

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS E INGENIERÍA
MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS E INGENIERÍA



Detección de Sars-CoV-2 en agua residual (AR) de la canalización del río Tijuana y plantas tratadoras de agua residual (PTAR) de Tecate B.C. como Epidemiología basada en agua residual

para obtener el grado de Doctor en Ciencias

Presenta

M en C. Jonathan Vincent Lopez Baena

Director de Tesis

Dra. Kenia Palomino Vizcaino

Co-director

Dra. Lilia Angélica Hurtado Ayala

Tijuana, Baja California; 2024.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS E INGENIERÍA

Folio No.358
Tijuana, B.C., a 17 de enero, 2024

C. Jonathan Vincent López Baena
Pasante de: Doctorado en Ciencias
Presente

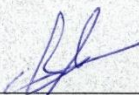
El tema de trabajo y/o tesis para su examen profesional, en la
Opción TESIS

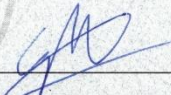
Es propuesto, por las C. Dra. Kenia Palomino Vizcaino y
Dra. Lilia Angelica Hurtado Ayala


Quienes serán los responsables de la calidad del trabajo que usted presente, referido
al tema "Detección de Sars-CoV-2 en agua residual (AR) de la canalización del
río Tijuana y plantas tratadoras de agua residual (PTAR) de Tecate B.C. como
Epidemiología basada en agua residual".


El cual deberá usted desarrollar, de acuerdo con el siguiente orden:

- I. INTRODUCCIÓN
- II. EXPERIMENTAL
- III. RESULTADOS Y DISCUSIONES
- IV. CONCLUSIONES
- V. REFERENCIAS
- VI. ANEXOS


M.C. Roberto Alejandro Reyes Martínez
Director


Dra. Ana Alejandra Ramírez Rodríguez
Subdirectora


Dra. Kenia Palomino Vizcaino
Directora De Tesis


Dra. Lilia Angelica Hurtado Ayala
Co-Directora De Tesis



Índice

Abreviaturas	5
Índice de tablas	7
Índice de figuras	7
Agradecimiento institucional	8
Agradecimientos	9
Resumen	10
Capítulo 1. Introducción	11
1.1 Familia Coronavirus.	12
1.2 Sars-CoV-2.	12
1.3 Transmisión.	13
1.4 Epidemiología del Sars-CoV-2.	14
1.5 Epidemiología molecular de SARS-CoV-2.	15
1.6 Epidemiología basada en agua residual (EBAR).	16
1.7 Aguas Residuales (AR).	17
1.8 Plantas Tratadoras de Agua Residual (PTAR).	18
1.9 Agua Residual Tratada (ART).	18
1.9.1 Niveles de Tratamiento del AR.	18
1.9.2 Tipos de tratamiento de AR.	19
1.10 Importancia que tiene el tratamiento de AR.	20
1.10.1 Reúso en servicios al público con contacto directo.	21
1.10.2 Reúso en servicios al público con contacto indirecto u ocasional.	21
1.11 Contaminantes Emergentes y reemergentes.	21
1.12 Virus en sistemas acuáticos.	22
2. Antecedentes	23
2.1 Plan de muestreo para la vigilancia epidemiológica de AR.	23
2.2 Preparación de las muestras.	23
2.3 Métodos de concentración de virus a partir de muestras ambientales.	24
2.3.1 Precipitación con polietilenglicol (PEG precipitación).	25
2.3.2 Concentración de virus por ultrafiltración.	25
2.4 Extracción de ARN en SARS-CoV-2.	26

2.5 Reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa en tiempo real (RT-qPCR).	26
2.6 Epidemiología Molecular.	27
2.7 Vigilancia del SARS-CoV-2 en AR y PTAR.	28
2.8 Número de infecciones por el Modelo Montecarlo.	29
2.9 Potencial riesgo en salud pública.	30
3. Planteamiento del problema.	30
4. Justificación.	33
5. Objetivo General.	36
5.1 Objetivos específicos.	36
6. Hipótesis.	37
6.1 Hipótesis nula.	37
7. Experimental	38
7.1 Sitios de muestreo.	39
7.2 Determinación de los residuos de ARN viral.	41
7.3 Número de infecciones por el Modelo Montecarlo.	42
8. Resultados y discusiones.	42
8.1 Detección de SARS-CoV-2 en agua residual y PTAR.	43
8.2 Vigilancia del SARS-CoV-2 en AR y PTAR.	45
8.3 Estimación de Número de personas infecciones por el Modelo Montecarlo.	46
9. Conclusiones.	49
10. Referencias	51
11. Anexos	70
11.1 Anexo 1	70
11.2 Anexo 2	71

Abreviaturas

ARN	Ácido Ribonucleico
CoVs	Coronavirus
SARS	Síndrome respiratorio agudo severo
MERS	Síndrome respiratorio del Medio Oriente
OMS	Organización Mundial de la Salud
CDC	Centros para el Control y Prevención de Enfermedades
SARS-CoV-2	Síndrome Respiratorio Agudo Severo Coronavirus-2
ECA2	Enzima convertidora de angiotensina 2
R0	Número de reproducción básica
OPS	Organización Panamericana de la Salud
EBAR	Epidemiología basada en agua residual
PTAR	Plantas tratadoras de agua residual
AR	Aguas Residuales
ART	Agua Residual tratada
DBO	Demanda bioquímica de oxígeno
CONAGUA	Comisión Nacional del Agua
NOM	Norma Oficial Mexicana
SEMARNAT	Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales
m	Metros
L	Litros
°C	Grados Centígrados
h	Horas
µm	Micrómetros
g	Gramos
PEG	Polietilenglicol
M	Molaridad
%	Porcentaje
G	Fuerza centrífuga relativa

min	Minutos
μL	Microlitros
Da	Dalton
RT-qPCR	Reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa en tiempo real
no. Cg	Número de copias genómicas
IN	Número estimado de personas infectadas
SARSW	Número de copias de ARN del SARS-CoV-2 por litro de aguas residuales
WW	Aguas residuales per cápita
IBM	Número de habitantes de la microcuenca
H	Heces per cápita
SARSH	Número de copias de ARN del SARS-CoV-2 por gramo de heces
HHRA	Evaluaciones de riesgos para la salud humana
ISCI	Instituto de Salud Carlos III
Log10	Logaritmo base 10
UABC	Universidad Autónoma de Baja California
B.C.	Baja California
SINAVE	Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica
p/v	Peso/Volumen
RdRp	RNA-dependent RNA polymerase
Ct	Umbral de ciclo
MO	Monte de los olivos
IMSS	Instituto Mexicano del Seguro Social
Clínica #1	IMSS Hospital General Regional No.1
P.Rio	Plaza Rio
HGT	Hospital General Tijuana
S#	Numero de Semana
N	Nucleocápside

Índice de tablas

	Página
Tabla 1. Materiales y Equipos utilizados en el proyecto de investigación.	35
Tabla 2. Descripción de los periodos de muestreo de agua residual en la canalización del rio Tijuana.	36
Tabla 3. Número de copias genómicas en promedio cuantificadas en cada semana de muestreo en la canalización rio Tijuana.	40

Índice de figuras

	Página
Figura 1. Estructura del SARS-CoV-2.	10
Figura 2. Características de SARS-CoV-2.	12
Figura 3. Concepto de interacción de datos a partir de las aguas residuales como herramienta para la epidemiología y la sociología.	13
Figura 4. Descripción general las vías transmisión de SARS-CoV-2 por el agua.	30
Figura 5. El tiempo de supervivencia de los SARS-CoV y otros virus envueltos en un rango de temperaturas en diferentes muestras de agua.	32
Figura 6. Sitios de muestreo en Tijuana y Tecate.	337
Figura 7. Prevalencia de casos activos reportados por secretaria de salud contra la concentración de número de copias.	42
Figura 8. Análisis Montecarlo por cada sitio de muestreo, comparando IN vs SARSW.	43
Figura 9. Análisis Montecarlo durante los periodos de muestreo semanales.	44

Agradecimiento institucional

Quiero expresar mi profundo agradecimiento a todas las instituciones que han sido fundamentales en mi trayectoria académica y de investigación durante mi doctorado:

En primer lugar, a la Universidad Autónoma de Baja California, cuya plataforma educativa y recursos han sido pilares esenciales en mi formación. Agradezco también al Laboratorio de Análisis Microbiológicos de la Facultad de Ciencias Químicas e Ingeniería, donde he tenido la oportunidad de enriquecer mi experiencia académica y profesional.

Mi reconocimiento se extiende al Laboratorio de Diagnóstico Molecular de Enfermedades Infecciosas de la Facultad de Medicina y Psicología. La colaboración en este laboratorio ha ampliado significativamente mis conocimientos en el campo de la investigación médica.

Finalmente, mi gratitud al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por brindarme la beca que ha hecho posible mi doctorado. Su apoyo financiero y respaldo académico han sido cruciales para mi desarrollo profesional y académico.

Cada una de estas instituciones y personas ha dejado una huella indeleble en mi camino académico, y estoy agradecido por la oportunidad de aprender y crecer con su apoyo constante.

Agradecimientos

Quiero expresar mi más profundo agradecimiento a las personas que han sido fundamentales en mi vida.

A mi querida madre, Lety, por tu amor incondicional, tu apoyo constante y por ser mi guía en cada paso que doy. Tu fortaleza y sabiduría son mi mayor inspiración.

A mis hermanos, por las innumerables risas y recuerdos que hemos compartido. Cada uno de ustedes ha contribuido a moldear la persona que soy hoy.

A mi Flaca, por su amor, paciencia y comprensión. Tu presencia en mi vida ha sido un regalo, y estoy agradecido por cada momento que compartimos juntos.

A mi estimada profesora, Lily, por su dedicación y compromiso con mi educación. Tu pasión por la enseñanza y tu fe en mis habilidades han sido fundamentales en mi crecimiento académico.

A mis amigos, por su amistad sincera, su apoyo incondicional y por los buenos momentos que hemos compartido. Cada uno de ustedes ha enriquecido mi vida de una manera única e irremplazable.

Y en memoria de abuela, Trini, cuyo amor y sabiduría siguen siendo una guía constante en mi vida. Aunque ya no estás con nosotros, tu espíritu vive en nuestros corazones.

A todos ustedes, gracias totales.

Resumen

En el presente proyecto se evaluó la presencia de material genómico de SARS-CoV-2 en muestras de agua residual durante un intervalo de 8 meses, en la canalización del río Tijuana y las plantas tratadoras de agua residual (PTAR) en Tecate B.C. Se utilizó la epidemiología de agua residual como herramienta, con el fin de generar una correlación entre los casos activos y el número de copias genómicas en los sitios de muestreo representativos. Se cuantificó ARN viral (6.8 Log₁₀ copias/L) en cuatro puntos diferentes del cauce del río Tijuana, mientras que en las muestras de las PTAR no se detectó material genómico viral. Con base en los resultados del número de copias genómicas por litro de ARN viral, la población expuesta por sitio, datos demográficos y epidemiológicos, se realizó una estimación del intervalo de número estimado de personas infectadas (IN) y la prevalencia del virus utilizando el modelo Montecarlo en los diferentes sitios de muestreo. Con el análisis de los datos se determinó que el porcentaje de la población infectada oscila entre 0.2-1.8% IN, mientras que los datos oficiales informan un porcentaje entre 0.1-0.4% IN. Este estudio pretende demostrar la utilidad del modelo de epidemiología de agua residual para la vigilancia epidemiológica de SARS-CoV-2 en agua residual con el fin de analizar la prevalencia de material genómico viral.

Capítulo 1. Introducción

1.1 Familia Coronavirus.

La extensa familia Coronaviridae, son de ácido ribonucleico (ARN) de cadena positiva. Su nombre es atribuido a las coronas que tiene en la superficie que son parecidas a espigas en forma de corona en su superficie. Estos virus fueron identificados y descritos por primera vez a mediados de 1960, tras ser detectados en cavidades nasales de pacientes, y pueden causar enfermedades leves como el resfriado común o Covid-19 (Hinojosa et al., 2020). Los coronavirus (CoVs) son virus ARN monocatenarios de sentido positivo, poseen envoltura, son altamente diversos y causan trastornos respiratorios, digestivos, hepáticos y neurológicos de severidad variable en un amplio rango de especies animales, incluyendo al ser humano, en quien pueden causar enfermedades graves. Los CoVs se agrupan en cuatro géneros: Alfacoronavirus, Betacoronavirus, Gammacoronavirus y Deltacoronavirus. Respecto a los Betacoronavirus, dos de ellos han sido de gran interés para la comunidad científica y la salud mundial en los últimos diecisiete años: el causante del síndrome respiratorio agudo severo (SARS) y el causante del síndrome respiratorio del Medio Oriente (MERS) (Palacios et al., 2021).

Los coronavirus presentan una alta tasa de mutación, situación que se vuelve problemática al generar nuevas enfermedades emergentes y pandemia; siendo trascendental su estudio (Hinojosa et al., 2020)

1.2 Sars-CoV-2.

La Organización Mundial de la Salud (OMS) denomina COVID-19 a la infección causada por un nuevo virus de la familia coronavirus. Actualmente, el nombre científico de referencia para el virus es Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus-2 (SARS-CoV-2) (García, et al 2021).

Se han identificado dos características genómicas notables en el SARS-CoV-2 (Figura 1). La primera es la optimización de la unión de su proteína espiga S (S, de su término original en inglés Spike) al receptor humano enzima convertidora de angiotensina 2 (ECA2) (Oliva Marín, 2020). La proteína (S) facilita la unión del virus

al receptor de la célula huésped, la proteína (M) ayuda a mantener la curvatura de la membrana y la unión con la nucleocápside, la proteína (E) juega un papel importante en el ensamblaje y liberación del virus y la proteína (N) forma parte de la nucleocápside al unirse al material genético viral. La proteína accesoria (HE) se halla solo en algunos β -coronavirus y su actividad esterasa facilita la entrada del virus en la célula huésped, además, de ayudar en su propagación (Patrian, et al 2020).

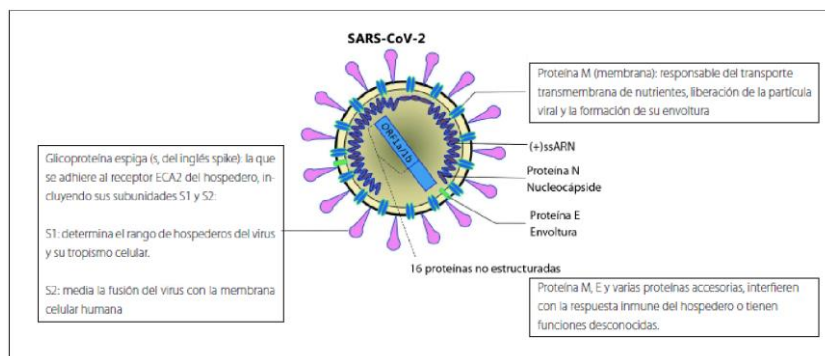


Figura 1. Estructura del SARS-CoV-2 (Oliva Marín, 2020).

1.3 Transmisión.

Las guías publicadas describen 3 vías de transmisión: a través de gotas, por contacto y aerosoles. La transmisión por gotas ocurre, por ejemplo, cuando las gotas respiratorias las emite una persona infectada mediante la tos o el estornudo, estas gotas son posteriormente inhaladas por una persona que se encuentra a una distancia próxima (menos de 2 m). La transmisión por contacto puede ocurrir cuando una persona toca un objeto o una superficie contaminada por el SARS-CoV-2 y posteriormente se toca la boca, la nariz o los ojos. La transmisión por aerosoles se puede dar cuando gotas respiratorias se combinan con el aire formando aerosoles y que podrían llegar a causar infección cuando son inhaladas en una elevada cantidad en un ambiente relativamente cerrado. Es necesaria e imprescindible la disponibilidad de los elementos de protección adecuados para evitar una tasa de contagio elevada entre el colectivo asistencial (García, 2021; Hinojosa et al., 2020).

El número de reproducción básica (R_0) es el número promedio de casos nuevos que genera un caso dado a lo largo de un período infeccioso. Es importante mencionar

que el R0 no es un valor fijo, puede cambiar con el tiempo y se altera a medida que nuestro comportamiento cambia y según se desarrolla inmunidad contra el virus, por ejemplo, para SARS- CoV-2 es variable según el momento de la pandemia. En la actualidad, el R0 se ha calculado por la OMS en 1.94 (Índice de confianza (IC) 95%: 1.4-2.5), similar al determinado en Wuhan de 2.2 (IC 95%: 1.4-3.9). Sin embargo, se han reportado R0 de hasta 10 en pacientes conocidos como «súper transmisores» (Aguilar et al., 2020).

Hay muchas rutas potenciales para la transmisión de patógenos entéricos excretados. La capacidad de un patógeno entérico para transmitirse por cualquiera de estas vías depende en gran medida de su resistencia a los factores ambientales, que controlan su supervivencia y su capacidad para ser transportado por el agua o el aire, a medida que se desplaza por el ambiente. Algunas rutas pueden considerarse rutas “naturales” para la transmisión de enfermedades transmitidas por el agua, pero otras, como el uso de Agua residual (AR) domésticas para la recarga de aguas subterráneas, proyectos de acuicultura a gran escala o disposición de pañales desechables en suelo, son en realidad rutas nuevas. creado por actividades humanas modernas (Gerba, 2015).

