



Ministerio  
de **Salud**  
Costa Rica



**mideplan**  
Ministerio de Planificación Nacional y Política Económica



ESTADO PLURINACIONAL DE  
**BOLIVIA**

MINISTERIO DE  
MEDIO AMBIENTE Y AGUA

Sistematización del proyecto piloto

# Sistema de Alerta Temprana para la Detección de Sars Cov-2 en Aguas Residuales



Implementada por:

**giz** Deutsche Gesellschaft  
für Internationale  
Zusammenarbeit (GIZ) GmbH

Estrategia de Saneamiento en Ciudades  
Intermedias Bolivia - Costa Rica -  
Alemania (ColiSan)

## ÍNDICE

1	ANTECEDENTES	4
2	INTRODUCCIÓN	4
3	DISEÑO DE LA SISTEMATIZACIÓN	5
3.1	Objetivo general	5
3.2	Eje de la sistematización	6
3.3	Metodología implementada	6
4	CONFORMACIÓN DEL COMITÉ CIENTIFICO INTERINSTITUCIONAL	7
4.1	Roles Institucionales	7
5	ANÁLISIS Y SISTEMATIZACIÓN DEL PROYECTO	9
5.1	Planificación inicial del Proyecto	9
6	METODOLOGÍA IMPLEMENTADA DE DETECCIÓN DE SARS-COV-2	15
6.1	Fase inicial	16
6.2	Creación del CCM	18
6.3	Fase operativa	19
6.4	Análisis de parámetros in situ, básico y complementarios	22
6.5	Análisis molecular	24
6.6	Procedimientos Empleados	25
6.7	Procesamiento y análisis de los resultados	32
7	VALIDACION DE PROCEDIMIENTOS Y METODOLOGIAS EMPLEADAS	32
7.1	Sitio de estudio	32
7.2	Construcción de la base de datos	33
7.3	Balance de masas	33
7.4	Análisis estadística de los datos obtenidos	33
8	CAPACITACIONES E INTERCAMBIO DE EXPERIENCIAS	34
8.1	Intercambio presencial de experiencias entre Costa Rica y Bolivia	34
8.2	Entrenamientos virtuales	34
8.3	Capacitaciones presenciales a nivel local	35
9	DIFICULTADES IDENTIFICADAS EN EL DESARROLLO DEL PROYECTO	37
9.1	Resultados obtenidos con diferentes kits para análisis en RT-PCR	37
10	CONCLUSIONES	37
11	RECOMENDACIONES	<b>¡Error! Marcador no definido.</b>
12	REFERENCIA BIBLIOGRAFICA	38

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1:</b> Comité Científico Interinstitucional.....	7
<b>Tabla 2:</b> Actores involucrados en el Proyecto.....	8
<b>Tabla 3:</b> Planificación CoTriSan – Línea de acción SAT SARS-CoV-2.....	9
<b>Tabla 4:</b> Acciones de cumplimiento del Indicador 1.....	10
<b>Tabla 5:</b> Acciones de cumplimiento del Indicador 2.....	13
<b>Tabla 6:</b> Acciones de cumplimiento del Indicador 3.....	14
<b>Tabla 7:</b> Puntos de toma de muestras.....	19
<b>Tabla 8:</b> Codificación de muestras colectadas.....	20
<b>Tabla 9:</b> Materiales, insumos, equipos empleados en la fase operativa.....	21
<b>Tabla 10:</b> Fase operativa - Etapas I, II y III.....	24
<b>Tabla 11:</b> Etapa I.....	25
<b>Tabla 12:</b> Etapa II.....	26
<b>Tabla 13:</b> Etapa III.....	28
<b>Tabla 14:</b> Experiencias obtenidas en Bolivia y Costa Rica.....	35

