gen de la fosfoproteína de la nucleocápside (N) / Longitud: 1260 pb.

- **ADN sintético gBlocks® (Integrated DNA Technologies, Inc., Coralville, IA, Estados Unidos):**

RV (acceso GenBank: X81436):

Región del gen de la proteína no estructural 3 (NSP3) / Longitud: 147 pb.

ATATGAGTAGTCACATAATTA AAAAATATTAACCATCTACACATGACCC
TCTATGAGCACAATAGTTAAAAGCTAACACTGTCAAAAACCTAAATGG
CTATAGGGGGGTTATGTGACCATCCGCAGAGAGGGGCGGTCTAACCTCA
CCG

NoV GGII (acceso GenBank: AF145896):

Región de unión ORF 1 - ORF 2 / Longitud: 149 pb.

ATGGACTTTTACGTGCCAGACAAGAGCCAATGTTTCAGATGGATGAGA
TTCTCAGATCTGAGCACGTGGGAGGGCGATCGCAATCTGGCTCCCAGT
TTTTGAATGAAGATGGCGTCGAGTGACGCCAACCCATCTGATGGGTCC
GCAG

HAdV (acceso GenBank: J01917.1):

Región del gen Ad hexon / Longitud: 273 pb.

ATGATGCCGCAATGGTCTTACATGCACATCGCCGGGCAGGACGCCTC
GGAGTATCTGAGCCCGGGCACACACACACACCTGGTGCAATTTGCC
GCGCCACCGATACGTACTTCAGCCTGGGGAACAAGTTCAGAAATCCC
GCTGCGATTCGTGCCAGTCGACCGCGAGGACACCGCTTATTCTTACA
AAGTGCGCTTTACGCTGGCCGTGGGCGACAACCGGGTGTGGACATG
GCCAGCACCTACTTTGACATCCGCGGCGTGCTGGATCG

3.2.6. Cebadores y sondas:

➤ SARS-CoV-2 (Center for Disease Control, 2019):

FWD (2019-nCoV_N1): 5'-GACCCCAAATCAGCGAAAT-3'

REV (2019-nCoV_N1): 5'-TCTGGTACTGCCAGTTGAATCTG-3'

PROBE (2019-nCoV_N1): 5'-/56-FAM/ACCCCGCAT/ZEN/TACGTTTGGT
GGACC/3IABkFQ/-3'

FWR (2019-nCoV_N2): 5'-TTACAAACATTGGCCGCAA-3'

REV (2019-nCoV_N2): 5'-GCGCGACATTCCGAAGAA-3'

PROBE (2019-nCoV_N2): 5'-/5SUN/ACAATTTGC/ZEN/CCCCAGCGCTTC
AG/3IABkFQ/ -3'

➤ RV (Zeng *et al.*, 2008):

FWD (NSP3F): 5'-ACCATCTWCACRTRACCCTCTATGAG-3'

REV (NSP3R): 5'-GGTCACATAACGCCCTATAGC-3'

PROBE (NSP3P): 5'-/56-FAM/AGTTAAAAGCTAACACTGTCAAA/3BHQ_1/
-3'

➤ NoV GGII (Loisy *et al.*, 2005):

FWR (QNIF2d): 5'-ATGTTTCAGRTGGATGAGRTTCTCCWGA-3'

REV (COG2R): 5'-TCGACGCCATCTTCATTCACA-3'

PROBE (QNIFS): 5'-/56-FAM/AGCACGTGGGAGGGCGATCG/3BHQ_1/-3'

➤ HAdV (Hernroth *et al.*, 2002):

FWD (AdF): 5'-CWTACATGCACATCKCSG-3'

REV (AdR): 5'-CRCGGGCRAAYTGCA-3'

PROBE (AdP1): 5'-/56-FAM/CCGGGCTCAGGTACTCCGAGGGCGTCCT/3
BH Q_1/-3'

3.2.7. Registro del número de casos clínicos:

Registro diario de los casos de COVID-19 en los distritos de Huancayo y El Tambo. Fuentes:

- Oficina de Epidemiología, Dirección Regional de Salud, Junín (<http://www.diresajunin.gob.pe/documentos/>).
- Centro Nacional de Epidemiología, Prevención y Control de Enfermedades, Ministerio De Salud (https://covid19.minsa.gob.pe/sala_situacional.asp).

Registro semanal de los casos de gastroenteritis aguda en los distritos de Huancayo y El Tambo. Fuente:

- Oficina de Epidemiología, Dirección Regional de Salud, Junín (<http://www.diresajunin.gob.pe/documentos/>).

3.2.8. Herramientas para el análisis de los resultados:

- QuantStudio™ Design & software (Version 1.5.1, Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, USA).
- R Statistical Software (v4.2.2; R Core Team 2022).

3.2.9. Reactivos, materiales y equipos:

El resto de reactivos, materiales y equipos, como termociclador en tiempo real, cabina de bioseguridad nivel 2, fluorómetro, refrigeradora, centrífuga, vórtex, agitador magnético, micropipetas, etc., se encuentran implementados y operativos en las instalaciones del laboratorio.

3.3. Diseño experimental:

3.3.1. Colecta y transporte de las muestras de aguas residuales:

El intervalo y tipo de muestreo se adaptaron a las recomendaciones de la Organización Panamericana de la Salud (OPS, 2021). Se recolectó un total de 65 muestras de aguas residuales cada dos semanas desde septiembre del 2021 hasta diciembre del 2022. La Figura 1 describe el esquema de muestreo para el análisis de SARS-CoV-2, RV, NoV GGII y HAdV, con sus correspondientes métodos de procesamiento, por cada semana epidemiológica en los distritos de Huancayo y El Tambo. Las muestras (1 L) se recolectaron manualmente en botellas de vidrio estériles durante la mañana (09:00 - 11:00 A.M.) en los puntos colectores “Daniel Alcides Carrión” (-12.081751502633644, -75.23348982998229) y “Parra del Riego” (-12.070341768873568, -75.23587667604411), encargados de eliminar todas las aguas residuales generadas en los distritos de Huancayo (119,993 habitantes) y El Tambo (166,359 habitantes), respectivamente. De acuerdo a los mapas oficiales de la autoridad gubernamental, los distritos de Huancayo y El Tambo se encuentran divididos por una falla geológica hídrica. Por esta razón, cada distrito dispone de un sistema de alcantarillado independiente, lo que evita la mezcla de aguas residuales (Figura 2). El personal de muestreo siguió estrictamente el protocolo de bioseguridad recomendado en la “Guía para el análisis y cuantificación de SARS-CoV-2 en las aguas residuales”, y utilizó equipo de protección personal, que incluyó mascarilla facial N95, cofia, protector facial, casco, doble par de guantes, mameluco impermeable y botas de punta de acero (OPS, 2021). Inmediatamente después de la recolección de las muestras, se midieron los principales parámetros físico-químicos de las aguas residuales: pH, temperatura, conductividad eléctrica (CE) y sólidos disueltos totales (SDT). Estas mediciones se realizaron para evaluar el impacto de las condiciones climáticas sobre la carga viral en las aguas residuales. Posteriormente, las muestras fueron transportadas en un contenedor hermético a 4°C hacia el laboratorio. El procesamiento de las muestras inició dentro de las dos horas posteriores a la recolección.

	2021								2022																									
	Ag	Sep			Oct		Nov		Di	Ene			Feb		Mar		Abr		May		Jun		Jul		Ago		Sep		Oct		Nov		Dic	
Semana epidemiológica	37	39	41	43	45	47	49	51	1	3	5	7	9	11	13	15	17	19	21	23	25	27	29	31	33	35	37	39	41	43	45	47	49	
Distrito de Huancayo		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Distrito de El Tambo	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X

50 muestras procesadas por análisis directo para SARS-CoV-2

50 muestras procesadas por floculación con leche desnatada para SARS-CoV-2

46 muestras procesadas por ultrafiltración para SARS-CoV-2

53 muestras analizadas para RV, NoV GGII y HAdV

53 muestras procesadas por floculación con leche desnatada para RV, NoV GGII y HAdV

Figura 1. Esquema de muestreo para el análisis de SARS-CoV-2, rotavirus (RV), norovirus genogrupo II (NoV GGII) y adenovirus humano (HAdV) en las aguas residuales de ambos distritos por cada semana epidemiológica (SE). Las muestras recolectadas desde la SE 1/2022 hasta la SE 49/2022 fueron analizadas y procesadas por análisis directo y floculación con leche desnatada para SARS-CoV-2. Además, las muestras recolectadas entre las SE 5/2022 y 49/2022 también fueron procesadas por ultrafiltración para SARS-CoV-2. Las muestras recolectadas desde la SE 37/2021 hasta la SE 37/2022 fueron analizadas y procesadas por floculación con leche desnatada para RV, NoV GGII y HAdV. El casillero en blanco de la SE 37/2021 representa una muestra que no fue recolectada en el distrito de Huancayo

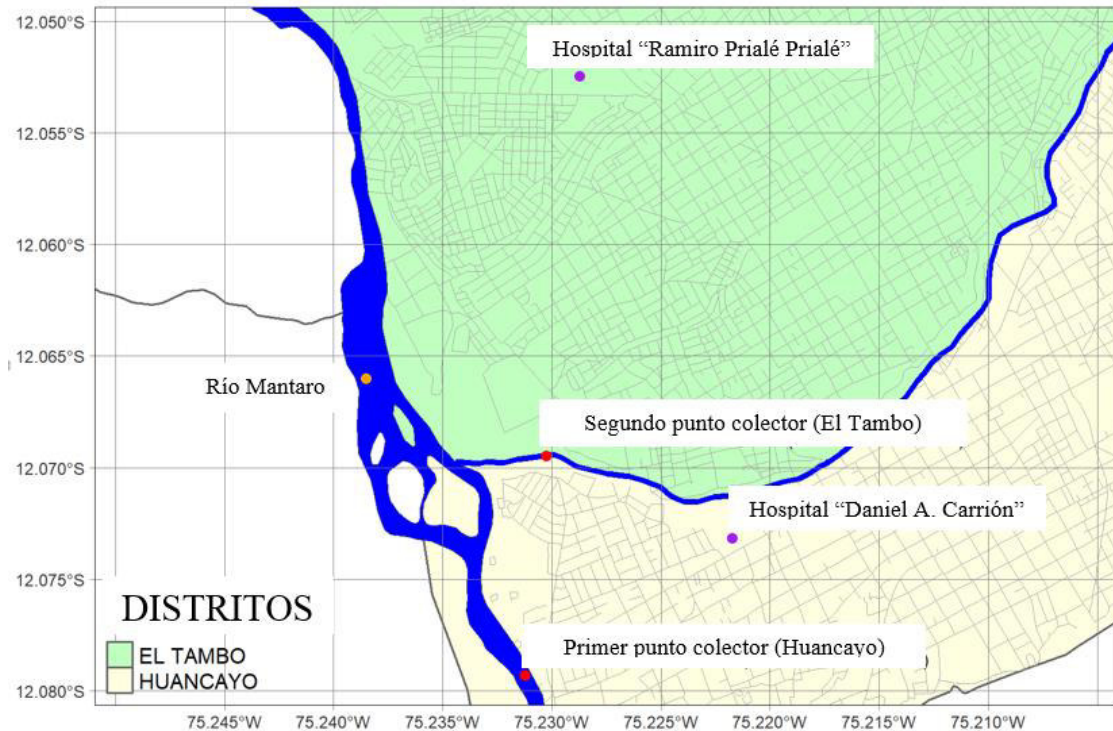


Figura 2. Mapa de los distritos de Huancayo (amarillo pálido) y El Tambo (verde pálido). Además, se muestran los puntos colectores de ambos distritos donde se recolectaron las muestras de aguas residuales, así como el río Mantaro (punto anaranjado) y los dos hospitales (puntos morados) más importantes de la ciudad de Huancayo.

3.3.2. Evaluación de la eficacia de recuperación:

Antes de iniciar el análisis de las muestras de aguas residuales, se evaluó la eficacia de recuperación de cada método de procesamiento a utilizar. Para ello, cuatro muestras de aguas residuales de 200 mL cada una, previamente negativas a SARS-CoV-2 (evaluadas mediante análisis directo, ultrafiltración y floculación con leche desnatada), se inocularon con 400 μ L (equivalente a $2.85E+06$ copias genómicas (CG)) de una muestra de hisopado nasofaríngeo positivo a SARS-CoV-2 y se homogenizaron a 200 rpm durante 30 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, a partir de cada muestra inoculada, se utilizaron 100 mL en el método de floculación con leche desnatada, 50 mL en el método de ultrafiltración y 200 μ L en el análisis directo.

La eficacia de recuperación para SARS-CoV-2 se calculó para cada método de procesamiento y en base a la cuantificación de CG por RT-qPCR a través de la siguiente ecuación:

$$\text{Eficacia de recuperación (\%)} = \frac{\text{Cantidad de CG recuperada}}{\text{Cantidad de CG inoculada}} \times 100$$

Las muestras de hisopado nasofaríngeo positivas a SARS-CoV-2, utilizadas en la evaluación de la eficacia de recuperación, se obtuvieron de otro trabajo de investigación, que contó con la aprobación bajo constancia N° 676-24-21 por el Comité Institucional de Ética en Investigación de la Universidad Peruana Cayetano Heredia.

3.3.3. Elaboración de la curva estándar:

Se elaboró una curva estándar para SARS-CoV-2 a partir de un plásmido bacteriano (Integrated DNA Technologies, Inc., Coralville, IA, Estados Unidos) que contenía las regiones N1 y N2 del gen de la nucleocápside viral. En el caso de RV, NoV GGII y HAdV, se utilizaron productos de ADN sintético gBlocks® (Integrated DNA Technologies, Inc., Coralville, IA, Estados Unidos), que previamente fueron cuantificados a través de un fluorómetro Qubit™ 4 (Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific, USA). La curva estándar de SARS-CoV-2 se elaboró con ocho puntos de registro y las diluciones se realizaron con suspensiones que contenían 2.00+05 CG hasta 2.00-02 CG. Además, las curvas estándar para RV, Nov GGII y HAdV se elaboraron con 12 puntos de registro. Las diluciones se realizaron con suspensiones que contenían desde 5.00E+08 hasta 5.00E-03 CG para RV y NoV GGII, y de 1.00E+09 a 1.00E-02 CG para HAdV. Es importante indicar que cada punto de dilución, para cada curva estándar, tuvo tres réplicas. Finalmente, y después de confirmar el correcto rendimiento de los ensayos de RT-qPCR y qPCR, todas las diluciones se dividieron en alícuotas de 30 µL y se conservaron a -80°C para su posterior uso.

3.3.4. Procesamiento de las muestras de aguas residuales:

3.3.4.1. Análisis directo:

El análisis directo sólo se utilizó para la detección y cuantificación de CG de SARS-CoV-2 en 50 muestras de aguas residuales colectadas desde enero hasta diciembre del 2022 (Figura 1). En cada una de estas muestras sólo se evaluó una réplica biológica. En el laboratorio, se tomaron 200 µL de cada muestra, previamente homogenizada, y se realizó la extracción de ácidos nucleicos inmediatamente.

3.3.4.2. Métodos de concentración viral:

La evaluación del SARS-CoV-2 también se realizó con dos métodos de concentración: floculación con leche desnatada (Calgua *et al.*, 2013) y ultrafiltración

(Ahmed, Bertsch *et al.*, 2020). La floculación con leche desnatada se utilizó en 50 muestras colectadas desde enero hasta diciembre del 2022, mientras que la ultrafiltración sólo se utilizó sólo en 46 muestras recolectadas desde febrero a diciembre del 2022 debido a problemas logísticos y escasos de los dispositivos de ultrafiltración ocasionada por la pandemia (Figura 1). Al igual que en el análisis directo, por cada muestra sólo se evaluó una réplica biológica.

La evaluación de RV, NoV GGII y HAdV se realizó en 53 muestras recolectadas desde septiembre del 2021 hasta septiembre del 2022 (Figura 1), y únicamente con el método de floculación con leche desnatada debido a que estudios previos lo han aplicado exitosamente en la recuperación y concentración de virus entéricos en muestras de aguas residuales (Calgua *et al.*, 2013; Gonzales-Gustavson *et al.*, 2017; Gonzales-Gustavson *et al.*, 2019). Sólo se evaluó una réplica biológica por cada muestra de agua residual.

3.3.4.2.1. Floculación con leche desnatada:

Antes de iniciar con el procesamiento de la muestra, se preparó una solución de leche desnatada prefloculada (1%, p/v) disolviendo 1 g de leche desnatada en polvo (Difco, Le Pont de Claix, Francia) en 100 mL de agua de mar artificial (33.33 gr/L) (Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, Estados Unidos) y ajustó el pH a 3.5 (± 0.02) con HCl 1 N. La muestra de agua residual (100 mL) fue transferida a una botella de vidrio estéril de 250 mL, se agitó durante 10 minutos y se ajustó el pH a 3.5 (± 0.02). Se agregó 3 mL de la solución de leche desnatada prefloculada a la muestra y nuevamente se ajustó el pH a 3.5 (± 0.02). La muestra se agitó a temperatura ambiente durante 8 horas para facilitar la adsorción de las partículas virales a los flóculos de leche. A continuación, la muestra se dejó reposar durante 8 horas para permitir la sedimentación de los flóculos. Se eliminó el sobrenadante y el sedimento fue centrifugado a 8000 g durante 30 minutos a 4°C. Finalmente, se eliminó el sobrenadante y el sedimento fue resuspendido en 10 mL de tampón fosfato a pH 7.5 (1:2, v/v de Na₂HPO₄ 0.2 M y NaH₂PO₄ 0.2 M). La muestra concentrada (10 mL) se almacenó a -80°C.

3.3.4.2.2. Ultrafiltración:

Antes del procesamiento de la muestra, los dispositivos de ultrafiltración centrífuga Amicom® Ultra-15 de 30 kDa (Merck Millipore Ltd., Irlanda) se enjuagaron con agua libre de nucleasas para eliminar el revestimiento de glicerina que recubren las

membranas de filtración. Este procedimiento es necesario para evitar que la glicerina interfiera en la concentración de las partículas virales. La muestra de agua residual (50 mL) se centrifugó a 4500 g durante 10 minutos a 4°C para sedimentar las partículas de mayor tamaño y de esta manera evitar la obstrucción de las membranas de filtración. Posteriormente, el sobrenadante se transfirió a 4 dispositivos Amicom® Ultra-15 de 30 kDa y se centrifugó a 4750 g durante 10 minutos a 4°C. La muestra concentrada (~2 mL) se almacenó a -80°C.

3.3.5. Extracción de ácidos nucleicos virales:

La extracción de ácidos nucleicos virales se realizó a partir de 200 µL de cada muestra procesada siguiendo las indicaciones del MagMAX™ Viral/Pathogen Nucleic Acid Isolation Kit (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, TX, Estados Unidos) (Anexo 3). Además, se incluyeron 200 µL de agua libre de nucleasas como control negativo para garantizar el adecuado procedimiento y corroborar que no se produjo contaminación cruzada. Al finalizar la extracción, se obtuvieron 50 µL de eluido de cada muestra. Los ensayos de RT-qPCR y qPCR se realizaron de inmediato para evitar la degradación de los ácidos nucleicos asociada con el almacenamiento, congelación y descongelación de la muestra.

3.3.6. Análisis molecular:

El análisis molecular de SARS-CoV-2 se realizó en las muestras de aguas residuales procesadas por el análisis directo y por los métodos de floculación con leche desnatada y ultrafiltración. Asimismo, cada muestra se evaluó por sextuplicado, y considerando dos réplicas técnicas sin diluir y dos réplicas técnicas para cada dilución de 1:10 y 1:100. En el caso de RV, NoV GGII y HAdV, se realizó lo mismo y sólo para el método de floculación con leche desnatada. Las diluciones en serie de las muestras se realizaron con el objetivo de reducir el efecto de las sustancias inhibitorias presentes en las aguas residuales. Además, en cada lote de muestras analizadas se colocó una curva estándar de ADN sintético gBlocks® del virus correspondiente para garantizar el correcto rendimiento de la RT-qPCR y qPCR.

Las cuantificaciones obtenidas de las réplicas técnicas de las diluciones 1:10 y 1:100 fueron multiplicadas por 10 y 100, respectivamente. Esto se realizó para restablecer la cantidad inicial de CG y expresar de forma correcta los resultados. Las cuantificaciones

de las réplicas técnicas sin diluir no se multiplicaron por ningún factor. Debido a que los resultados obtenidos en las réplicas técnicas de la dilución 1:100 mostraron las mayores cuantificaciones, se optó por utilizar sólo esta dilución en los análisis estadísticos posteriores porque expresaba mejor las concentraciones de CG presentes en las aguas residuales.

3.3.6.1. RT-qPCR:

De acuerdo a las indicaciones de referencias bibliográficas, revisadas para SARS-CoV-2, RV y NoV GGII, se realizaron los cálculos para ajustar las concentraciones y volúmenes de cada reactivo en relación a un volumen final de reacción de 25 μL (20 μL de la mezcla de reacción + 5 μL de ARN viral). En el caso de SARS-CoV-2, sólo las muestras que mostraron un ciclo de cuantificación menor de 40 (de un total de 45 ciclos), en ambas réplicas de la dilución 1:100, fueron consideradas positivas. Este criterio es respaldo por investigaciones realizadas anteriormente (Medema *et al.*, 2020; Philo *et al.*, 2021). En cuanto a RV y NoV GGII, también se consideraron positivas todas aquellas muestras que evidenciaron un ciclo de amplificación menor de 40, de un total de 45 ciclos, en ambas réplicas técnicas de la dilución 1:100 (Loisy *et al.*, 2005; Zeng *et al.*, 2008). Los límites de detección del ensayo RT-qPCR para SARS-Cov-2, RV y NoV GGII fueron de 2, 5 y 5 CG por reacción, respectivamente. Las condiciones de temperatura y tiempo para cada ensayo de RT-qPCR se detallan a continuación.

Cuadro 1. Volúmenes y concentraciones de cada reactivo en el volumen de reacción final de la RT-qPCR para SARS-CoV-2 (Whitney *et al.*, 2020).

REACTIVO	VOLUMEN FINAL (μL)	CONCENTRACIÓN FINAL (μM)
RNA UltraSense™ Enzyme Mix	1.25	-
RNA UltraSense™ 5X Reaction Mix	5	1X
ROX™ Reference Dye	0.5	1X
SARS-CoV-2-N1 Forward primer	0.5	0.5
SARS-CoV-2-N1 Reverse primer	0.5	0.5
SARS-CoV-2-N1 Probe	0.5	0.125
SARS-CoV-2-N2 Forward primer	0.5	0.5
SARS-CoV-2-N2 Reverse primer	0.5	0.5
SARS-CoV-2-N1 Probe	0.5	0.125
Agua libre de nucleasas	10.25	-
ARN	5	-
VOLUMEN TOTAL (μL)	25	-

Cuadro 2. Condiciones de temperatura y tiempo de la RT-qPCR para SARS-CoV-2 (Whitney *et al.*, 2020).

ETAPA	TEMPERATURA	TIEMPO	CICLOS
Pre-incubación	25°C	2'	1
Transcripción reversa	50°C	15'	1
Denaturación inicial	95°C	2'	1
Denaturación	95°C	3''	45
Hibridación / Extensión	55°C	30''	45

Cuadro 3. Volúmenes y concentraciones de cada reactivo en el volumen de reacción final de la RT-qPCR para rotavirus (RV) (Zeng *et al.*, 2008).

REACTIVO	VOLUMEN FINAL (µL)	CONCENTRACIÓN FINAL (µM)
RNA UltraSense™ Enzyme Mix	1.25	-
RNA UltraSense™ 5X Reaction Mix	5	1X
ROX™ Reference Dye	0.5	1X
NSP3F	1	0.4
NSP3R	1	0.4
NSP3P	0.25	0.4
H ₂ O	11	-
ARN	5	-
VOLUMEN TOTAL (µL)	25	-

Cuadro 4. Condiciones de temperatura y tiempo de la RT-qPCR para rotavirus (RV) (Zeng *et al.*, 2008).

ETAPA	TEMPERATURA	TIEMPO	CICLOS
Transcripción reversa	48°C	30'	1
Denaturación inicial	95°C	10'	1
Denaturación	95°C	15''	45
Hibridación / Extensión	60°C	1'	45

Cuadro 5. Volúmenes y concentraciones de cada reactivo en el volumen de reacción final de la RT-qPCR para norovirus genogrupo II (NoV GGII) (Loisy *et al.*, 2005).

REACTIVO	VOLUMEN FINAL (μL)	CONCENTRACIÓN FINAL (μM)
RNA UltraSense™ Enzyme Mix	1.25	-
RNA UltraSense™ 5X Reaction Mix	5	1X
ROX™ Reference Dye	0.5	1X
QNIF2d	1	0.4
COG2R	1	0.4
QNIFS	0.25	0.4
H ₂ O	11	-
ARN	5	-
VOLUMEN TOTAL (μL)	25	-

Cuadro 6. Condiciones de temperatura y tiempo de la RT-qPCR para norovirus genogrupo II (NoV GGII) (Loisy *et al.*, 2005).