1.4 Epidemiología del Sars-CoV-2.

Desde la confirmación de los primeros casos de COVID-19 hasta el 15 de enero de 2021, se han notificado 91.492.398 casos acumulados confirmados de COVID-19, incluidas 1.979.507 defunciones en todo el mundo, lo que representa un total de 23.326.521 casos confirmados adicionales de COVID-19, incluidas 422.122 defunciones, desde la última actualización epidemiológica publicada por la Organización Panamericana de la Salud (OPS) el 11 de diciembre de 2020 (Bulut y Kato, 2020; Ganesh et al., 2021; Garcia, 2021).

Tal como la OMS comunicó en el documento titulado “Ocurrencia de variantes de SARS-CoV-2 en las Américas. Información preliminar”, publicado el 11 de enero de 2021, la aparición de mutaciones es un evento natural y esperado dentro del proceso

de evolución de los virus. Desde la caracterización genómica inicial del SARS -CoV-2, este virus se ha dividido en diferentes grupos genéticos. De hecho, algunas mutaciones específicas definen los grupos genéticos virales (también denominados linajes) que circulan actualmente a nivel global. Por diversos procesos de microevolución y presiones de selección, pueden aparecer algunas mutaciones adicionales, generando diferencias al interior de cada grupo genético (denominadas variantes). Es importante mencionar, que la denominación de clado, linaje, variante, etc., son arbitrarias y no corresponden a una jerarquía taxonómica oficial (Halaji et al., 2021; Koelle et al., 2022; Salzberger et al., 2021).

1.5 Epidemiología molecular de SARS-CoV-2.

Gracias a un esfuerzo sin precedentes se han conseguido secuenciar más de 40.000 genomas completos del SARS-CoV-2 en países de todo el mundo. Esto ha permitido que plataformas como Nextstrain (Figura 2) hayan podido mostrar prácticamente a tiempo real la epidemiología genómica del virus y como ha ido transmitiéndose a lo largo del tiempo por los diferentes países afectados (Flores et al., 2021; Oude et al., 2021).

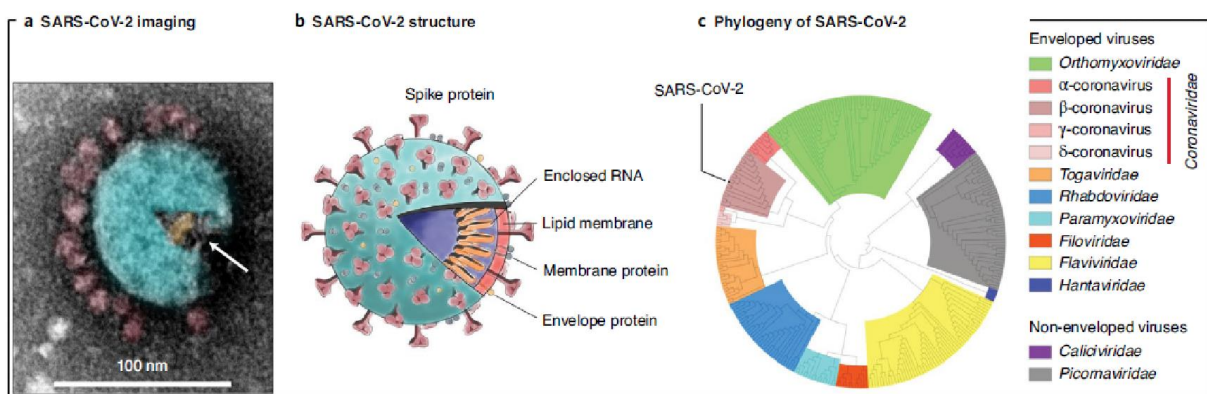


Figura 2. Características de SARS-CoV-2 (Larsen y Wigginton, 2020a).

1.6 Epidemiología basada en agua residual (EBAR).

El estudio de las AR como herramienta epidemiológica (WBE, del inglés wastewater-based epidemiology) se fundamenta en la elevada correlación existente entre los contaminantes y biomarcadores detectados en estas matrices, y datos cualitativos y cuantitativos de las poblaciones de las cuales provienen (Figura 3). Esta herramienta está siendo utilizada en la detección de perfiles de resistencia a antibióticos a partir de metagenomas alrededor del mundo, revelando diferencias notables en diversidad y abundancia de acuerdo con los niveles de sanitización de origen. A nivel de viromas (colección total de virus), una de las principales preguntas de investigación pendientes es la estandarización de técnicas de extracción, purificación, secuenciación y análisis bioinformático, con la finalidad de evitar sesgos sistemáticos (Velástegui et al., 2022a).



Figura 3. Concepto de interacción de datos a partir de las aguas residuales como herramienta para la epidemiología y la sociología (Corominas et al., 2020).

La EBAR se ha convertido en el método de referencia para medir las variaciones epidemiológicas de un patógeno con respecto al tiempo en un área o población determinada, así como para hacer comparaciones entre poblaciones. Otros estudios con metodología similar han conseguido estimar la exposición de la población a

plaguicidas, estimar el consumo de fármacos en zonas concretas, la estimación de factores de riesgo de salud de una población y, actualmente, la popular y mediática cuantificación del SARS-CoV-2 en las aguas residuales para realizar el seguimiento de la propagación del virus en una comunidad concreta (Corominas et al., 2020).

El análisis de virus en AR se lleva realizando desde hace años; (proyecto Underworlds de América del Norte, por citar algún ejemplo). A partir de la pandemia COVID-19 se ha popularizado la aplicación de la EBAR para la vigilancia de epidemias. Existen ya resultados preliminares exitosos sobre la efectividad de la EBAR para esta finalidad. Cabe remarcar, además, que también se podría hacer seguimiento de epidemias causadas por otros agentes patógenos como bacterias y hongos. Se prevé un gran aumento en el número de estudios en esta temática durante los próximos meses (Agrawal et al., 2021; Aguiar et al., 2020). La sensibilidad de EBAR depende de la carga viral en las heces de las personas infectadas. La detección del SARS-CoV-2 en las AR podría ser menos sensible que la de norovirus, porque la carga viral del SARS-CoV-2 en las heces es $1-2 \log_{10}$ más baja que norovirus (Hata et al., 2021; Wu et al., 2021).

1.7 Aguas Residuales (AR).

Se consideran AR a los líquidos que han sido utilizados en las actividades diarias de una ciudad (domésticas, comerciales, industriales y de servicios). Comúnmente las AR suelen clasificarse como:

- Aguas Residuales Municipales: Residuos líquidos transportados por el alcantarillado de una ciudad o población.
- Aguas Residuales Industriales: provenientes de las descargas de Industrias de Manufactura.

Una forma de clasificar es en base al contenido de contaminantes que contiene, así se conocen como:

1. Aguas negras: a las AR provenientes de inodoros, es decir, aquellas que transportan excrementos y orina, ricas en sólidos suspendidos, nitrógeno y coliformes fecales.
2. Aguas grises: a las provenientes de tinajas, duchas, lavamanos y lavadoras, que aportan sólidos suspendidos, fosfatos, grasas y coliformes fecales, esto es, aguas residuales domésticas, excluyendo las de los inodoros.
3. Aguas negras industriales: a la mezcla de las aguas negras de una industria en combinación con las AR de sus descargas. Los contaminantes provenientes de la descarga están en función del proceso industrial, y tienen la mayoría de ellos efectos nocivos a la salud si no existe un control de la descarga (Raffo y Ruiz, 2014).

1.8 Plantas Tratadoras de Agua Residual (PTAR).

Es una instalación donde a las AR se les retiran los contaminantes, para hacer de ella un agua sin riesgos a la salud y/o medio ambiente al disponerla en un cuerpo receptor natural (mar, ríos o lagos) o por su reusó en otras actividades de nuestra vida cotidiana con excepción del consumo humano (no para ingerir o aseo personal).

1.9 Agua Residual Tratada (ART).

Las AR son conducidas a una PTAR donde se realiza la remoción de los contaminantes, a través de métodos biológicos o fisicoquímicos. La salida (efluente) del sistema de tratamiento es conocida como Aguas Residuales Tratadas.

1.9.1 Niveles de Tratamiento del AR.

En la formulación, planeación y diseño de un sistema de tratamiento se pueden considerar objetivos diferentes, teniendo en cuenta la disponibilidad de recursos económicos y técnicos, así como los criterios establecidos para descarga de efluentes o eficiencias mínimas y, eventualmente, motivaciones ecológicas.

En un desarrollo gradual de sistemas de tratamiento se pueden considerar, como objetivos iniciales y principales del tratamiento de aguas residuales, los siguientes:

1. Remoción de la demanda bioquímica de oxígeno (DBO).

2. Remoción de sólidos suspendidos.
3. Remoción de patógenos.

Posteriormente ha sido común agregar:

4. Remoción de nitrógeno y fósforo.

Finalmente se involucra:

5. Remoción de sustancias orgánicas refractarias como los detergentes, fenoles y pesticidas.
6. Remoción de trazas de metales pesados.
7. Remoción de sustancias inorgánicas disueltas.

La complejidad del sistema de tratamiento es, por tanto, en función de los objetivos propuestos. Teniendo en cuenta el gran número de operaciones y procesos disponibles para tratamiento de agua, es común hablar de pretratamiento, tratamiento primario, tratamiento secundario y tratamiento terciario o avanzado de AR (De la Peña et al., 2013).

En general, el pretratamiento tiene como objeto remover del AR aquellos constituyentes que pueden causar dificultades de operación y mantenimiento en los procesos posteriores o que, en algunos casos, no pueden tratarse junto con los demás componentes del AR.

El tratamiento primario se refiere comúnmente a la remoción parcial de sólidos suspendidos, materia orgánica u organismos patógenos, mediante sedimentación u otro medio, y constituye un método de preparar el agua para el tratamiento secundario. Por lo regular, el tratamiento primario remueve alrededor del 60% de los sólidos suspendidos del AR cruda y un 35 a 40% de la DBO (Galindo et al., 2020).

1.9.2 Tipos de tratamiento de AR.

Un sistema de tratamiento de AR es seleccionado de acuerdo con los objetivos que se fijan al buscar la remoción de los contaminantes. Existen diferentes sistemas de tratamiento que implican procesos biológicos, procesos fisicoquímicos, y en ocasiones se presentan ambos. En México para el tratamiento de AR municipales

generalmente se emplean métodos biológicos los cuales se subdividen en las siguientes categorías: aerobios y anaerobios.

Ya en la clasificación dada por el tipo de crecimiento (adherido y/o suspendido), los sistemas de tratamiento son nombrados de acuerdo con el principio de operación (p.e. lodos activados, zanjas de oxidación, lagunas anaerobias, película fija, filtros percoladores, etc.). Una de las tecnologías más utilizadas en México es la de lodos activados (CONAGUA, 2016).

1.10 Importancia que tiene el tratamiento de AR.

En la formulación, planeación y diseño de un sistema de tratamiento se pueden considerar objetivos diferentes, teniendo en cuenta la disponibilidad de recursos económicos y técnicos, así como los criterios establecidos para descarga de efluentes o eficiencias mínimas y, eventualmente, motivaciones ecológicas.

1. **Proteger la Salud Pública y el Medio Ambiente.** Si las AR van a ser vertidas a un cuerpo receptor natural (mar, ríos, lagos), será necesario realizar un tratamiento para evitar enfermedades causadas por bacterias y virus en las personas que entran en contacto con esas aguas, y también para proteger la fauna y flora presentes en el cuerpo receptor natural.
2. **El Reúso del Agua Tratada.** Existen actividades en las que no se requiere utilizar agua potable estrictamente y que se pueden realizar con agua tratada, sin ningún riesgo a la salud, tales como:
 - *Riego de Áreas Verdes:* (glorietas, camellones, jardines, centros recreativos, parques, campos deportivos, fuentes de ornato).
 - *Industriales y de servicios:* (lavado de patios y nave industrial, lavado de flota vehicular, sanitarios, intercambiadores de calor, calderas, cortinas de agua, etc.).

En este caso, la función del tratamiento de las AR será el garantizar que no existirán efectos nocivos a la salud por entrar en contacto con el agua tratada en las actividades antes descritas. Este tipo de objetivos involucran tratamientos de mayor nivel, que generalmente involucran la implementación de las mejores tecnologías y las calidades logradas son casi tan buenas como las generadas para el agua potable (De la Peña et al., 2013).

1.10.1 Reúso en servicios al público con contacto directo.

Se destina a actividades donde el público usuario esté expuesto directamente o en contacto físico. En lo que corresponde a la Norma Oficial Mexicana (NOM-003-SEMARNAT-1997) se consideran los siguientes reúsos: llenado de lagos y canales artificiales recreativos con paseos en lancha, remo, canotaje y esquí; fuentes de ornato, lavado de vehículos, riego de parques y jardines (SEMARNAT, 1998).

1.10.2 Reúso en servicios al público con contacto indirecto u ocasional.

Se destina a actividades donde el público en general esté expuesto indirectamente o en contacto físico incidental y que su acceso es restringido, ya sea por barreras físicas o personal de vigilancia. En lo que corresponde a esta Norma Oficial Mexicana se consideran los siguientes reúsos: riego de jardines y camellones en autopistas; camellones en avenidas; fuentes de ornato, campos de golf, abastecimiento de hidrantes de sistemas contra incendio, lagos artificiales no recreativos, barreras hidráulicas de seguridad y panteones (Abia et al., 2016; Soller et al., 2016).

1.11 Contaminantes Emergentes y reemergentes.

“Contaminantes emergentes” o “nuevos contaminantes”, que no están regulados y cuya presencia en el medio ambiente no es necesariamente nueva, aunque sus implicaciones son aún desconocidas (Pérez et al., 2012).

Diversos estudios han demostrado que los contaminantes emergentes se encuentran en cuerpos de agua; aguas residuales, ríos, arroyos, aguas subterráneas y entornos marinos. Existe la necesidad de estudiar el efecto que producen estos compuestos

en el ambiente, pues se piensa que pueden causar daños a la salud y ecológicos (Peña y Castillo, 2015).

En forma adicional a los patógenos que tradicionalmente se han detectado en el agua, son causantes de enfermedades emergentes. Este tipo de enfermedades comprende aquellas cuya incidencia en los seres humanos ha aumentado en las dos últimas décadas.

Frente a este fenómeno surge la necesidad de incluir nuevos indicadores microbiológicos debido a que se han encontrado que algunos microorganismos patógenos pueden ser más resistentes a cloración y otros factores de estrés ambiental (Castro et al., 2009; Peña y Castillo, 2015).

Uno de las principales fuentes de contaminantes emergentes son las AR que no reciben ningún tratamiento y los efluentes de las PTAR, las cuales no están diseñadas para tratar este tipo de sustancias, por lo que una alta proporción de estos compuestos y sus metabolitos no sufren ningún cambio y entran con una gran toxicidad al medio acuático, como acuíferos y sistemas marinos, entre otros (García, 2008; Jacobo y Santacruz, 2021; Losa, 2021; Reinoso et al., 2017).

1.12 Virus en sistemas acuáticos.

La abundancia de virus animales y bacteriófagos (virus bacterianos), en sistemas acuáticos es variable, de acuerdo con los sitios de muestreo, profundidad y estación del año. Se han reportado datos que van del orden de 10^7 a 10^{11} partículas/L en agua marina superficial. El número de virus, de manera similar a las bacterias, decrece aproximadamente un orden de magnitud entre aguas costeras ricas en nutrientes y el mar abierto pobre en nutrientes. También se reporta una disminución de entre cinco y diez veces en la zona eufótica a profundidades de 500 m y aún más para profundidades abismales.

Existen algunos reportes sobre abundancia viral en diferentes sistemas acuáticos, los reportes de virus humanos son de importancia en la epidemiología en nichos de agua,

los cuales se centran en el desarrollo de métodos de detección y cuantificación. (Espinosa et al., 2004).

2. Antecedentes

2.1 Plan de muestreo para la vigilancia epidemiológica de AR.

La implementación de una estrategia de muestreo de vigilancia de AR en el contexto de COVID-19 debería estar impulsada por las necesidades de salud pública estatales, tribales, locales y territoriales con un fuerte compromiso de las PTAR. Los datos de vigilancia de AR tienen como objetivo complementar otros indicadores de vigilancia de COVID-19 utilizados para implementar medidas de salud pública. Las intervenciones y medidas de salud pública no deberían basarse solo en los datos sobre AR. La estrategia de muestreo debería equilibrar los recursos disponibles y la capacidad de realización de pruebas de detección con la necesidad de contar con datos de salud pública, y es posible que deba actualizarse con el paso del tiempo en función de los conocimientos científicos más recientes y las necesidades de salud pública.

Si el objetivo de la vigilancia de las AR es detectar la presencia del SARS-CoV-2 en estas, tomar muestras una vez por semana podría ser una frecuencia adecuada. Si el objetivo es lograr la indicación temprana de tendencias de infección, se necesitan al menos tres puntos de muestreo dentro de un periodo de tendencia de interés para llevar a cabo la vigilancia. Hay pocos datos disponibles que describan con qué rapidez podrían cambiar las concentraciones en las aguas residuales bajo diferentes situaciones epidemiológicas (Cruz et al., 2020; OMS, 2020).