# **SISTEMA DE ALERTA TEMPRANA PARA DETECCIÓN DE SARS COV-2 EN AGUAS RESIDUALES EN BOLIVIA**

## **1 ANTECEDENTES**

A finales del año 2019 en Wuhan China surgió un nuevo coronavirus denominado SARS-CoV-2, causante de la enfermedad COVID-19 (denominado por la Organización Mundial de Salud), de acuerdo con las palabras "corona", "virus", mientras que 19 representa el año en que surgió (el brote se informó a la OMS el 31 de diciembre de 2019) que rápidamente se diseminó por todos los continentes declarándose una pandemia. Tal enfermedad presenta un cuadro sintomático con las siguientes características de fiebre o antecedentes recientes de fiebre, tos, dolor de garganta, dificultad para respirar, escalofríos, diarrea, vómitos y neumonía hasta pacientes asintomáticos u oligosintomáticas (Zhu et al., 2020), que al no padecer de ningún síntoma pueden pasar desapercibido sin tomar las medidas de bioseguridad correspondientes, ocasionando más contagios.

Ante el creciente número de casos de la COVID-19, se ha implementado en varios países el principio de epidemiología basada en aguas residuales (Wastewater-Based Epidemiology - WBE), al ser una herramienta emergente que brinda información temporal y espacial sobre el estado de salud una población en específica, la WBE se ha implementado desde el 1950 con la identificación de otros genomas virales causantes de la enfermedad de Hepatitis A, Hepatitis B, enterovirus, rotavirus y poliovirus (Prado et al., 2012; Romero et al., 2014).

Al respecto, en el año 2020 la ciudad de Valencia España fue la primera en desarrollar un sistema epidemiológico de alerta temprana para la detección de SARS-CoV-2 en aguas residuales, que a través de diferentes científicos e investigadores que fueron replicando la metodología para diferentes países. Es posible identificar el virus SARS-CoV-2 en aguas residuales, 7 de 15 pacientes que padecían la COVID-19 mediante un estudio se determinó que tuvieron positividad en heces fecales para SARS-CoV-2 mediante secuenciación metagenómica de RNA viral (Cheung et al., 2020).

La vigilancia y monitoreo de las aguas residuales permite la recolección de datos estadísticos sobre los restos de alimentos, medicamentos y diversos insumos que ingiere una comunidad, funcionando como un indicador temprano de una infección o enfermedad en sus primeras etapas. La presencia confirmada de SARS-CoV-2 en las heces fecales humanas supera por un periodo prolongado a la presencia positiva en muestras de secreciones del aparato respiratorio, permitiendo la detección temprana de nuevas olas de COVID-19 o como seguimiento de la circulación del virus en una población determinada. También podemos aproximar una cantidad de personas infectadas que puedan estar excretando el virus, viendo si va en aumento o disminución. La detección del virus en las muestras fecales tiene una media de 28 días desde la aparición del primer síntoma, y un promedio de 11 días más que las pruebas positivas extraídas de muestras de secreciones respiratorias (Wu. et al., 2020).

## **2 INTRODUCCIÓN**

En Bolivia, el Fondo Regional para la Cooperación Triangular en América Latina y el Caribe ha aprobado el Proyecto de Cooperación Triangular (CoTriSan), entre los países de Costa Rica, Bolivia y Alemania para la implementación de Estrategias de Saneamiento en ciudades

intermedias (como medida de acción para la detección del SARS-CoV-2), teniendo dentro de sus líneas de acción el diseño e implementación de un Sistema de Alerta Temprana de detección del SARS-CoV-2 en aguas residuales.

El Proyecto consistió en establecer un Sistema de Alerta Temprana piloto, en una zona específica de la ciudad de Santa Cruz de la Sierra, donde se establezcan todas las condiciones de trabajo que permitan generar las alertas para uso y toma de decisiones por parte de las autoridades en salud a nivel local, así como para la posible generación de políticas y estrategias epidemiológicas de prevención a nivel Nacional. Para lograr estos objetivos de manera ordenada y eficiente, se ha un Centro de Control y Monitoreo (CCM) en una plataforma web, en el que se ha cargado el modelo hidráulico dinámico de la red de Alcantarillado Sanitario en operación (simulación efectuada en la fase inicial del proyecto), sectorizando en 5 zonas de trabajo. Este modelo constituye ya una herramienta operativa para la mejora en la prestación de servicios de saneamiento por parte de la Cooperativa de Servicios Públicos de Agua Potable y Alcantarillado Plan Tres – COOPLAN R.L.