ETAPA	TEMPERATURA	TIEMPO	CICLOS
Transcripción reversa	55°C	60'	1
Denaturación inicial	95°C	5'	1
Denaturación	95°C	15''	45
Hibridación	60°C	1'	45
Extensión	65°C	1'	45

3.3.6.2. qPCR:

De acuerdo a las indicaciones de referencias bibliográficas, revisadas para HAdV, se realizaron los cálculos para ajustar las concentraciones y volúmenes de cada reactivo en relación a un volumen final de reacción de 25 μL (15 μL de la mezcla de reacción + 10 μL de ADN viral). Se consideraron como positivas todas aquellas muestras que evidenciaron amplificación, en ambas réplicas técnicas de la dilución 1:100, hasta finalizar los ciclos de cuantificación establecidos en el ensayo. El límite de detección del ensayo qPCR fue de 10 CG por reacción. Las condiciones de temperatura y tiempo para el ensayo qPCR se detallan a continuación.

Cuadro 7. Volúmenes y concentraciones de cada reactivo en el volumen de reacción final de la qPCR para adenovirus humano (HAdV) (Hernroth *et al.*, 2002).

REACTIVO	VOLUMEN FINAL (μL)	CONCENTRACIÓN FINAL (μM)
TaqMan® Environmental Master Mix 2.0	12.5	1X
AdF	1	0.9
AdR	1	0.9
AdP1	0.5	0.225
ADN	10	-
VOLUMEN TOTAL (μL)	25	-

Cuadro 8. Condiciones de temperatura y tiempo de la qPCR para adenovirus humano (HAdV) (Hernroth *et al.*, 2002).

ETAPA	TEMPERATURA	TIEMPO	CICLOS
Denaturación inicial	95°C	10'	1
Denaturación	95°C	15''	40
Hibridación / Extensión	60°C	1'	40

3.3.7. Registro del número de casos clínicos:

El número de nuevos casos reportados de COVID-19 y gastroenteritis aguda en los distritos de Huancayo y El Tambo fueron registrados rutinariamente a partir de los informes de la autoridad sanitaria local de Junín. Esta información está disponible públicamente en su página web oficial (http://www.diresajunin.gob.pe/grupo_ordenado/nombre/20190122050243_epidemiologia/). La distribución del número de casos se ajustó al intervalo de muestreo y se registraron en una base de datos como casos acumulados cada dos semanas. En algunas ocasiones, la autoridad sanitaria local publicaba los registros de COVID-19 después de un determinado número de días. El mayor periodo sin registro de casos fue de tres días consecutivos. Frente a esto, el número de casos se distribuyó proporcionalmente por el número de días en los que no hubo registro diario (Anexo 4). Por otra parte, los casos de gastroenteritis aguda fueron clasificados en cuatro grupos: menor de 1 año de edad, entre 1 a 4 años de edad, mayor de 5 años de edad y total (Anexo 5).

3.3.8. Tamaño de muestra:

Este estudio evaluó la relación entre la concentración de SARS-CoV-2 en las aguas residuales y los casos de COVID-19 reportados en la comunidad, y la relación entre

RV, NoV GGII y HAdV con los casos de gastroenteritis aguda. El tamaño de muestra se determinó en base a un nivel de confianza del 95%, una potencia del 80% y un coeficiente de correlación del 50%.

[1] Tamaños de muestra. Coeficiente de correlación:

Datos:

Coeficiente de correlación a detectar: 0.500
 Nivel de confianza: 95.0%

Resultados:

Potencia (%)	Tamaño de muestra	
	Unilateral	Bilateral
80.0	23	29

Para determinar el intervalo de muestreo se decidió seguir las recomendaciones de la Organización Panamericana de la Salud (OPS, 2021) y la calendarización aplicada en investigaciones realizadas en España, Países Bajos y Australia (Rusiñol *et al.*, 2014; Medema *et al.*, 2020; Ahmed, Angel *et al.*, 2020). El periodo de muestreo se ajustó a 12 meses para SARS-CoV-2 y para RV, NoV GGII y HAdV, en base al criterio del grupo de investigación, al tiempo de duración del proyecto que estableció la entidad financiadora PROCENCIA, a la disponibilidad de recursos y a la incertidumbre de la aparición de un nuevo brote de COVID-19 o gastroenteritis aguda. Bajo estas premisas, se decidió recolectar 65 muestras de 1 L de aguas residuales, cada dos semanas, en cada uno de los dos distritos bajo estudio desde septiembre del 2021 hasta diciembre del 2022.

3.3.9. Análisis de datos:

3.3.9.1. Evaluación del rendimiento del análisis molecular:

La evaluación de la detección y cuantificación de CG de SARS-CoV-2, RV, NoV GGII y HAdV se realizó en el programa QuantStudio™ Design & Analysis (Version1.5.1, Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, USA). Asimismo, se analizó el rendimiento de cada ensayo de RT-qPCR y qPCR. Se utilizaron configuraciones automáticas para el ciclo de cuantificación y la línea base.

3.3.9.2. Evaluación de la relación entre la concentración viral en las aguas residuales y el número de casos registrados en la población:

Todos los análisis se realizaron en R Statistical Software (v4.2.2; R Core Team 2022). Se determinó el coeficiente de correlación de Spearman (prueba no paramétrica) pareando las concentraciones de CG de SARS-CoV-2 en las aguas residuales y el número de casos acumulados cada dos semanas de COVID-19, y las concentraciones de CG de RV, NoV GGII y HAdV con los casos de gastroenteritis aguda en la comunidad registrados durante el periodo de estudio. Dado que las cuantificaciones de CG muestran una elevada variabilidad y no siguen la distribución normal, el coeficiente de correlación de Spearman utiliza los rankings de estas cuantificaciones, ordenadas de mayor a menor, para evaluar la correlación con los casos clínicos.

Para el cálculo del coeficiente de correlación de Spearman, se utilizó el análisis de series temporales (Cowpertwait y Metcalfe, 2009) y se partió de la premisa que la concentración de CG virales en las aguas residuales tiene la capacidad de anticipar un brote de la enfermedad en la comunidad. Es decir, antes de que inicie un brote en la comunidad, una gran parte de la población se infectará pero permanecerá de forma asintomática. Estos individuos asintomáticos contagiarán a otras personas y, a su vez, excretarán partículas virales a las aguas residuales. Por esta razón, se consideró que los resultados de las aguas residuales pueden anticipar el incremento del número de casos clínicos que se registrarán en el futuro.

El cálculo del coeficiente de correlación de Spearman entre las concentraciones de CG virales en las aguas residuales y los casos clínicos reportados en la comunidad se realizó considerando tres escenarios:

- Sin retraso: evaluación entre la concentración de CG virales y los casos clínicos en la misma semana epidemiológica (Figura **3A**).
- Dos semanas de retraso: evaluación considerando un desplazamiento de dos semanas hacia adelante (futuro) de la concentración de CG virales respecto a los casos clínicos (Figura **3B**).
- Cuatro semanas de retraso: evaluación considerando un desplazamiento de cuatro semanas hacia adelante (futuro) de la concentración de CG virales respecto a los casos clínicos (Figura **3C**).

A

Casos clínicos en comunidad	A	B	C	D	E	F	G
CG virales en aguas residuales	a	b	c	d	e	f	g

B

Casos clínicos en comunidad	A	B	C	D	E	F	G
CG virales en aguas residuales		a	b	c	d	e	f

C

Casos clínicos en comunidad	A	B	C	D	E	F	G
CG virales en aguas residuales			a	b	c	d	e

Figura 3. Esquema para el cálculo del coeficiente de correlación de Spearman entre las copias genómicas (CG) virales en las aguas residuales y los casos clínicos reportados en la comunidad. Las mismas letras en mayúscula y minúscula corresponden a la misma semana epidemiológica. Las figuras A, B y C indican la evaluación de ambas variables en la misma semana epidemiológica (sin retraso), considerando dos semanas de retraso de las CG virales respecto a los casos clínicos y considerando cuatro semanas de retraso de las CG virales respecto a los casos clínicos, respectivamente.

IV. RESULTADOS

4.1. Eficacia de recuperación para SARS-CoV-2 inoculado en muestras de aguas residuales:

El análisis directo obtuvo la mayor eficacia de recuperación promedio, seguido por la ultrafiltración con el dispositivo Amicom® Ultra-15 de 30. La floculación con leche desnatada alcanzó el menor rendimiento (Cuadro 9).

Cuadro 9. Eficacia de recuperación para SARS-CoV-2 inoculado en muestras de aguas residuales por cada método de procesamiento.

Código	Análisis directo (%)	Ultrafiltración (%)	FLD ^a (%)
AR-001-21	73.61	51.94	5.73
AR-001-21	69.52	53.37	6.23
AR-003-21	65.95	53.75	4.95
AR-003-21	79.86	44.41	5.64
	72.24 ± 5.97^b	50.87 ± 4.37	5.64 ± 0.53

^a Floculación con leche desnatada, ^b media \pm desviación estándar (%).

4.2. Detección y cuantificación de copias genómicas virales en las aguas residuales:

El monitoreo de las aguas residuales mostró que el 72.0% (36/50) de las muestras fueron positivas para SARS-CoV-2. Las proporciones de muestras positivas por distrito fueron del 80.0% (20/25) y 64.0 (16/25) en Huancayo y El Tambo, respectivamente. El análisis directo registró la mayor frecuencia de detección y las mayores cuantificaciones de CG del SARS-CoV-2 en comparación con la ultrafiltración y la floculación con leche desnatada

(Cuadro 10). No se observó una diferencia estadísticamente significativa entre las proporciones obtenidas con el análisis directo y la ultrafiltración ($p=0.75$), pero sí se produjo una diferencia significativa entre el análisis directo y la floculación con leche desnatada ($p=0.0002$). Es importante resaltar que la ultrafiltración fue el único método que detectó tres de las cinco muestras con la menor concentración de CG de SARS-CoV-2 ($3.78E+02$ a $1.08E+03$ CG/100 mL). Además, el ensayo CDC-N1 pudo detectar y cuantificar consistentemente el ARN de SARS-CoV-2 en todas las muestras positivas, mientras que el ensayo CDC-N2 pudo detectar al SARS-CoV-2 en sólo el 8.3% (3/36) de las muestras positivas para el ensayo CDC-N1. Por otra parte, todas las muestras de aguas residuales procesadas por el método de floculación con leche desnatada fueron positivas y mostraron elevadas concentraciones de CG de RV, NoV GGII y HAdV. En el Cuadro 11 se detalla la mediana, así como los valores mínimo y máximo, en CG de RV, NoV GGII y HAdV. Es importante considerar que la elevada variabilidad en las concentraciones virales de las aguas residuales ocasiona que las cuantificaciones registradas no sigan una distribución normal. Por esta razón, la mediana es la medida de tendencia central más adecuada para resumir las cuantificaciones detectadas en las aguas residuales. Asimismo, la inclusión de los valores mínimos y máximos permite una mejor descripción de la variabilidad de las cuantificaciones en comparación con la desviación estándar.

Las variaciones registradas cada dos semanas epidemiológicas (SE) de las concentraciones de CG de SARS-CoV-2, RV y HAdV por cada distrito se representan en las Figuras 4, 5A-B y 5C, respectivamente. En la sección del Apéndice (Anexo 6-11) se proporciona mayor información, incluyendo la variación quincenal de las CG de NoV GGII en las aguas residuales de los distritos de Huancayo y El Tambo.

Todas las cuantificaciones de CG y sus correspondientes ciclos de cuantificación para SARS-CoV-2, RV, NoV GGII y HAdV, obtenidas de las réplicas técnicas de la dilución 1:100, se detallan en la sección del Apéndice (Anexo 12-19).

Cuadro 10. Detecciones y cuantificaciones en copias genómicas (CG) por 100 mL de muestra de agua residual para SARS-CoV-2 por cada método de procesamiento en ambos distritos.

Distrito	Análisis directo		Ultrafiltración		FLD^a	
	Positivos / Total (%)	Cuantificación Máx / Mín (CG/100 mL)	Positivos / Total (%)	Cuantificación Máx / Mín (CG/100 mL)	Positivos / Total (%)	Cuantificación Máx / Mín (CG/100 mL)
Huancayo	16 / 25 (64.0)	9.32E+06 1.14E+04	14 / 23 (60.8)	3.53E+05 3.78E+02	3 / 25 (12.0)	2.54E+04 1.63E+03
El Tambo	16 / 25 (64.0)	8.42E+06 1.48E+04	11 / 23 (47.8)	5.55E+05 9.55E+02	2 / 25 (8.0)	3.53E+03 1.50E+03

^a FLD: Floculación con leche desnatada.

Cuadro 11. Valores de la mediana, mínimos y máximos en copias genómicas (CG) por 100 mL de muestra de agua residual para rotavirus (RV), norovirus genogrupo II (NoV GGII) y adenovirus humano (HAdV) concentrados por el método de floculación con leche desnatada en ambos distritos.

Distrito	Virus	Mediana (CG/100 mL)	Mín. Cuantif. (CG/100 mL)	Máx. Cuantif. (CG/100 mL)
Huancayo	RV	3.10E+06	5.17E+04	2.38E+08
	NoV GGII	1.47E+06	1.78E+04	1.02E+07
	HAdV	1.68E+06	7.47E+04	5.03E+07
El Tambo	RV	9.13E+06	2.08E+05	2.75E+08
	NoV GGII	1.27E+06	2.31E+04	1.22E+07
	HAdV	3.69E+06	1.26E+05	1.92E+07

4.3. Casos de COVID-19 y gastroenteritis aguda:

Hasta abril del 2023, se han reportado cinco olas de la pandemia de COVID-19 en el Perú, y la ocurrencia de las últimas tres coincidió con el desarrollo de este estudio. La tercera ola (diciembre 2021-febrero 2022) alcanzó el pico de la curva epidémica en la SE 2/2022 y SE 3/2022 con 1379 casos en el distrito de Huancayo y 1602 casos en el distrito de El Tambo, respectivamente. La cuarta ola (junio 2022-septiembre 2022) alcanzó el pico de contagios en la SE 27/2022 y se registraron 600 casos en el distrito de Huancayo y 609 casos en el distrito de El Tambo. Finalmente, el inicio de la quinta ola (diciembre 2022-enero 2023) coincidió con la etapa final del estudio y se observó un incremento constante en el número de casos a partir de la SE 44/2022 en ambos distritos (Figura 4).

En general, el número de casos de gastroenteritis aguda se mantuvieron dentro de los valores normales a lo largo del estudio, excepto por los tres brotes identificados en ambos distritos. En el distrito de El Tambo, sólo se reportó un brote de 64 casos de gastroenteritis aguda en niños menores de 1 año de edad durante la SE 13/2022 (Figura 5A). En el distrito de Huancayo se registraron dos brotes. El primer brote ocurrió en la semana inicial del estudio (39/2021) y se registraron 49 casos en el grupo mayor de 5 años de edad. En el segundo brote, se reportaron 18 casos en niños entre 1 a 4 años de edad durante la SE 35/2022 (Figura 5B-C).

4.4. Relación entre la concentración de SARS-CoV-2 en las aguas residuales y el número de casos de COVID-19:

En general, se observó un comportamiento similar entre las concentraciones de SARS-CoV-2 en las aguas residuales y la evolución de la pandemia de la COVID-19 en el Perú. Las mayores cuantificaciones detectadas en este estudio para SARS-CoV-2 en las aguas residuales fueron $9.32E+06$ CG/100 mL (distrito de Huancayo) y $8.42E+06$ CG/100 mL (distrito de El Tambo) (Cuadro 10), y coincidieron con el pico de infecciones de la tercera ola (SE 2/2022 y SE 3/2022) en ambos distritos (Figura 4). Sin embargo, y debido a la falta de evaluaciones en las aguas residuales antes de enero del 2022, no fue posible anticipar el inicio de la tercera ola. En el transcurso de la SE 21/2022 y SE 23/2022, se detectaron dos incrementos de $3.04E+04$ GC/100 mL en el distrito de Huancayo y $2.25E+04$ GC/100 mL en el distrito de El Tambo, respectivamente. Estas cuantificaciones lograron anticipar, hasta en dos semanas, el inicio de la cuarta ola. Las mayores concentraciones de SARS-CoV-2 en la cuarta ola ocurrieron en la SE 25/2022 para el distrito de El Tambo ($2.41E+06$ CG/100 mL) y en la SE 29/2022 para el distrito de Huancayo ($1.06E+06$ CG/100 mL) (Figura 4). Finalmente, las cuantificaciones de $5.48E+05$ CG/100 mL en el distrito de Huancayo y de $1.21E+05$ CG/100 mL en el distrito de El Tambo, reportadas en la SE 45/2022, también precedieron en 2 semanas el inicio de la quinta ola (Figura 4).

Los coeficientes de correlación de Spearman entre las concentraciones de SARS-CoV-2 y los casos de COVID-19 fueron de 35.9% ($p=0.07$) en el distrito de Huancayo y 60.8% ($p<0.01$) en el distrito de El Tambo. Asimismo, se consideró un retraso de dos semanas en la concentración de CG de SARS-CoV-2 con el objetivo de anticipar el incremento de casos de COVID-19 en la población. Con este retraso, fue posible mejorar

el nivel de correlación a 55.2% ($p < 0.01$) en el distrito de Huancayo y 71.4% ($p < 0.01$) en el distrito de El Tambo. Por lo tanto, estos resultados confirman los hallazgos de los niveles de correlación identificados durante el monitoreo de las aguas residuales y sugieren que el aumento de la concentración de CG de SARS-CoV-2 tiene la capacidad de anticipar, hasta en dos semanas, el inicio de un brote de COVID-19 en la comunidad. Además, se observó que la disminución paulatina de la concentración de CG de SARS-CoV-2 en las aguas residuales hasta niveles por debajo del límite de detección precedió a la disminución del número de casos clínicos en la población (Figura 4).

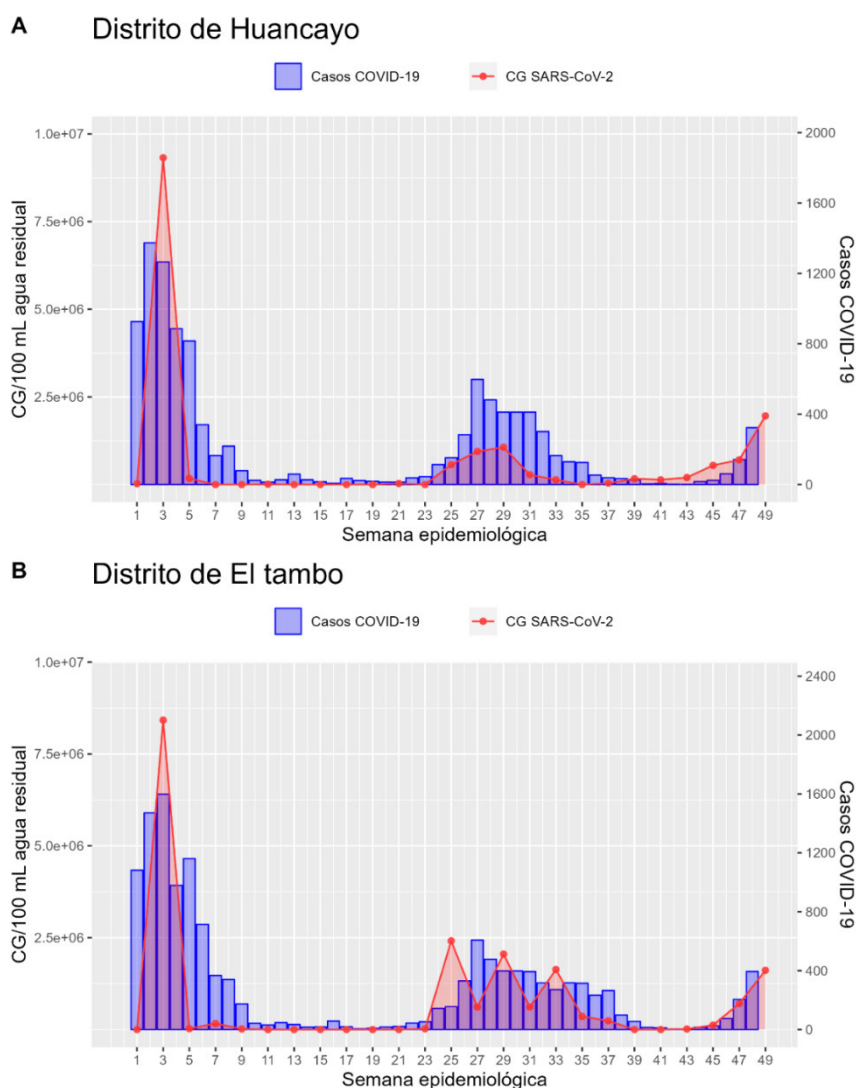


Figura 4. Monitoreo de las concentraciones de SARS-CoV-2 en las aguas residuales y registro semanal de los casos de COVID-19. Las barras azules representan los casos de COVID-19 notificados por la autoridad sanitaria del Perú, mientras que la línea roja representa la concentración de copias genómicas (CG) por 100 mL de muestra de agua residual evaluada en este estudio, a lo largo de las semanas epidemiológicas para los distritos de Huancayo (A) y El Tambo (B).

4.5. Relación entre la concentración de RV, NoV GGII y HAdV en las aguas residuales y el número de casos de gastroenteritis aguda:

Las concentraciones de CG de los virus entéricos analizadas en las aguas residuales permanecieron dentro de los valores estimados a lo largo del estudio. Sin embargo, las concentraciones de CG de RV y HAdV en las aguas residuales presentaron importantes incrementos en determinadas SE que lograron anticipar el inicio de brotes de gastroenteritis aguda en la población, con las mayores cuantificaciones registradas hasta cuatro semanas antes del inicio de estos brotes. En el distrito de El Tambo, la mayor cuantificación de RV ($2.75E+08$ CG/100 mL) en este estudio ocurrió en la SE 9/2022 y cuatro semanas antes del inicio de un brote de 64 casos en niños menores de 1 año (Figura 5A). Posteriormente, en el distrito de Huancayo, se identificaron dos incrementos considerables de $2.38E+08$ CG/100 mL para RV (segunda mayor cuantificación) (Figura 5B) y $5.03E+07$ CG/100 mL para HAdV (mayor cuantificación) (Figura 5C) durante la SE 31/2022. Ambas concentraciones también anticiparon, en cuatro semanas, un brote de 18 casos en niños de 1 a 4 años que ocurrió en la SE 35/2022. Por otro lado, se detectó un brote de 49 casos en el grupo mayor de 5 años en el distrito de Huancayo pero no fue posible anticiparlo porque ocurrió en la semana inicial del estudio (SE 39/2022).

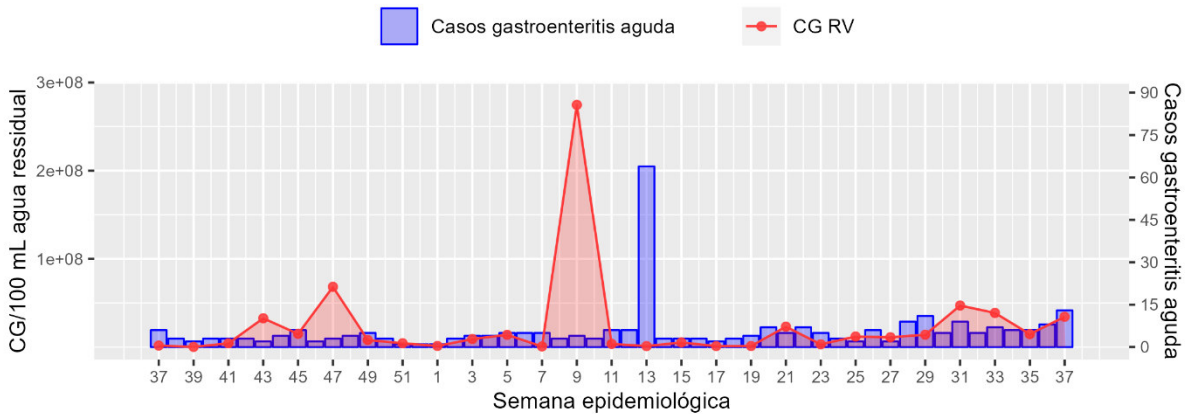
Es importante indicar que en las SE 43/2021 y SE 47/2021 ocurrieron dos incrementos en las concentraciones de RV en las aguas residuales del distrito de El Tambo que lograron anticipar, en dos semanas, aumentos discretos en el número de casos de gastroenteritis aguda en niños menores de un año (Figura 6). Este evento no se puede apreciar con mayor detalle en la Figura 5A debido al efecto de la alta concentración de RV en las aguas y al elevado registro de casos de diarreas en niños menores de un año que ocurrieron en la SE 9/2022 y SE 13/2022, respectivamente.

Por otra parte, no se observó una relación en las concentraciones de CG de NoV GGII en las aguas residuales y los casos de gastroenteritis aguda reportados en los distritos de Huancayo y El Tambo.