2.2 Preparación de las muestras.

Almacenar y preparar adecuadamente las muestras de AR ayuda a garantizar que las mediciones de ARN del SARS-CoV-2 del AR sean precisas.

- *Almacenamiento:* refrigerar las muestras a 4 °C inmediatamente después de recogerlas y, si es posible, procéselas dentro de las siguientes 24 horas para reducir la degradación del ARN del SARS-CoV-2 y mejorar la utilidad de la vigilancia. Si no se puede procesar las muestras dentro de las 24 horas posteriores a su recolección, se agrega un control de recuperación de matriz a las muestras antes de refrigerarlas a 4 °C o congelarlas a -20 °C o -70 °C.
- *Homogeneización:* tanto las muestras de AR líquidas como las muestras de lodo primario deben mezclarse bien antes de extraer porciones de las aguas residuales recogidas para su posterior procesamiento. Se mezclan invirtiendo las muestras varias veces (en el caso de muestras líquidas) o mediante métodos de mezclado mecánico. La homogeneización de las muestras también puede incluir procedimientos para descomponer los sólidos de las AR y desagregar las partículas de virus, por ejemplo, mediante sonicación.
- *Clarificación de las muestras:* clarificar las muestras líquidas de AR al eliminar los sólidos grandes puede facilitar los pasos subsiguientes de concentración por filtración si se utilizan para concentrar la muestra. No obstante, eliminar los sólidos también eliminará el ARN del SARS-CoV-2 adherido a estos sólidos. Se pueden clarificar las muestras usando filtros con gran tamaño de poro (5 µm o más grande) o centrifugación (OPS, 2021).

2.3 Métodos de concentración de virus a partir de muestras ambientales.

Las AR urbanas contienen concentraciones de virus suficientemente elevadas que permiten la detección directa, o tras una etapa sencilla de concentración. Pero en ocasiones los virus entéricos se encuentran en el medio acuático en cantidades muy pequeñas, lo que hace que sea necesario la concentración de grandes volúmenes de agua. Este paso constituye uno de los problemas principales de la virología ambiental. La mayor parte de los métodos de recuperación de virus aprovechan las propiedades de los virus como macromoléculas proteicas. Los virus se comportan en el medio como un coloide hidrófilo en el que la carga eléctrica neta varía en función del pH y de la fuerza iónica del medio. Tienen, además, la capacidad de adsorberse sobre partículas en suspensión o soportes de cualquier tipo. Un buen método de

concentración debe ser lo más simple, rápido y barato posible, debe proporcionar altas tasas de recuperación y ser aplicable a la recuperación de diferentes virus. El concentrado viral obtenido debe estar libre de posibles sustancias tóxicas o inhibitoras presentes en las muestras para que pueda ser utilizado en los procesos de detección de subsiguientes.

Se han propuesto más de 30 métodos de concentración, aunque no existe un método universal aplicable a todo tipo de agua y a todo tipo de virus. La metodología debe escogerse en función de los diferentes factores:

- a) La concentración viral, variable según el tipo de agua, el virus de interés y la estación, a la vez que dependiente de factores geográficos y climáticos.
- b) El tipo de agua, ya que las variaciones en sus características fisicoquímicas y en la cantidad de materia orgánica afectan a la capacidad de agregación de los virus, así como a la eficiencia de algunos métodos.
- c) El tipo de virus, ya que ciertos métodos podrían provocar la inactivación de algunos virus (Pina, 2001).

2.3.1 Precipitación con polietilenglicol (PEG precipitación).

La precipitación con polietilenglicol (PEG) se aplica para concentrar virus en las muestras de AR con 8.0 g de PEG 8000 y 4.7 g de cloruro de sodio (NaCl) a concentraciones finales de 10% y 1 M, respectivamente. La mezcla se incuba durante la noche en un agitador a 4 °C. Posteriormente, la mezcla se centrifuga a 10.000 G durante 30 min. El sobrenadante se descarta y los sedimentos resultantes se resuspenden en 500 µL de tampón fosfato como concentrado de virus (Alexander et al., 2020; Hata et al., 2021).

2.3.2 Concentración de virus por ultrafiltración.

La ultrafiltración permite la separación mecánica de las partículas en función de su peso molecular. Se utilizan membranas con un diámetro de poro inferior al tamaño de los virus (peso molecular nominal límite entre 103 y 106 Da) para permitir su retención. La suspensión vírica puede pasar a través de la membrana perpendicularmente o circular tangencialmente a la superficie. Son métodos de gran

sensibilidad, aunque el caudal de filtración suele ser pequeño y limitado por la colmatación de los filtros. Se ha aplicado comúnmente a aguas muy limpias y como método de concentración secundaria (Forés et al., 2021).

2.4 Extracción de ARN en SARS-CoV-2.

La extracción cuantitativa de ácidos nucleicos con alta pureza a partir de muestras complejas es el requisito previo para ensayos de RT-qPCR eficientes y es un paso crucial en el uso de técnicas moleculares para la detección eficiente de virus en muestras clínicas. Tanto las concentraciones virales absolutas como relativas determinarán el éxito de los ensayos moleculares posteriores (Cuadra et al., 2021). En general, la etapa de lisis de la muestra en la extracción de ARN inactiva cualquier virus. Por lo tanto, la muestras después de la lisis se consideran generalmente como no infecciosa. La inactivación del virus SARS-CoV-2 a través de la lisis de la muestra se ha verificado para algunos kits comerciales (OPS, 2021). El ARN viral se extrae de los concentrados utilizando el kit de extracción viral (ZYMO research, 2022). Actualmente se utilizan dos métodos principales de extracción de ARN previo a la RT-qPCR para la detección de SARS-CoV-2: la cromatografía de columna y la aplicación de partículas magnéticas (Cuadra et al., 2021; Randazzo, et al., 2020).

La extracción utilizando cromatografía por columna se basa en la adsorción reversible del ácido nucleico a un soporte de sílice (membrana) bajo condiciones determinadas de pH y fuerza iónica que permite su limpieza y posterior recuperación (Vandeventer et al., 2012). Por otro lado, el uso de partículas construidas con componentes de naturaleza magnética se fundamenta en la unión rápida y reversible del ácido nucleico a estas, seguida de la aplicación de un campo magnético externo que permite la separación del complejo partícula-ARN de la fase líquida de la muestra logrando así su aislamiento y purificación (Lee et al., 2018).

2.5 Reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa en tiempo real (RT-qPCR).

En la PCR a tiempo real, los procesos de amplificación y detección se producen de manera simultánea en el mismo vial cerrado, sin necesidad de ninguna acción

posterior. Además, mediante detección por fluorescencia se puede medir durante la amplificación la cantidad de ADN sintetizado en cada momento, ya que la emisión de fluorescencia producida en la reacción es proporcional a la cantidad de ADN formado. Esto permite conocer y registrar en todo momento la cinética de la reacción de amplificación (Costa, 2004). Los sistemas de detección por fluorescencia empleados en la PCR a tiempo real pueden ser de dos tipos: agentes intercalantes y sondas específicas marcadas con fluorocromos y diseñadas (Chung et al., 2021; Park et al., 2020). Debido a la enorme proyección que tienen los ensayos de la PCR en tiempo real como herramienta útil y extremadamente sensible en investigación clínica, industrial, biológica y biomédica, (Adams, 2020; Corman et al., 2020; Heid et al., 1996).

2.6 Epidemiología Molecular.

El estudio epidemiológico molecular de las enfermedades infecciosas tiene por objeto determinar la relación clonal que existe entre varios aislados de una misma especie. Esta información es muy útil, sobre todo cuando se producen brotes epidémicos causados por cepas multirresistentes, porque permite determinar el número de clones circulantes, identificar la fuente de contaminación o reservorio y los vehículos de transmisión, evaluar la eficacia de las medidas de control dirigidas a evitar la diseminación de clones y diferenciar entre infección y recidiva (Fernández, 2004). Los virus de RNA y muchas bacterias tienen tasas de mutación y evolución muy elevadas, lo que permite que se acumulen suficientes diferencias genéticas en sus genomas en tiempos muy cortos. El análisis de genes que evolucionan rápidamente o el de genomas completos permite la reconstrucción de las relaciones genealógicas entre los aislados obtenidos tanto de muestras clínicas como de fuentes ambientales o de otros orígenes (González et al., 2018).

El análisis del genoma completo de patógenos se ha revelado como una importante herramienta en el estudio de la epidemiología molecular de las enfermedades infecciosas. La existencia de plataformas de publicación y de análisis de secuencias, como las ya citadas y otras como NextStrain y GISAID, han permitido la visualización

en tiempo real de las secuencias disponibles de los diferentes países, facilitando el estudio de la distribución del virus y la identificación de mutaciones que pudiesen derivar en posibles adaptaciones al hospedador humano o cambios en las características del virus (Zaballos et al., 2020). NextStrain consiste en un conjunto de herramientas que toman secuencias sin procesar (en formato FASTA, que es un formato basado en texto para representar secuencias de nucleótidos o secuencias de aminoácidos) y metadatos asociados (por ejemplo, hora, sexo, región, país, publicaciones, autores y laboratorios) como entrada (Iglesias et al., 2021). El primer genoma de SARS-CoV-2 se reportó el 13 de enero de 2020 y hacia finales de septiembre del 2020 se habían reportado en la base de datos GISAID más de 126,000 genomas a nivel mundial, de los cuales más de 2.200 provienen de Latinoamérica y el Caribe. La abundancia y la velocidad de la producción de datos genómicos en el contexto de la epidemia es un hecho sin precedentes en la historia de la humanidad y ha permitido el monitoreo en tiempo real del avance de la pandemia, el estudio de la introducción del virus en diferentes territorios, la vigilancia de la utilidad y aplicabilidad de los métodos diagnósticos y el desarrollo de las posibles vacunas. Además, la información temprana aportada sobre la composición genética de las cepas de SARS-CoV-2 que llegaron durante los primeros meses fue crucial para monitorear la diversificación regional, la fijación de linajes y la importación entre países vecinos a la región (Álvarez et al., 2020).

2.7 Vigilancia del SARS-CoV-2 en AR y PTAR.

A nivel mundial en el año 2021 se tiene que el 45.79% de los casos activos corresponde a la región de Pacífico Occidental, seguido de Europa (32.58%), América (19.61%), Asia Sudoriental (1.47%), África (0.3%) y Mediterráneo Oriental (0.26%). Durante el curso de la Pandemia en México, se han identificado cinco diferentes olas pandémicas, las cuales han representado diferentes escenarios para la implementación de respuesta organizada por parte de todas las instituciones que representan al Sector Salud en nuestro país (Alcocer et al., 2021). El virus SARS-CoV-2, responsable de la actual pandemia COVID-19. Diferentes estudios así lo atestiguan, al haberse detectado la presencia del SARS-CoV-2 en las heces de los

pacientes y también en las aguas residuales no tratadas (Amirian, 2020; Lodder y De Roda Husman, 2020).

La vigilancia microbiológica en AR puede utilizarse como indicador epidemiológico para la detección de la circulación del virus en la población, la utilización de esta herramienta ha demostrado su sensibilidad, incluso cuando la prevalencia de la COVID-19 presenta niveles bajos en la población. Resulta muy interesante esta iniciativa, que va ofreciendo datos semanalmente, en los que se puede ir apreciando, con un cierto distanciamiento en el tiempo, la relación entre la disminución de los casos de Incidencia Acumulada y la evolución de la carga vírica en las aguas residuales analizadas (Mao et al., 2020; Randazzo, Truchado, et al., 2020; Randazzo, Cuevas, et al., 2020; Saguti et al., 2021).

2.8 Número de infecciones por el Modelo Montecarlo.

Ante el problema de la propagación de la nueva enfermedad COVID-19, causada por el nuevo coronavirus SARS-CoV-2, el procedimiento estándar es analizar o ajustar los datos epidemiológicos con los modelos matemáticos adecuados. Esta metodología es muy útil, no sólo para determinar los parámetros particulares de la enfermedad, sino también para pronosticar la evolución de su propagación mediante el uso de algunas cifras típicas de mérito como el tiempo de duplicación, el tiempo de pico y los números reproductivos básicos y afectivos (Ahmed et al., 2020; Maltezos & Georgakopoulou, 2021), el cual se muestra en la siguiente ecuación.

$$IN = \frac{(SARSW)(WW)(IMB)}{(H)(SARSH)}$$

Donde

IN: número estimado de personas infectadas (personas);

SARSW: número de copias de ARN del SARS-CoV-2 por litro de aguas residuales (copias/L);

WW: aguas residuales per cápita (L);

IMB: número de habitantes de la microcuenca (personas);

H: heces per cápita (g);

SARSH: número de copias de ARN del SARS-CoV-2 por gramo de heces (copias/g).

Las copias de ARN de SARS-CoV-2/L de las AR se modelaron como estimaciones puntuales para cada fecha de detección y lugar de muestreo. El flujo diario de aguas residuales se calculó utilizando el producto del número de habitantes que vierten AR a la microcuenca y el promedio de AR per cápita generadas en cada municipio (Cheung et al., 2020; Lescure et al., 2020; Rose et al., 2015; F. Wu et al., 2020).

2.9 Potencial riesgo en salud pública.

La evaluación del riesgo para la salud humana (HHRA, por sus siglas en inglés) es el proceso usado para estimar la naturaleza y probabilidad de efectos adversos para la salud en seres humanos que pueden estar expuestos a peligros en medios ambientales contaminados con virus de carácter patógeno, ahora o en el futuro (Ashbolt et al., 2013).

3. Planteamiento del problema.

La gravedad de esta enfermedad, capaz de poner en peligro la vida de los pacientes, impacta de manera especialmente intensa a aquellos con factores de riesgo, como algunas enfermedades crónicas degenerativas. Además, su alta capacidad de transmisión ha llevado a la detección de casos en la mayoría de los países, clasificándola claramente como una pandemia. (Miranda et al., 2019).

Los problemas de contaminación por residuos sólidos urbano-rurales, que sufren los arroyos, ríos, lagunas, lagos y embalses de presas en México, sumado a la recepción permanente de AR sin tratar de centros de población, hospitales y comunidades anexas distribuidas a lo largo y ancho del territorio nacional, se traducen en problemas de polución del medio ambiente y riesgos para la salud humana (Mundo, 2012).

Se especula que la presencia del virus en AR indica un riesgo de contaminación ambiental que pudiera traducirse en contaminaciones de agua potable, playas, así como de frutas y verduras irrigadas con agua contaminada y la generación de

bioaerosoles. Las AR de los hospitales, especialmente las unidades de enfermedades infecciosas, pueden contener el virus de la epidemia, por lo que requieren una desinfección eficaz antes de descargarlas en aguas naturales (Arora et al., 2020a).

Otras posibles vías de contagio relacionadas con el agua que se deben evaluar son las derivadas de la presencia del virus en AR ya puedan llegar a masas de agua para su reusó para zonas recreativas y también la supervivencia del virus proveniente de las heces de la población contagiada (SCIII, 2023).

Al igual que el SARS-CoV, se ha detectado ARN del recién surgido SARS-CoV-2 en muestras de heces y en AR. Por lo tanto, se ha postulado que el SARS-CoV-2 de reciente aparición se ha detectado en muestras de heces y en AR y que estas podrían ser una vía de infección indirecta durante los brotes de SARS-CoV-2 (Bogler et al., 2020).

En 2001, surge un concepto nuevo, epidemiología basada en aguas residuales (EBAR). Primero se propuso para estimar la situación del abuso de drogas en una comunidad mediante el análisis de la concentración de fármacos en las AR. El desarrollo de una EBAR rápida y económica puede facilitar y empoderar a una autoridad de salud pública local para lograr la vigilancia en tiempo real y la predicción de brotes futuros de la pandemia de COVID-19 (Lu et al., 2020).

En los últimos años, los científicos han aplicado la EBAR a una amplia gama de virus transmitidos por el agua, los alimentos y las heces que las personas infectadas suelen excretar en alta concentración. Sin embargo, el concepto de EBAR también se puede aplicar a virus más allá de los comúnmente asociados con la ruta fecal-oral (es decir, virus entéricos), ya que la diseminación viral puede involucrar diferentes fluidos corporales que finalmente se descargan en las AR urbanas (La Rosa, et al., 2020a). Esto puede considerarse como la ruta principal de transmisión del SARS-CoV-2 en

agua (Figura 4) y las AR porque el SARS-CoV-2 puede seguir siendo infeccioso en las muestras durante más de 7 días a 20 °C (Tran et al., 2021).

Se sabe que los virus envueltos son capaces de retener infectividad durante días a meses en ambientes acuosos. Aproximadamente la mitad de los pacientes sintomáticos eliminan de forma persistente ARN del SARS-CoV-2 en las heces a niveles que llegan a 10⁸ copias de ARN por muestra de heces, lo que significa que un solo paciente puede eliminar miles de millones de copias de ARN de SARS-CoV-2 en las AR a la vez (Trottier et al., 2020).