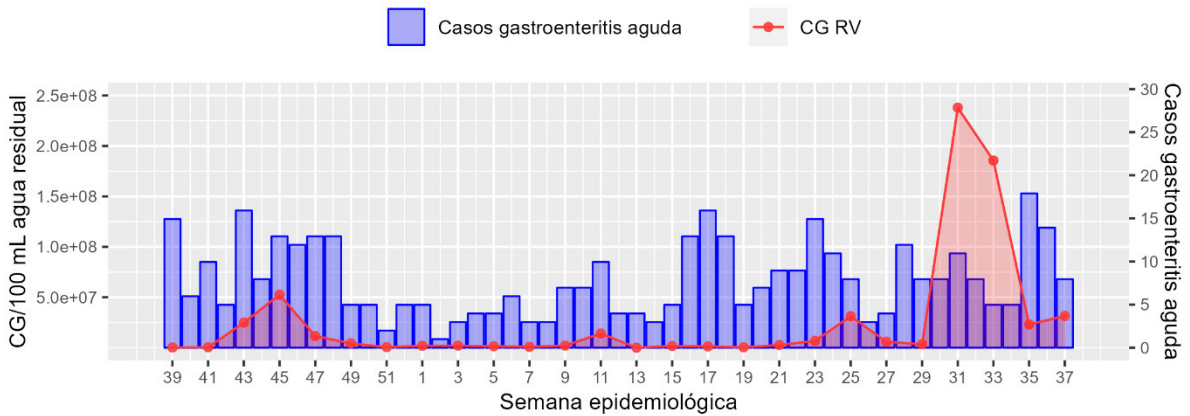
Los coeficientes de correlación de Spearman, sin semanas de retraso, mostraron un moderado nivel de correlación entre las concentraciones de CG de RV y HAdV en las aguas residuales y el número de casos de gastroenteritis aguda en niños menores de 4 años de edad de ambos distritos y en niños de 1 a 4 años en el distrito de Huancayo,

respectivamente (Anexo 20). Los coeficientes de correlación, sin semanas de retraso y con dos semanas de retraso, observados entre las concentraciones de CG de cada virus en las aguas residuales y los casos clínicos totales reportados en cada distrito se detallan en el cuadro 12. Cuando se consideró un retraso de dos semanas en la concentración de CG de los virus entéricos, se obtuvieron resultados similares a los del SARS-CoV-2.

A Distrito de El Tambo (niños menores de un año de edad)



B Distrito de Huancayo (niños entre uno a cuatro años de edad)



C Distrito de Huancayo (niños entre uno a cuatro años de edad)

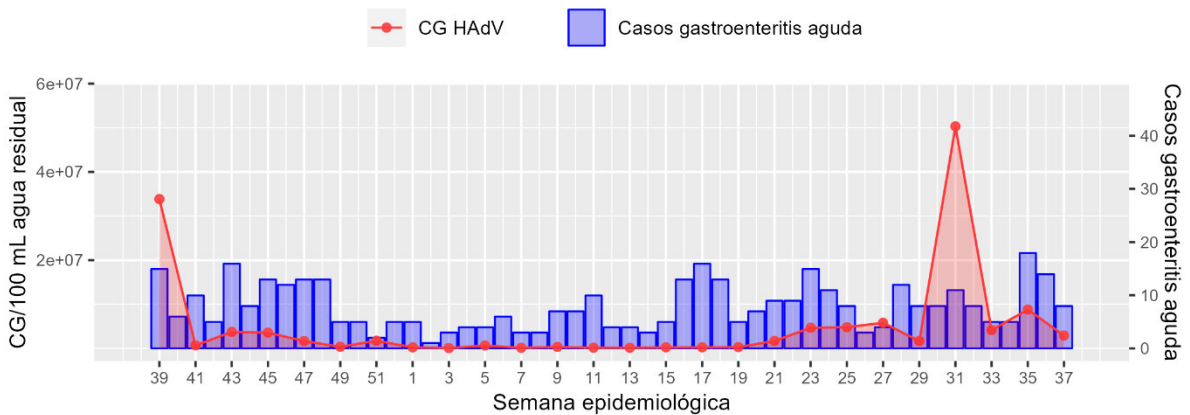


Figura 5. Monitoreo de las concentraciones de rotavirus (RV) y adenovirus humano (HAdV) en las aguas residuales y registro semanal de los casos de gastroenteritis aguda. Las barras azules representan los casos de gastroenteritis aguda notificados por la autoridad sanitaria de Perú, mientras que la línea roja representa la concentración de copias genómicas (GC) por 100 mL de muestra de agua residual evaluada en este estudio. En las Figuras A y B se muestran las concentraciones de RV y el número de casos en niños menores de 1 año para el Distrito de El Tambo (A) y el número de casos en niños de 1 a 4 años para el Distrito de Huancayo (B). La Figura C muestra las concentraciones de HAdV y el número de casos en niños de 1 a 4 años para el distrito de Huancayo.

Distrito de El Tambo (niños menores de un año)

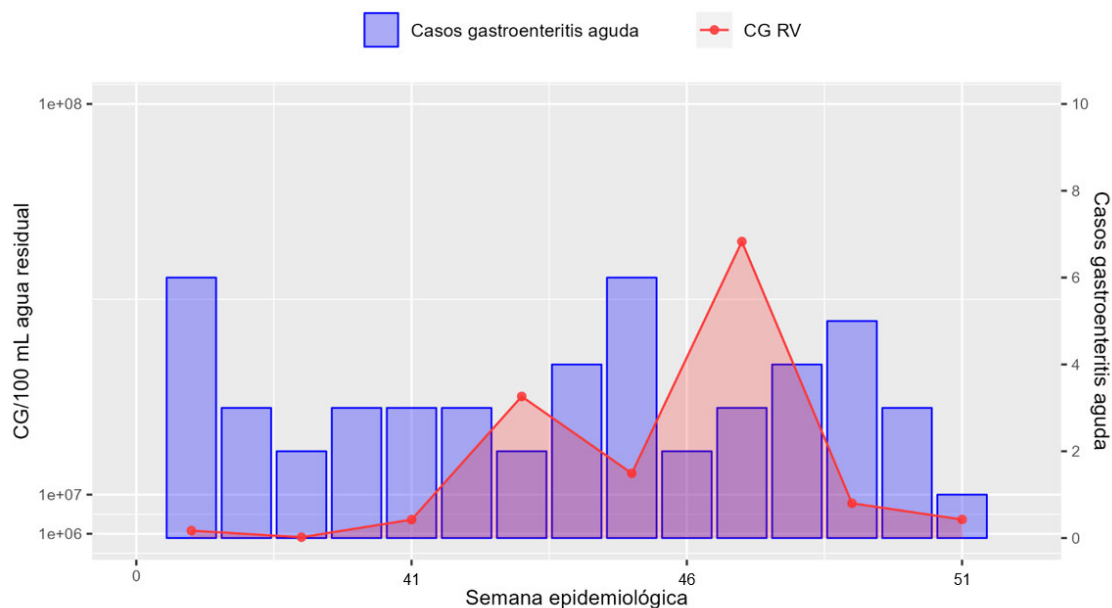


Figura 6. Monitoreo de las concentraciones de rotavirus (RV) y registro semanal (37-51) de los casos de gastroenteritis aguda. A mayor detalle, se observa que en las semanas epidemiológicas 43 y 47 se producen dos incrementos en las concentraciones de copias genómicas (CG) de RV (línea roja) en las aguas residuales que anticipan en dos semanas el aumento del número de casos de gastroenteritis aguda (barras azules) en niños menores de un año de edad en las semanas epidemiológicas 45 y 49.

Cuadro 12. Coeficientes de correlación de Spearman entre las concentraciones de copias genómicas de SARS-CoV-2, rotavirus (RV), norovirus genogrupo II (NoV GGII) y adenovirus humano (HAdV) en las aguas residuales y los casos totales de COVID-19 y gastroenteritis aguda reportados en ambos distritos.

		Distrito de Huancayo		Distrito de El Tambo	
		Sin retraso	2 semanas de retraso	Sin retraso	2 semanas de retraso
SARS-CoV-2	<i>r</i>	0.35	0.55	0.60	0.71
	<i>p</i>	0.07	<0.01	<0.01	<0.01
RV	<i>r</i>	0.09	0.35	0.22	0.40
	<i>p</i>	0.62	0.08	0.25	0.03
NoV GGII	<i>r</i>	-0.07	0.17	0.14	0.53
	<i>p</i>	0.72	0.41	0.47	<0.01
HAdV	<i>r</i>	-0.01	0.05	0.11	-0.10
	<i>p</i>	0.95	0.77	0.56	0.60

p corresponde al valor de la probabilidad de la prueba de correlación de Spearman.

4.6. Parámetros físico-químicos de las aguas residuales:

Las variaciones de los parámetros físico-químicos se mantuvieron dentro de los rangos normales y no se asociaron con un incremento considerable de la concentración de CG virales en las aguas residuales de los distritos de Huancayo y El Tambo. Esto se puede atribuir al hecho que, durante el periodo de muestreo, la ciudad de Huancayo experimentó una notable escases de precipitaciones debido al fenómeno atmosférico “La Niña”. El Cuadro 13 describe las mediciones promedio de cada parámetro físico-químico, incluyendo los valores mínimos y máximos. Los Anexos 21 y 22 detallan las mediciones y variaciones de los parámetros físico-químicos en cada distrito a lo largo del estudio, respectivamente.

Cuadro 13. Valores de la media, mínimos y máximos de cada parámetro físico-químico de las aguas residuales de cada distrito: pH, temperatura, conductividad eléctrica (CE) y sólidos disueltos totales (SDT).

	Distrito de Huancayo			Distrito de El Tambo		
	Media \pm DE ^a	Mín. valor	Máx. valor	Media \pm DE	Mín. valor	Máx. valor
pH	7.85 \pm 0.23	7.30	8.24	8.13 \pm 0.21	7.64	8.80
Temperatura (°C^b)	16.82 \pm 1.33	13.60	20.10	17.82 \pm 1.51	14.30	21.40
CE (mS/cm^c)	1.36 \pm 0.26	1.00	2.24	1.46 \pm 0.21	1.05	1.94
SDT (ppt^d)	0.68 \pm 0.12	0.50	1.09	0.73 \pm 0.10	0.53	0.97

^a Desviación estándar, ^b grados Celsius, ^c miliSiemens por centímetro, ^d partes por trillón.

V. DISCUSIÓN

En el presente trabajo de investigación, se monitorearon las aguas residuales de los principales distritos de la ciudad de Huancayo durante un año con el objetivo de evaluar la correlación entre la concentración de CG de SARS-CoV-2 y los casos de COVID-19 reportados en la comunidad. Asimismo, se evaluó la relación entre las CG de RV, NoV GGII y HAdV con el número de casos de gastroenteritis aguda. Los resultados del estudio demostraron que el monitoreo periódico de SARS-CoV-2 pudo anticipar, hasta en dos semanas, el inicio de la cuarta y quinta ola de la pandemia de COVID-19 en el Perú. Este hecho coincidió con los hallazgos de estudios realizados en Brasil, España y Países Bajos, donde lograron detectar las CG de SARS-CoV-2 en las aguas residuales entre una a dos semanas antes del reporte del primer caso de COVID-19 en la población y del inicio de la primera ola de la pandemia (Medema *et al.*, 2020; Randazzo *et al.*, 2020; Claro *et al.*, 2021; Rusiñol *et al.*, 2021).

Además, se ha sugerido que la concentración de CG de SARS-CoV-2 en las aguas residuales representa una adecuada herramienta predictiva para el número de casos de COVID-19 hasta una semana después del muestreo (Rusiñol *et al.*, 2021). En el presente estudio obtuvimos resultados similares, ya que se observó un fuerte nivel de correlación entre la concentración de CG de SARS-CoV-2 en las aguas residuales y los casos de COVID-19 hasta dos semanas después del muestreo. A pesar que estudios previos recomiendan la recolección semanal de muestras de aguas residuales (Medema *et al.*, 2020; Claro *et al.*, 2021), y que un intervalo de muestreo más corto probablemente arrojaría mejores resultados, nuestro estudio sugiere que el intervalo de muestreo cada

dos semanas es una opción útil y económica para vigilar al SARS-CoV-2 y anticipar el inicio inminente de un brote de COVID-19 en la comunidad. Esto es particularmente importante para países en vías de desarrollo, donde existe una limitada disponibilidad de laboratorios de investigación y de recursos económicos y humanos.

En Sudamérica, el primer reporte de SARS-CoV-2 detectado en las aguas residuales fue realizado en Brasil en Abril del 2020 (Prado *et al.*, 2020). Sin embargo, existe evidencia que sugiere que el SARS-CoV-2 estuvo circulando sin ser detectado en la población antes de los primeros casos de COVID-19 reportados oficialmente en la región (Fongaro *et al.*, 2021). Posteriormente, se desarrollaron una mayor cantidad de estudios en Brasil, Argentina y Chile que ayudaron a monitorear el incremento del SARS-CoV-2 (Barrios *et al.*, 2021; Plaza-Garrido *et al.*, 2023) y complementaron las medidas de contención y mitigación implementadas por las autoridades en la comunidad (Prado *et al.*, 2021). En este sentido, la presente investigación realizada en la sierra central es uno de los primeros estudios realizados en el Perú y contribuye a los esfuerzos colectivos de estos países para promover la implementación de la WBE a gran escala en la región.

Aunque se observó un moderado nivel de correlación entre las concentraciones de CG de RV en las aguas residuales y los casos totales de gastroenteritis aguda reportados en la población, las mayores cuantificaciones para este virus ocurrieron cuatro semanas antes del inicio de brotes en niños menores de cuatro años de edad en ambos distritos. Esto se debe a que se registraron aumentos de CG de RV hasta dos semanas antes del incremento en el número de casos de gastroenteritis (Figura 5). Por otra parte, estos resultados también coincidieron con los hallazgos de un estudio realizado en Gotemburgo, Suecia, que pudo anticipar, hasta en tres semanas, un brote de enfermedad diarreica ocasionado por NoV GGII (Hellmér *et al.*, 2014). Sin embargo, y a diferencia del estudio anterior, una importante limitación del presente estudio fue que la autoridad sanitaria de Junín no dispone de los recursos necesarios para identificar al agente etiológico de los casos de gastroenteritis aguda.

Las altas concentraciones de CG de RV detectadas en las aguas residuales antes de un brote de gastroenteritis aguda en niños menores de un año de edad se podrían considerar una relación espuria. Sin embargo, es muy importante considerar que RV es la principal causa de gastroenteritis aguda en niños (OPS, 2007) y que la cobertura de vacunación en la ciudad de Huancayo se redujo del 100% (2018-2019) hasta el 80%

(2020) debido a la pandemia de la COVID-19 (<https://www.minsa.gob.pe/reunis/data/Inmunizaciones.asp>). Además, el uso de pañales de tela es una costumbre que se observa frecuentemente en la sierra central, por lo tanto, las heces de los infantes terminarían inevitablemente en el sistema de alcantarillado y, posteriormente, en las aguas residuales. Asimismo, el contacto cercano entre los niños y sus padres podría provocar transmisión intrafamiliar y una infección asintomática en los adultos (Banerjee *et al.*, 2008; Lopman *et al.*, 2013), lo que aumentaría considerablemente la carga viral en las aguas residuales sin afectar los casos reportados de gastroenteritis aguda.

El desarrollo de esta investigación tuvo algunas limitaciones. Primero, existió una inadecuada notificación, a nivel regional y nacional, de los casos clínicos de diversas enfermedades (incluyendo COVID-19 y gastroenteritis aguda) debido a que una elevada proporción de la población no busca atención médica o la evita activamente, así como al número insuficiente de pruebas de diagnóstico clínico disponibles en los centros de salud. Otro inconveniente fue la recolección manual, a una determinada hora del día, de las muestras de aguas residuales debido a la falta de un sistema de muestreo automático refrigerado que recolecte una muestra compuesta a lo largo del día como se implementa en las plantas de tratamiento. A pesar de estas limitaciones, nuestros resultados mostraron que el monitoreo de las aguas residuales podría anticipar el aumento de los casos reportados de COVID-19 y gastroenteritis aguda en la comunidad. Por lo tanto, este hecho sugiere que la WBE sería un excelente complemento para la vigilancia de enfermedades infecciosas endémicas y permitiría anticipar brotes epidémicos en regiones donde existen limitaciones en los registros epidemiológicos.

Las concentraciones de CG de RV, NoV GGII y HAdV en las aguas residuales de la ciudad de Huancayo se mantuvieron relativamente constantes durante el desarrollo del estudio, a excepción de los picos descritos anteriormente. Los resultados de NoV GGII y HAdV revelaron las cuantificaciones de CG más altas registradas en las aguas residuales de la región, superando los reportes de Chile (Plaza-Garrido *et al.*, 2023), Brasil (Fumian *et al.*, 2019; Espinosa *et al.*, 2022) y Uruguay (Lizasoain *et al.*, 2018). Nuestros resultados también fueron superiores a los reportados en países desarrollados de diferentes continentes: Estados Unidos (McCall *et al.*, 2020), España (Silva-Sales *et al.*, 2020), Suecia (Hellmér *et al.*, 2014), Japón (Kobayashi *et al.*, 2017), China (Zhou *et al.*, 2016)

y Sudáfrica (Mabasa *et al.*, 2018). Por otra parte, las concentraciones de RV fueron similares a las obtenidas en Brasil (Prado *et al.*, 2019) y España (Silva-Sales *et al.*, 2020), y superiores a las de Argentina (Barril *et al.*, 2015), Uruguay (Lizasoain *et al.*, 2018), Estados Unidos (Kiulia *et al.*, 2021), Suecia (Hellmér *et al.*, 2014), Japón (Kobayashi *et al.*, 2017) y Egipto (Elmahdy *et al.*, 2020). Es importante resaltar que los resultados de nuestro estudio deben ser analizados con cautela y considerar que las cuantificaciones virales pueden variar en cada región debido a las características geográficas y poblacionales del lugar en estudio, las particularidades físico-químicas de las aguas residuales (como la presencia de sustancias inhibitorias de la PCR) y la carga viral excretada por las personas infectadas, incluyendo la metodología de muestreo (que no consideró la centrifugación de las muestras) y la eficacia de recuperación del método de concentración.

Un aspecto importante relacionado a los estudios de WBE es identificar un método estadístico que permita establecer una relación entre las CG virales de las aguas residuales y los casos clínicos reportados en la comunidad. Por esta razón, y considerando que la naturaleza de los datos recopilados en las aguas residuales no sigue la distribución normal y son altamente variables, decidimos utilizar una prueba no paramétrica, el coeficiente de correlación de Spearman. De hecho, las pruebas no paramétricas no utilizan los valores obtenidos sino que utilizan los rankings de estos valores ordenados de mayor a menor, y estos rankings son los que se evalúan a través de la correlación. Un estudio complementario con otros colegas soporta el uso de esta metodología a través de una investigación que recientemente publicamos (Stehlík *et al.*, 2023). Por otra parte, es necesario mencionar que la duración de nuestro estudio no fue lo suficientemente largo para evaluar otras herramientas del análisis de series temporales, lo que nos hubiera permitido predecir el comportamiento de los brotes de COVID-19 y gastroenteritis aguda en la comunidad.

Desde su conceptualización, los resultados de la WBE se han respaldado en dos herramientas fundamentales: curva estándar y control externo de proceso. Aunque es posible que la cuantificación precisa de CG virales pueda ser una tarea desafiante debido a la elevada complejidad biológica y química de las aguas residuales (Ahmed, Bivins *et al.*, 2020), la inclusión de una curva estándar permite asegurar el correcto rendimiento del ensayo qPCR seleccionado, tener una referencia para la cuantificación molecular y

comparar los resultados obtenidos entre laboratorios o en diferentes contextos. Por otra parte, en nuestro estudio no fue posible utilizar un control externo de proceso. A pesar que esto pudo ser una limitación debido a que el control externo de proceso garantiza una correcta concentración y detección viral en las aguas residuales, su aplicación requiere que el virus seleccionado no se encuentre presente en las muestras a analizar para evitar sobrevaloraciones en los resultados (OPS, 2021). Ante esto, y siguiendo las recomendaciones de estudios previos (Wurtzer *et al.*, 2022), optamos por evaluar las concentraciones de HAdV en las aguas residuales dado que su excreción se mantiene relativamente constante a lo largo del tiempo, es un buen indicador de contaminación fecal humana y es capaz de representar posibles fluctuaciones en el número de habitantes dentro de una comunidad (ingreso o salida de personas) (Calgua *et al.*, 2013; Rusiñol *et al.*, 2021).

Otra limitación de nuestro estudio es que sólo se evaluó una réplica biológica por cada muestra de agua residual recolectada en los distritos de Huancayo y El Tambo. Aunque este evento podría reducir la exactitud de las cuantificaciones de las CG, nuestros protocolos se ajustaron a las recomendaciones realizadas por laboratorios referentes en el estudio de aguas residuales (Randazzo *et al.*, 2020; Claro *et al.*, 2021; Rusiñol *et al.*, 2021). Además, el objetivo de la vigilancia de las aguas residuales no es lograr una cuantificación precisa, sino identificar el incremento de CG virales que ocurre durante el monitoreo periódico (Randazzo *et al.*, 2020). De esta manera, sería posible alertar con antelación a las autoridades sanitarias sobre el inicio inminente de un brote en la población. Además, otro objetivo de la WBE es ser una herramienta rápida, económica y fácil de implementar (Tandukar *et al.*, 2022). Por lo tanto, la inclusión de un mayor número de réplicas biológicas duplicaría o triplicaría los gastos asociados al análisis de las aguas residuales, lo cual limitaría la aplicación de la WBE en regiones con escasos recursos. Asimismo, nuestros resultados sugieren que es suficiente analizar sólo una réplica biológica por muestra para lograr anticipar la ocurrencia de un brote en la comunidad.

Estudios previos recomiendan encarecidamente la aplicación de los métodos de concentración en el análisis de muestras de aguas residuales para aumentar los límites de detección y cuantificación viral (Hellmér *et al.*, 2014; Gonçalves *et al.*, 2021). Sin embargo, en el presente estudio, el análisis directo obtuvo el mayor rendimiento para el

SARS-CoV-2 tanto en la evaluación de la eficacia de recuperación como en la vigilancia de las aguas residuales (Cuadro 1). Es probable que estos hallazgos se deban al elevado número de personas infectadas durante la pandemia, lo que incrementó la carga viral en las aguas residuales y facilitó la detección y cuantificación del ARN del SARS-CoV-2. Además, reconociendo que los virus envueltos tienden a asociarse con la materia orgánica presente en las aguas residuales, lo cual les podría proporcionar protección frente a los factores ambientales, es probable que el proceso de acidificación realizado durante la floculación con leche desnatada degrade a las partículas virales libres de SARS-CoV-2 (un virus con envoltura lipídica) y a su ARN, inoculado a la muestra de agua residual. Por lo tanto, este hecho podría no representar lo que ocurre bajo condiciones ambientales y explicaría el menor rendimiento de la floculación con leche desnatada frente al análisis directo. Por otra parte, la presencia de una elevada concentración de inhibidores en las aguas residuales podría haber contribuido en el menor rendimiento de los métodos de concentración en comparación al análisis directo.

En cuanto a RV, NoV GGII y HAdV, lamentablemente no fue posible evaluar la eficacia de recuperación para estos virus utilizando la floculación con leche desnatada bajo las condiciones de las aguas residuales de la ciudad de Huancayo. Sin embargo, tomamos como referencia varios estudios que han descrito un alto rendimiento de la floculación con leche desnatada para la concentración de virus entéricos sin envoltura lipídica: RV (26-31%), NoV GGII (45-90%) y HAdV (54-79%) (Calgua *et al.*, 2013; Hellmér *et al.*, 2014; Gonzales-Gustavson *et al.*, 2019). Además, todas las muestras analizadas fueron positivas y evidenciaron altas concentraciones de CG virales.

Finalmente, y considerando la transición de la COVID-19 hacia la endenmicidad, recomendamos continuar evaluando el análisis directo y utilizar la ultrafiltración con el dispositivo Amicon® Ultra-15 30 kDa para la vigilancia periódica del SARS-CoV-2 en las aguas residuales, dado que fue el único método que detectó la mayor cantidad de muestras con la menor concentración de CG de SARS-CoV-2 y alcanzó el segundo mayor rendimiento en el estudio. Aunque se ha informado que este método reduciría la eficacia de la recuperación viral (Ye *et al.*, 2016; Ahmed, Bertsch *et al.*, 2020), se ha demostrado que es altamente reproducible y presenta una baja intravariabilidad (Forés *et al.*, 2021).

VI. CONCLUSIONES

- Los incrementos de las concentraciones de copias genómicas (CG) de SARS-CoV-2 en las aguas residuales anticiparon, hasta en dos semanas, la ocurrencia de brotes de COVID-19 en los distritos de Huancayo y El Tambo.
- Las CG de rotavirus (RV), norovirus genogrupo II (NoV GGII) y adenovirus humano (HAdV) se presentaron permanentemente y en elevadas concentraciones en todas las muestras de aguas residuales analizadas en este estudio.
- Los incrementos de las concentraciones de CG de RV y HAdV anticiparon, hasta en cuatro semanas, la ocurrencia de brotes de gastroenteritis aguda en niños menores de cuatro años de edad en los distritos de Huancayo y El Tambo. Sin embargo, no tenemos certeza de que estos virus hayan sido la causa.
- La implementación de la Epidemiología Basada en Aguas Residuales como una herramienta de alerta temprana para anticipar brotes del SARS-CoV-2 quedó demostrada en el presente estudio. Es posible que esta herramienta pueda ser aplicada para otros virus.
- La aplicación del análisis directo de las aguas residuales, sin etapa previa de concentración, demostró ser una alternativa eficaz y podría ahorrar tiempo y recursos en la vigilancia del SARS-CoV-2 en condiciones de pandemia.

VII. RECOMENDACIONES

- A pesar que el análisis directo demostró un mayor rendimiento frente a los métodos de concentración de ultrafiltración y floculación con leche desnatada, aún es necesario evaluarla en diferentes contextos, como en condiciones de endenmicidad, donde la carga viral podría mantenerse en niveles mínimos y constantes.

VIII. BIBLIOGRAFÍA CITADA

Aguiar-Oliveira M de L, Campos A, R Matos A, Rigotto C, Sotero-Martins A, Teixeira PFP, Siqueira MM. 2020. Wastewater-Based Epidemiology (WBE) and Viral Detection in Polluted Surface Water: A Valuable Tool for COVID-19 Surveillance-A Brief Review. Int J Environ Res Public Health. 17(24). doi: 10.3390/ijerph17249251.

Ahmed, W., Angel, N., Edson, J., Bibby, K., Bivins, A., O'Brien, J.W., Choi, P.M., Kitajima, M., Simpson, S.L., Li, J., Tscharke, B., Verhagen, R., Smith, W.J.M., Zaugg, J., Dierens, L., Hugenholtz, P., Thomas, K. V, Mueller, J.F. 2020a. First confirmed detection of SARS-CoV-2 in untreated wastewater in Australia: A proof of concept for the wastewater surveillance of COVID-19 in the community. Sci Total Environ. 728: 138764. doi: 10.1016/j.scitotenv.2020.138764.

Ahmed, W., Bertsch, P.M., Bivins, A., Bibby, K., Farkas, K., Gathercole, A., Haramoto, E., Gyawali, P., Korajkic, A., McMinn, B.R., Mueller, J.F., Simpson, S.L., Smith, W.J.M., Symonds, E.M., Thomas, K. V., Verhagen, R., Kitajima, M. 2020b. Comparison of virus concentration methods for the RT-qPCR-based recovery of murine hepatitis virus, a surrogate for SARS-CoV-2 from untreated wastewater. Sci Total Environ. 739(June): 139960. doi: 10.1016/j.scitotenv.2020.139960.

Ahmed, W., Tscharke, B., Bertsch, P.M., Bibby, K., Bivins, A., Choi, P., Clarke, L., Dwyer, J., Edson, J., Nguyen, T.M.H., O'Brien, J.W., Simpson, S.L., Sherman, P., Thomas, K. V, Verhagen, R., Zaugg, J., Mueller, J.F. 2021. SARS-CoV-2 RNA monitoring in wastewater as a potential early warning system for COVID-19 transmission

in the community: A temporal case study. *Sci Total Environ.* 761: 144216. doi: 10.1016/j.scitotenv.2020.144216.

Ampuero JS, Ocaña V, Gómez J, Gamero ME, Garcia J, Halsey ES, Laguna-Torres VA. 2012. Adenovirus respiratory tract infections in Peru. *PLoS One.* 7(10): e46898. doi: 10.1371/journal.pone.0046898.

Asghar, H., Diop, O.M., Weldegebriel, G., Malik, F., Shetty, S., Bassioni, L. El, Akande, A.O., Maamoun, E. Al, Zaidi, S., Adeniji, A.J., Burns, C.C., Deshpande, J., Oberste, M.S., Lowther, S.A. 2014. Environmental surveillance for polioviruses in the global polio eradication initiative. *J Infect Dis.* 210(Suppl 1): S294–S303. doi: 10.1093/infdis/jiu384.

Barril, P.A., Fumian, T.M., Prez, V.E., Gil, P.I., Martínez, L.C., Giordano, M.O., Masachessi, G., Isa, M.B., Ferreyra, L.J., Ré, V.E., Miagostovich, M., Pavan, J. V, Nates, S. V. 2015. Rotavirus seasonality in urban sewage from Argentina: effect of meteorological variables on the viral load and the genetic diversity. *Environ Res.* 138: 409–415. doi: 10.1016/j.envres.2015.03.004.

Barril PA, Pianciola LA, Mazzeo M, Ousset MJ, Jaureguiberry MV, Alessandrello M, Sánchez G, Oteiza JM. 2021. Evaluation of viral concentration methods for SARS-CoV-2 recovery from wastewaters. *Sci Total Environ.* 756: 144105. doi: 10.1016/j.scitotenv.2020.144105.

Barrios ME, Díaz SM, Torres C, Costamagna DM, Blanco Fernández MD, Mbayed VA. 2021. Dynamics of SARS-CoV-2 in wastewater in three districts of the Buenos Aires metropolitan region, Argentina, throughout nine months of surveillance: A pilot study. *Sci Total Environ.* 800: 149578. doi: 10.1016/j.scitotenv.2021.149578.

Calgua B, Mengewein A, Grunert A, Bofill-Mas S, Clemente-Casares P, Hundesa A, Wyn-Jones AP, López-Pila JM, Girones R. 2008. Development and application of a one-step low cost procedure to concentrate viruses from seawater samples. *J Virol Methods.* 153(2): 79–83. doi: 10.1016/j.jviromet.2008.08.003.

Calgua B, Rodriguez-Manzano J, Hundesa A, Suñen E, Calvo M, Bofill-Mas S, Girones R. 2013. New methods for the concentration of viruses from urban sewage using quantitative PCR. *J Virol Methods.* 187(2): 215–221. doi: 10.1016/j.jviromet.2012.10.012.

CENEPRED. 2021. Escenario de riesgo por COVID-19. CENEPRED.

Center for Disease Control. 2019. Research Use Only 2019-Novel Coronavirus (2019-nCoV) Real-time RT-PCR Primers and Probes. CDC's Diagnostic Test COVID-19 Only Supplies [Internet].: 2019–2020. doi: Available from: <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/lab/virus-requests.html>

Chhabra, P., de Graaf, M., Parra, G.I., Chan, M.C.-W., Green, K., Martella, V., Wang, Q., White, P.A., Katayama, K., Vennema, H., Koopmans, M.P.G., Vinjé, J. 2019. Updated classification of norovirus genogroups and genotypes. *J Gen Virol.* 100(10): 1393–1406. doi: 10.1099/jgv.0.001318.

Claro ICM, Cabral AD, Augusto MR, Duran AFA, Graciosa MCP, Fonseca FLA, Speranca MA, Bueno R de F. 2021. Long-term monitoring of SARS-COV-2 RNA in wastewater in Brazil: A more responsive and economical approach. *Water Res.* 203: 117534. doi: 10.1016/j.watres.2021.117534.

Cowpertwait PSP, Metcalfe AV. 2009. *Introductory Time Series with R.* 1^a ed. Springer Science+Business Media, LLC, 233 Spring Street, New York, USA.

Cuevas-Ferrando E, Randazzo W, Pérez-Cataluña A, Sánchez G. 2019. HEV Occurrence in Waste and Drinking Water Treatment Plants. *Front Microbiol.* 10: 2937. doi: 10.3389/fmicb.2019.02937.

Daughton CG. 2001. Emerging pollutants, and communicating the science of environmental chemistry and mass spectrometry: pharmaceuticals in the environment. *J Am Soc Mass Spectrom.* 12(10): 1067–1076. doi: 10.1016/S1044-0305(01)00287-2.

Daughton CG. 2020. Wastewater surveillance for population-wide Covid-19: The present and future. *Sci Total Environ.* 736: 139631. doi: 10.1016/j.scitotenv.2020.139631.

Dey RS, Ghosh S, Chawla-Sarkar M, Panchalingam S, Nataro JP, Sur D, Manna B, Ramamurthy T. 2011. Circulation of a novel pattern of infections by enteric adenovirus serotype 41 among children below 5 years of age in Kolkata, India. *J Clin Microbiol.* 49(2): 500–505. doi: 10.1128/JCM.01834-10.

Elmahdy EM, Shaheen MNF, Rizk NM, Saad-Hussein A. 2020. Quantitative Detection of Human Adenovirus and Human Rotavirus Group A in Wastewater and El-Rahawy Drainage Canal Influencing River Nile in the North of Giza, Egypt. *Food Environ Virol.* 12(3): 218–225. doi: 10.1007/s12560-020-09429-x.

Espinosa MF, Verbyla ME, Vassalle L, Leal C, Leroy-Freitas D, Machado E, Fernandes L, Rosa-Machado AT, Calábria J, Chernicharo C, Mota Filho CR. 2022. Reduction and liquid-solid partitioning of SARS-CoV-2 and adenovirus throughout the different stages of a pilot-scale wastewater treatment plant. *Water Res.* 212: 118069. doi: 10.1016/j.watres.2022.118069.

Fongaro, G., Stoco, P.H., Souza, D.S.M., Grisard, E.C., Magri, M.E., Rogovski, P., Schörner, M.A., Barazzetti, F.H., Christoff, A.P., de Oliveira, L.F.V., Bazzo, M.L., Wagner, G., Hernández, M., Rodríguez-Lázaro, D. 2021. The presence of SARS-CoV-2 RNA in human sewage in Santa Catarina, Brazil, November 2019. *Sci Total Environ.* 778: 146198. doi: 10.1016/j.scitotenv.2021.146198.

Forés E, Bofill-Mas S, Itarte M, Martínez-Puchol S, Hundesa A, Calvo M, Borrego CM, Corominas LL, Girones R, Rusñol M. 2021. Evaluation of two rapid ultrafiltration-based methods for SARS-CoV-2 concentration from wastewater. *Sci Total Environ.* 768: 144786. doi: 10.1016/j.scitotenv.2020.144786.

Fumian TM, Fioretti JM, Lun JH, Dos Santos IAL, White PA, Miagostovich MP. 2019. Detection of norovirus epidemic genotypes in raw sewage using next generation

sequencing. *Environ Int.* 123: 282–291. doi: 10.1016/j.envint.2018.11.054.

Fumian TM, Leite JPG, Castello AA, Gaggero A, Caillou MSL de, Miagostovich MP. 2010. Detection of rotavirus A in sewage samples using multiplex qPCR and an evaluation of the ultracentrifugation and adsorption-elution methods for virus concentration. *J Virol Methods.* 170(1–2): 42–46. doi: 10.1016/j.jviromet.2010.08.017.

Gallardo J, Pérez-Illana M, Martín-González N, San Martín C. 2021. Adenovirus Structure: What Is New? *Int J Mol Sci.* 22(10). doi: 10.3390/ijms22105240.

Giraud-Billoud M, Cuervo P, Altamirano JC, Pizarro M, Aranibar JN, Catapano A, Cuello H, Masachessi G, Vega IA. 2021. Monitoring of SARS-CoV-2 RNA in wastewater as an epidemiological surveillance tool in Mendoza, Argentina. *Sci Total Environ.* 796: 148887. doi: 10.1016/j.scitotenv.2021.148887.

Gonçalves J, Gutiérrez-Aguirre I, Balasubramanian MN, Zagorščak M, Ravnikar M, Turk V. 2018. Surveillance of human enteric viruses in coastal waters using concentration with methacrylate monolithic supports prior to detection by RT-qPCR. *Mar Pollut Bull.* 128: 307–317. doi: 10.1016/j.marpolbul.2018.01.040.

Gonçalves J, Koritnik T, Mioč V, Trkov M, Bolješič M, Berginc N, Prosenč K, Kotar T, Paragi M. 2021. Detection of SARS-CoV-2 RNA in hospital wastewater from a low COVID-19 disease prevalence area. *Sci Total Environ.* 755(Pt 2): 143226. doi: 10.1016/j.scitotenv.2020.143226.

Gonzales-Gustavson, E., Cárdenas-Youngs, Y., Calvo, M., da Silva, M.F.M., Hundesa, A., Amorós, I., Moreno, Y., Moreno-Mesonero, L., Rosell, R., Ganges, L., Araujo, R., Girones, R. 2017. Characterization of the efficiency and uncertainty of skimmed milk flocculation for the simultaneous concentration and quantification of water-borne viruses, bacteria and protozoa. *J Microbiol Methods.* 134: 46–53. doi: 10.1016/j.mimet.2017.01.006.

Gonzales-Gustavson E, Rusñol M, Medema G, Calvo M, Girones R. 2019. Quantitative

risk assessment of norovirus and adenovirus for the use of reclaimed water to irrigate lettuce in Catalonia. *Water Res.* 153: 91–99. doi: <https://doi.org/10.1016/j.watres.2018.12.070>.

Guerrero-Latorre, L., Collado, N., Abasolo, N., Anzaldi, G., Bofill-Mas, S., Bosch, A., Bosch, L., Busquets, S., Caimari, A., Canela, N., Carcereny, A., Chacón, C., Ciruela, P., Corbella, I., Domingo, X., Escoté, X., Espiñeira, Y., Forés, E., Gandullo-Sarró, I., Garcia-Pedemonte, D., Girones, R., Guix, S., Hundesa, A., Itarte, M., Mariné-Casadó, R., Martínez, A., Martínez-Puchol, S., Mas-Capdevila, A., Mejías-Molina, C., Rafa, M.M.I., Munné, A., Pintó, R.M., Pueyo-Ros, J., Robusté-Cartró, J., Rusiñol, M., Sanfeliu, R., Teichenné, J., Torrell, H., Corominas, L., Borrego, C.M. 2022. The Catalan Surveillance Network of SARS-CoV-2 in Sewage: design, implementation, and performance. *Sci Rep.* 12(1): 16704. doi: [10.1038/s41598-022-20957-3](https://doi.org/10.1038/s41598-022-20957-3).

Guerrero-Latorre L, Romero B, Bonifaz E, Timoneda N, Rusiñol M, Girones R, Rios-Touma B. 2018. Quito's virome: Metagenomic analysis of viral diversity in urban streams of Ecuador's capital city. *Sci Total Environ.* 645: 1334–1343. doi: [10.1016/j.scitotenv.2018.07.213](https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.07.213).

Haramoto E, Kitajima M, Katayama H, Ito T, Ohgaki S. 2009. Development of virus concentration methods for detection of koi herpesvirus in water. *J Fish Dis.* 32(3): 297–300. doi: [10.1111/j.1365-2761.2008.00977.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.2008.00977.x).

Haramoto E, Malla B, Thakali O, Kitajima M. 2020. First environmental surveillance for the presence of SARS-CoV-2 RNA in wastewater and river water in Japan. *Sci Total Environ.* 737: 140405. doi: [10.1016/j.scitotenv.2020.140405](https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.140405).

Hart OE, Halden RU. 2020. Computational analysis of SARS-CoV-2/COVID-19 surveillance by wastewater-based epidemiology locally and globally: Feasibility, economy, opportunities and challenges. *Sci Total Environ.* 730: 138875. doi: [10.1016/j.scitotenv.2020.138875](https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.138875).

Hata A, Hara-Yamamura H, Meuchi Y, Imai S, Honda R. 2021. Detection of SARS-

CoV-2 in wastewater in Japan during a COVID-19 outbreak. *Sci Total Environ.* 758: 143578. doi: 10.1016/j.scitotenv.2020.143578.

Hellmér M, Paxéus N, Magnius L, Enache L, Arnholm B, Johansson A, Bergström T, Norder H. 2014. Detection of pathogenic viruses in sewage provided early warnings of hepatitis A virus and norovirus outbreaks. *Appl Environ Microbiol.* 80(21): 6771–6781. doi: 10.1128/AEM.01981-14.

Hernroth BE, Conden-Hansson A-C, Rehnstam-Holm A-S, Girones R, Allard AK. 2002. Environmental factors influencing human viral pathogens and their potential indicator organisms in the blue mussel, *Mytilus edulis*: the first Scandinavian report. *Appl Environ Microbiol.* 68(9): 4523–4533. doi: 10.1128/AEM.68.9.4523-4533.2002.

Hu B, Guo H, Zhou P, Shi Z-L. 2021. Characteristics of SARS-CoV-2 and COVID-19. *Nat Rev Microbiol.* 19(3): 141–154. doi: 10.1038/s41579-020-00459-7.

Huang, Y., Zhou, N., Zhang, S., Yi, Y., Han, Ying, Liu, M., Han, Yue, Shi, N., Yang, L., Wang, Q., Cui, T., Jin, H. 2022. Norovirus detection in wastewater and its correlation with human gastroenteritis: a systematic review and meta-analysis. *Environ Sci Pollut Res Int.* 29(16): 22829–22842. doi: 10.1007/s11356-021-18202-x.

Jafferli MH, Khatami K, Atasoy M, Birgersson M, Williams C, Cetecioglu Z. 2021. Benchmarking virus concentration methods for quantification of SARS-CoV-2 in raw wastewater. *Sci Total Environ.* 755(Pt 1): 142939. doi: 10.1016/j.scitotenv.2020.142939.

Kazama, S., Miura, T., Masago, Y., Konta, Y., Tohma, K., Manaka, T., Liu, X., Nakayama, D., Tanno, T., Saito, M., Oshitani, H., Omura, T. 2017. Environmental Surveillance of Norovirus Genogroups I and II for Sensitive Detection of Epidemic Variants. *Appl Environ Microbiol.* 83(9). doi: 10.1128/AEM.03406-16.

Kim J-S, Lee SK, Ko D-H, Hyun J, Kim H-S, Song W, Kim HS. 2017. Associations of Adenovirus Genotypes in Korean Acute Gastroenteritis Patients with Respiratory Symptoms and Intussusception. *Biomed Res Int.* 2017: 1602054. doi:

10.1155/2017/1602054.

Kitajima M, Ahmed W, Bibby K, Carducci A, Gerba CP, Hamilton KA, Haramoto E, Rose JB. 2020. SARS-CoV-2 in wastewater: State of the knowledge and research needs. *Sci Total Environ.* 739: 139076. doi: 10.1016/j.scitotenv.2020.139076.

Kiulia NM, Gonzalez R, Thompson H, Aw TG, Rose JB. 2021. Quantification and Trends of Rotavirus and Enterovirus in Untreated Sewage Using Reverse Transcription Droplet Digital PCR. *Food Environ Virol.* 13(2): 154–169. doi: 10.1007/s12560-020-09455-9.

Kobayashi, N., Oshiki, M., Ito, T., Segawa, T., Hatamoto, M., Kato, T., Yamaguchi, T., Kubota, K., Takahashi, M., Iguchi, A., Tagawa, T., Okubo, T., Uemura, S., Harada, H., Motoyama, T., Araki, N., Sano, D. 2017. Removal of human pathogenic viruses in a down-flow hanging sponge (DHS) reactor treating municipal wastewater and health risks associated with utilization of the effluent for agricultural irrigation. *Water Res.* 110: 389–398. doi: 10.1016/j.watres.2016.10.054.

Kumar M, Patel AK, Shah A V, Raval J, Rajpara N, Joshi M, Joshi CG. 2020. First proof of the capability of wastewater surveillance for COVID-19 in India through detection of genetic material of SARS-CoV-2. *Sci Total Environ.* 746: 141326. doi: 10.1016/j.scitotenv.2020.141326.

La Rosa G, Bonadonna L, Lucentini L, Kenmoe S, Suffredini E. 2020a. Coronavirus in water environments: Occurrence, persistence and concentration methods - A scoping review. *Water Res.* 179: 115899. doi: 10.1016/j.watres.2020.115899.

La Rosa G, Iaconelli M, Mancini P, Bonanno Ferraro G, Veneri C, Bonadonna L, Lucentini L, Suffredini E. 2020b. First detection of SARS-CoV-2 in untreated wastewaters in Italy. *Sci Total Environ.* 736: 139652. doi: 10.1016/j.scitotenv.2020.139652.

La Rosa G, Mancini P, Bonanno Ferraro G, Veneri C, Iaconelli M, Bonadonna L,

Lucentini L, Suffredini E. 2021. SARS-CoV-2 has been circulating in northern Italy since December 2019: Evidence from environmental monitoring. *Sci Total Environ.* 750: 141711. doi: 10.1016/j.scitotenv.2020.141711.

Lizasoain, A., Tort, L.F.L., García, M., Gillman, L., Alberti, A., Leite, J.P.G., Miagostovich, M.P., Pou, S.A., Cagiao, A., Rzsap, A., Huertas, J., Berois, M., Victoria, M., Colina, R. 2018. Human enteric viruses in a wastewater treatment plant: evaluation of activated sludge combined with UV disinfection process reveals different removal performances for viruses with different features. *Lett Appl Microbiol.* 66(3): 215–221. doi: 10.1111/lam.12839.

Lodder W, de Roda Husman AM. 2020. SARS-CoV-2 in wastewater: potential health risk, but also data source. *lancet Gastroenterol Hepatol.* 5(6): 533–534.

Loisy F, Atmar RL, Guillon P, Le Cann P, Pommepuy M, Le Guyader FS. 2005. Real-time RT-PCR for norovirus screening in shellfish. *J Virol Methods.* 123(1): 1–7. doi: 10.1016/j.jviromet.2004.08.023.

Lynch JP III, Kajon AE. 2016. Adenovirus: Epidemiology, Global Spread of Novel Serotypes, and Advances in Treatment and Prevention. *Semin Respir Crit Care Med.* 37(4): 586–602. doi: 10.1055/s-0036-1584923.

Mabasa V V, Meno KD, Taylor MB, Mans J. 2018. Environmental Surveillance for Noroviruses in Selected South African Wastewaters 2015-2016: Emergence of the Novel GII.17. *Food Environ Virol.* 10(1): 16–28. doi: 10.1007/s12560-017-9316-2.

Madico G, Checkley W, Gilman RH, Bravo N, Cabrera L, Calderon M, Ceballos A. 1996. Active surveillance for *Vibrio cholerae* O1 and vibriophages in sewage water as a potential tool to predict cholera outbreaks. *J Clin Microbiol.* 34(12): 2968–2972. doi: 10.1128/jcm.34.12.2968-2972.1996

Mans J. 2019. Norovirus Infections and Disease in Lower-Middle and Low-Income Countries, 1997–2018. *Viruses.* 11(4). doi: 10.3390/v11040341.

Masachessi G, Castro G, Cachi AM, Marinzalda M de LÁ, Liendo M, Pisano MB, Sicilia P, Ibarra G, Rojas RM, López L, et al. 2022. Wastewater based epidemiology as a silent sentinel of the trend of SARS-CoV-2 circulation in the community in central Argentina. *Water Res.* 219: 118541. doi: 10.1016/j.watres.2022.118541.

Masclaux FG, Hotz P, Friedli D, Savova-Bianchi D, Oppliger A. 2013. High occurrence of hepatitis E virus in samples from wastewater treatment plants in Switzerland and comparison with other enteric viruses. *Water Res.* 47(14): 5101–5109. doi: 10.1016/j.watres.2013.05.050.

McCall C, Wu H, Miyani B, Xagorarakis I. 2020. Identification of multiple potential viral diseases in a large urban center using wastewater surveillance. *Water Res.* 184: 116160. doi: 10.1016/j.watres.2020.116160.

Medema G, Heijnen L, Elsinga G, Italiaander R, Brouwer A. 2020. Presence of SARS-Coronavirus-2 RNA in Sewage and Correlation with Reported COVID-19 Prevalence in the Early Stage of the Epidemic in the Netherlands. *Environ Sci Technol Lett.* 7(7): 511–516. doi: 10.1021/acs.estlett.0c00357.

Ministerio de Vivienda, Construcción y Saneamiento. 2022. Monitoreo epidemiológico del SARS-CoV-2 en aguas residuales: una herramienta temprana del COVID-19. Lima: MVCS. Serie de Boletines Semanales. 11 p.

MINSA. 2022. Centro Nacional de Epidemiología, Prevención y Control de Enfermadades: Boletín Epidemiológico).

Nemudryi A, Nemudraia A, Wiegand T, Surya K, Buyukyoruk M, Cicha C, Vanderwood KK, Wilkinson R, Wiedenheft B. 2020. Temporal Detection and Phylogenetic Assessment of SARS-CoV-2 in Municipal Wastewater. *Cell reports Med.* 1(6): 100098. doi: 10.1016/j.xcrm.2020.100098.

Operario, D.J., Platts-Mills, J.A., Nadan, S., Page, N., Seheri, M., Mphahlele, J., Praharaj, I., Kang, G., Araujo, I.T., Leite, J.P.G., Cowley, D., Thomas, S., Kirkwood,

C.D., Dennis, F., Armah, G., Mwenda, J.M., Wijesinghe, P.R., Rey, G., Grabovac, V., Berejena, C., Simwaka, C.J., Uwimana, J., Sherchand, J.B., Thu, H.M., Galagoda, G., Bonkougou, I.J.O., Jagne, S., Tsolenyanu, E., Diop, A., Enweronu-Laryea, C., Borbor, S.-A., Liu, J., McMurry, T., Lopman, B., Parashar, U., Gentsch, J., Steele, A.D., Cohen, A., Serhan, F., Houpt, E.R. 2017. Etiology of Severe Acute Watery Diarrhea in Children in the Global Rotavirus Surveillance Network Using Quantitative Polymerase Chain Reaction. *J Infect Dis.* 216(2): 220–227. doi: 10.1093/infdis/jix294.