Como en muchos otros países, la política de vigilancia de las autoridades sanitarias en México se centra en pacientes con síntomas leves a graves, lo que puede subestimar la propagación de la pandemia, ya que hasta el 43% de las personas infectadas son asintomáticas. A la fecha, México es el cuarto país del mundo que reporta muertes (alrededor de 73,000) causadas por COVID-19, y existe una necesidad de herramientas de vigilancia más eficientes (Carrillo et al., 2021).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) subrayó en su orientación provisional del 23 de abril de 2020 la importancia de gestionar de forma segura las AR. Limitar la diseminación del SARS-CoV-2 en el medio ambiente es de gran importancia considerando que varios animales ya han sido identificados como huéspedes potenciales y que el agua recuperada podría usarse en riego. El factor de eliminación de virus que las PTAR deben proporcionar dependen del uso de agua para reúso. Para el riego de cultivos comestibles, indican que una eliminación de 6 log₁₀ es suficiente, mientras que se necesitaría una eliminación de 12 log₁₀ para que el agua sea potable (Lesimple et al., 2020).

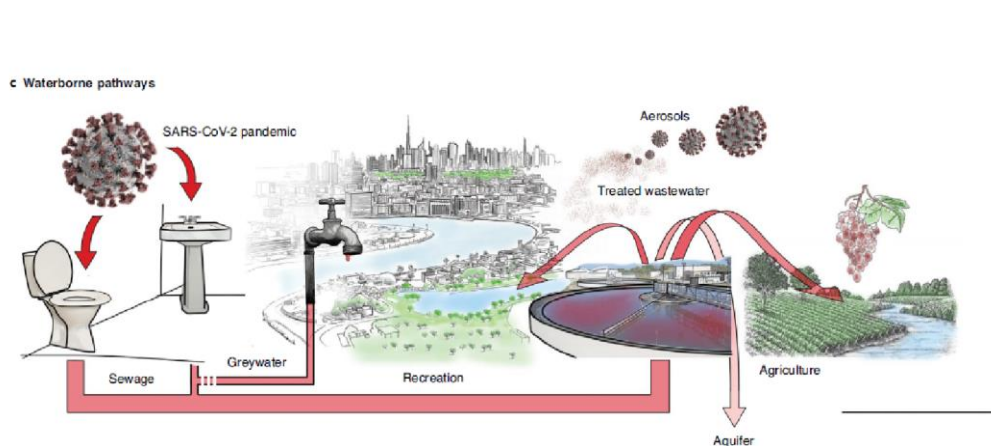


Figura 4. Descripción general las vías transmisión de SARS-CoV-2 por el agua (Bogler et al., 2020).

4. Justificación.

Existe la necesidad de generar más información sobre sus vías de transmisión a través de diversas exposiciones ambientales, incluida la vía de las aguas residuales (AR). Esto se debe a que se sabe que las AR son una fuente importante de transmisión de patógenos y el agua contaminada con patógenos debe tratarse con cuidado. La posibilidad de tal transmisión podría ser una preocupación importante en áreas que no cuentan con instalaciones adecuadas de saneamiento y tratamiento de agua, ya que la descarga de AR sin el tratamiento adecuado expondría al público a la infección (Kataki et al., 2021).

El tema del SARS-CoV-2 y sus implicaciones en los recursos hídricos de México, cobra relevancia por su relación con las descargas de AR (especialmente las no tratadas), debido a que la inmensa mayoría de las descargas de aguas servidas de las grandes ciudades, cabeceras municipales, comunidades de zonas urbanas y rurales en México se realizan a los ríos, arroyos, lagos, lagunas y embalses de presas, con riesgos potenciales para el medio ambiente y la salud humana, especialmente en dos de los grandes sectores hídricos de la nación:

1. El suministro de agua para el consumo humano y usos domésticos.

2. El riego agrícola para la producción de alimentos (Mundo, 2012).

Sin embargo, las tendencias longitudinales de los niveles de ARN del SARS-CoV-2 en las AR aún pueden ser útiles para complementar los métodos de vigilancia tradicionales, comprender las tendencias en la transmisión comunitaria (Larsen y Wigginton, 2020a).

Es de suma importancia lograr la evidencia para la detección de muestras de ARN del SARS-CoV-2 en las plantas de tratamiento de aguas residuales (PTAR) municipales para las correlaciones entre los resultados positivos de las muestras de AR de las PTAR con los datos de salud pública (Arora et al., 2020a).

En numerosas condiciones ambientales, los viriones del SARS-CoV-2 y otros virus envueltos permanecen infecciosos durante varios días. Algunos factores que afectan la infectividad del SARS-CoV-2 en el agua y las AR incluyen la temperatura, el contenido orgánico y el pH del agua (Figura 5). Sin embargo, aún se desconoce la forma en que esto se traduce en riesgo de infección, especialmente porque las actividades humanas y la exposición al agua difieren entre estaciones y regiones (Bogler et al., 2020).

Uno de los principales desafíos en la investigación del SARS-CoV-2 en muestras de AR, es la falta de protocolos estandarizados para su detección. Desde la recolección de muestras hasta la concentración de virus, todavía no existe consenso sobre el procedimiento más eficiente. La forma en que se recolecta la muestra o se concentra el virus parece ser crucial para evitar resultados falsos negativos o concentraciones informadas inexactas (Bofill y Rusiñol, 2020).

La epidemiología basada en agua residual (EBAR) puede ser una herramienta poderosa para estudiar los puntos críticos de epidemias emergentes como COVID-19, con un potencial de ahorro de costos en comparación con los exámenes médicos (Carrillo et al., 2021).

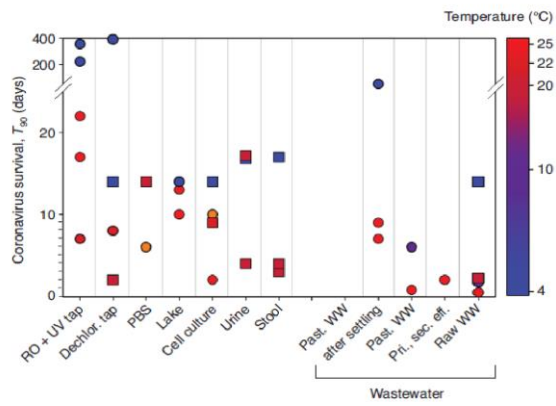


Figura 5. El tiempo de supervivencia de los SARS-CoV y otros virus envueltos en un rango de temperaturas en diferentes muestras de agua (Larsen & Wigginton, 2020a).

5. Objetivo General.

Detección y cuantificación de SARS-CoV-2 como epidemiología basada en agua residual en plantas tratadoras de agua residual en Tijuana y Tecate B.C., mediante técnicas de concentración viral y biología molecular en el Laboratorio de Análisis Microbiológicos de la Facultad de Ciencias Químicas e Ingeniería, así como el Laboratorio de Microbiología y Biología Celular de la Facultad de Medicina y Psicología, UABC, de enero del año 2021 a enero del año 2022 en Tijuana B.C. como sistema de vigilancia epidemiológica basada en agua residual.

5.1 Objetivos específicos.

- 1) Obtener información científica mediante la búsqueda en las bases de datos electrónica de la biblioteca central de la UABC tales como; PubMed, ScienceDirect, Elsevier, EBSCO, SciELO, OMS, OPS, SINAVE, entre otras, para actualizar la información en los antecedentes de la tesis de Doctorado.
- 2) Tomar muestras de agua residual en la canalización río Tijuana, así como en PTAR de Tecate B.C.
- 3) Análisis de Temperatura, pH, DBO, así como de flujo de agua en las muestras tomadas en las PTAR.
- 4) Realizar técnicas de concentración viral en las muestras obtenidas (SARS-CoV-2) Laboratorio de Análisis Microbiológicos de la Facultad de Ciencias Químicas e Ingeniería UABC-Tijuana.
- 5) Detección y cuantificación del gen N de SARS-CoV-2 por la técnica de RT-qPCR en el Laboratorio de Microbiología y Biología Celular de la Facultad de Medicina y Psicología UABC-Tijuana.
- 6) Estimar el número de infecciones por el Modelo Montecarlo, en los sitios de muestreo de la canalización río Tijuana y las PTAR en Tecate B.C.

6. Hipótesis.

Las aguas residuales no tratadas y tratadas de Tijuana y Tecate B.C contiene carga de ARN viral (SARS-CoV-2) como epidemiología basada en agua residual.

6.1 Hipótesis nula.

Las aguas residuales no tratadas y tratadas de Tijuana y Tecate B.C. no contienen carga de ARN viral (SARS-CoV-2) como epidemiología basada en agua residual.

7. Experimental

En la tabla 1 se describen los materiales y equipos utilizados en el desarrollo de este proyecto.

Tabla 1. Materiales y Equipos utilizados en el proyecto de investigación.

Material/Equipo	Catalogo	Marca
Termociclador	12011319	Biorad
Campana de flujo laminar	BIB-BBS-V1300	Biobase
Micropipetas 1000,200 y 20 μ L	10635313	Gilson™
Placas RT-qPCR	12749448	Axygen™
Película Selladora	10720181	Thermo Scientific™
Puntillas 1000, 200 y 20 μ L	10691213	Fisherbrand™
Microtubos Eppendorf 1.5 mL	10458312	Eppendorf™
Kit viral de ARN rápido	R1034	Zymo research
SARS-CoV-2 Nucleic Acid detection kit	CoV2-32	Zybio Inc.
Agua, (para trabajar con ARN) (tratada con DEPC, sin DNAas, sin RNAas/biol. mol)	10245203	Fisher Bioreagents
Frascos de reactivo de vidrio de borosilicato con tapón de polipropileno 250 mL	11902629	Pyrex™
Ultracentrífuga	15362177	Thermo Scientific™
Ultracongelador	UF V 500 - 477 L	Binder

7.1 Sitios de muestreo.

El presente es un estudio transversal, el cual se realizó en dos municipios de Baja California (Figura 6), en la ciudad de Tijuana se recolectaron muestras de agua residual en cuatro sitios de interés epidemiológico sobre la canalización del río Tijuana de agosto 2021 a agosto 2022, en la ciudad de Tecate se tomaron muestras en los puntos críticos de dos PTAR en el período de marzo a mayo 2022. (Tabla 2)

Tabla 2. Descripción de los periodos de muestreo de agua residual en la canalización del río Tijuana.

<i>Mes/Año</i>	<i>Muestras (n)</i>	<i>Ciudad</i>	<i>Muestras positivas/mes (n)</i>	<i>Estación del año</i>
09/2021	4	Tijuana	4	Otoño
10/2021	12	Tijuana	10	Otoño
11-2021	12	Tijuana	11	Otoño
02-2022	12	Tijuana	2	Invierno
03-2022	8	Tijuana	1	Invierno
03-2022	2	Tecate	0	Invierno
04-2022	4	Tijuana	0	Primavera
04-2022	2	Tecate	0	Primavera
05-2022	8	Tijuana	2	Primavera
05-2022	2	Tecate	0	Primavera
06-2022	7	Tijuana	1	Verano
06-2022	2	Tecate	0	Verano
07-2022	7	Tijuana	0	Verano
Total	82		31(38%)	

Con respecto a la descripción de los diferentes sitios de muestreo, son: en la canalización del río Tijuana se toparon 4 diferentes sitios.

1. Monte de los Olivos (MO)
2. IMSS Clínica #1 (C#1)
3. Hospital general de Tijuana (HGT)
4. Plaza Río (P. Río)

En la ciudad de Tecate se tomaron muestras de la entrada y salida de dos diferentes PTAR.

1. PTAR-Tecate
2. PTAR-Cereso “El Hongo”

Las muestras de aguas se captaron una vez a la semana de acuerdo con protocolos sugeridos de vigilancia de AR del CDC (CDC, 2020). Se captaron 500 mL de AR en frascos de vidrio estériles y se transportaron hasta el laboratorio manteniendo una cadena de frío (2 °C a 8 °C), en recipientes de tipo nevera acondicionado con hielo asegurando temperatura baja en todo el trayecto con el uso de elementos del tipo gel frío. Las muestras se procesan en el laboratorio dentro de las próximas 24 horas reduciendo el riesgo la degradación del material genómico del SARS-CoV-2 de acuerdo con recomendaciones de la OPS (OPS, 2021).

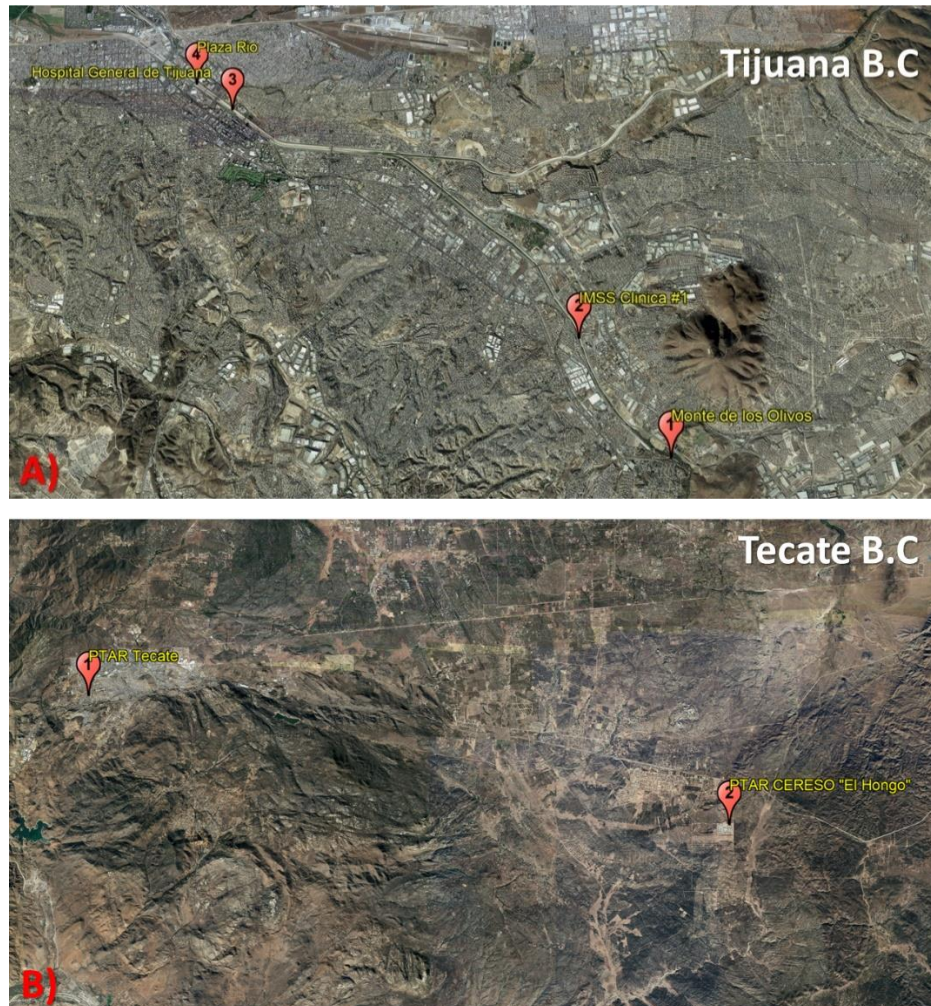


Figura 6. Sitios de muestreo en Tijuana y Tecate. **A)**: 1) Monte de los olivos (MO), 2) IMSS Clínica #1 (C#1), 3) Hospital general de Tijuana (HGT), 4) Plaza Rio (P. Rio). **B)**: 1) PTAR-Tecate y 2) PTAR-Cereso "El Hongo". Google maps

7.2 Determinación de los residuos de ARN viral.

Las muestras obtenidas se colocaron alícuotas de 50 mL en tubos cónicos, para la determinación del SARS-CoV-2 de acuerdo con la metodología descrita a continuación (OMS, 2020). Se utilizó una combinación de dos técnicas de concentración viral, la primera de ellas fue la se ultra centrifugaron para separar la materia orgánica. A continuación, se realizó una dilución 3:1 del sobrenadante (10 mL) de la centrifugación con la solución de polietilenglicol 8000 (30 mL) (8% p/v) y 0.9 g de NaCl (0,3 M) como técnica de precipitación, la cual se mezcló para llevarla a incubación a 4°C durante toda la noche en agitación. Posteriormente se

centrifugaron a 10,000 G durante 1 h hasta la formación de un pellet (Hjelmsø et al., 2017; Lewis y Metcalf, 1988; Rusiñol et al., 2020).

El sedimento viral se resuspendió en agua grado molecular libre de ADNAsas y RNAsas para la extracción de ARN con el método automatizado con perlas, seguida de RT-qPCR con cebadores para el gen de la nucleocápside N. El control positivo (IDT) es un plásmido que contiene el gen completo de la nucleocápside del SARS-CoV-2 y se utiliza para crear las curvas estándar para los cebadores N1, N2 (Carrillo, et al., 2021; La Rosa et al., 2020; Westhaus et al., 2021). El resultado se reportó en número de copias genómicas por litro de AR. (Haramoto et al., 2020; La Rosa et al., 2020b; Larsen y Wigginton, 2020b; Medema et al., 2020).

7.3 Número de infecciones por el Modelo Montecarlo.

La prevalencia de la infección por SARS-CoV-2 en la cuenca de captación se estimó mediante un balance de masas sobre el número total de copias de ARN viral en las AR cada día, medido en las AR por RT-qPCR, y el número de copias de ARN de SARS-CoV-2 excretadas en las heces por un infectado. Las copias de ARN de SARS-CoV-2/L de las AR se modelaron como estimaciones puntuales para cada fecha de detección y lugar de muestreo. El flujo diario de AR se calculó utilizando el producto del número de habitantes que vierten AR a la microcuenca y el promedio de AR per cápita generadas en cada municipio (Cheung et al., 2020; Lescure et al., 2020; Rose et al., 2015; Wu et al., 2020).

8. Resultados y discusiones.

Se evaluaron dos genes del SARS-CoV-2, N1 y N2 esto depende directamente del kit utilizado y aprobado para la detección de SARS-CoV-2 alguno autores reportan haber utilizado genes como (E,S, ORF1ab) como lo reportan (Arora et al., 2020a; Carrillo, Barragán, et al., 2021), esto en cada muestra de AR procedente de cada uno de los cuatro sitios elegidos en Tijuana y dos PTAR de Tecate B.C. durante el período de agosto 2021- agosto 2022. La cuantificación de número de copias genómicas del gen N se realizó utilizando las pendientes de las curvas estándar para la

cuantificación del gen N1 (Anexo 1) con coeficientes de correlación de 0,95 (Anexo 2).

8.1 Detección de SARS-CoV-2 en agua residual y PTAR.

Se recogieron 82 muestras en total: 74 muestras de AR pertenecen a los cuatro puntos críticos de muestreo de la canalización río Tijuana, 8 muestras ART en dos PTAR de la ciudad de Tecate B.C., teniendo que el 38% de las muestras del AR fueron positivas para al menos uno de los genes del SARS-CoV-2 analizados y 0% en las muestras de ART (Tabla 3).

Tabla 3. Número de copias genómicas en promedio cuantificadas en cada semana de muestreo en la canalización río Tijuana.

<i>Fechas</i>	<i>Semanas</i>	<i># Casos activos</i>	<i>Umbral de ciclo (Ct)*</i>	<i>No. Copias genómicas (#Cg) *</i>	<i>Log10/L</i>
24/09/2021	S1	7855	36.25	11732.1	7.5
15/10/2021	S2	5590	37.17	1510.7	6.7
23/10/2021	S3	4145	36.99	3549.9	7.0
29/10/2021	S4	3718	36.26	11585.0	7.5
15/11/2021	S5	2770	38.57	1.0	3.5
19/11/2021	S6	2324	37.10	2354.5	6.8
29/11/2021	S7	2951	37.05	2861.2	6.9
10/02/2022	S8	308	0.00	0.0	0.0
17/02/2022	S9	251	36.52	8744.4	7.4
24/02/2022	S10	170	38.12	1.0	3.5
31/03/2022	S11	145	38.98	1.0	3.5
05/05/2022	S12	87	41.405	1.0	3.5

*, Media

En cuanto al número total de muestras analizadas se puede observar que nuestra n (74) es mayor que la mayoría de investigación en el tema, existen proyectos con un

mínimo de muestras (9) (Ahmed et al., 2020) y otros que su n es muy alta (112) (Mlejnkova et al., 2020). En este proyecto se optó por tomar muestras de dos diferentes nichos de agua: AR y PTAR, mientras que otras investigaciones solo se enfocaron en un solo nicho, (Farkas et al., 2021; Westhaus et al., 2021). Lo más relevante en este proyecto es la temporalidad ya que se tomaron muestras durante un año, esto permite comparar con diversos factores externos por ejemplo: estaciones del año, otros investigadores lo hicieron con menos tiempo, (Gonzalez et al., 2020) lo hizo durante una semana, mientras que (Claro et al., 2021) lo hicieron durante 11 meses.

La presencia del ARN del SARS-CoV-2 en AR suscita nuevas preocupaciones. Según la OMS, debido a los riesgos potenciales de enfermedades infecciosas relacionadas con el excremento, incluida la posible presencia de SARS-CoV-2, obliga a que las AR deban tratarse en plantas de tratamiento bien diseñadas (OMS, 2020; OPS, 2021). Además, se sugiere que no hay pruebas sobre la supervivencia de los virus infecciosos del SARS-CoV-2 en las AR; por lo tanto, los procesos convencionales de tratamiento de aguas residuales deberían inactivar los virus con envoltura, incluido el SARS-CoV-2 (Aguilar et al., 2020). En este estudio se obtuvieron resultados más altos en los periodos de invierno, específicamente de noviembre a diciembre, que a su vez concuerda con los altos índices de contagios de COVID-19 en la población de las ciudades analizadas en este mismo periodo (Sims y Kasprzyk, 2020; Wathore et al., 2020). En cuanto al análisis para la detección de SARS-CoV-2 en ART, no se detectó material genómico en ninguno de los dos sitios de muestreo (PTAR Tecate y PTAR Cereso “El Hongo”) durante todo el análisis temporal, esto puede depender de diferentes factores externos, como mayor temperatura, un pH elevado o bajo, contenido de materia orgánica y la luz solar facilitan la reducción de la cantidad de virus (Ardunio et al., 2020). Sin embargo hay otros trabajos donde sí detectan Cg en PTAR en donde (Arora et al., 2020a; Carrillo, Barragán, et al., 2021) comentan que la detección de material genómico viral dependerá de factores externos y tipos de tratamiento de AR.

Uno de los grandes retos ha sido encontrar la mejor técnica de concentración viral, entre las más utilizadas se tienen las de centrifugación (ultra centrifugación) y precipitación (Polietilenglicol), así mismo la confinación de ambos o con otras técnicas como filtración. En nuestro estudio se decidió utilizar la combinación de las dos técnicas más utilizadas, la cual nos permitió tener un mejor concentrado viral. A la fecha existen pocas guías para la obtención del concentrado viral, se ha estado descubriendo conforme avanza la pandemia de SARS-CoV-2. (Alexander et al., 2020; Alygizakis et al., 2021; Farkas et al., 2021; Pérez et al., 2012; Torii et al., 2022; Wang et al., 2005)

8.2 Vigilancia del SARS-CoV-2 en AR y PTAR.

La vigilancia microbiológica en AR puede utilizarse como indicador epidemiológico para la detección de la circulación del virus en la población, la utilización de esta herramienta ha demostrado su sensibilidad, incluso cuando la prevalencia de la COVID-19 presenta niveles bajos en la población (Lodder y De Roda Husman, 2020). El presente estudio se monitoreo durante un periodo de tiempo el no. Cg de SARS-CoV-2, donde los resultados los expresamos en semanas y se comparó con el número de casos activos reportados por la Secretaría de Salud para el municipio de Tijuana, en el mismo periodo de tiempo, por lo que se observa que existe una relación estrecha del número de casos activos/ no. Cg como vigilancia y rastreo de la población expuesta (Figura 7). Donde se puede observar que la semana 4, 7 y 9, son los picos mas altos, se detectan 6.8-7.5 Log_{10} Cg/L mientras que en otros estudios reportados hay promedios de 2-5 Log_{10} Cg/L (Carrillo, Barragán, et al., 2021; Randazzo, Truchado, et al., 2020) resulta muy interesante esta iniciativa, que va ofreciendo datos semanalmente, en los que se puede ir apreciando la evolución de la carga vírica en las aguas residuales analizadas (Mao et al., 2020; Randazzo, Truchado, et al., 2020; Randazzo, Cuevas, et al., 2020; Saguti et al., 2021).

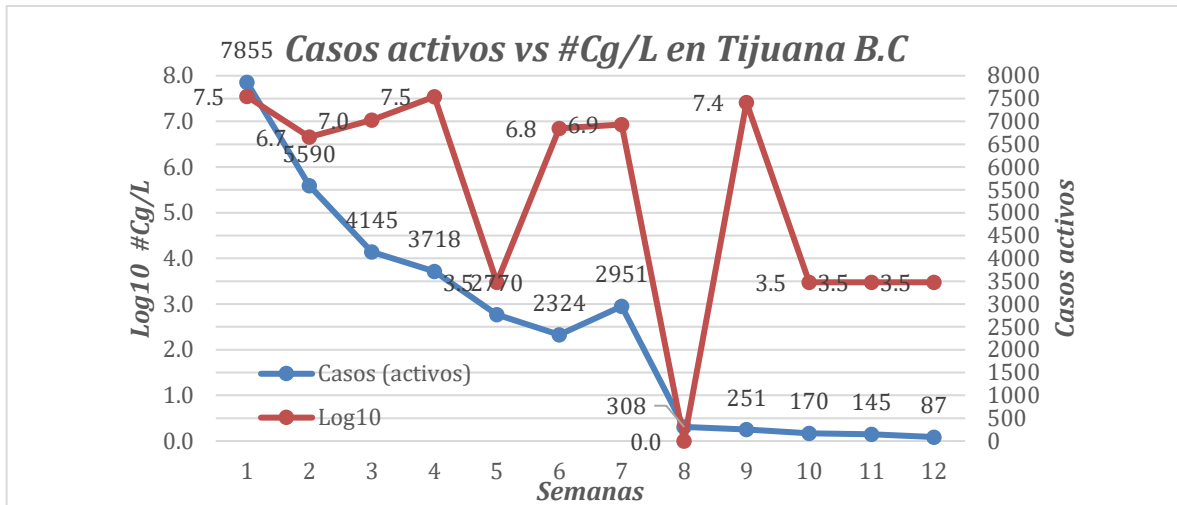
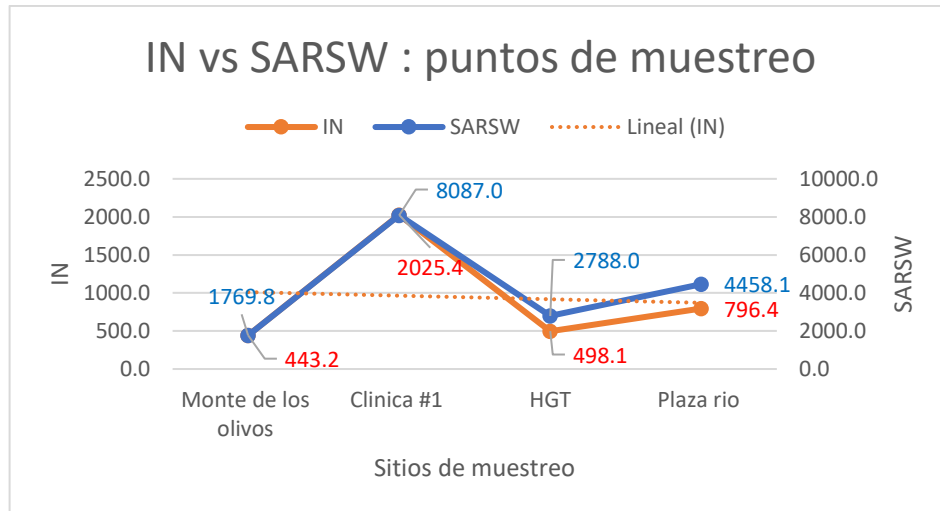


Figura 7. Prevalencia de casos activos reportados por la Secretaría de Salud contra la concentración de número de copias (Log10 Cg/l) durante el periodo de muestreo (media de los 4 puntos por semanas).

8.3 Estimación de Número de personas infecciones por el Modelo Montecarlo.

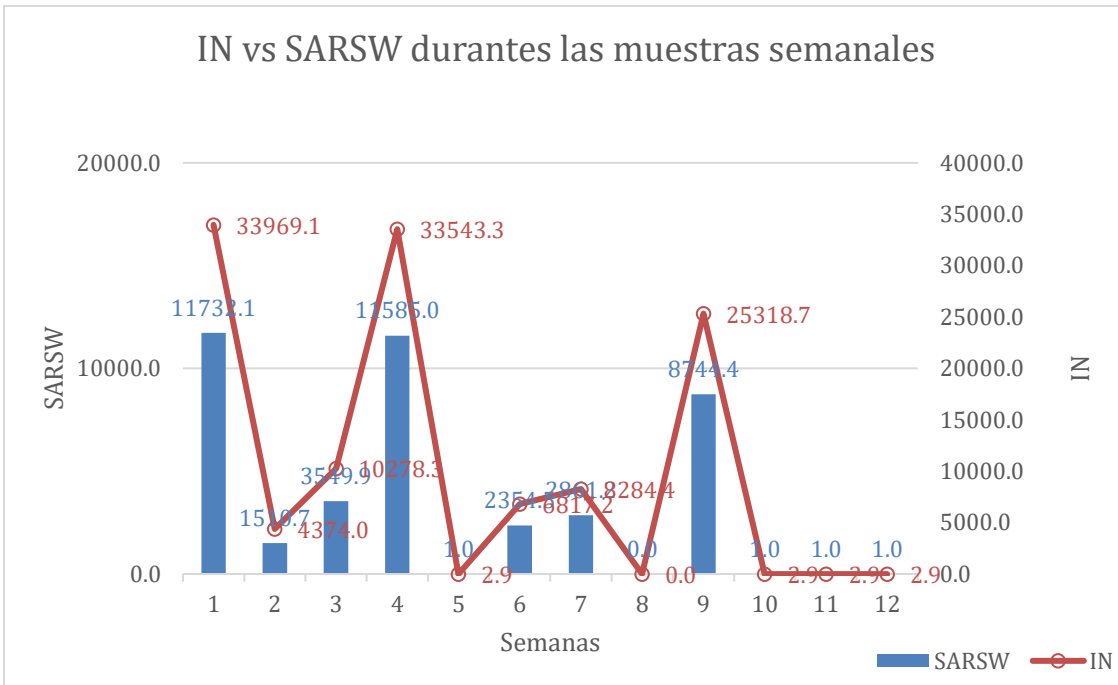
El modelo de Montecarlo permitió obtener una distribución estimada estadísticamente aceptable de posibles casos de personas infectadas con SARS-CoV-2. Dado que este modelo es un método no determinista, informamos los resultados de la siguiente manera: mediana (valor mínimo-valor máximo). Considerando la mediana, obtenemos los siguientes resultados ordenados (Figura 8), en cuanto al número de personas infectadas por sitio de muestreo: 443, 2025, 498 y 796 personas infectadas para Monte de los Olivos, Clínica #1, HGT y Plaza Rio, respectivamente.



SARSW: Número estimado de personas infectadas, **IN:** Número estimado de personas infectadas

Figura 8. Análisis Montecarlo por cada sitio de muestreo, comparando IN vs SARSW.

Otros autores reportan promedios de 2-170 (IN) en los diferentes sitios (Ahmed et al., 2020) que es un promedio bajo comparado con nuestros resultados, sin embargo existen reportes donde hay promedios muy altos, donde se alcanzan 13,000 (IN), hay que analizar que esto depende del #Cg reportadas, la población expuesta, así como el volumen de descarga de AR. Así mismo, se analizó la temporalidad de posibles infecciones durante los periodos semanales, teniendo como resultado lo mostrado en la figura 9, como semanas con más proyección de personas infectadas: S1 (33969), S4 (33543) y S9 (25318). Utilizando la mediana de no. Cg por semana en todos los sitios de muestreo.



SARSW: Número estimado de personas infectadas, IN: Número estimado de personas infectadas

Figura 9. Análisis Montecarlo durante los periodos de muestreo semanales.

Hablando del seguimiento epidemiológico la herramienta que se ha utilizado durante la pandemia para un monitoreo ambiental en los diferentes tipos de aguas es WBE. Hay una diferencia entre los nichos de agua donde se hace el monitoreo enfocado en el número de copias genómicas detectadas, esto dependerá del tipo de tratamiento que tiene esta agua, de los factores ambientales (pH, humedad, flujo de agua, y temperatura) que influye en la concentración encontrada como, por ejemplo, en las PTAR existen factores externos, como tipo de tratamiento, cantidad de grasas, pH y Flujo de agua que puedan impedir la detección. En cuanto a la diferencia que existe entre los 4 sitios que se muestreo en este proyecto en la canalización del río Tijuana, se puede observar diferentes flujos de AR, se logró observar algunas compuertas cercanas a los hospitales (sitio #2 y sitio #3) que se notaba la salida de AR con detergentes. Todo esto influye de manera directa como factor externo en la detección de virus (Foladori et al., 2022; Girón et al., 2021; Gonzalez et al., 2020; McCall et al., 2020; Michael et al., 2020; Orive et al., 2020; Velástegui et al., 2022b). Debido a que no existe evidencia definitiva sobre el riesgo de contagio directo de la población expuesta.. Sin embargo, estos datos no pueden aproximarse mucho a los casos notificados oficialmente a menos que aumente el nivel de respuesta de las

pruebas gubernamentales (Ahmed et al., 2020; J. R. González et al., 2021; Hasan et al., 2021). Para maximizar el potencial de los diversos esfuerzos de WBE en curso, se propone un esfuerzo global para coordinar las metodologías y el intercambio de datos para maximizar los rendimientos de EBAR para los brotes actuales y futuros de la enfermedad. La comunidad también se beneficiará de la inclusión de controles y estándares cuantitativos apropiados.