OPS. 2007. Vigilancia epidemiológica de diarreas causadas por rotavirus: guía práctica). Publicación Científica y Técnica No 623 [Internet]. ISBN 92 75: 43. doi: Available from: www.paho.org

OPS. 2021. Guía para el análisis y la cuantificación del SARS-CoV-2 en aguas residuales.

Peccia, J., Zulli, A., Brackney, D.E., Grubaugh, N.D., Kaplan, E.H., Casanovas-Massana, A., Ko, A.I., Malik, A.A., Wang, D., Wang, M., Warren, J.L., Weinberger, D.M., Arnold, W., Omer, S.B. 2020. Measurement of SARS-CoV-2 RNA in wastewater tracks community infection dynamics. *Nat Biotechnol.* 38(10): 1164–1167. doi: 10.1038/s41587-020-0684-z.

Pérez-Cataluña A, Cuevas-Ferrando E, Randazzo W, Falcó I, Allende A, Sánchez G. 2021. Comparing analytical methods to detect SARS-CoV-2 in wastewater. *Sci Total Environ.* 758: 143870. doi: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.143870>.

Philo, S.E., Keim, E.K., Swanstrom, R., Ong, A.Q.W., Burnor, E.A., Kossik, A.L., Harrison, J.C., Demeke, B.A., Zhou, N.A., Beck, N.K., Shirai, J.H., Meschke, J.S. 2021. A comparison of SARS-CoV-2 wastewater concentration methods for environmental surveillance. *Sci Total Environ.* 760: 144215. doi: 10.1016/j.scitotenv.2020.144215.

Platts-Mills, J.A., Babji, S., Bodhidatta, L., Gratz, J., Haque, R., Havt, A., McCormick, B.J., McGrath, M., Olortegui, M.P., Samie, A., Shakoob, S., Mondal, D., Lima, I.F., Hariraju, D., Rayamajhi, B.B., Qureshi, S., Kabir, F., Yori, P.P., Mufamadi, B.,

Amour, C., Carreon, J.D., Richard, S.A., Lang, D., Bessong, P., Mduma, E., Ahmed, T., Lima, A.A., Mason, C.J., Zaidi, A.K., Bhutta, Z.A., Kosek, M., Guerrant, R.L., Gottlieb, M., Miller, M., Kang, G., Houpt, E.R. 2015. Pathogen-specific burdens of community diarrhoea in developing countries: a multisite birth cohort study (MAL-ED). *Lancet Glob Heal.* 3(9): e564-75. doi: 10.1016/S2214-109X(15)00151-5.

Plaza-Garrido A, Ampuero M, Gaggero A, Villamar-Ayala CA. 2023. Norovirus, Hepatitis A and SARS-CoV-2 surveillance within Chilean rural wastewater treatment plants based on different biological treatment typologies. *Sci Total Environ.* 863: 160685. doi: 10.1016/j.scitotenv.2022.160685.

Polo D, Quintela-Baluja M, Corbishley A, Jones DL, Singer AC, Graham DW, Romalde JL. 2020. Making waves: Wastewater-based epidemiology for COVID-19 - approaches and challenges for surveillance and prediction. *Water Res.* 186: 116404. doi: 10.1016/j.watres.2020.116404.

Prado T, de Castro Bruni A, Barbosa MRF, Garcia SC, de Jesus Melo AM, Sato MIZ. 2019. Performance of wastewater reclamation systems in enteric virus removal. *Sci Total Environ.* 678: 33–42. doi: 10.1016/j.scitotenv.2019.04.435.

Prado T, Fumian TM, Mannarino CF, Maranhão AG, Siqueira MM, Miagostovich MP. 2020. Preliminary results of SARS-CoV-2 detection in sewerage system in Niterói municipality, Rio de Janeiro, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 115: e200196. doi: 10.1590/0074-02760200196.

Prado T, Fumian TM, Mannarino CF, Resende PC, Motta FC, Eppinghaus ALF, Chagas do Vale VH, Braz RMS, de Andrade J da SR, Maranhão AG, Miagostovich MP. 2021. Wastewater-based epidemiology as a useful tool to track SARS-CoV-2 and support public health policies at municipal level in Brazil. *Water Res.* 191: 116810. doi: 10.1016/j.watres.2021.116810.

R Core Team. 2023. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.

Ramos M, Soto G, Loayza L, Valle R, Luna G, Gonzalez S, Quispe J, Silva M, Wong J, Bausch DG. 2015. Brote de Infección por Norovirus del Grupo II en un Centro de Entrenamiento Militar, Perú 2013. *Rev Peru Med Exp Salud Publica* [Internet]. 32: 87–92. doi: Available from: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1726-46342015000100013&nrm=iso

Randazzo W, Piqueras J, Evtoski Z, Sastre G, Sancho R, Gonzalez C, Sánchez G. 2019. Interlaboratory Comparative Study to Detect Potentially Infectious Human Enteric Viruses in Influent and Effluent Waters. *Food Environ Virol.* 11(4): 350–363. doi: 10.1007/s12560-019-09392-2.

Randazzo W, Truchado P, Cuevas-Ferrando E, Simón P, Allende A, Sánchez G. 2020. SARS-CoV-2 RNA in wastewater anticipated COVID-19 occurrence in a low prevalence area. *Water Res.* 181: 115942. doi: 10.1016/j.watres.2020.115942.

Rodriguez D, Serrano H, Delgado A, Nolasco D, Saltiel G. 2018. De residuo a recurso: Cambiando paradigmas para intervenciones más inteligentes para la gestión de aguas residuales en América Latina y el Caribe. *Bancomundial.org* [Internet]. Available from: <https://openknowledge.worldbank.org/bitstream/handle/10986/33436/146823SP.pdf>

Rojas M, Dias HG, Gonçalves JLS, Manchego A, Rosadio R, Pezo D, Santos N. 2019. Genetic diversity and zoonotic potential of rotavirus A strains in the southern Andean highlands, Peru. *Transbound Emerg Dis.* 66(4): 1718–1726. doi: 10.1111/tbed.13207.

Rusiñol M, Fernandez-Cassi X, Hundesa A, Vieira C, Kern A, Eriksson I, Ziros P, Kay D, Miagostovich M, Vargha M, Allard A, Vantarakis A, Wyn-Jones P, Bofill-Mas S, Girones R. 2014. Application of human and animal viral microbial source tracking tools in fresh and marine waters from five different geographical areas. *Water Res.* 59: 119–129. doi: 10.1016/j.watres.2014.04.013.

Rusiñol M, Girones R. 2017. Summary of Excreted and Waterborne Viruses. *Water Sanit 21st Century Heal Microbiol Asp Excreta Wastewater Manag (Global Water Pathog Proj.* doi: 10.14321/waterpathogens.19.

Rusiñol M, Zammit I, Itarte M, Forés E, Martínez-Puchol S, Girones R, Borrego C, Corominas L, Bofill-Mas S. 2021. Monitoring waves of the COVID-19 pandemic: Inferences from WWTPs of different sizes. *Sci Total Environ.* 787: 147463. doi: 10.1016/j.scitotenv.2021.147463.

Sadiq A, Bostan N, Yinda KC, Naseem S, Sattar S. 2018. Rotavirus: Genetics, pathogenesis and vaccine advances. *Rev Med Virol.* 28(6): e2003. doi: 10.1002/rmv.2003.

Saguti, F., Magnil, E., Enache, L., Churqui, M.P., Johansson, A., Lumley, D., Davidsson, F., Dotevall, L., Mattsson, A., Trybala, E., Lagging, M., Lindh, M., Gisslén, M., Brezicka, T., Nyström, K., Norder, H. 2021. Surveillance of wastewater revealed peaks of SARS-CoV-2 preceding those of hospitalized patients with COVID-19. *Water Res.* 189: 116620. doi: 10.1016/j.watres.2020.116620.

Saito, M., Goel-Apaza, S., Espetia, S., Velasquez, D., Cabrera, L., Loli, S., Crabtree, J.E., Black, R.E., Kosek, M., Checkley, W., Zimic, M., Bern, C., Cama, V., Gilman, R.H. 2014. Multiple norovirus infections in a birth cohort in a Peruvian Periurban community. *Clin Infect Dis.* 58(4): 483–491. doi: 10.1093/cid/cit763.

Salvo M, Moller A, Alvareda E, Gamazo P, Colina R, Victoria M. 2021. Evaluation of low-cost viral concentration methods in wastewaters: Implications for SARS-CoV-2 pandemic surveillances. *J Virol Methods.* 297: 114249. doi: 10.1016/j.jviromet.2021.114249.

Sherchan SP, Shahin S, Ward LM, Tandukar S, Aw TG, Schmitz B, Ahmed W, Kitajima M. 2020. First detection of SARS-CoV-2 RNA in wastewater in North America: A study in Louisiana, USA. *Sci Total Environ.* 743: 140621. doi: 10.1016/j.scitotenv.2020.140621.

Silva-Sales M, Martínez-Puchol S, Gonzales-Gustavson E, Hundesa A, Gironès R. 2020. High Prevalence of Rotavirus A in Raw Sewage Samples from Northeast Spain. *Viruses.* 12(3). doi: 10.3390/v12030318.

Sims N, Kasprzyk-Hordern B. 2020. Future perspectives of wastewater-based epidemiology: Monitoring infectious disease spread and resistance to the community level. *Environ Int.* 139: 105689. doi: 10.1016/j.envint.2020.105689.

Singer AC, Järhult JD, Grabic R, Khan GA, Fedorova G, Fick J, Lindberg RH, Bowes MJ, Olsen B, Söderström H. 2013. Compliance to oseltamivir among two populations in Oxfordshire, United Kingdom affected by influenza A(H1N1)pdm09, November 2009--a waste water epidemiology study. *PLoS One.* 8(4): e60221. doi: 10.1371/journal.pone.0060221.

Stehlík M, Ibacache-Quiroga C, Dinamarca MA, Gonzalez-Pizarro K, Valdivia-Carrera CA, Gonzales-Gustavson E, Ho-Palma AC, Barraza-Morales B. 2023. On asymmetric relations and robustified cross-correlation approach to surveillance based on detection of SARS-CoV-2 in wastewater in Chile and Perú. *Chemom Intell Lab Syst.:* 104987. doi: <https://doi.org/10.1016/j.chemolab.2023.104987>.

Symonds EM, Griffin DW, Breitbart M. 2009. Eukaryotic viruses in wastewater samples from the United States. *Appl Environ Microbiol.* 75(5): 1402–1409. doi: 10.1128/AEM.01899-08.

Tandukar S, Sthapit N, Thakali O, Malla B, Sherchan SP, Shakya BM, Shrestha LP, Sherchand JB, Joshi DR, Lama B, Haramoto E. 2022. Detection of SARS-CoV-2 RNA in wastewater, river water, and hospital wastewater of Nepal. *Sci Total Environ.* 824: 153816. doi: 10.1016/j.scitotenv.2022.153816.

Tang A, Tong Z-D, Wang H-L, Dai Y-X, Li K-F, Liu J-N, Wu W-J, Yuan C, Yu M-L, Li P, Yan J-B. 2020. Detection of Novel Coronavirus by RT-PCR in Stool Specimen from Asymptomatic Child, China. *Emerg Infect Dis.* 26(6): 1337–1339. doi: 10.3201/eid2606.200301.

Tohmé MJ, Delgui LR. 2021. Advances in the Development of Antiviral Compounds for Rotavirus Infections. *MBio.* 12(3). doi: 10.1128/mBio.00111-21.

van Beek, J., de Graaf, M., Al-Hello, H., Allen, D.J., Ambert-Balay, K., Botteldoorn, N., Brytting, M., Buesa, J., Cabrerizo, M., Chan, M., Cloak, F., Di Bartolo, I., Guix, S., Hewitt, J., Iritani, N., Jin, M., Johne, R., Lederer, I., Mans, J., Martella, V., Maunula, L., McAllister, G., Niendorf, S., Niesters, H.G., Podkolzin, A.T., Poljsak-Prijatelj, M., Rasmussen, L.D., Reuter, G., Tuite, G., Kroneman, A., Vennema, H., Koopmans, M.P.G. 2018. Molecular surveillance of norovirus, 2005-16: an epidemiological analysis of data collected from the NoroNet network. *Lancet Infect Dis.* 18(5): 545–553. doi: 10.1016/S1473-3099(18)30059-8.

Wang H, Neyvaldt J, Enache L, Sikora P, Mattsson A, Johansson A, Lindh M, Bergstedt O, Norder H. 2020. Variations among Viruses in Influent Water and Effluent Water at a Wastewater Plant over One Year as Assessed by Quantitative PCR and Metagenomics. *Appl Environ Microbiol.* 86(24). doi: 10.1128/AEM.02073-20.

Westhaus S, Weber F-A, Schiwy S, Linnemann V, Brinkmann M, Widera M, Greve C, Janke A, Hollert H, Wintgens T, Ciesek S. 2021. Detection of SARS-CoV-2 in raw and treated wastewater in Germany - Suitability for COVID-19 surveillance and potential transmission risks. *Sci Total Environ.* 751: 141750. doi: 10.1016/j.scitotenv.2020.141750.

Whitney, O.N., Kennedy, L.C., Fan, V., Hinkle, A., Kantor, R., Greenwald, H., Crits-Christoph, A., Al-Shayeb, B., Chaplin, M., Maurer, A.C., Tjian, R., Nelson, K.L. 2020. Sewage, Salt, Silica and SARS-CoV-2 (4S): An economical kit-free method for direct capture of SARS-CoV-2 RNA from wastewater. *medRxiv Prepr Serv Heal Sci.*

Wilhelm, A., Schoth, J., Meinert-Berning, C., Agrawal, S., Bastian, D., Orschler, L., Ciesek, S., Teichgräber, B., Wintgens, T., Lackner, S., Weber, F.-A., Widera, M. 2022. Wastewater surveillance allows early detection of SARS-CoV-2 omicron in North Rhine-Westphalia, Germany. *Sci Total Environ.* 846: 157375. doi: 10.1016/j.scitotenv.2022.157375.

Wölfel, R., Corman, V.M., Guggemos, W., Seilmaier, M., Zange, S., Müller, M.A., Niemeyer, D., Jones, T.C., Vollmar, P., Rothe, C., Hoelscher, M., Bleicker, T., Brünink,

S., Schneider, J., Ehmann, R., Zwirgmaier, K., Drosten, C., Wendtner, C. 2020. Virological assessment of hospitalized patients with COVID-2019. *Nature*. 581(7809): 465–469. doi: 10.1038/s41586-020-2196-x.

Wu C-R, Yin W-C, Jiang Y, Xu HE. 2022. Structure genomics of SARS-CoV-2 and its Omicron variant: drug design templates for COVID-19. *Acta Pharmacol Sin*. 43(12): 3021–3033. doi: 10.1038/s41401-021-00851-w.

Wu, F., Zhang, J., Xiao, A., Gu, X., Lee, W.L., Armas, F., Kauffman, K., Hanage, W., Matus, M., Ghaeli, N., Endo, N., Duvallat, C., Poyet, M., Moniz, K., Washburne, A.D., Erickson, T.B., Chai, P.R., Thompson, J., Alm, E.J. 2020. SARS-CoV-2 Titers in Wastewater Are Higher than Expected from Clinically Confirmed Cases. *mSystems*. 5(4). doi: 10.1128/mSystems.00614-20.

Wurtzer, S., Waldman, P., Levert, M., Cluzel, N., Almayrac, J.L., Charpentier, C., Masnada, S., Gillon-Ritz, M., Mouchel, J.M., Maday, Y., Boni, M., Marechal, V., Moulin, L. 2022. SARS-CoV-2 genome quantification in wastewaters at regional and city scale allows precise monitoring of the whole outbreaks dynamics and variants spreading in the population. *Sci Total Environ*. 810: 152213. doi: 10.1016/j.scitotenv.2021.152213.

Ye Y, Ellenberg RM, Graham KE, Wigginton KR. 2016. Survivability, Partitioning, and Recovery of Enveloped Viruses in Untreated Municipal Wastewater. *Environ Sci Technol*. 50(10): 5077–5085. doi: 10.1021/acs.est.6b00876.

Zeng SQ, Halkosalo A, Salminen M, Szakal ED, Puustinen L, Vesikari T. 2008. One-step quantitative RT-PCR for the detection of rotavirus in acute gastroenteritis. *J Virol Methods*. 153(2): 238–240. doi: 10.1016/j.jviromet.2008.08.004.

Zhang, D., Ling, H., Huang, X., Li, J., Li, W., Yi, C., Zhang, T., Jiang, Y., He, Y., Deng, S., Zhang, X., Wang, X., Liu, Y., Li, G., Qu, J. 2020. Potential spreading risks and disinfection challenges of medical wastewater by the presence of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) viral RNA in septic tanks of Fangcang Hospital. *Sci Total Environ*. 741: 140445. doi:

10.1016/j.scitotenv.2020.140445.

Zhang, D., Zhang, X., Yang, Y., Huang, X., Jiang, J., Li, M., Ling, H., Li, J., Liu, Y., Li, G., Li, W., Yi, C., Zhang, T., Jiang, Y., Xiong, Y., He, Z., Wang, X., Deng, S., Zhao, P., Qu, J. 2021. SARS-CoV-2 spillover into hospital outdoor environments. *J Hazard Mater Lett.* 2: 100027. doi: 10.1016/j.hazl.2021.100027.

Zhou, H., Chen, X., Hu, T., Li, J., Song, H., Liu, Y., Wang, P., Liu, D., Yang, J., Holmes, E.C., Hughes, A.C., Bi, Y., Shi, W. 2020. A Novel Bat Coronavirus Closely Related to SARS-CoV-2 Contains Natural Insertions at the S1/S2 Cleavage Site of the Spike Protein. *Curr Biol.* 30(19): 3896.

Zhou N, Lin X, Wang S, Tao Z, Xiong P, Wang H, Liu Y, Song Y, Xu A. 2016. Molecular epidemiology of GI and GII noroviruses in sewage: 1-year surveillance in eastern China. *J Appl Microbiol.* 121(4): 1172–1179. doi: 10.1111/jam.13218.

Zhou, P., Yang, X.-L., Wang, X.-G., Hu, B., Zhang, L., Zhang, W., Si, H.-R., Zhu, Y., Li, B., Huang, C.-L., Chen, H.-D., Chen, J., Luo, Y., Guo, H., Jiang, R.-D., Liu, M.-Q., Chen, Y., Shen, X.-R., Wang, X., Zheng, X.-S., Zhao, K., Chen, Q.-J., Deng, F., Liu, L.-L., Yan, B., Zhan, F.-X., Wang, Y.-Y., Xiao, G.-F., Shi, Z.-L. 2020. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature.* 579(7798): 270–273. doi: 10.1038/s41586-020-2012-7.

Zuccato E, Chiabrando C, Castiglioni S, Calamari D, Bagnati R, Schiarea S, Fanelli R. 2005. Cocaine in surface waters: a new evidence-based tool to monitor community drug abuse. *Environ Health.* 4: 14. doi: 10.1186/1476-069X-4-14.

IX. APÉNDICE

Anexo 1. Imágenes del punto colector “Daniel Alcides Carrión” del distrito de Huancayo y áreas aledañas.



Anexo 2. Imágenes del punto colector “Parra del Riego” del distrito de El Tambo y áreas aledañas.



Anexo 3. Protocolo de extracción de ácidos nucleicos “MagMAX™ Viral/Pathogen Nucleic Acid Isolation Kit”.

EXTRACCIÓN DE ÁCIDO NUCLEICO VIRAL (ARN / ADN) VIRAL A PARTIR DE MUESTRA DE AGUA RESIDUAL

EXTRACCIÓN DE ALTO RENDIMIENTO DE ÁCIDO NUCLEICO (ADN / ARN) VIRAL Y BACTERIANO A PARTIR DE FLUIDO ORGÁNICO O MEDIO DE TRANSPORTE

High throughput isolation of viral nucleic acid (RNA / DNA)
from biofluids and transport media (A42352)

MagMAX™ Viral/Pathogen Nucleic Acid Isolation Kit

DESCRIPCIÓN DEL KIT:

The Applied Biosystems™ MagMAX™ Viral/Pathogen Nucleic Acid Isolation Kit ha sido desarrollado para la cuantificación y purificación rápida de ácido nucleico (ADN / ARN) viral y bacteriano fácil de lisar a partir de fluido orgánico o medio de transporte. El ácido nucleico purificado obtenido puede ser utilizado para diversas aplicaciones de biología molecular, como qPCR en tiempo real, RT-PCR en tiempo real y secuenciamiento.

COMPONENTE	CANTIDAD	ALMACENAMIENTO
Binding Solution	53 mL.	15 - 25°C
Dynabeads®	2 mL.	
Proteinase K	1 mL.	
Wash Buffer	100 mL.	
Elution Solution	10 mL.	

REGLAS GENERALES:

- Realizar todo el procedimiento de extracción de ácido nucleico a temperatura ambiente (20-25°C).

- Antes del primer uso del kit, preparar etanol 80° a partir de etanol absoluto molecular y agua libre de nucleasas. Es necesario considerar que se utilizará 1500 µL. por cada muestra.
- En caso se produzca la formación de precipitado en Binding Solution, debido a una temperatura ambiente demasiado fría, se deberá calentar el reactivo a 37°C durante 5 minutos y homogenizarlo manualmente invirtiéndolo con cuidado evitando la formación de burbujas.
- El volumen de partida es de 200 µL. de muestra de agua residual (200 µL. de agua residual floculada con leche desnatada / 200 µL. de agua residual concentrada con ultrafiltración / 200 µL. de agua residual del análisis directo).
- Trabajar con el rack de enfriamiento para reducir la degradación del ARN viral.

PROCESAMIENTO DE LA MUESTRA:

1. DIGESTIÓN ARTIFICIAL CON PROTEINASE K.

- 1.1. Vortexear la muestra de agua residual floculada con leche desnatada para homogenizarla y transferir 100-200 µL. a un vial Eppendorf (1.5 mL.) (1)* nuevo. En caso se transfiera sólo 100 µL. de muestra, será necesario adicionar 100 µL. de agua libre de nucleasas. Por otra parte, agregar 200 µL. de la muestra de agua mineral floculada con leche desnatada o agua libre de nucleasas en otro vial Eppendorf (1.5 mL.) (control negativo de extracción).

A partir de esta indicación, el vial Eppendorf (1.5 mL.) (1)* será denominado “muestra”.

- 1.2. Agregar 10 µL. de Proteinase K a la muestra.

Debido a la elevada densidad del reactivo, es necesario pipetear lentamente y no reutilizar la punta con el objetivo de extraer el volumen exacto.

- 1.3. Homogenizar manualmente los Dynabeads® realizando movimiento circulares y agregar 20 µL. a la muestra.

En este punto, es posible utilizar una sola punta para agregar los Dynabeads® a las diferentes muestras. Evitar contaminar la punta.

- 1.4. Agregar 530 µL. de Binding Solution a la muestra.

Debido a la elevada densidad del reactivo, es necesario pipetear lentamente y no reutilizar la punta con el objetivo de extraer el volumen exacto.

- 1.5. Aplicar las siguientes condiciones:

1° Agitar a 1050 rpm durante 2 minutos a temperatura ambiente.

2° Incubar a 65°C durante 5 minutos.

3° Agitar a 1050 rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente.

- 1.6. Colocar la muestra en la rejilla del imán DynaMag™ -2 en reposo durante 10 minutos. Posteriormente, eliminar el sobrenadante con la pipeta evitando alterar los Dynabeads®.

2. LAVADO DE Dynabeads®.

- 2.1. Retirar la muestra de la rejilla del imán DynaMag™ -2.

- 2.2. Agregar 1000 µL. de Wash Buffer a la muestra.

Debido a la elevada densidad del reactivo, es necesario pipetear lentamente y no reutilizar la punta con el objetivo de extraer el volumen exacto.

- 2.3. Agitar a 1050 rpm durante 1 minuto a temperatura ambiente.

- 2.4. Colocar la muestra en la rejilla del imán DynaMag™ -2 en reposo durante 2 minutos. Posteriormente, eliminar el sobrenadante con la pipeta evitando alterar los Dynabeads®.

- 2.5. Retirar la muestra de la rejilla del imán DynaMag™ -2.

- 2.6. Agregar 1000 µL. de etanol 80° a la muestra.

- 2.7. Agitar a 1050 rpm durante 1 minuto a temperatura ambiente.

- 2.8. Colocar la muestra en la rejilla del imán DynaMag™ -2 en reposo durante 2 minutos. Posteriormente, eliminar el sobrenadante con la pipeta evitando alterar los Dynabeads®.

- 2.9. Retirar la muestra de la rejilla del imán DynaMag™ -2.

- 2.10. Agregar 500 µL. de etanol 80° a la muestra.

- 2.11. Agitar a 1050 rpm durante 1 minuto a temperatura ambiente.

- 2.12. Colocar la muestra en la rejilla del imán DynaMag™ -2 en reposo durante 2 minutos. Posteriormente, eliminar el sobrenadante con la pipeta evitando alterar los Dynabeads®.

- 2.13. Agitar la muestra destapada a 1050 rpm durante 2 minutos a temperatura ambiente.

3. ELUCIÓN DE ÁCIDO NUCLEICO.

- 3.1. Agregar 50 µL. de Elution Solution a la muestra.

- 3.2. Aplicar las siguientes condiciones:

1° Agitar a 1050 rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente.

2° Incubar a 65°C durante 10 minutos.

3° Agitar a 1050 rpm durante 5 minutos temperatura ambiente.

3.3. Colocar la muestra en la rejilla del imán DynaMag™ -2 en reposo durante 3 minutos. Posteriormente, extraer el sobrenadante (ácido nucleico) con la pipeta evitando alterar los Dynabeads®.

3.4. Transferir el sobrenadante (ácido nucleico) a un vial Eppendorf (1.5 mL.) (2)* nuevo y cerrar de inmediato para evitar la evaporación.

LA MUESTRA DE ÁCIDO NUCLEICO ESTÁ LISTA PARA LA REACCIÓN ENCADENA DE LA POLIMERASA EN TIEMPO REAL (qPCR).

4. MANTENER LA MUESTRA A -20°C PARA SU CONSERVACIÓN.

- Para iniciar la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR), es necesario descongelar la muestra de ácido nucleico a temperatura ambiente y almacenarla inmediatamente después de su uso en el rack de congelación.
- La elevada concentración de Dynabeads® en la muestra de ácido nucleico puede afectar negativamente el rendimiento de la PCR cuantitativa en tiempo real.

* El número entre paréntesis indica la cantidad de viales Eppendorf (1.5 mL.) que se utilizarán por cada muestra.

Anexo 4. Registro semanal del número de casos de COVID-19 en los distritos de Huancayo y El Tambo por la Dirección Regional de Salud (DIRESA), Junín.

Semana Epidemiológica	Distrito de Huancayo	Distrito de El Tambo
1 / 2022	930	1084
2 / 2022	1379	1474
3 / 2022	1270	1602
4 / 2022	889	981
5 / 2022	819	1163
6 / 2022	342	716
7 / 2022	165	368
8 / 2022	219	340
9 / 2022	79	175
10 / 2022	24	42
11 / 2022	14	31
12 / 2022	27	47
13 / 2022	59	34
14 / 2022	27	16
15 / 2022	16	18
16 / 2022	8	58
17 / 2022	35	19
18 / 2022	23	5
19 / 2022	19	8
20 / 2022	14	17
21 / 2022	14	21
22 / 2022	38	44
23 / 2022	45	53
24 / 2022	114	144
25 / 2022	153	155
26 / 2022	284	331
27 / 2022	600	609
28 / 2022	483	478
29 / 2022	413	399
30 / 2022	413	399
31 / 2022	413	394
32 / 2022	302	317
33 / 2022	165	271
34 / 2022	130	318
35 / 2022	126	315
36 / 2022	54	233
37 / 2022	39	265
38 / 2022	34	99
39 / 2022	27	55
40 / 2022	4	14
41 / 2022	6	12
42 / 2022	2	3
43 / 2022	1	3

44 / 2022	17	15
45 / 2022	24	25
46 / 2022	61	75
47 / 2022	142	205
48 / 2022	324	395
49 / 2022	340	404

Anexo 5. Registro del número de casos de gastroenteritis aguda por cada semana epidemiológica (SE) realizado por la Dirección Regional de Salud (DIRESA), Junín, en los distritos de Huancayo y El Tambo.

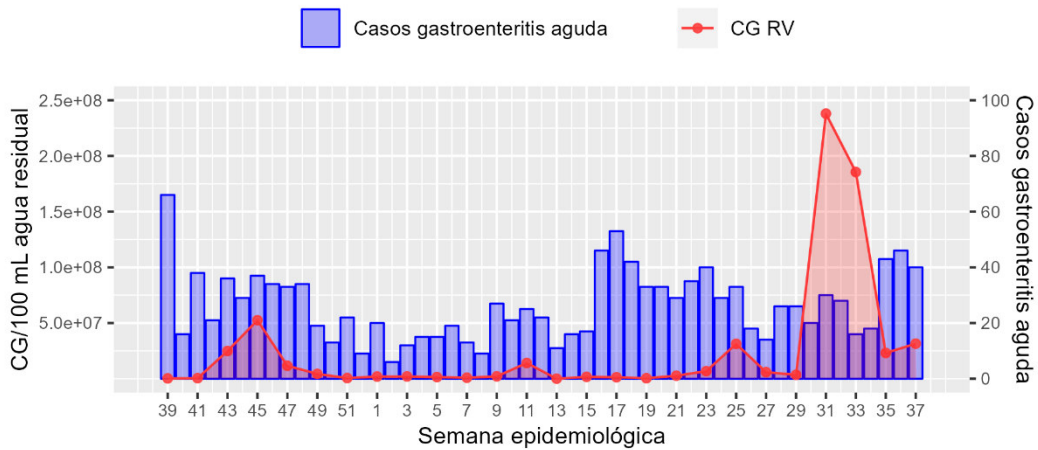
SE	Distrito de Huancayo				Distrito de El Tambo			
	<1 año	1-4 años	>5 años	Total	<1 año	1-4 años	>5 años	Total
37 / 2021	NA	NA	NA	NA	6	12	21	39
38 / 2021	NA	NA	NA	NA	3	13	18	34
39 / 2021	2	15	49	66	2	11	19	32
40 / 2021	1	6	9	16	3	22	35	60
41 / 2021	3	10	25	38	3	17	22	42
42 / 2021	0	5	16	21	3	16	28	47
43 / 2021	3	16	17	36	2	15	40	57
44 / 2021	5	8	16	29	4	16	34	54
45 / 2021	1	13	23	37	6	13	39	58
46 / 2021	7	12	15	34	2	22	31	55
47 / 2021	1	13	19	33	3	20	27	50
48 / 2021	4	13	17	34	4	8	34	46
49 / 2021	3	5	11	19	5	9	23	37
50 / 2021	0	5	8	13	3	16	24	43
51 / 2021	3	2	17	22	1	9	16	26
52 / 2021	1	5	3	9	1	9	14	24
1 / 2022	1	5	14	20	1	7	26	34
2 / 2022	2	1	3	6	3	4	22	29
3 / 2022	1	3	8	12	4	13	31	48
4 / 2022	2	4	9	15	4	14	18	36
5 / 2022	1	4	10	15	5	13	17	35
6 / 2022	3	6	10	19	5	3	12	20
7 / 2022	1	3	9	13	5	4	24	33
8 / 2022	1	3	5	9	3	16	14	33
9 / 2022	5	7	15	27	4	8	19	31
10 / 2022	6	7	8	21	3	11	12	26
11 / 2022	3	10	12	25	6	6	28	40
12 / 2022	5	4	13	22	6	15	12	33
13 / 2022	2	4	5	11	64	9	20	93
14 / 2022	2	3	11	16	3	14	20	37
15 / 2022	2	5	10	17	3	8	17	28
16 / 2022	4	13	29	46	3	7	23	33
17 / 2022	6	16	31	53	2	10	23	35
18 / 2022	6	13	23	42	3	7	30	40
19 / 2022	4	5	24	33	4	18	32	54
20 / 2022	1	7	25	33	7	13	45	65
21 / 2022	2	9	18	29	5	5	20	30
22 / 2022	0	9	26	35	7	15	31	53
23 / 2022	3	15	22	40	5	18	19	42
24 / 2022	2	11	16	29	3	11	17	31

25 / 2022	1	8	24	33	2	9	26	37
26 / 2022	2	3	13	18	6	19	21	46
27 / 2022	4	4	6	14	2	13	20	35
28 / 2022	4	12	10	26	9	15	36	60
29 / 2022	3	8	15	26	11	11	36	58
30 / 2022	2	8	10	20	5	14	21	40
31 / 2022	6	11	13	30	9	13	18	40
32 / 2022	2	8	18	28	5	15	36	56
33 / 2022	2	5	9	16	7	10	26	43
34 / 2022	2	5	11	18	6	19	23	48
35 / 2022	7	18	18	43	6	30	24	60
36 / 2022	2	14	30	46	8	22	29	59
37 / 2022	6	8	26	40	13	14	34	61

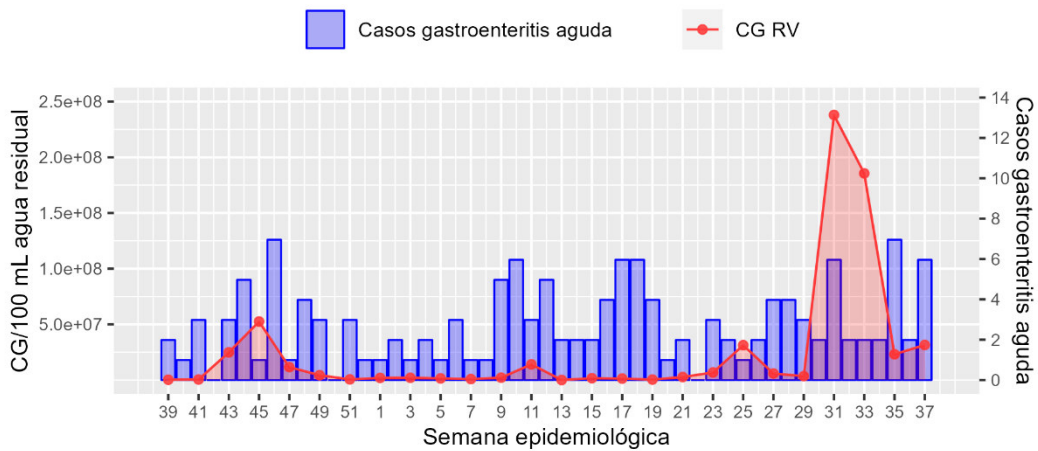
Los casos de gastroenteritis aguda fueron clasificados en cuatro grupos: menor a 1 año de edad, entre 1 a 4 años de edad, mayor de 5 años de edad y total.

Anexo 6. Monitoreo de las concentraciones de rotavirus (RV) en las aguas residuales y registro semanal de los casos de gastroenteritis aguda en el distrito de Huancayo. Las barras azules representan los casos notificados de gastroenteritis aguda en total (A), en niños menores de 1 año (B) y en personas mayores de 5 años (C), mientras que la línea roja representa las concentraciones de copias genómicas (CG) de RV por 100 mL de muestra de agua residual evaluadas a lo largo de las semanas epidemiológicas.

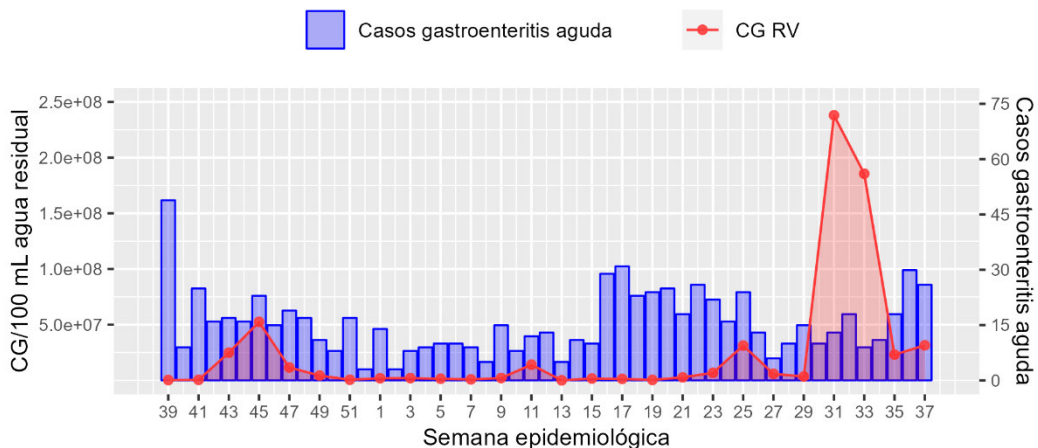
A Total



B Niños menores de un año de edad

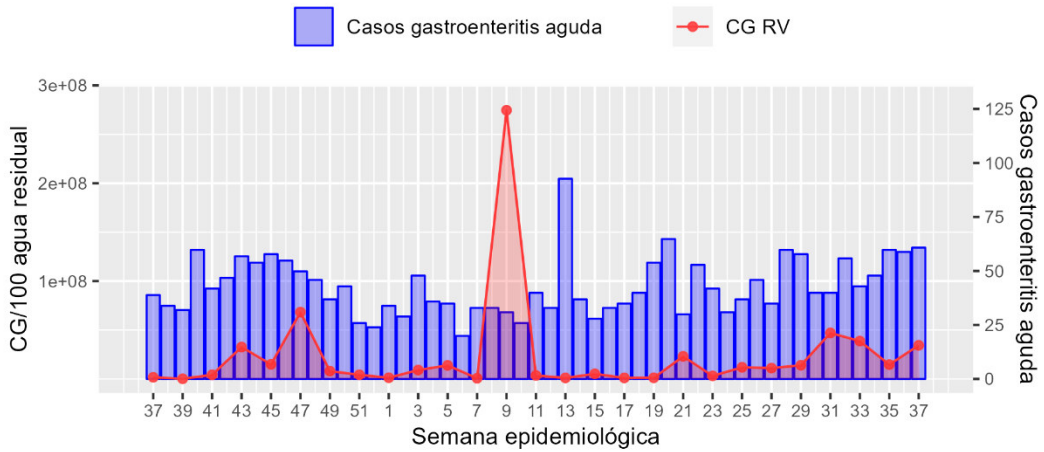


C Personas mayores de cinco años de edad

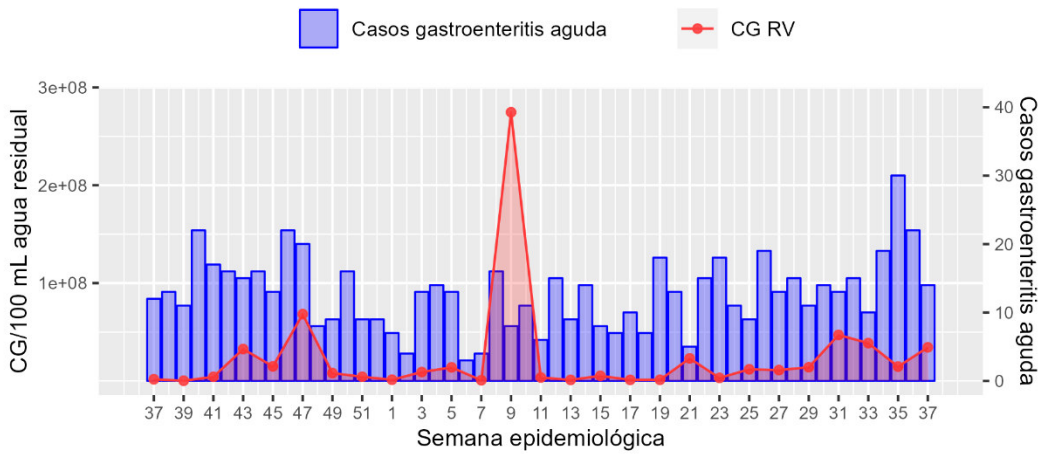


Anexo 7. Monitoreo de las concentraciones de rotavirus (RV) en las aguas residuales y registro semanal de los casos de gastroenteritis aguda en el distrito de El Tambo. Las barras azules representan el total de casos notificados de gastroenteritis aguda (A), en niños de 1 a 4 años (B) y en personas mayores de 5 años (C), mientras que la línea roja representa las concentraciones de copias genómicas (CG) de RV por 100 mL de muestra de agua residual evaluadas a lo largo de las semanas epidemiológicas.

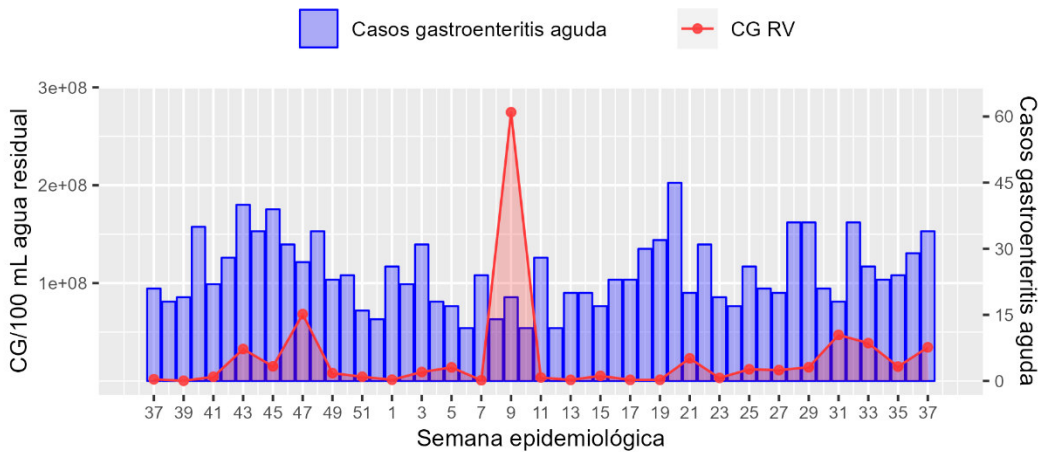
A Total



B Niños entre uno a cuatro años de edad

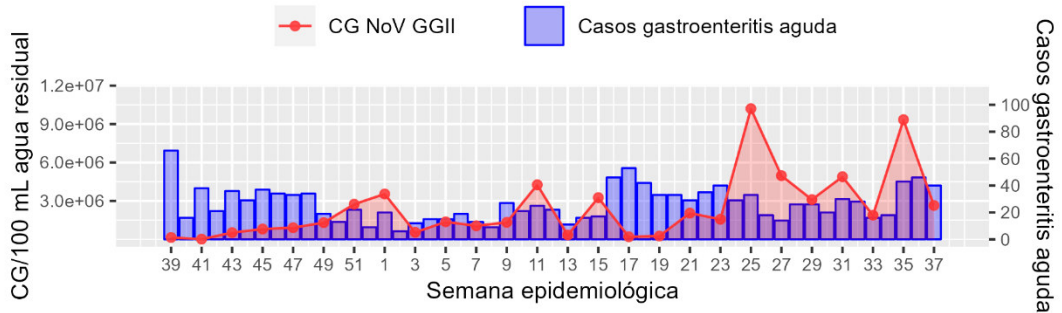


C Personas mayores de cinco años de edad

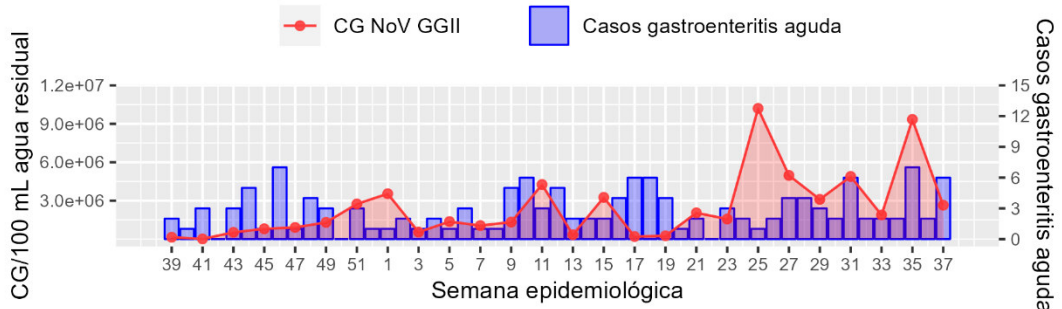


Anexo 8. Monitoreo de las concentraciones de norovirus genogrupo II (NoV GGII) en las aguas residuales y registro semanal de los casos de gastroenteritis aguda en el distrito de Huancayo. Las barras azules representan los casos notificados de gastroenteritis aguda en total (A), en niños menores de 1 año (B), en niños de 1 a 4 años (C) y en personas mayores 5 años de edad (D), mientras que la línea roja representa las concentraciones de copias genómicas (CG) de NoV GGII por 100 mL de muestra de agua residual evaluadas a lo largo de las semanas epidemiológicas.

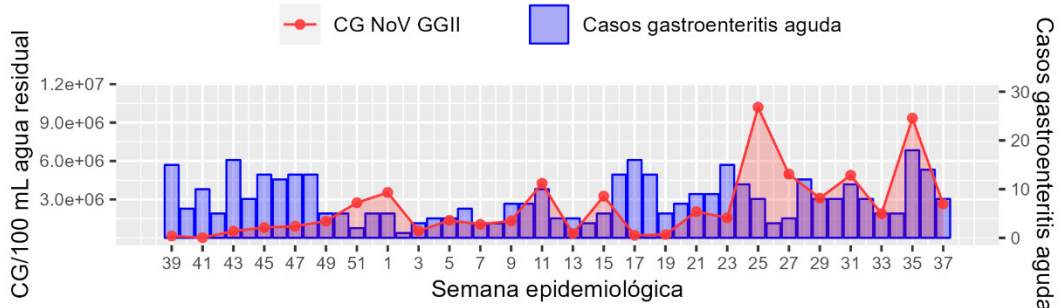
A Total



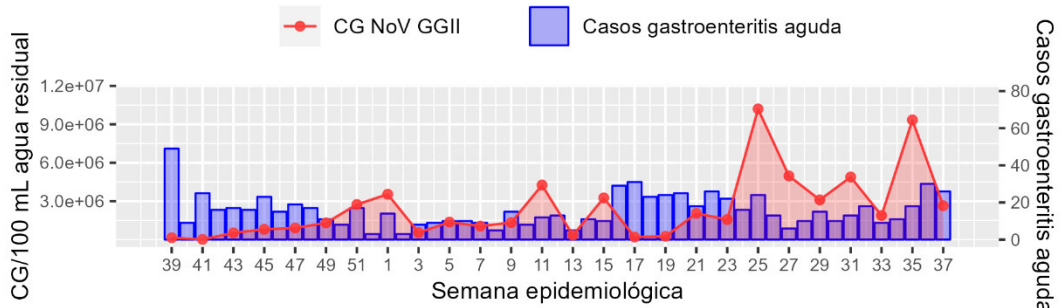
B Niños menores de un año de edad



C Niños entre uno a cuatro años

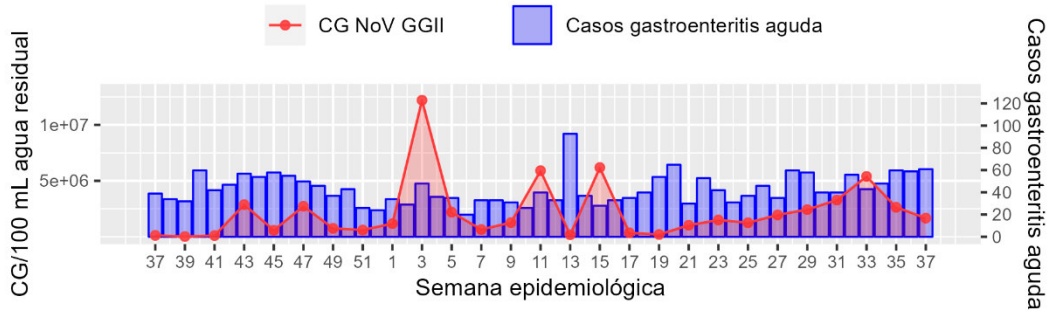


D Personas mayores de cinco años de edad

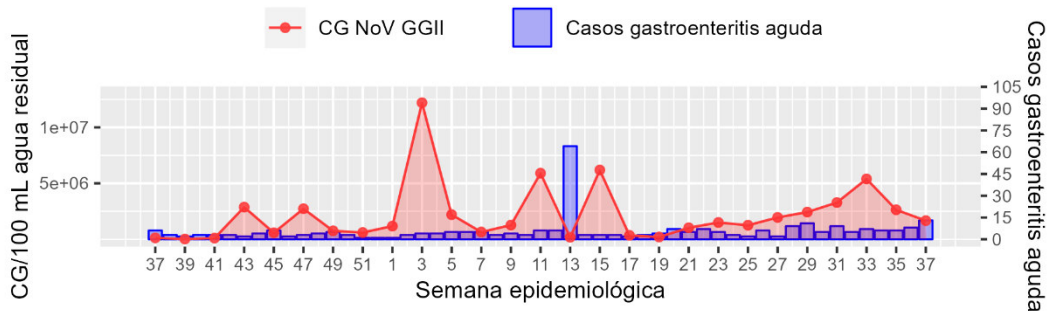


Anexo 9. Monitoreo de las concentraciones de norovirus genogrupo II (NoV GGII) en las aguas residuales y registro semanal de los casos de gastroenteritis aguda en el distrito de El Tambo. Las barras azules representan los casos notificados de gastroenteritis aguda en total (A), en niños menores de 1 año (B), en niños de 1 a 4 años (C) y en personas mayores 5 años de edad (D), mientras que la línea roja representa las concentraciones de copias genómicas (CG) de NoV GGII por 100 mL de muestra de agua residual evaluadas a lo largo de las semanas epidemiológicas.