9. Conclusiones.

La epidemiología basada en agua residual se ha convertido en una herramienta factible en el mundo, en México hay poca evidencia, aunque su aplicación está en fase temprana, es necesario hacer más seguimiento en diferentes temporalidades, esto con el fin de general más información de cómo se comporta el virus en agua, para conocer la prevalencia de SARS-CoV-2 utilizando la detección de los genes (N, RdRp, E,) mediante la técnica de RT-qPCR con el fin de cuantificar el número de copias genómicas de ARN viral. Ha sido un reto durante todo en periodo de pandemia, encontrar el mejor método de concentración de ARN viral, ya que la técnica de recuperación dará la pauta para monitoreos futuros hablando de concentraciones más elevadas de material viral.

La opción que se utilizó en el presente trabajo fue la combinación de técnicas (ultracentrifugación y precipitación) para así optimizar y tener mejores resultados analizando AR. Por otra parte, los resultados mostraron una coincidencia significativa con los casos confirmados en la ciudad de Tijuana, pero la ciudad de Tecate con las PTAR no hay resultados positivos que concluyan alguna correlación con la población estudiada. Esto nos indica que el proceso de tratamiento de las aguas residuales en ambas PTAR en Tecate B.C. podrían eliminar ARN de SARS-CoV-2. Este estudio intenta proporcionar cierta estimación en los diferentes puntos de muestreo utilizando el método Montecarlo, el cual simula un número de personas que se pueden contagiar en correlación con el número de copias genómicas detectadas en cada sitio de muestreo. En general, este estudio demostró el potencial de la detección del SARS-CoV-2 en las aguas residuales como herramienta de alerta temprana y

predicción de la propagación de la enfermedad. Este seguimiento puede ayudar a las autoridades a tomar medidas apropiadas y rápidas en salud pública para contener cualquier posible brote de COVID-19 en sus comunidades.

10. Referencias

- Abia, A. L. K., Ubomba-Jaswa, E., Genthe, B., & Momba, M. N. B. (2016). Quantitative microbial risk assessment (QMRA) shows increased public health risk associated with exposure to river water under conditions of riverbed sediment resuspension. *Science of The Total Environment*, 566–567, 1143–1151. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.05.155>
- Adams, G. (2020). A beginner's guide to RT-PCR, qPCR and RT-qPCR. *The Biochemist*, 42(3), 48–53. <https://doi.org/10.1042/BIO20200034>
- Agrawal, S., Orschler, L., & Lackner, S. (2021). Long-term monitoring of SARS-CoV-2 RNA in wastewater of the Frankfurt metropolitan area in Southern Germany. *Scientific Reports*, 11(1), 5372. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-84914-2>
- Aguiar, M. D. L., Campos, A., R. Matos, A., Rigotto, C., Sotero-Martins, A., Teixeira, P. F. P., & Siqueira, M. M. (2020). Wastewater-Based Epidemiology (WBE) and Viral Detection in Polluted Surface Water: A Valuable Tool for COVID-19 Surveillance—A Brief Review. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 17(24), 9251. <https://doi.org/10.3390/ijerph17249251>
- Aguilar, N., Hernández, A., & Ibanes, C. (2020). Características del SARS-CoV-2 y sus mecanismos de transmisión. *Revista Latinoamericana de Infectología Pediátrica*, 33(3), 143–148. <https://doi.org/10.35366/95651>
- 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. (2020). 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. *Science of The Total Environment*, 728, 138764.

<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.138764>

Alcocer, J., Lopez-Gatell, H., Ferrer, J., & Lecuona, M. (2021). *Informe integral COVID-19 en México* (1ero; p. 80). Secretaria de Salud (SS).

Alexander, M. R., Rootes, C. L., Van Vuren, P. J., & Stewart, C. R. (2020). Concentration of infectious SARS-CoV-2 by polyethylene glycol precipitation. *Journal of Virological Methods*, 286, 113977. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2020.113977>

Álvarez, D. A., Laiton-Donato, K., Franco-Muñoz, C., & Mercado-Reyes, M. (2020). Secuenciación del SARS-CoV-2: La iniciativa tecnológica para fortalecer los sistemas de alerta temprana ante emergencias de salud pública en Latinoamérica y el Caribe. *Biomédica*, 40(Supl. 2), 188–197.

<https://doi.org/10.7705/biomedica.5841>

Alygizakis, N., Markou, A. N., Rousis, N. I., Galani, A., Avgeris, M., Adamopoulos, P. G., Scorilas, A., Lianidou, E. S., Paraskevis, D., Tsiodras, S., Tsakris, A., Dimopoulos, M.-A., & Thomaidis, N. S. (2021). Analytical methodologies for the detection of SARS-CoV-2 in wastewater: Protocols and future perspectives. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 134, 116125. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2020.116125>

Amirian, S. (2020). Potential fecal transmission of SARS-CoV-2: Current evidence and implications for public health. *International Journal of Infectious Diseases*, 95, 363–370. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2020.04.057>

Ardunio, M., Berendes, D., Casanova, L., & Cunliffe, D. (2020). *Agua, saneamiento, higiene y gestión de desechos en relación con el virus de la COVID-19* (p. 10). OMS.

- Arora, S., Nag, A., Sethi, J., Rajvanshi, J., Saxena, S., Shrivastava, S. K., & Gupta, A. B. (2020a). Sewage surveillance for the presence of SARS-CoV-2 genome as a useful wastewater based epidemiology (WBE) tracking tool in India. *Water Science and Technology*, 82(12), 2823–2836. <https://doi.org/10.2166/wst.2020.540>
- Arora, S., Nag, A., Sethi, J., Rajvanshi, J., Saxena, S., Shrivastava, S. K., & Gupta, A. B. (2020b). Sewage surveillance for the presence of SARS-CoV-2 genome as a useful wastewater based epidemiology (WBE) tracking tool in India. *Water Science and Technology*, 82(12), 2823–2836. <https://doi.org/10.2166/wst.2020.540>
- Ashbolt, N. J., Amézquita, A., Backhaus, T., Borriello, P., Brandt, K. K., Collignon, P., Coors, A., Finley, R., Gaze, W. H., Heberer, T., Lawrence, J. R., Larsson, D. G. J., McEwen, S. A., Ryan, J. J., Schönfeld, J., Silley, P., Snape, J. R., Van Den Eede, C., & Topp, E. (2013). Human Health Risk Assessment (HHRA) for Environmental Development and Transfer of Antibiotic Resistance. *Environmental Health Perspectives*, 121(9), 993–1001. <https://doi.org/10.1289/ehp.1206316>
- Bofill, S., & Rusiñol, M. (2020). Recent trends on methods for the concentration of viruses from water samples. *Current Opinion in Environmental Science & Health*, 16, 7–13. <https://doi.org/10.1016/j.coesh.2020.01.006>
- Bogler, A., Packman, A., Furman, A., Gross, A., Kushmaro, A., Ronen, A., Dagot, C., Hill, C., Vaizel-Ohayon, D., Morgenroth, E., Bertuzzo, E., Wells, G., Kiperwas, H. R., Horn, H., Negev, I., Zucker, I., Bar-Or, I., Moran-Gilad, J., Balcazar, J. L., ... Bar-Zeev, E. (2020). Rethinking wastewater risks and monitoring in light of the COVID-19

pandemic. *Nature Sustainability*, 3(12), 981–990.

<https://doi.org/10.1038/s41893-020-00605-2>

Bulut, C., & Kato, Y. (2020). Epidemiology of COVID-19. *TURKISH JOURNAL OF MEDICAL SCIENCES*, 50(SI-1), 563–570. <https://doi.org/10.3906/sag-2004-172>

Bustin, S. A., & Nolan, T. (2020). RT-qPCR Testing of SARS-CoV-2: A Primer.

International Journal of Molecular Sciences, 21(8), 3004.

<https://doi.org/10.3390/ijms21083004>

Carrillo, J., Barragán, M., & Buitrón, G. (2021). Surveillance of SARS-CoV-2 in sewage and wastewater treatment plants in Mexico. *Journal of Water Process Engineering*, 40, 101815. <https://doi.org/10.1016/j.jwpe.2020.101815>

Carrillo, J., Barragán-Trinidad, M., & Buitrón, G. (2021). Surveillance of SARS-CoV-2 in sewage and wastewater treatment plants in Mexico. *Journal of Water Process Engineering*, 40, 101815. <https://doi.org/10.1016/j.jwpe.2020.101815>

Castro, L., Gortáres-Moroyoqui, P., Mondaca-Fernández, I., Meza, M. M., & Balderas-Cortez, J. J. (2009). *Patógenos emergentes como restricción para el reuso de las aguas residuales municipales tratadas de Cd. Obregón, Sonora*.

CDC. (2020). *Implementación de la vigilancia de aguas residuales para la detección de COVID-19 con el Sistema Nacional de Vigilancia de Aguas Residuales*.

Cheung, K. S., Hung, I. F. N., Chan, P. P. Y., Lung, K. C., Tso, E., Liu, R., Ng, Y. Y., Chu, M. Y., Chung, T. W. H., Tam, A. R., Yip, C. C. Y., Leung, K.-H., Fung, A. Y.-F., Zhang, R. R., Lin, Y., Cheng, H. M., Zhang, A. J. X., To, K. K. W., Chan, K.-H., ... Leung, W. K. (2020). Gastrointestinal Manifestations of SARS-CoV-2 Infection and Virus Load in Fecal Samples From a Hong Kong Cohort: Systematic Review and Meta-

analysis. *Gastroenterology*, 159(1), 81–95.

<https://doi.org/10.1053/j.gastro.2020.03.065>

Chung, Y.-S., Lee, N.-J., Woo, S. H., Kim, J.-M., Kim, H. M., Jo, H. J., Park, Y. E., & Han, M.-G.

(2021). Validation of real-time RT-PCR for detection of SARS-CoV-2 in the early stages of the COVID-19 outbreak in the Republic of Korea. *Scientific Reports*,

11(1), 14817. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-94196-3>

Claro, I. C. M., Cabral, A. D., Augusto, M. R., Duran, A. F. A., Graciosa, M. C. P., Fonseca, F. L.

A., Speranca, M. A., & Bueno, R. D. F. (2021). Long-term monitoring of SARS-COV-2 RNA in wastewater in Brazil: A more responsive and economical approach.

Water Research, 203, 117534. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2021.117534>

CONAGUA. (2016). *LINEAMIENTOS TÉCNICOS: SISTEMA DE TRATAMIENTO DE AGUAS*

RESIDUALES A NIVEL VIVIENDA EN ZONA RURAL (1; p. 40). Secretaria de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT).

Corman, V. M., Landt, O., Kaiser, M., Molenkamp, R., Meijer, A., Chu, D. K., Bleicker, T.,

Brünink, S., Schneider, J., Schmidt, M. L., Mulders, D. G., Haagmans, B. L., Van Der

Veer, B., Van Den Brink, S., Wijsman, L., Goderski, G., Romette, J.-L., Ellis, J.,

Zambon, M., ... Drosten, C. (2020). Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR. *Eurosurveillance*, 25(3).

<https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2020.25.3.2000045>

Corominas, L., Borrego, C., Escolà, M., Gago-Ferrero, P., Petrovic, M., Rodríguez-Mozaz,

S., Schröter, N., Senta, I., & Zammit, I. (2020). *Epidemiología y sociología basadas en el análisis de las aguas residuales*.

- Corpuz, M. V. A., Buonerba, A., Vigliotta, G., Zarra, T., Ballesteros, F., Campiglia, P., Belgiorno, V., Korshin, G., & Naddeo, V. (2020). Viruses in wastewater: Occurrence, abundance and detection methods. *Science of The Total Environment*, 745, 140910. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.140910>
- Costa, J. (2004). Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a tiempo real. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 22(5), 299–305. [https://doi.org/10.1016/S0213-005X\(04\)73092-X](https://doi.org/10.1016/S0213-005X(04)73092-X)
- Cruz, C., Rodríguez-Dozal, S., Cortez-Lugo, M., Ovilla-Muñoz, M., Carnalla-Cortés, M., Sánchez-Pájaro, A., & Schilmann, A. (2020). Revisión rápida: Monitoreo de la presencia e infectividad del virus SARS-CoV-2 y otros coronavirus en aguas residuales. *Salud Pública de México*, 63(1, ene-feb), 109–119. <https://doi.org/10.21149/11783>
- Cuadra, T. E., Guadrón Meléndez, A. A., Cruz Aguilar, R. D. J., & Vásquez Rodríguez, E. A. (2021). Factores relevantes sobre el ensayo RT-PCR para la detección de SARS-CoV-2, virus causante del COVID-19. *Alerta, Revista científica del Instituto Nacional de Salud*, 4(1), 31–39. <https://doi.org/10.5377/alerta.v4i1.10060>
- De la Peña, M., Ducci, J., & Zamora, V. (2013). *Tratamiento de aguas residuales en México* (Tecnico 521; p. 42). Banco Interamericano de Desarrollo (BID).
- Espinosa, Ana., Arias, C. ., & Mazari, Marisa. (2004). Virus en sistemas acuáticos e implicaciones en salud pública Virus in aquatic systems and public health implications. *Hidrobiología*, 14(2), 166–178.
- Farkas, K., Hillary, L. S., Thorpe, J., Walker, D. I., Lowther, J. A., McDonald, J. E., Malham, S. K., & Jones, D. L. (2021). Concentration and Quantification of SARS-CoV-2 RNA in

Wastewater Using Polyethylene Glycol-Based Concentration and qRT-PCR.

Methods and Protocols, 4(1), 17. <https://doi.org/10.3390/mps4010017>

Fernández, F. (2004). Aplicaciones de las técnicas de PCR a la epidemiología molecular de las enfermedades infecciosas. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 22(6), 355–360. [https://doi.org/10.1016/S0213-005X\(04\)73108-0](https://doi.org/10.1016/S0213-005X(04)73108-0)

Flores, A., Cruz-Rangel, A., Rodríguez-Gómez, F., González, J., Torres-Guerrero, C. A., Delgado, G., Cravioto, A., & Morales-Espinosa, R. (2021). Molecular Epidemiology Surveillance of SARS-CoV-2: Mutations and Genetic Diversity One Year after Emerging. *Pathogens*, 10(2), 184. <https://doi.org/10.3390/pathogens10020184>

Foladori, P., Cutrupi, F., Cadonna, M., & Manara, S. (2022). Coronaviruses and SARS-CoV-2 in sewerage and their removal: Step by step in wastewater treatment plants. *Environmental Research*, 207, 112204. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2021.112204>

Forés, E., Bofill-Mas, S., Itarte, M., Martínez-Puchol, S., Hundesa, A., Calvo, M., Borrego, C. M., Corominas, L. L., Girones, R., & Rusiñol, M. (2021). Evaluation of two rapid ultrafiltration-based methods for SARS-CoV-2 concentration from wastewater. *Science of The Total Environment*, 768, 144786. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.144786>

Galindo, F. V., Jacobo-Salcedo, M. D. R., Cueto, J. A., Reta Sánchez, D. G., García Hernández, J. L., & Vázquez-Vázquez, C. (2020). Caracterización de aguas residuales tratadas de la comarca lagunera y su viabilidad en el riego agrícola. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 11(1), 189–201. <https://doi.org/10.29312/remexca.v11i1.2084>

- Ganesh, B., Rajakumar, T., Malathi, M., Manikandan, N., Nagaraj, J., Santhakumar, A., Elangovan, A., & Malik, Y. S. (2021). Epidemiology and pathobiology of SARS-CoV-2 (COVID-19) in comparison with SARS, MERS: An updated overview of current knowledge and future perspectives. *Clinical Epidemiology and Global Health*, *10*, 100694. <https://doi.org/10.1016/j.cegh.2020.100694>
- García, F. (2008). Enfermedades infecciosas emergentes: Interacción entre el mundo microbiano y las sociedades humanas. *Acta Médica Costarricense*, *50*(3), 136–143. <https://doi.org/10.51481/amc.v50i3.376>
- García, J. M. (2021). Aspectos epidemiológicos, clínica y mecanismos de control de la pandemia por SARS-CoV-2: Situación en España. *Enfermería Clínica*, *31*, S4–S11. <https://doi.org/10.1016/j.enfcli.2020.05.001>
- Gerba, C. P. (2015). Environmentally Transmitted Pathogens. En *Environmental Microbiology* (pp. 509–550). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394626-3.00022-3>
- Girón, R., Linares, I., & Castillo, L. A. (2021). The impact of coronavirus SARS-CoV-2 (COVID-19) in water: Potential risks. *Environmental Science and Pollution Research*, *28*(38), 52651–52674. <https://doi.org/10.1007/s11356-021-16024-5>
- González, F., Bracho, M. A., Hillung, J., Chiner, A., Ruiz-Hueso, P., Francés-Cuesta, C., Mejía, M. L., & Beamud, B. (2018). Epidemiología molecular de microorganismos patógenos: Entre la evolución y la clínica. *ESPECIAL TAXONOMÍA, FILOGENIA Y DIVERSIDAD*, *65*, 33.
- González, J. R., Hernández, M. D. L. L., Paredes, J. E., Téllez, A., Fayad, O., & Carranza, L. (2021). Detection of SARS-CoV-2 in Wastewater Northeast of Mexico City:

Strategy for Monitoring and Prevalence of COVID-19. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 18(16), 8547.