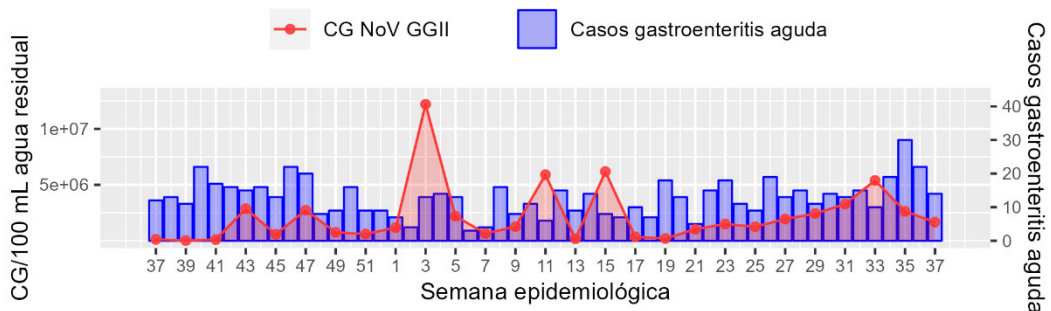
A Total



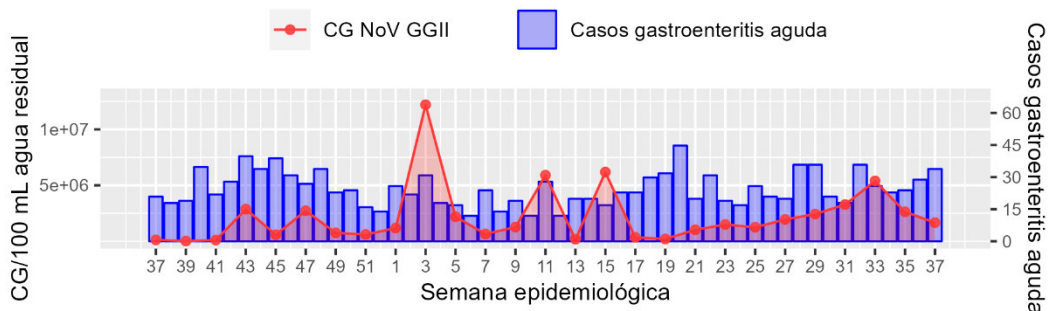
B Niños menores de un año de edad



C Niños entre uno a cuatro años edad

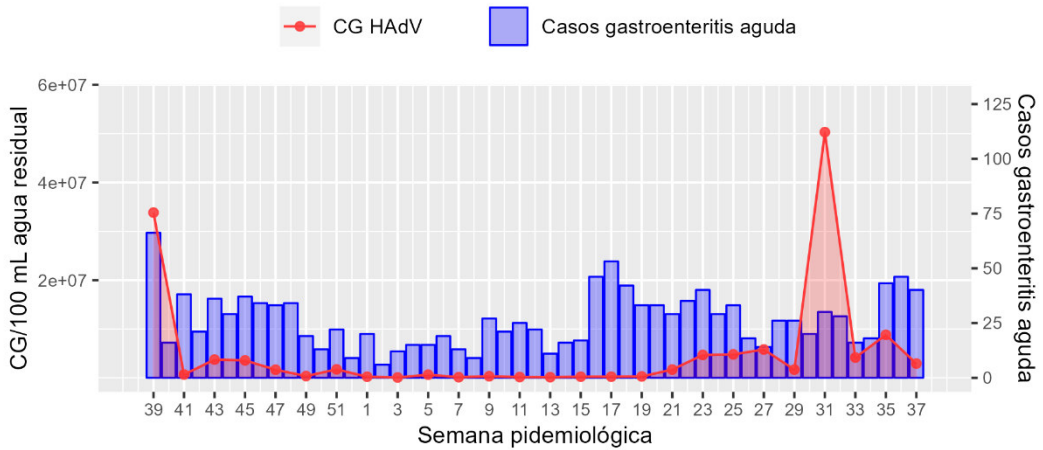


D Personas mayores de cinco años de edad

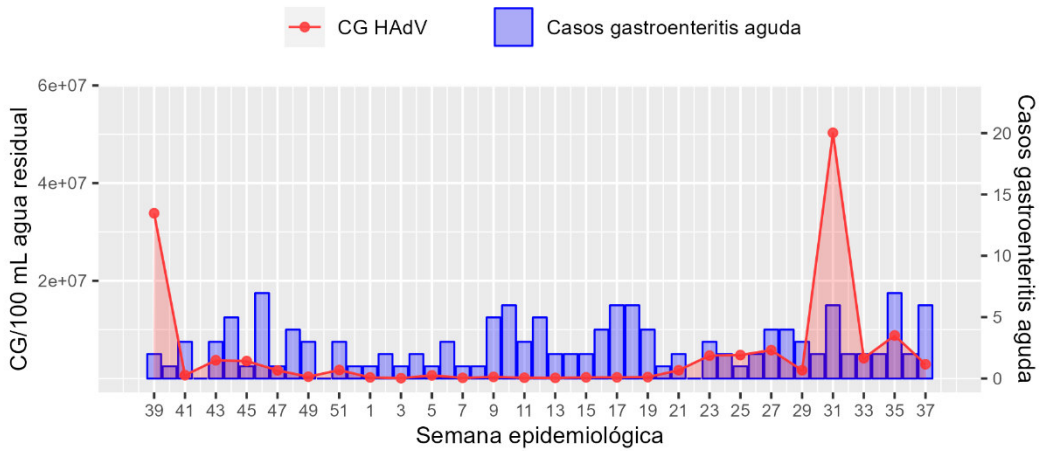


Anexo 10. Monitoreo de las concentraciones de adenovirus humano (HAdV) en las aguas residuales y registro semanal de los casos de gastroenteritis aguda en el distrito de Huancayo. Las barras azules representan los casos notificados de gastroenteritis aguda en total (A), en niños menores de 1 año (B) y en personas mayores de 5 años (C), mientras que la línea roja representa las concentraciones de copias genómicas (CG) de HAdV por 100 mL de muestra de agua residual evaluadas a lo largo de las semanas epidemiológicas.

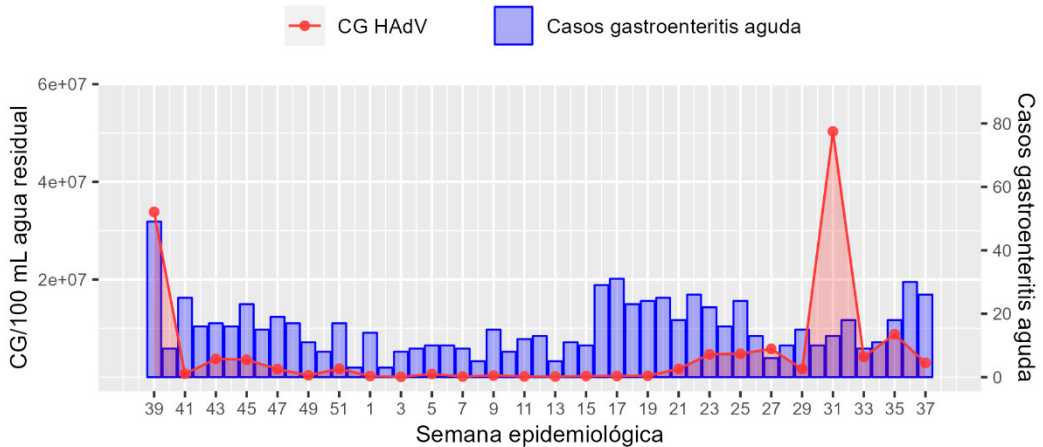
A Total



B Niños menores de un año de edad

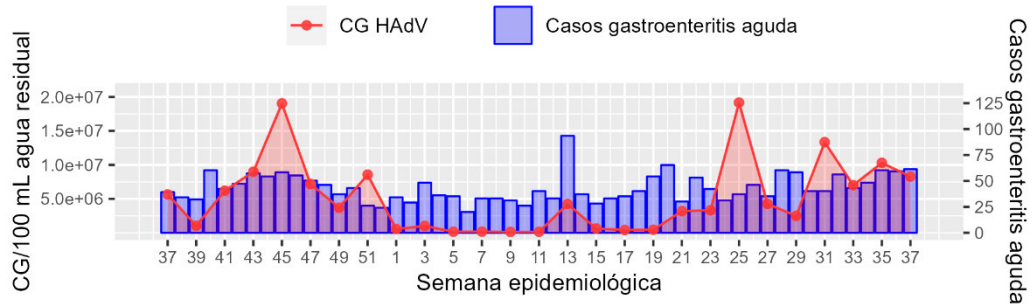


C Personas mayores de cinco años de edad

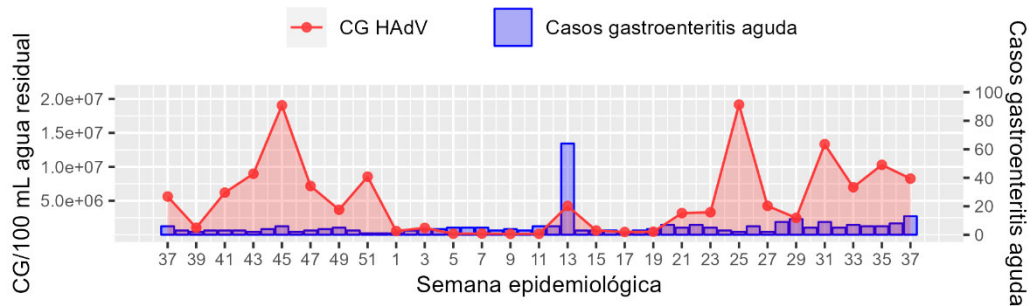


Anexo 11. Monitoreo de las concentraciones de adenovirus humano (HAdV) en las aguas residuales y registro semanal de casos de gastroenteritis aguda en el distrito de El Tambo. Las barras azules representan los casos notificados de gastroenteritis aguda en total (A), en niños menores de 1 año (B), en niños de 1 a 4 años (C) y en personas mayores 5 años de edad (Fig. C), mientras que la línea roja representa las concentraciones de copias genómicas (CG) de HAdV por 100 mL de muestra de agua residual evaluadas a lo largo de las semanas epidemiológicas.

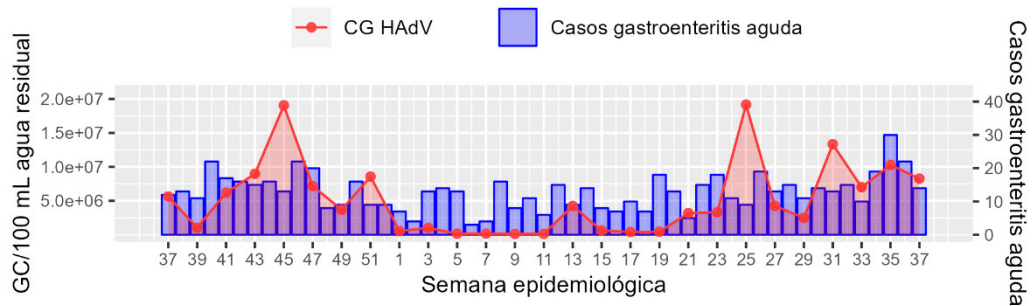
A Total



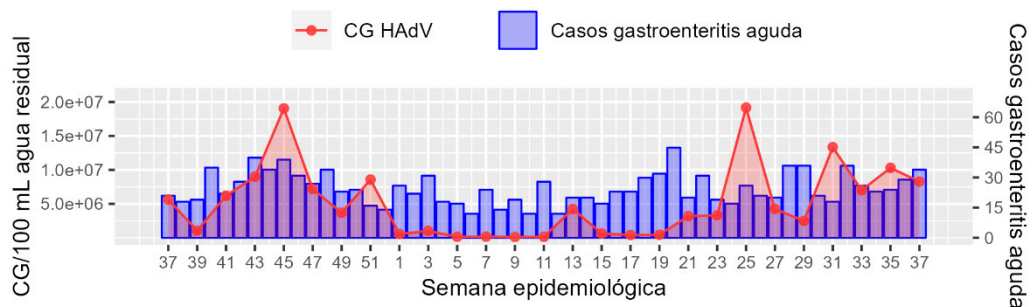
B Niños menores de un año de edad



C Niños entre uno a cuatro años de edad



D Personas mayores de cinco años de edad



Anexo 12. Detecciones y concentraciones de copias genómicas (CG) en el volumen de reacción final para SARS-CoV-2 por cada método de procesamiento, a lo largo de las semanas epidemiológicas (SE), en el distrito de Huancayo. Se presentan las cuantificaciones y el ciclo de cuantificación (Cq) obtenidos de las réplicas técnicas (RT) de la dilución 1:100.

SE	Análisis directo				Ultrafiltración				Floculación con leche desnatada			
	RT 1	Cq 1	RT 2	Cq 2	RT 1	Cq 1	RT 2	Cq 2	RT 1	Cq 1	RT 2	Cq 2
1 / 2022	<LdD ^a	<LdD	<LdD	<LdD	NA	NA	NA	NA	0.507	38.534	0.505	38.538
3 / 2022	1.16E+01	37.070	2.56E+01	36.212	NA	NA	NA	NA	<LdD	<LdD	<LdD	<LdD
5 / 2022	3.41E+00	39.100	3.69E+00	39.015	<LdD	<LdD	<LdD	<LdD	<LdD	<LdD	<LdD	<LdD
7 / 2022	<LdD	<LdD	<LdD	<LdD	<LdD	<LdD	<LdD	<LdD	<LdD	<LdD	<LdD	<LdD
9 / 2022	<LdD	<LdD	<LdD	<LdD	<LdD	<LdD	<LdD	<LdD	<LdD	<LdD	<LdD	<LdD
11 / 2022	2.28E+00	39.692	2.28E+00	39.690	<LdD	<LdD	<LdD	<LdD	<LdD	<LdD	<LdD	<LdD
13 / 2022	<LdD	<LdD	<LdD	<LdD	<LdD	<LdD	<LdD	<LdD	<LdD	<LdD	<LdD	<LdD
15 / 2022	<LdD	<LdD	<LdD	<LdD	<LdD	<LdD	<LdD	<LdD	<LdD	<LdD	<LdD	<LdD
17 / 2022	<LdD	<LdD	<LdD	<LdD	1.97E+00	39.905	1.97E+00	39.898	<LdD	<LdD	<LdD	<LdD
19 / 2022	<LdD	<LdD	<LdD	<LdD	<LdD	<LdD	<LdD	<LdD	<LdD	<LdD	<LdD	<LdD
21 / 2022	6.07E+00	38.273	6.07E+00	38.281	9.60E+00	37.607	9.57E+00	37.811	<LdD	<LdD	<LdD	<LdD
23 / 2022	<LdD	<LdD	<LdD	<LdD	4.91E+00	38.582	4.91E+00	38.586	<LdD	<LdD	<LdD	<LdD
25 / 2022	8.07E+00	37.679	1.48E+01	37.031	<LdD	<LdD	<LdD	<LdD	<LdD	<LdD	<LdD	<LdD
27 / 2022	2.29E+01	36.361	1.49E+01	36.879	8.88E+01	34.368	4.36E+01	35.229	<LdD	<LdD	<LdD	<LdD
29 / 2022	1.28E+01	36.898	2.98E+01	35.998	1.10E+02	34.048	1.18E+02	33.970	<LdD	<LdD	<LdD	<LdD
31 / 2022	3.35E+00	38.879	7.91E+00	37.887	1.62E+01	36.824	1.82E+01	36.688	<LdD	<LdD	<LdD	<LdD
33 / 2022	1.04E+00	39.995	4.39E+00	38.727	4.36E+00	38.463	9.58E+00	37.679	<LdD	<LdD	<LdD	<LdD
35 / 2022	<LdD	<LdD	<LdD	<LdD	4.41E+00	38.740	4.41E+00	38.729	<LdD	<LdD	<LdD	<LdD
37 / 2022	2.08E+00	38.787	1.37E+01	36.995	1.02E+01	37.511	1.02E+01	37.520	3.82E-01	38.943	3.81E-01	38.948

39 / 2022	3.34E+00	39.137	3.53E+00	39.107	1.24E+01	37.594	3.97E+00	38.085	<LdD	<LdD	<LdD	<LdD
41 / 2022	2.84E+00	39.442	2.84E+00	39.440	<LdD	<LdD	<LdD	<LdD	<LdD	<LdD	<LdD	<LdD
43 / 2022	3.99E+00	38.888	4.00E+00	38.883	3.33E+00	39.117	3.81E+00	38.974	<LdD	<LdD	<LdD	<LdD
45 / 2022	1.52E+01	37.004	6.75E+00	37.827	9.17E+00	37.600	1.21E+01	37.317	<LdD	<LdD	<LdD	<LdD
47 / 2022	1.48E+01	36.994	1.34E+01	37.103	5.26E+01	35.133	5.25E+01	35.135	<LdD	<LdD	<LdD	<LdD
49 / 2022	3.88E+00	38.931	4.03E+00	38.887	2.44E+02	32.936	1.90E+02	33.205	3.25E-01	39.180	3.20E-01	39.185

^a Límite de detección.

Anexo 13. Detecciones y concentraciones de copias genómicas (CG) en el volumen de reacción final para SARS-CoV-2 por cada método de procesamiento, a lo largo de las semanas epidemiológicas (SE), en el distrito de El Tambo. Se presentan las cuantificaciones y el ciclo de cuantificación (Cq) obtenidos de las réplicas técnicas (RT) de la dilución 1:100.

SE	Análisis directo				Ultrafiltración				Floculación con leche desnatada			
	RT 1	Cq 1	RT 2	Cq 2	RT 1	Cq 1	RT 2	Cq 2	RT 1	Cq 1	RT 2	Cq 2
1 / 2022	<LdD	<LdD	<LdD	<LdD	NA	NA	NA	NA	<LdD	<LdD	<LdD	<LdD
3 / 2022	1.42E+01	36.958	1.94E+01	36.620	NA	NA	NA	NA	2.96E-01	39.305	2.98E-01	39.300
5 / 2022	5.01E+00	38.553	5.02E+00	38.545	<LdD	<LdD	<LdD	<LdD	<LdD	<LdD	<LdD	<LdD
7 / 2022	3.31E+00	39.159	3.31E+00	39.153	<LdD	<LdD	<LdD	<LdD	<LdD	<LdD	<LdD	<LdD
9 / 2022	3.41E+00	39.108	3.42E+00	39.105	<LdD	<LdD	<LdD	<LdD	<LdD	<LdD	<LdD	<LdD
11 / 2022	<LdD	<LdD	<LdD	<LdD	<LdD	<LdD	<LdD	<LdD	<LdD	<LdD	<LdD	<LdD
13 / 2022	<LdD	<LdD	<LdD	<LdD	<LdD	<LdD	<LdD	<LdD	<LdD	<LdD	<LdD	<LdD
15 / 2022	<LdD	<LdD	<LdD	<LdD	<LdD	<LdD	<LdD	<LdD	<LdD	<LdD	<LdD	<LdD
17 / 2022	<LdD	<LdD	<LdD	<LdD	<LdD	<LdD	<LdD	<LdD	<LdD	<LdD	<LdD	<LdD
19 / 2022	<LdD	<LdD	<LdD	<LdD	<LdD	<LdD	<LdD	<LdD	<LdD	<LdD	<LdD	<LdD
21 / 2022	<LdD	<LdD	<LdD	<LdD	<LdD	<LdD	<LdD	<LdD	<LdD	<LdD	<LdD	<LdD
23 / 2022	4.50E+00	38.708	4.51E+00	38.699	<LdD	<LdD	<LdD	<LdD	<LdD	<LdD	<LdD	<LdD
25 / 2022	4.83E+00	38.606	4.82E+00	38.621	4.62E+00	38.672	4.62E+00	38.677	<LdD	<LdD	<LdD	<LdD
27 / 2022	9.51E+00	37.526	1.51E+01	36.971	4.92E+01	35.187	6.35E+01	34.879	<LdD	<LdD	<LdD	<LdD
29 / 2022	4.93E+01	35.276	3.29E+01	35.231	7.20E+01	34.697	6.37E+01	34.828	<LdD	<LdD	<LdD	<LdD
31 / 2022	9.87E+00	37.475	1.48E+01	38.107	4.08E+01	35.473	4.83E+01	35.278	<LdD	<LdD	<LdD	<LdD
33 / 2022	3.27E+00	39.174	3.27E+00	39.178	3.53E+00	38.896	5.89E+00	38.388	<LdD	<LdD	<LdD	<LdD
35 / 2022	4.23E+00	38.556	1.01E+01	37.209	5.38E+00	38.449	5.37E+00	38.458	<LdD	<LdD	<LdD	<LdD
37 / 2022	4.78E+00	38.625	4.79E+00	38.619	4.24E+00	38.794	4.23E+00	38.955	<LdD	<LdD	<LdD	<LdD

39 / 2022	<LdD	<LdD	<LdD	<LdD	<LdD	<LdD	<LdD	<LdD	<LdD	<LdD	<LdD	<LdD
41 / 2022	<LdD	<LdD	<LdD	<LdD	<LdD	<LdD	<LdD	<LdD	<LdD	<LdD	<LdD	<LdD
43 / 2022	2.94E+00	39.318	2.94E+00	39.320	6.58E+00	38.153	2.18E+00	38.337	<LdD	<LdD	<LdD	<LdD
45 / 2022	2.44E+00	39.607	2.50E+00	39.615	6.54E+00	38.162	6.53E+00	38.165	<LdD	<LdD	<LdD	<LdD
47 / 2022	1.83E+01	36.716	1.00E+01	37.367	1.07E+02	34.152	6.74E+01	34.646	<LdD	<LdD	<LdD	<LdD
49 / 2022	5.25E+01	35.059	1.19E+01	36.631	3.60E+02	32.306	4.10E+02	32.169	2.08E-01	38.981	1.20E+00	37.128

^a Límite de detección.

Anexo 14. Concentraciones de copias genómicas (CG) en el volumen de reacción final para rotavirus concentrado por floculación con leche desnatada, a lo largo de las semanas epidemiológicas (SE), en el distrito de Huancayo. Se presentan las cuantificaciones y el ciclo de cuantificación (Cq) obtenidos de las réplicas técnicas (RT) de la dilución 1:100.

SE	Dilución 1:100				Promedio	
	RT 1	Cq 1	RT 2	Cq 2	CG	Cq
39 / 2021	9.76E+01	33.260	7.39E+01	33.688	8.58E+01	33.474
41 / 2021	4.97E+02	30.767	4.60E+02	30.884	4.78E+02	30.825
43 / 2021	5.20E+03	27.167	4.76E+03	27.301	4.98E+03	27.234
45 / 2021	1.08E+03	29.575	1.02E+03	29.660	1.05E+03	29.618
47 / 2021	2.30E+02	32.431	2.36E+02	32.392	2.33E+02	32.412
49 / 2021	8.68E+01	33.929	8.71E+01	33.923	8.69E+01	33.926
51 / 2021	1.19E+01	36.993	1.19E+01	36.993	1.19E+01	36.993
1 / 2022	3.63E+01	35.270	4.04E+01	35.105	3.83E+01	35.188
3 / 2022	4.54E+01	34.544	3.58E+01	34.912	4.06E+01	34.728
5 / 2022	2.61E+01	35.404	3.31E+01	35.035	2.96E+01	35.219
7 / 2022	2.18E+01	35.684	1.40E+01	36.374	1.79E+01	36.029
9 / 2022	4.05E+01	34.722	4.42E+01	34.585	4.24E+01	34.653
11 / 2022	2.85E+02	32.162	2.79E+02	32.197	2.82E+02	32.179
13 / 2022	9.69E+00	35.606	1.10E+01	35.420	1.03E+01	35.513
15 / 2022	3.35E+01	36.573	3.25E+01	36.619	3.30E+01	36.596
17 / 2022	2.76E+01	37.820	2.55E+01	37.938	2.66E+01	37.879
19 / 2022	8.74E+01	36.095	8.65E+01	36.110	8.69E+01	36.103
21 / 2022	5.60E+02	33.313	5.22E+02	33.418	5.41E+02	33.366
23 / 2022	1.30E+03	32.053	1.42E+03	31.917	1.36E+03	31.985
25 / 2022	5.96E+02	33.219	6.56E+02	33.077	6.26E+02	33.148
27 / 2022	1.14E+02	38.306	1.21E+02	38.224	1.18E+02	38.265
29 / 2022	7.68E+01	38.881	6.32E+01	39.163	7.00E+01	39.022
31 / 2022	4.78E+03	31.636	4.74E+03	31.651	4.76E+03	31.643
33 / 2022	3.95E+03	31.910	3.47E+03	32.099	3.71E+03	32.005
35 / 2022	4.26E+02	32.546	5.00E+02	32.320	4.63E+02	32.433
37 / 2022	5.92E+03	28.798	6.67E+03	28.627	6.30E+03	28.712

Anexo 15. Concentraciones de copias genómicas (CG) en el volumen de reacción final para rotavirus concentrado por floculación con leche desnatada, a lo largo de las semanas epidemiológicas (SE), en el distrito de El Tambo. Se presentan las cuantificaciones y el ciclo de cuantificación (Cq) obtenidos de las réplicas técnicas (RT) de la dilución 1:100.