<https://doi.org/10.3390/ijerph18168547>

Gonzalez, R., Curtis, K., Bivins, A., Bibby, K., Weir, M. H., Yetka, K., Thompson, H., Keeling, D., Mitchell, J., & Gonzalez, D. (2020). COVID-19 surveillance in Southeastern Virginia using wastewater-based epidemiology. *Water Research*, 186, 116296.

<https://doi.org/10.1016/j.watres.2020.116296>

Halaji, M., Heiat, M., Faraji, N., & Ranjbar, R. (2021). Epidemiology of COVID-19: An updated review. *Journal of Research in Medical Sciences*, 26(1), 82.

https://doi.org/10.4103/jrms.JRMS_506_20

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. *Science of The Total Environment*, 737, 140405.

<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.140405>

Hasan, S. W., Ibrahim, Y., Daou, M., Kannout, H., Jan, N., Lopes, A., Alsafar, H., & Yousef, A. F. (2021). Detection and quantification of SARS-CoV-2 RNA in wastewater and treated effluents: Surveillance of COVID-19 epidemic in the United Arab

Emirates. *Science of The Total Environment*, 764, 142929.

<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.142929>

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. *Science of The Total Environment*, 758, 143578. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.143578>

Heid, C. A., Stevens, J., Livak, K. J., & Williams, P. M. (1996). Real Time Quantitative PCR. *GENOME RESEARCH*, 6, 986–994.

Hinojosa, R. A., Lizangela Aurelia Hinojosa Yzarra, Judit Mendoza Ruiz, Thais Neftaly Rodríguez Ramos, Nayly Elena Pineda Bejarano, & Schann dall Joana Tomaylla Porras. (2020). Coronavirus: Una extensa familia de virus. *Revista Nor@ndina*, 3(1), 68–79. <https://doi.org/10.37518/2663-6360X2020v3n1p68>

Hjelmsø, M. H., Hellmér, M., Fernandez-Cassi, X., Timoneda, N., Lukjancenکو, O., Seidel, M., Elsässer, D., Aarestrup, F. M., Löfström, C., Bofill-Mas, S., Abril, J. F., Girones, R., & Schultz, A. C. (2017). Evaluation of Methods for the Concentration and Extraction of Viruses from Sewage in the Context of Metagenomic Sequencing. *PLOS ONE*, 12(1), e0170199. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0170199>

Iglesias, S., Alcantara, M., Arce, Z., Córdoba, L., López, E., & Rafael, A. (2021). *Nextstrain: Una herramienta que analiza la epidemiología molecular del SARS-CoV-2*. 32(2), 22.

Instituto de Salud Carlos III (ISCIII). (2023). *EL ISCIII Y LA COVID-19: LABOR DURANTE LA PANDEMIA* (p. 67). Instituto de Salud Carlos III (ISCIII).

Jacobo, D., & Santacruz, G. (2021). Contaminantes emergentes en el agua: Regulación en México, principio precautorio y perspectiva comparada. *Revista de Derecho Ambiental*, 15, 51. <https://doi.org/10.5354/0719-4633.2021.57414>

Kataki, S., Chatterjee, S., Vairale, M. G., Sharma, S., & Dwivedi, S. K. (2021). Concerns and strategies for wastewater treatment during COVID-19 pandemic to stop plausible transmission. *Resources, Conservation and Recycling*, 164, 105156. <https://doi.org/10.1016/j.resconrec.2020.105156>

- Koelle, K., Martin, M. A., Antia, R., Lopman, B., & Dean, N. E. (2022). The changing epidemiology of SARS-CoV-2. *Science*, 375(6585), 1116–1121.
<https://doi.org/10.1126/science.abm4915>
- La Rosa, G., Bonadonna, L., Lucentini, L., Kenmoe, S., & Suffredini, E. (2020). Coronavirus in water environments: Occurrence, persistence and concentration methods - A scoping review. *Water Research*, 179, 115899.
<https://doi.org/10.1016/j.watres.2020.115899>
- La Rosa, G., Iaconelli, M., Mancini, P., Bonanno Ferraro, G., Veneri, C., Bonadonna, L., Lucentini, L., & Suffredini, E. (2020a). First detection of SARS-CoV-2 in untreated wastewaters in Italy. *Science of The Total Environment*, 736, 139652.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.139652>
- 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. *Science of The Total Environment*, 736, 139652.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.139652>
- Larsen, D. A., & Wigginton, K. R. (2020a). Tracking COVID-19 with wastewater. *Nature Biotechnology*, 38(10), 1151–1153. <https://doi.org/10.1038/s41587-020-0690-1>
- Larsen, D. A., & Wigginton, K. R. (2020b). Tracking COVID-19 with wastewater. *Nature Biotechnology*, 38(10), 1151–1153. <https://doi.org/10.1038/s41587-020-0690-1>

- Lee, A. H. F., Gessert, S. F., Chen, Y., Sergeev, N. V., & Haghiri, B. (2018). Preparation of iron oxide silica particles for Zika viral RNA extraction. *Heliyon*, 4(3), e00572. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2018.e00572>
- Lescure, F., Bouadma, L., Nguyen, D., Parisey, M., Wicky, P.-H., Behillil, S., Gaymard, A., Bouscambert-Duchamp, M., Donati, F., Le Hingrat, Q., Enouf, V., Houhou-Fidouh, N., Valette, M., Mailles, A., Lucet, J.-C., Mentre, F., Duval, X., Descamps, D., Malvy, D., ... Yazdanpanah, Y. (2020). Clinical and virological data of the first cases of COVID-19 in Europe: A case series. *The Lancet Infectious Diseases*, 20(6), 697–706. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(20\)30200-0](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(20)30200-0)
- Lesimple, A., Jasim, S. Y., Johnson, D. J., & Hilal, N. (2020). The role of wastewater treatment plants as tools for SARS-CoV-2 early detection and removal. *Journal of Water Process Engineering*, 38, 101544. <https://doi.org/10.1016/j.jwpe.2020.101544>
- Lewis, G. D., & Metcalf, T. G. (1988). Polyethylene glycol precipitation for recovery of pathogenic viruses, including hepatitis A virus and human rotavirus, from oyster, water, and sediment samples. *Applied and Environmental Microbiology*, 54(8), 1983–1988. <https://doi.org/10.1128/aem.54.8.1983-1988.1988>
- Lodder, W., & De Roda Husman, A. M. (2020). SARS-CoV-2 in wastewater: Potential health risk, but also data source. *The Lancet Gastroenterology & Hepatology*, 5(6), 533–534. [https://doi.org/10.1016/S2468-1253\(20\)30087-X](https://doi.org/10.1016/S2468-1253(20)30087-X)
- Losa, J. E. (2021). Emerging infectious diseases: A medical reality. *An. Sist. Sanit. Navar.*, 44.

- Lu, D., Huang, Z., Luo, J., Zhang, X., & Sha, S. (2020). Primary concentration – The critical step in implementing the wastewater based epidemiology for the COVID-19 pandemic: A mini-review. *Science of The Total Environment*, 747, 141245. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.141245>
- Maltezos, S., & Georgakopoulou, A. (2021). Novel approach for Monte Carlo simulation of the new COVID-19 spread dynamics. *Infection, Genetics and Evolution*, 92, 104896. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2021.104896>
- Mao, K., Zhang, K., Du, W., Ali, W., Feng, X., & Zhang, H. (2020). The potential of wastewater-based epidemiology as surveillance and early warning of infectious disease outbreaks. *Current Opinion in Environmental Science & Health*, 17, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.coesh.2020.04.006>
- McCall, C., Wu, H., Miyani, B., & Xagorarakis, I. (2020). Identification of multiple potential viral diseases in a large urban center using wastewater surveillance. *Water Research*, 184, 116160. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2020.116160>
- Medema, G., Been, F., Heijnen, L., & Petterson, S. (2020). Implementation of environmental surveillance for SARS-CoV-2 virus to support public health decisions: Opportunities and challenges. *Current Opinion in Environmental Science & Health*, 17, 49–71. <https://doi.org/10.1016/j.coesh.2020.09.006>
- Michael, I., Karaolia, P., & Fatta-Kassinou, D. (2020). Sewage analysis as a tool for the COVID-19 pandemic response and management: The urgent need for optimised protocols for SARS-CoV-2 detection and quantification. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 8(5), 104306. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2020.104306>

- Miranda, M. G., Vargas, I., & Aragón, R. (2019). COVID-19 por SARS-CoV-2: La nueva emergencia de salud. *Revista Mexicana de Pediatría*, 86(6), 213–218.
<https://doi.org/10.35366/91871>
- Mlejnkova, H., Sovova, K., Vasickova, P., Ocenaskova, V., Jasikova, L., & Juranova, E. (2020). Preliminary Study of Sars-Cov-2 Occurrence in Wastewater in the Czech Republic. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 17(15), 5508. <https://doi.org/10.3390/ijerph17155508>
- Mundo, M. (2012). EVIDENCIAS CIENTÍFICAS DE LA SOBREVIVENCIA DEL SARS COV-2 EN AGUA DE GRIFO NO CONTAMINADA Y EN AGUAS RESIDUALES NO TRATADAS. *Revista Espacio I+D Innovación más Desarrollo*, 9(25), 180–207.
<https://doi.org/10.31644/IMASD.25.2020.a11>
- Oliva Marín, J. E. (2020). SARS-CoV-2: Origen, estructura, replicación y patogénesis. *Alerta, Revista científica del Instituto Nacional de Salud*, 3(2).
<https://doi.org/10.5377/alerta.v3i2.9619>
- OMS. (2020). *Situación de la vigilancia ambiental del SARS-CoV-2* (p. 5) [Científico]. Organización Mundial de la Salud.
- OPS. (2021). *Guía para el análisis y la cuantificación del SARS-CoV-2 en aguas residuales* (p. 55) [Científico]. Organización Panamericana de la Salud.
- Orive, G., Lertxundi, U., & Barcelo, D. (2020). Early SARS-CoV-2 outbreak detection by sewage-based epidemiology. *Science of The Total Environment*, 732, 139298.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.139298>
- Oude, B. B., Worp, N., Nieuwenhuijse, D. F., Sikkema, R. S., Haagmans, B., Fouchier, R. A. M., & Koopmans, M. (2021). The next phase of SARS-CoV-2 surveillance: Real-

time molecular epidemiology. *Nature Medicine*, 27(9), 1518–1524.

<https://doi.org/10.1038/s41591-021-01472-w>

Palacios, M., Santos, E., Velázquez, M. A., & León Juárez, M. (2021). COVID-19, una emergencia de salud pública mundial. *Revista Clínica Española*, 221(1), 55–61.

<https://doi.org/10.1016/j.rce.2020.03.001>

Park, M., Won, J., Choi, B. Y., & Lee, C. J. (2020). Optimization of primer sets and detection protocols for SARS-CoV-2 of coronavirus disease 2019 (COVID-19) using PCR and real-time PCR. *Experimental & Molecular Medicine*, 52(6), 963–

977. <https://doi.org/10.1038/s12276-020-0452-7>

Pastrian, G. (2020). Bases Genéticas y Moleculares del COVID-19 (SARS-CoV-2).

Mecanismos de Patogénesis y de Respuesta Inmune. *International journal of odontostomatology*, 14(3), 331–337. <https://doi.org/10.4067/S0718-381X2020000300331>

Peña, A., & Castillo, A. (2015). Identificación y cuantificación de contaminantes emergentes en aguas residuales por microextracción en fase sólida-cromatografía de gases-espectrometría de masas (MEFS-CG-EM). *TIP*, 18(1), 29–42. <https://doi.org/10.1016/j.recqb.2015.05.003>

Pérez, A., Niell, S., Colazzo, M., Besil, N., Cesio, V., & Heinzen, H. (2012). EVALUACIÓN PRELIMINAR DE LA OCURRENCIA DE CONTAMINANTES EMERGENTES EN AGUAS RESIDUALES DE MONTEVIDEO, URUGUAY. *VII Congreso de Medio Ambiente*.

Pina, S. P. (2001). *Detección y caracterización de virus patógenos humanos en muestras ambientales y moluscos bivalvos*. Universidad de Barcelona.

- Raffo, E., & Ruiz, E. C. (2014). Caracterización de las aguas residuales y la demanda bioquímica de oxígeno. *Industrial Data*, 17(1), 71.
<https://doi.org/10.15381/idata.v17i1.12035>
- Randazzo, W., Truchado, P., Cuevas, E., Simón, P., Allende, A., & Sánchez, G. (2020). SARS-CoV-2 RNA in wastewater anticipated COVID-19 occurrence in a low prevalence area. *Water Research*, 181, 115942.
<https://doi.org/10.1016/j.watres.2020.115942>
- Randazzo, Walter., Cuevas, E., Sanjuán, R., Domingo, P., & Sánchez, G. (2020). Metropolitan wastewater analysis for COVID-19 epidemiological surveillance. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 230, 113621.
<https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2020.113621>
- Reinoso, J., Serrano, C., & Orellana, D. (2017). *Contaminantes emergentes y su impacto en la salud*. 35(2), 55–59.
- Rose, C., Parker, A., Jefferson, B., & Cartmell, E. (2015). The Characterization of Feces and Urine: A Review of the Literature to Inform Advanced Treatment Technology. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 45(17), 1827–1879. <https://doi.org/10.1080/10643389.2014.1000761>
- Rusiñol, M., Martínez-Puchol, S., Forés, E., Itarte, M., Girones, R., & Bofill-Mas, S. (2020). Concentration methods for the quantification of coronavirus and other potentially pandemic enveloped virus from wastewater. *Current Opinion in Environmental Science & Health*, 17, 21–28.
<https://doi.org/10.1016/j.coesh.2020.08.002>

- 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 Research, 189*, 116620. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2020.116620>
- Salzberger, B., Buder, F., Lampl, B., Ehrenstein, B., Hitzenbichler, F., Holzmann, T., Schmidt, B., & Hanses, F. (2021). Epidemiology of SARS-CoV-2. *Infection, 49*(2), 233–239. <https://doi.org/10.1007/s15010-020-01531-3>
- SEMARNAT. (1998). *NOM-003-ECOL-1997, Que establece los límites máximos permisibles de contaminantes para las aguas residuales tratadas que se reusen en servicios al público*. Secretaria de Salud.
- Sherchan, S. P., Shahin, S., Ward, L. M., Tandukar, S., Aw, T. G., Schmitz, B., Ahmed, W., & Kitajima, M. (2020). First detection of SARS-CoV-2 RNA in wastewater in North America: A study in Louisiana, USA. *Science of The Total Environment, 743*, 140621. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.140621>
- Sims, N., & Kasprzyk, B. (2020). Future perspectives of wastewater-based epidemiology: Monitoring infectious disease spread and resistance to the community level. *Environment International, 139*, 105689. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2020.105689>
- Soller, J. A., Eftim, S., Wade, T. J., Ichida, A. M., Clancy, J. L., Johnson, T. B., Schwab, K., Ramirez-Toro, G., Nappier, S., & Ravenscroft, J. E. (2016). Use of quantitative microbial risk assessment to improve interpretation of a recreational water

epidemiological study. *Microbial Risk Analysis*, 1, 2–11.

<https://doi.org/10.1016/j.mran.2015.04.001>

Torii, S., Oishi, W., Zhu, Y., Thakali, O., Malla, B., Yu, Z., Zhao, B., Arakawa, C., Kitajima, M., Hata, A., Ihara, M., Kyuwa, S., Sano, D., Haramoto, E., & Katayama, H. (2022).

Comparison of five polyethylene glycol precipitation procedures for the RT-qPCR based recovery of murine hepatitis virus, bacteriophage phi6, and pepper mild mottle virus as a surrogate for SARS-CoV-2 from wastewater. *Science of The Total Environment*, 807, 150722.

<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.150722>

Tran, H. N., Le, G. T., Nguyen, D. T., Juang, R.-S., Rinklebe, J., Bhatnagar, A., Lima, E. C.,

Iqbal, H. M. N., Sarmah, A. K., & Chao, H.-P. (2021). SARS-CoV-2 coronavirus in water and wastewater: A critical review about presence and concern.

Environmental Research, 193, 110265.

<https://doi.org/10.1016/j.envres.2020.110265>

Trottier, J., Darques, R., Ait Mouheb, N., Partiot, E., Bakhache, W., Deffieu, M. S., &

Gaudin, R. (2020). Post-lockdown detection of SARS-CoV-2 RNA in the wastewater of Montpellier, France. *One Health*, 10, 100157.

<https://doi.org/10.1016/j.onehlt.2020.100157>

Vandeventer, P. E., Lin, J. S., Zwang, T. J., Nadim, A., Johal, M. S., & Niemz, A. (2012).