SE	Dilución 1:100				Promedio	
	RT 1	Cq 1	RT 2	Cq 2	CG	Cq
37 / 2021	5.08E+02	30.732	4.77E+02	30.829	4.92E+02	30.780
39 / 2021	2.09E+02	32.095	2.08E+02	32.101	2.08E+02	32.098
41 / 2021	8.67E+02	29.912	8.34E+02	29.972	8.50E+02	29.942
43 / 2021	7.05E+02	30.229	6.00E+02	30.476	6.53E+02	30.352
45 / 2021	2.90E+02	31.591	3.07E+02	31.504	2.99E+02	31.547
47 / 2021	1.42E+03	29.625	1.31E+03	29.751	1.37E+03	29.688
49 / 2021	1.64E+02	32.953	1.58E+02	33.010	1.61E+02	32.982
51 / 2021	8.47E+01	33.967	8.68E+01	33.928	8.57E+01	33.947
1 / 2022	2.90E+01	35.243	2.17E+01	35.693	2.53E+01	35.468
3 / 2022	1.77E+02	32.431	1.88E+02	32.339	1.83E+02	32.385
5 / 2022	2.63E+02	31.819	2.93E+02	31.653	2.78E+02	31.736
7 / 2022	8.53E+00	37.139	2.04E+01	35.785	1.45E+01	36.462
9 / 2022	5.36E+03	27.140	5.62E+03	27.067	5.49E+03	27.104
11 / 2022	6.86E+01	34.322	7.41E+01	34.205	7.14E+01	34.264
13 / 2022	2.04E+01	34.536	2.36E+01	34.332	2.20E+01	34.434
15 / 2022	1.06E+02	34.805	1.04E+02	34.832	1.05E+02	34.818
17 / 2022	2.25E+01	38.130	2.19E+01	38.164	2.22E+01	38.147
19 / 2022	2.21E+02	34.705	2.54E+02	34.496	2.38E+02	34.600
21 / 2022	4.62E+02	33.600	4.62E+02	33.601	4.62E+02	33.600
23 / 2022	5.35E+01	36.829	7.18E+01	36.388	6.27E+01	36.609
25 / 2022	1.98E+02	34.872	2.80E+02	34.352	2.39E+02	34.612
27 / 2022	2.19E+02	37.367	2.26E+02	37.324	2.23E+02	37.345
29 / 2022	3.06E+02	36.886	2.55E+02	37.148	2.81E+02	37.017
31 / 2022	7.88E+02	34.233	1.10E+03	33.759	9.42E+02	33.996
33 / 2022	7.92E+02	34.225	7.56E+02	34.293	7.74E+02	34.259
35 / 2022	2.86E+02	33.113	3.01E+02	33.043	2.94E+02	33.078
37 / 2022	6.96E+02	31.848	6.79E+02	31.883	6.88E+02	31.866

Anexo 16. Concentraciones de copias genómicas (CG) en el volumen de reacción final para norovirus genogrupo II concentrado por floculación con leche desnatada, a lo largo de las semanas epidemiológicas (SE), en el distrito de Huancayo. Se presentan las cuantificaciones y el ciclo de cuantificación (Cq) obtenidos de las réplicas técnicas (RT) de la dilución 1:100.

SE	Dilución 1:100				Promedio	
	RT 1	Cq 1	RT 2	Cq 2	CG	Cq
39 / 2021	4.86E+01	34.496	3.44E+01	35.007	4.15E+01	34.751
41 / 2021	1.65E+01	36.092	1.90E+01	35.886	1.78E+01	35.989
43 / 2021	1.10E+02	33.278	1.01E+02	33.416	1.06E+02	33.347
45 / 2021	1.69E+01	36.064	1.54E+01	36.197	1.61E+01	36.131
47 / 2021	1.63E+01	35.549	2.02E+01	35.228	1.82E+01	35.389
49 / 2021	2.48E+01	34.922	2.75E+01	34.772	2.61E+01	34.847
51 / 2021	6.33E+01	33.534	4.65E+01	33.991	5.49E+01	33.763
1 / 2022	7.18E+01	33.347	7.00E+01	33.385	7.09E+01	33.366
3 / 2022	8.43E+00	37.114	1.35E+01	36.426	1.10E+01	36.770
5 / 2022	2.04E+01	35.819	3.44E+01	35.054	2.74E+01	35.437
7 / 2022	2.19E+01	35.715	2.04E+01	35.820	2.11E+01	35.767
9 / 2022	2.87E+01	35.318	2.45E+01	35.552	2.66E+01	35.435
11 / 2022	9.46E+01	34.314	7.59E+01	34.638	8.52E+01	34.476
13 / 2022	3.88E+00	36.942	9.81E+00	35.613	6.85E+00	36.277
15 / 2022	8.00E+01	34.128	5.02E+01	34.826	6.51E+01	34.477
17 / 2022	4.52E+00	36.583	3.54E+00	36.932	4.03E+00	36.757
19 / 2022	6.09E+00	36.158	4.25E+00	36.672	5.17E+00	36.415
21 / 2022	5.26E+01	33.069	2.95E+01	33.899	4.11E+01	33.484
23 / 2022	2.96E+02	30.596	3.32E+02	30.434	3.14E+02	30.515
25 / 2022	1.89E+02	31.240	2.19E+02	31.027	2.04E+02	31.134
27 / 2022	9.47E+01	32.264	1.04E+02	32.130	9.95E+01	32.197
29 / 2022	5.63E+01	32.989	6.79E+01	32.728	6.21E+01	32.859
31 / 2022	1.01E+02	33.008	9.44E+01	33.110	9.78E+01	33.059
33 / 2022	3.80E+02	31.091	3.75E+02	31.109	3.77E+02	31.100
35 / 2022	1.91E+02	32.090	1.83E+02	32.150	1.87E+02	32.120
37 / 2022	5.00E+01	34.032	5.59E+01	33.868	5.29E+01	33.950

Anexo 17. Concentraciones de copias genómicas (CG) en el volumen de reacción final para norovirus genogrupo II concentrado por floculación con leche desnatada, a lo largo de las semanas epidemiológicas (SE), en el distrito de El Tambo. Se presentan las cuantificaciones y el ciclo de cuantificación (Cq) obtenidos de las réplicas técnicas (RT) de la dilución 1:100.

SE	Dilución 1:100				Promedio	
	RT 1	Cq 1	RT 2	Cq 2	CG	Cq
37 / 2021	3.95E+01	34.801	3.06E+01	35.182	3.51E+01	34.991
39 / 2021	2.85E+01	35.286	1.77E+01	35.993	2.31E+01	35.639
41 / 2021	1.06E+01	36.758	3.22E+01	35.103	2.14E+01	35.931
43 / 2021	5.60E+01	34.286	5.90E+01	34.209	5.75E+01	34.247
45 / 2021	1.67E+01	36.076	6.55E+00	37.465	1.16E+01	36.770
47 / 2021	6.85E+01	33.416	4.07E+01	34.190	5.46E+01	33.803
49 / 2021	1.47E+01	35.695	1.54E+01	35.630	1.51E+01	35.663
51 / 2021	1.20E+01	35.997	1.22E+01	35.976	1.21E+01	35.987
1 / 2022	2.71E+01	35.402	2.00E+01	35.850	2.35E+01	35.626
3 / 2022	2.48E+02	32.155	2.40E+02	32.206	2.44E+02	32.181
5 / 2022	3.60E+01	34.986	5.20E+01	34.447	4.40E+01	34.717
7 / 2022	1.35E+01	36.421	1.24E+01	36.553	1.30E+01	36.487
9 / 2022	2.61E+01	35.459	2.47E+01	35.540	2.54E+01	35.500
11 / 2022	1.33E+02	33.809	1.03E+02	34.186	1.18E+02	33.998
13 / 2022	2.69E+00	37.467	4.47E+00	36.739	3.58E+00	37.103
15 / 2022	1.37E+02	33.322	1.10E+02	33.648	1.24E+02	33.485
17 / 2022	6.09E+00	36.158	7.87E+00	35.790	6.98E+00	35.974
19 / 2022	4.15E+00	36.707	3.96E+00	36.772	4.05E+00	36.740
21 / 2022	1.28E+01	35.091	1.82E+01	34.586	1.55E+01	34.839
23 / 2022	2.64E+01	34.058	3.36E+01	33.712	3.00E+01	33.885
25 / 2022	1.85E+01	34.564	3.17E+01	33.796	2.51E+01	34.180
27 / 2022	4.65E+01	33.256	3.16E+01	33.795	3.90E+01	33.525
29 / 2022	4.72E+01	33.233	5.00E+01	33.155	4.86E+01	33.194
31 / 2022	6.90E+02	30.224	6.23E+02	30.374	6.57E+02	30.299
33 / 2022	1.24E+02	32.717	9.20E+01	33.147	1.08E+02	32.932
35 / 2022	4.95E+02	30.708	5.59E+02	30.530	5.27E+02	30.619
37 / 2022	3.38E+01	34.599	3.28E+01	34.641	3.33E+01	34.620

Anexo 18. Concentraciones de copias genómicas (CG) en el volumen de reacción final para adenovirus humano concentrado por floculación por leche desnatada, a lo largo de las semanas epidemiológicas (SE), en el distrito de Huancayo. Se presentan las cuantificaciones y el ciclo de cuantificación (Cq) obtenidos de las réplicas técnicas (RT) de la dilución 1:100.

SE	Dilución 1:100				Promedio	
	RT 1	Cq 1	RT 2	Cq 2	CG	Cq
39 / 2021	1.97E+05	23.413	1.89E+05	23.476	1.93E+05	23.444
41 / 2021	1.41E+04	27.319	1.32E+04	27.424	1.36E+04	27.371
43 / 2021	1.43E+04	26.524	1.57E+04	26.388	1.50E+04	26.456
45 / 2021	1.42E+03	30.373	1.44E+03	30.354	1.43E+03	30.363
47 / 2021	6.45E+02	31.515	6.90E+02	31.418	6.68E+02	31.467
49 / 2021	1.57E+02	34.689	1.37E+02	34.880	1.47E+02	34.784
51 / 2021	7.60E+02	32.508	6.30E+02	32.768	6.95E+02	32.638
1 / 2022	9.05E+01	30.829	9.31E+01	30.790	9.18E+01	30.809
3 / 2022	3.16E+01	32.351	2.82E+01	32.516	2.99E+01	32.433
5 / 2022	2.13E+01	32.918	3.03E+01	32.411	2.58E+01	32.665
7 / 2022	6.59E+00	34.616	4.34E+00	35.220	5.46E+00	34.918
9 / 2022	8.58E+00	34.234	1.75E+01	33.202	1.31E+01	33.718
11 / 2022	6.60E+01	31.286	6.23E+01	31.370	6.41E+01	31.328
13 / 2022	5.99E+01	31.427	4.77E+01	31.755	5.38E+01	31.591
15 / 2022	9.85E+01	30.866	9.13E+01	30.974	9.49E+01	30.920
17 / 2022	1.06E+02	30.757	8.53E+01	31.071	9.58E+01	30.914
19 / 2022	1.07E+02	30.742	1.21E+02	30.569	1.14E+02	30.655
21 / 2022	7.31E+01	31.290	6.27E+01	31.510	6.79E+01	31.400
23 / 2022	1.99E+02	30.794	1.76E+02	30.976	1.88E+02	30.885
25 / 2022	1.86E+03	27.548	1.99E+03	27.450	1.92E+03	27.499
27 / 2022	2.47E+02	29.842	2.17E+02	30.031	2.32E+02	29.937
29 / 2022	7.68E+01	31.558	5.83E+01	31.964	6.76E+01	31.761
31 / 2022	2.03E+03	27.945	2.00E+03	27.963	2.01E+03	27.954
33 / 2022	1.57E+02	31.687	1.76E+02	31.514	1.66E+02	31.601
35 / 2022	3.47E+03	27.159	3.58E+03	27.111	3.52E+03	27.135
37 / 2022	1.23E+02	32.041	1.10E+02	32.198	1.17E+02	32.119

Anexo 19. Concentraciones de copias genómicas (CG) en el volumen de reacción final para adenovirus humano concentrado por floculación con leche desnatada, a lo largo de las semanas epidemiológicas (SE), en el distrito de El Tambo. Se presentan las cuantificaciones y el ciclo de cuantificación (Cq) obtenidos de las réplicas técnicas (RT) de la dilución 1:100.

SE	Dilución 1:100				Promedio	
	RT 1	Cq 1	RT 2	Cq 2	CG	Cq
37 / 2021	3.24E+04	26.089	3.21E+04	26.104	3.22E+04	26.097
39 / 2021	2.07E+04	26.753	2.11E+04	26.724	2.09E+04	26.739
41 / 2021	3.37E+04	25.276	1.59E+04	26.362	2.48E+04	25.819
43 / 2021	3.44E+03	28.587	3.75E+03	28.461	3.60E+03	28.524
45 / 2021	7.32E+03	27.998	7.92E+03	27.885	7.62E+03	27.941
47 / 2021	2.71E+03	29.438	3.04E+03	29.270	2.88E+03	29.354
49 / 2021	1.46E+03	31.604	1.49E+03	31.576	1.48E+03	31.590
51 / 2021	3.50E+03	30.397	3.35E+03	30.458	3.43E+03	30.427
1 / 2022	2.37E+02	29.437	2.06E+02	29.644	2.22E+02	29.540
3 / 2022	4.15E+03	25.302	3.99E+03	25.359	4.07E+03	25.330
5 / 2022	6.29E+01	31.356	6.15E+01	31.388	6.22E+01	31.372
7 / 2022	7.15E+02	27.844	6.42E+02	27.998	6.79E+02	27.921
9 / 2022	5.95E+00	34.764	4.16E+00	35.279	5.05E+00	35.021
11 / 2022	4.95E+01	31.701	6.26E+01	31.362	5.61E+01	31.532
13 / 2022	1.74E+03	26.559	1.66E+03	26.630	1.70E+03	26.595
15 / 2022	2.39E+02	29.602	2.69E+02	29.435	2.54E+02	29.518
17 / 2022	1.62E+01	33.433	1.65E+01	33.414	1.63E+01	33.423
19 / 2022	1.80E+02	30.005	1.76E+02	30.042	1.78E+02	30.024
21 / 2022	1.21E+03	27.289	1.34E+03	27.148	1.28E+03	27.218
23 / 2022	1.28E+03	28.085	1.37E+03	27.989	1.33E+03	28.037
25 / 2022	7.80E+02	28.810	7.54E+02	28.859	7.67E+02	28.834
27 / 2022	1.76E+02	30.339	1.64E+02	30.444	1.70E+02	30.392
29 / 2022	1.06E+02	31.083	9.31E+01	31.277	9.96E+01	31.180
31 / 2022	5.39E+02	29.879	5.28E+02	29.909	5.34E+02	29.894
33 / 2022	2.69E+03	27.528	2.91E+03	27.414	2.80E+03	27.471
35 / 2022	4.00E+03	26.949	4.24E+03	26.866	4.12E+03	26.907
37 / 2022	3.35E+02	30.575	3.27E+02	30.611	3.31E+02	30.593

Anexo 20. Coeficientes de correlación de Spearman entre las concentraciones de copias genómicas de SARS-CoV-2, rotavirus (RV), norovirus genogrupo II (NoV GGII) y adenovirus humano (HAdV) en las aguas residuales con los casos de COVID-19 y gastroenteritis aguda reportados en los distritos de Huancayo y El Tambo.

		Distrito de Huancayo			Distrito de El Tambo		
		Sin retraso	Dos semanas de retraso	Cuatro semanas de retraso	Sin retraso	Dos semanas de retraso	Cuatro semanas de retraso
SARS-CoV-2	r^a	0.35	0.55	0.52	0.60	0.71	0.54
	p^b	0.07	<0.01	0.01	<0.01	<0.01	<0.01
RV							
<1 año	r	0.21	0.16	-0.10	0.39	0.26	0.25
	p	0.30	0.43	0.62	0.04	0.19	0.22
1-4 años	r	0.16	0.06	-0.10	0.40	0.20	-0.13
	p	0.42	0.76	0.61	0.03	0.30	0.51
>5 años	r	0.33	0.24	-0.03	0.47	0.19	0.12
	p	0.09	0.23	0.86	0.01	0.34	0.55
Total	r	0.09	0.35	0.22	0.22	0.40	0.19
	p	0.62	0.08	0.29	0.25	0.03	0.34
NoV GGII							
<1 año	r	-0.25	-0.16	-0.29	0.05	0.20	-0.12
	p	0.20	0.42	0.16	0.80	0.30	0.55
1-4 años	r	-0.25	-0.23	-0.28	0.14	-0.11	-0.32
	p	0.20	0.25	0.17	0.45	0.52	0.11
>5 años	r	-0.16	-0.04	-0.24	0.12	-0.03	0.05
	p	0.42	0.81	0.24	0.52	0.86	0.77
Total	r	-0.07	0.17	0.20	0.14	0.53	0.14
	p	0.72	0.41	0.33	0.47	<0.01	0.47
HAdV							
<1 año	r	0.47	0.29	0.10	0.56	0.33	0.34
	p	0.01	0.15	0.61	<0.01	0.09	0.09
1-4 años	r	0.51	0.31	0.08	0.39	0.43	0.47
	p	<0.01	0.13	0.69	0.03	0.02	0.01
>5 años	r	0.46	0.38	0.25	0.54	0.47	0.28
	p	0.01	0.05	0.23	<0.01	0.01	0.17
Total	r	-0.01	0.05	0.07	0.11	-0.10	-0.05
	p	0.95	0.77	0.72	0.56	0.60	0.80

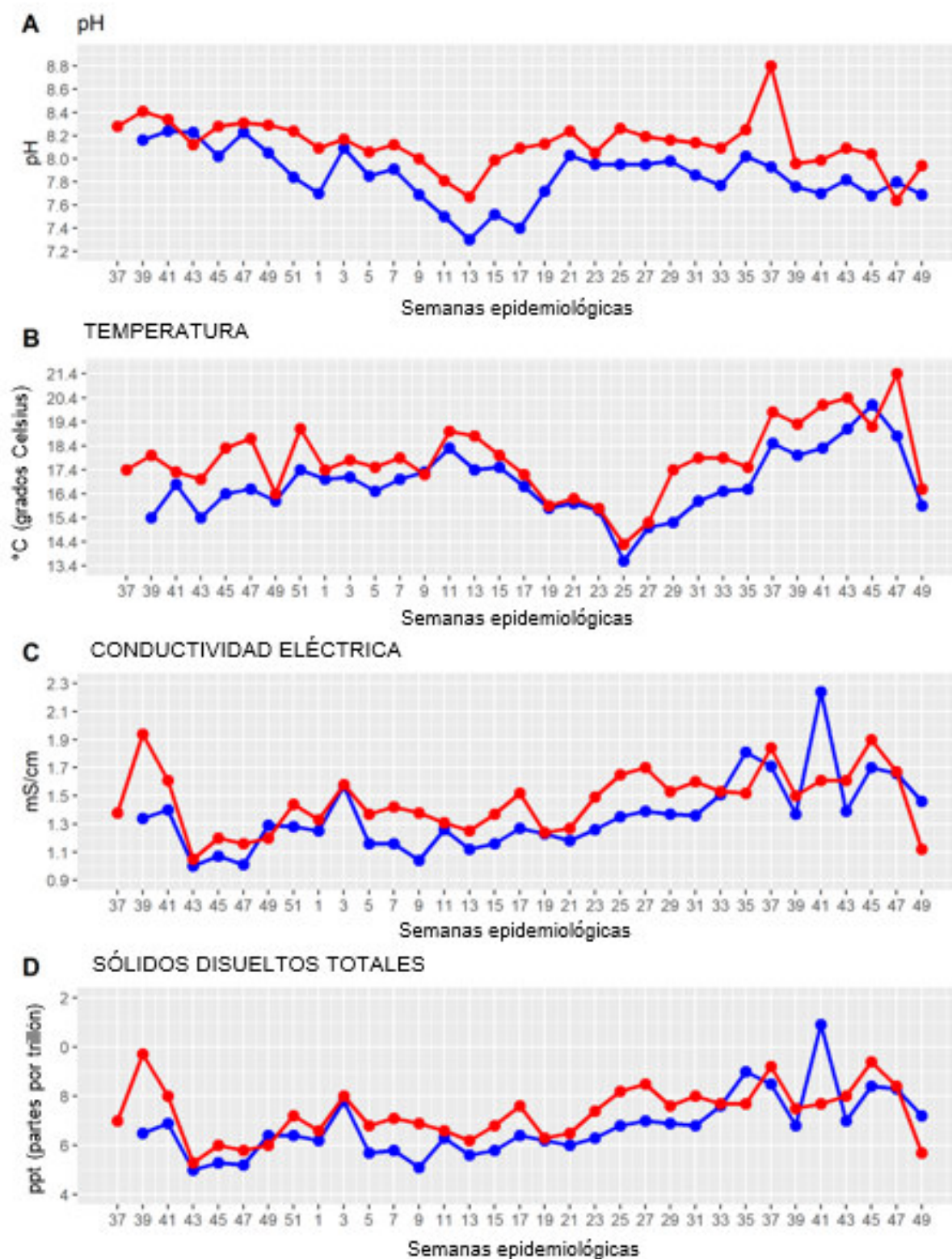
^a Coeficiente de correlación de Spearman, ^b p -valor.

Anexo 21. Valores de los parámetros físico-químicos de las aguas residuales, a lo largo de las semanas epidemiológicas (SE), en los distritos de Huancayo y El Tambo.

SE	Distrito de Huancayo				Distrito de El Tambo			
	pH	T ^{oa}	CE ^b	SDT ^c	pH	T ^o	CE	SDT
37 / 2021	NA	NA	NA	NA	8.28	17.40	1.38	0.70
39 / 2021	8.16	15.40	1.34	0.65	8.41	18.00	1.94	0.97
41 / 2021	8.24	16.80	1.40	0.69	8.34	17.30	1.61	0.80
43 / 2021	8.23	15.40	1.00	0.50	8.12	17.00	1.05	0.53
45 / 2021	8.02	16.40	1.07	0.53	8.28	18.30	1.20	0.60
47 / 2021	8.23	16.60	1.01	0.52	8.31	18.70	1.16	0.58
49 / 2021	8.05	16.10	1.29	0.64	8.29	16.40	1.20	0.60
51 / 2021	7.84	17.40	1.28	0.64	8.24	19.10	1.44	0.72
1 / 2022	7.70	17.00	1.25	0.62	8.09	17.40	1.33	0.66
3 / 2022	8.09	17.10	1.57	0.78	8.17	17.80	1.58	0.80
5 / 2022	7.85	16.50	1.16	0.57	8.06	17.50	1.37	0.68
7 / 2022	7.91	17.00	1.16	0.58	8.12	17.90	1.42	0.71
9 / 2022	7.69	17.30	1.04	0.51	8.00	17.20	1.38	0.69
11 / 2022	7.50	18.30	1.26	0.63	7.81	19.00	1.31	0.66
13 / 2022	7.30	17.40	1.12	0.56	7.67	18.80	1.25	0.62
15 / 2022	7.52	17.50	1.16	0.58	7.99	18.00	1.37	0.68
17 / 2022	7.40	16.70	1.27	0.64	8.09	17.20	1.52	0.76
19 / 2022	7.72	15.80	1.23	0.62	8.13	15.90	1.24	0.63
21 / 2022	8.03	16.00	1.18	0.60	8.24	16.20	1.27	0.65
23 / 2022	7.95	15.70	1.26	0.63	8.05	15.80	1.49	0.74
25 / 2022	7.95	13.60	1.35	0.68	8.26	14.30	1.65	0.82
27 / 2022	7.95	15.00	1.39	0.70	8.19	15.20	1.70	0.85
29 / 2022	7.98	15.20	1.37	0.69	8.16	17.40	1.53	0.76
31 / 2022	7.86	16.10	1.36	0.68	8.14	17.90	1.60	0.80
33 / 2022	7.77	16.50	1.51	0.76	8.09	17.90	1.53	0.77
35 / 2022	8.02	16.60	1.81	0.90	8.25	17.50	1.52	0.77
37 / 2022	7.93	18.50	1.71	0.85	8.80	19.80	1.84	0.92
39 / 2022	7.76	18.00	1.37	0.68	7.96	19.30	1.50	0.75
41 / 2022	7.70	18.30	2.24	1.09	7.99	20.10	1.61	0.77
43 / 2022	7.82	19.10	1.39	0.70	8.09	20.40	1.61	0.80
45 / 2022	7.68	20.10	1.70	0.84	8.04	19.20	1.90	0.94
47 / 2022	7.80	18.80	1.66	0.83	7.64	21.40	1.67	0.84
49 / 2022	7.69	15.90	1.46	0.72	7.94	16.60	1.12	0.57

^a Temperatura en grados Celsius, ^b conductividad eléctrica en miliSiemens por centímetro, ^c sólidos disueltos totales en partes por trillón.

Anexo 22. Variaciones en los valores de los parámetros físico-químicos de las aguas residuales, a lo largo de las semanas epidemiológicas, en los distritos de Huancayo (línea azul) y El Tambo (línea roja).



Anexo 23. Rendimientos de los ensayos RT-qPCR y qPCR.

	Pendiente	Eficiencia (%)	r^{2a}	Y-intercepto
SARS-CoV-2	-3.349	98.883	0.997	40.896
RV ^b	-3.367	98.165	0.999	41.278
NoV GGII ^c	-3.325	99.872	0.999	39.828
HAdV ^d	-3.367	98.145	1.000	38.580

^a Coeficiente de correlación, ^b rotavirus, ^c norovirus genogrupo II, ^d adenovirus humano.