Multiphasic DNA Adsorption to Silica Surfaces under Varying Buffer, pH, and Ionic Strength Conditions. *The Journal of Physical Chemistry B*, 116(19), 5661–5670. <https://doi.org/10.1021/jp3017776>

- Velástegui, E., Lalaleo, L., & Cáceres, W. C. (2022a). ¿Se pueden prevenir las pandemias? Epidemiología basada en aguas residuales. *Investigación y Desarrollo*, 12(1), 88–90. <https://doi.org/10.31243/id.v12.2020.991>
- Velástegui, E., Lalaleo, L., & Cáceres, W. C. (2022b). ¿Se pueden prevenir las pandemias? Epidemiología basada en aguas residuales. *Investigación y Desarrollo*, 12(1), 88–90. <https://doi.org/10.31243/id.v12.2020.991>
- Wang, X.-W., Li, J.-S., Guo, T.-K., Zhen, B., Kong, Q.-X., Yi, B., Li, Z., Song, N., Jin, M., Xiao, W.-J., Zhu, X.-M., Gu, C.-Q., Yin, J., Wei, W., Yao, W., Liu, C., Li, J.-F., Ou, G.-R., Wang, M.-N., ... Li, J.-W. (2005). Concentration and detection of SARS coronavirus in sewage from Xiao Tang Shan Hospital and the 309th Hospital. *Journal of Virological Methods*, 128(1–2), 156–161. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2005.03.022>
- Wathore, R., Gupta, A., Bherwani, H., & Labhasetwar, N. (2020). Understanding air and water borne transmission and survival of coronavirus: Insights and way forward for SARS-CoV-2. *Science of The Total Environment*, 749, 141486. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.141486>
- 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. *Science of The Total Environment*, 751, 141750. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.141750>
- Wu, F., Zhang, J., Xiao, A., Gu, X., Lee, W. L., Armas, F., Kauffman, K., Hanage, W., Matus, M., Ghaeli, N., Endo, N., Duvallet, 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*. 5(4).

Wu, J., Wang, Z., Lin, Y., Zhang, L., Chen, J., Li, P., Liu, W., Wang, Y., Yao, C., & Yang, K. (2021). Technical framework for wastewater-based epidemiology of SARS-CoV-2. *Science of The Total Environment*, 791, 148271. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.148271>

Wu, Y., Guo, C., Tang, L., Hong, Z., Zhou, J., Dong, X., Yin, H., Xiao, Q., Tang, Y., Qu, X., Kuang, L., Fang, X., Mishra, N., Lu, J., Shan, H., Jiang, G., & Huang, X. (2020). Prolonged presence of SARS-CoV-2 viral RNA in faecal samples. *The Lancet Gastroenterology & Hepatology*, 5(5), 434–435. [https://doi.org/10.1016/S2468-1253\(20\)30083-2](https://doi.org/10.1016/S2468-1253(20)30083-2)

Zaballos, Á., Varona, S., Iglesias-Caballero, M., Monzón, S., Pozo, F., Casas, I., & Cuesta, I. (2020). *Secuenciación de genomas de SARS-CoV-2: Herramienta clave en esta pandemia*. 70, 17.

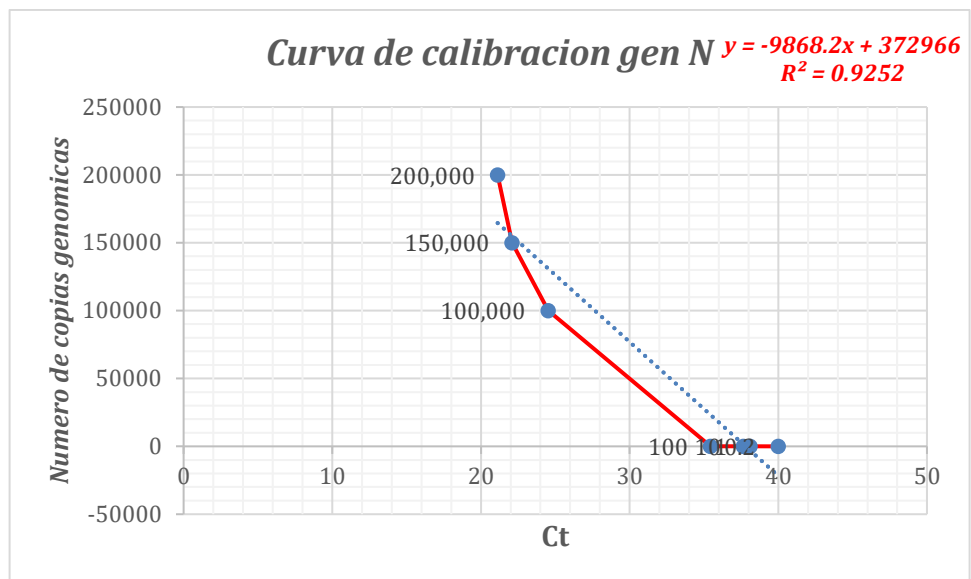
ZYMO RESEARCH. (2022). *Quick-RNA™ Viral Kit*.

11. Anexos

11.1 Anexo 1

Curva de calibración para gen N (nucleocápside) SARS-CoV-2

Se realiza curva de calibración para poder hacer la conversión de los valores obtenidos de Ct a número de copias genómicas por muestra.



Posteriormente con los datos obtenidos de la curva la pendiente y la ordenada al origen para así realizar el cálculo de #Cg por muestra

$$\text{Numero de copias genómicas} = 10^{(Ct-b)/m}$$

Para la interpretación final los resultados se muestran en Log 10 #Cg/L por cada sitio de muestreo.

11.2 Anexo 2

Análisis estadístico para intervalos de confianza

Se realizó el análisis para intervalos de confianza, de la estadística descriptiva, por grupos, según el grupo de muestras (sitio de muestreo y semanas) para el número de copias genómicas (#Cg). Y a su vez se analizó los resultados de la predicción (IN) en dos grupos (por delegación y semanas).

<u>#Cg(Semana)</u>	<u>Datos</u>	<u>#Cg/L(Semana)</u>	<u>Datos</u>	<u>Log 10</u> <u>#Cg/L(Semana)</u>	<u>Datos</u>
<u>Media</u>	<u>3528.5</u>	<u>Media</u>	<u>10585449.4</u>	<u>Media</u>	<u>5.3</u>
<u>Error típico</u>	<u>1312.9</u>	<u>Error típico</u>	<u>3938717.1</u>	<u>Error típico</u>	<u>0.7</u>
<u>Mediana</u>	<u>1932.6</u>	<u>Mediana</u>	<u>5797746.4</u>	<u>Mediana</u>	<u>6.8</u>
<u>Moda</u>	<u>1.0</u>	<u>Moda</u>	<u>3000.0</u>	<u>Moda</u>	<u>3.5</u>
<u>Desviación estándar</u>	<u>4548.0</u>	<u>Desviación estándar</u>	<u>13644116.1</u>	<u>Desviación estándar</u>	<u>2.4</u>
<u>Varianza de la muestra</u>	<u>20684656.2</u>	<u>Varianza de la muestra</u>	<u>186161905436276.0</u>	<u>Varianza de la muestra</u>	<u>6.0</u>
<u>Curtosis</u>	<u>-0.2</u>	<u>Curtosis</u>	<u>-0.2</u>	<u>Curtosis</u>	<u>0.1</u>

<u>Coeficiente de asimetría</u>	<u>1.1</u>
<u>Rango</u>	<u>11732.1</u>
<u>Mínimo</u>	<u>0.0</u>
<u>Máximo</u>	<u>11732.1</u>
<u>Suma</u>	<u>42341.8</u>
<u>Cuenta</u>	<u>12.0</u>
<u>Mayor (1)</u>	<u>11732.1</u>
<u>Menor(1)</u>	<u>0.0</u>
<u>Nivel de confianza(95.0%)</u>	<u>2889.7</u>

<u>Coeficiente de asimetría</u>	<u>1.1</u>
<u>Rango</u>	<u>35196253.6</u>
<u>Mínimo</u>	<u>0.0</u>
<u>Máximo</u>	<u>35196253.6</u>
<u>Suma</u>	<u>127025393.3</u>
<u>Cuenta</u>	<u>12.0</u>
<u>Mayor (1)</u>	<u>35196253.6</u>
<u>Menor(1)</u>	<u>0.0</u>
<u>Nivel de confianza(95.0%)</u>	<u>8669057.8</u>

<u>Coeficiente de asimetría</u>	<u>-1.0</u>
<u>Rango</u>	<u>7.5</u>
<u>Mínimo</u>	<u>0.0</u>
<u>Máximo</u>	<u>7.5</u>
<u>Suma</u>	<u>63.9</u>
<u>Cuenta</u>	<u>12.0</u>
<u>Mayor (1)</u>	<u>7.5</u>
<u>Menor(1)</u>	<u>0.0</u>
<u>Nivel de confianza(95.0%)</u>	<u>1.6</u>

<u>#Cg(Semana)</u>	<u>Datos</u>
Media	3528.5
Error típico	1312.9
Mediana	1932.6
Moda	1.0
Desviación estándar	4548.0
Varianza de la muestra	20684656.2
Curtosis	-0.2
Coeficiente de asimetría	1.1
Rango	11732.1
Mínimo	0.0
Máximo	11732.1
Suma	42341.8
Cuenta	12.0
Mayor (1)	11732.1
Menor(1)	0.0
Nivel de confianza(95.0%)	2889.7

<u>#Cg/L(Semana)</u>	<u>Datos</u>
Media	10585449.4
Error típico	3938717.1
Mediana	5797746.4
Moda	3000.0
Desviación estándar	13644116.1
Varianza de la muestra	186161905436276.0
Curtosis	-0.2
Coeficiente de asimetría	1.1
Rango	35196253.6
Mínimo	0.0
Máximo	35196253.6
Suma	127025393.3
Cuenta	12.0
Mayor (1)	35196253.6
Menor(1)	0.0
Nivel de confianza(95.0%)	8669057.8

<u>Log 10</u>	
<u>#Cg/L(Semana)</u>	<u>Datos</u>
Media	5.3
Error típico	0.7
Mediana	6.8
Moda	3.5
Desviación estándar	2.4
Varianza de la muestra	6.0
Curtosis	0.1
Coeficiente de asimetría	-1.0
Rango	7.5
Mínimo	0.0
Máximo	7.5
Suma	63.9
Cuenta	12.0
Mayor (1)	7.5
Menor(1)	0.0
Nivel de confianza(95.0%)	1.6

<u>#Cg(Total M)</u>	<u>Datos</u>
Media	10047.2
Error típico	6483.8
Mediana	1.0

<u>#Cg/L(Total M)</u>	<u>Datos</u>
Media	30141676.5
Error típico	19451289.6
Mediana	3000.0

<u>Log 10</u>	
<u>#Cg(Total M)</u>	<u>Datos</u>
Media	3.1
Error típico	0.4
Mediana	3.5

Moda	0.0	Moda	0.0	Moda	0.0
Desviación estándar	51870.1	Desviación estándar	155610316.8	Desviación estándar	3.3
Varianza de la muestra	26905078	Varianza de la muestra	2421457068105	Varianza de la muestra	10.6
Curtosis	53.5	Curtosis	8800.0	Curtosis	-1.5
Curtosis	61.4	Curtosis	61.4	Curtosis	-1.5
Coeficiente de asimetría	7.8	Coeficiente de asimetría	7.8	Coeficiente de asimetría	0.4
Rango	414522.2	Rango	1243566666.7	Rango	9.1
Mínimo	0.0	Mínimo	0.0	Mínimo	0.0
Máximo	414522.2	Máximo	1243566666.7	Máximo	9.1
					195.
Suma	643022.4	Suma	1929067293.3	Suma	3
Cuenta	64.0	Cuenta	64.0	Cuenta	64.0
Mayor (1)	414522.2	Mayor (1)	1243566666.7	Mayor (1)	9.1
Menor(1)	0.0	Menor(1)	0.0	Menor(1)	0.0
Nivel de confianza(9 5.0%)	12956.8	Nivel de confianza(9 5.0%)	38870300.6	Nivel de confianza(9 5.0%)	0.8

#Cg(Total M)	Datos	#Cg/L(Total M)	Datos	Log 10 #Cg(Total M)	Datos
Media	10047.2	Media	30141676.5	Media	3.1
Error típico	6483.8	Error típico	19451289.6	Error típico	0.4
Mediana	1.0	Mediana	3000.0	Mediana	3.5
Moda	0.0	Moda	0.0	Moda	0.0
Desviación estándar	51870.1	Desviación estándar	155610316.8	Desviación estándar	3.3
Varianza de la muestra	26905078	Varianza de la muestra	2421457068105	Varianza de la muestra	10.6
Curtosis	53.5	Curtosis	8800.0	Curtosis	-1.5
Curtosis	61.4	Curtosis	61.4	Curtosis	-1.5
Coeficiente de asimetría	7.8	Coeficiente de asimetría	7.8	Coeficiente de asimetría	0.4
Rango	414522.2	Rango	1243566666.7	Rango	9.1
Mínimo	0.0	Mínimo	0.0	Mínimo	0.0
Máximo	414522.2	Máximo	1243566666.7	Máximo	9.1
					195.
Suma	643022.4	Suma	1929067293.3	Suma	3
Cuenta	64.0	Cuenta	64.0	Cuenta	64.0
Mayor (1)	414522.2	Mayor (1)	1243566666.7	Mayor (1)	9.1
Menor(1)	0.0	Menor(1)	0.0	Menor(1)	0.0
Nivel de confianza(9 5.0%)	12956.8	Nivel de confianza(9 5.0%)	38870300.6	Nivel de confianza(9 5.0%)	0.8

<u>IN(Sitio)</u>	<u>Datos</u>
<u>Media</u>	<u>940.8</u>
<u>Error típico</u>	<u>369.8</u>
<u>Mediana</u>	<u>647.2</u>
<u>Moda</u>	<u>#N/D</u>
<u>Desviación estándar</u>	<u>739.5</u>
<u>Varianza de la muestra</u>	<u>546932.6</u>
<u>Curtosis</u>	<u>3.0</u>
<u>Coefficiente de asimetría</u>	<u>1.8</u>
<u>Rango</u>	<u>1582.2</u>
<u>Mínimo</u>	<u>443.2</u>
<u>Máximo</u>	<u>2025.4</u>
<u>Suma</u>	<u>3763.2</u>
<u>Cuenta</u>	<u>4.0</u>
<u>Mayor (1)</u>	<u>2025.4</u>
<u>Menor(1)</u>	<u>443.2</u>
<u>Nivel de confianza(95.0%)</u>	<u>1176.8</u>

<u>IN(Sitio)</u>	<u>Datos</u>
<u>Media</u>	<u>940.8</u>
<u>Error típico</u>	<u>369.8</u>
<u>Mediana</u>	<u>647.2</u>
<u>Moda</u>	<u>#N/D</u>
<u>Desviación estándar</u>	<u>739.5</u>
<u>Varianza de la muestra</u>	<u>546932.6</u>
<u>Curtosis</u>	<u>3.0</u>
<u>Coefficiente de asimetría</u>	<u>1.8</u>
<u>Rango</u>	<u>1582.2</u>
<u>Mínimo</u>	<u>443.2</u>
<u>Máximo</u>	<u>2025.4</u>
<u>Suma</u>	<u>3763.2</u>
<u>Cuenta</u>	<u>4.0</u>
<u>Mayor (1)</u>	<u>2025.4</u>
<u>Menor(1)</u>	<u>443.2</u>
<u>Nivel de confianza(95.0%)</u>	<u>1176.8</u>

<u>IN(Semana)</u>	<u>Datos</u>
<u>Media</u>	<u>10216.4</u>
<u>Error típico</u>	<u>3801.4</u>
<u>Mediana</u>	<u>5595.6</u>
<u>Moda</u>	<u>2.9</u>
<u>Desviación estándar</u>	<u>13168.4</u>
<u>Varianza de la muestra</u>	<u>173407067.2</u>
<u>Curtosis</u>	<u>-0.2</u>
<u>Coefficiente de asimetría</u>	<u>1.1</u>
<u>Rango</u>	<u>33969.1</u>
<u>Mínimo</u>	<u>0.0</u>
<u>Máximo</u>	<u>33969.1</u>
<u>Suma</u>	<u>122596.6</u>
<u>Cuenta</u>	<u>12.0</u>
<u>Mayor (1)</u>	<u>33969.1</u>
<u>Menor(1)</u>	<u>0.0</u>
<u>Nivel de confianza(95.0%)</u>	<u>8366.8</u>

<u>IN(Semana)</u>	<u>Datos</u>
<u>Media</u>	<u>10216.4</u>
<u>Error típico</u>	<u>3801.4</u>
<u>Mediana</u>	<u>5595.6</u>
<u>Moda</u>	<u>2.9</u>
<u>Desviación estándar</u>	<u>13168.4</u>
<u>Varianza de la muestra</u>	<u>173407067.2</u>
<u>Curtosis</u>	<u>-0.2</u>
<u>Coefficiente de asimetría</u>	<u>1.1</u>
<u>Rango</u>	<u>33969.1</u>
<u>Mínimo</u>	<u>0.0</u>
<u>Máximo</u>	<u>33969.1</u>
<u>Suma</u>	<u>122596.6</u>
<u>Cuenta</u>	<u>12.0</u>
<u>Mayor (1)</u>	<u>33969.1</u>
<u>Menor(1)</u>	<u>0.0</u>

Nivel de
confianza(95.0%) 8366.8