Para el levantamiento periódico de información, se conformaron brigadas de campo quienes, con ayuda de una aplicación móvil (sistema operativo Android), introducen los datos del análisis de parámetros in situ, básicos y moleculares, de las muestras de agua residual colectadas de forma semanal en puntos de control de las 5 zonas priorizadas en el área de servicio con Alcantarillado Sanitario de COOPLAN, como la información levantada in situ como la remitida por los laboratorios especializados en biología molecular de la cuantificación de trazas virales por dos métodos (RT-qPCR y RT-LAMP), aplicando 4 bases genéticas y moleculares del COVID-19, tales como N1, N2, E y RdRp.

Adicionalmente, se monitorea parámetros fisicoquímicos y microbiológicos a través de un laboratorio externo legalmente establecido, información cargada al sistema informático para correlacionar el conjunto de datos recabados. Los resultados se muestran en la misma herramienta informática (CCM), incluyendo gráficas y proyecciones probabilísticas, sobre las cuales es posible avanzar hacia una etapa reactiva para el control de la dispersión del virus en el área de intervención.

El proyecto incluyó la capacitación por parte de expertos de Costa Rica, el intercambio de documentación técnica de alcance internacional, a forma de estandarizar la metodología y procedimientos a ser aplicados en el contexto Nacional.

### **3 DISEÑO DE LA SISTEMATIZACIÓN**

#### **3.1 Objetivo general**

Sistematizar las acciones efectuadas y resultados obtenidos del cumplimiento de indicadores en el diseño e implementación de un Sistema de Alerta Temprana (SAT) de detección de SARS-CoV-2 en aguas residuales.

##### **3.1.1 Objetivos específicos**

- Revisión de antecedentes de concepción del Proyecto y de conformación del comité técnico - científico de coordinación y ejecución de acciones interinstitucionales.

- Evaluar a detalle el cumplimiento de indicadores de la planificación general del Proyecto de Cooperación Triangular para el Saneamiento, Macroproceso Sistema de Alerta Temprana (SAT) para la detección de SARS-CoV-2 en aguas residuales.
- Sistematizar los principales resultados obtenidos de las distintas consultorías efectuadas en el marco del alcance y objetivos del Proyecto.

### **3.2 Eje de la sistematización**

El enfoque central de la sistematización es la organización, ordenamiento y sistematización de la información existente, resultado de la ejecución del Proyecto de Cooperación Triangular para el Saneamiento entre Bolivia, Costa Rica y Alemania, macroproceso "Sistema de Alerta Temprana (SAT) para la detección de SARS-CoV-2 en aguas residuales".

De esta forma, poder consolidar en un solo documento los principales actuados y resultados obtenidos de la intervención e interrelación entre los distintos actores del sector saneamiento, especialistas en Epidemiología y biología molecular, además del cumplimiento multitemporal del propósito y objetivos del proyecto, respecto al diseño e implementación de un Sistema de Alerta temprana de detección de SARS-CoV-2 en aguas residuales sanitarias.

### **3.3 Metodología implementada**

#### **3.3.1 Revisión, ordenamiento y recojo de la información disponible**

Revisión e identificación de todas las actividades, informes y guías desarrolladas en la gestión 2021 - 2022. A continuación, se mencionan las fuentes de información empleadas:

- Documento de la Planificación general de actividades como Cooperación Triangular (CoTriSan), entre los países de Costa Rica, Bolivia y Alemania para la "Estrategia de Saneamiento en ciudades intermedias (como medida de acción para la detección del SARS-CoV-2)".
- Capacitaciones e intercambio de experiencias para el diseño e implementación del Sistema de Alerta Temprana para la detección de SARS-CoV-2 en aguas residuales sanitarias.
- Taller Virtual de intercambio de experiencias sobre la determinación de SARS-CoV-2 en aguas superficiales, presentado por la Dra. María Teresa Álvarez de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas de la Universidad Mayor de San Andrés – UMSA (Grabación de la capacitación efectuada el día 09 de diciembre del 2021).
- Taller Virtual de intercambio de experiencias sobre la metodología de detección de SARS-CoV-2 en aguas residuales implementado en Costa Rica, presentado por el Dr. Pablo Cesar Rivera del Instituto Costarricense de Acueductos y Alcantarillados – AYA (Grabación de la capacitación efectuada el día 10 de diciembre del 2021).
- Gestiones de Implementación del Centro de Control para el Monitoreo de Aguas Residuales.
- Guía para el diseño e implementación de un Sistema de Alerta Temprana para la Detección de SARS-CoV-2 en aguas residuales.
- Metodología y Protocolos de detección y cuantificación de SARS-CoV-2 en aguas residuales.
- Consultorías de Validación Estadística de la Metodología de detección y cuantificación de SARS-COV-2 en aguas residuales.
- Modelación hidráulica dinámica de la red de Alcantarillado Sanitario de la Cooperativa de Servicios Públicos Agua Potable y Alcantarillado Plan Tres mil COOPLAN R.L.

- Resultados obtenidos de la fase operativa del Proyecto y la implementación de la metodología de detección y cuantificación de SARS-CoV-2 en aguas residuales.

## 4 CONFORMACIÓN DEL COMITÉ CIENTIFICO INTERINSTITUCIONAL

### 4.1 Roles Institucionales

Durante la conformación del sistema de monitoreo de aguas residuales para la detección de virus SARS-CoV-2, se conformó un equipo multidisciplinario con diferentes instituciones especialistas Sanitarios Hidráulicos, Bioquímicos, Biotecnólogos que facultaron el desarrollo y cumplimiento de los objetivos propuestos. Las diferentes instituciones participantes, son citadas a continuación:

**Tabla 1:** Comité Científico Interinstitucional

	<p><b>Universidad Mayor de San Andrés – Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas:</b> Especializada en la formación de profesionales Químicos Farmacéuticos y Bioquímicos con un alto nivel científico investigativo y humanístico con capacidad de vinculación y respuesta social que busca la formación de excelencia y que coadyuve a la solución de los problemas de salud de la sociedad a nivel local, regional y nacional.</p>
	<p><b>Cooperativa de Servicios Públicos Agua Potable y Alcantarillado Plan Tres mil COOPLAN R.L.:</b> Institución pública encargada de llevar los servicios básicos de agua potable y Alcantarillado Sanitario a la población de la ciudadela Andrés Ibáñez Plan 3000 municipio de la ciudad de Santa Cruz de la Sierra (área de intervención con el proyecto piloto).</p>
	<p><b>Laboratorio de Diagnóstico e Investigación BIOSCIENCE SRL</b> Laboratorio especializado en análisis clínico, diagnóstico molecular e investigación científica, que contribuye con el desarrollo y crecimiento de nuevos investigadores a nivel Nacional.</p>
	<p><b>Universidad Católica Boliviana “San Pablo” Unidad Académica Santa Cruz – Carrera Ingeniería en Biotecnología:</b> La Facultad de Ingeniería en Biotecnología ofrecen sus instalaciones y equipos de laboratorio para investigaciones científicas con el fin de aportar al desarrollo de los futuros profesionales e investigadores altamente competentes en el área de tecnología y ciencia para la resolución de problemas, procesos y toma de decisiones. La carrera de Ingeniería en Biotecnología se destaca por formar parte de proyectos de investigación tanto internos como externos, en áreas como salud, agroindustrias, medio ambiente, alimentos, entre otras.</p>
	<p><b>Instituto Costarricense de Acueductos y Alcantarillados;</b> Laboratorio Nacional de Aguas: Departamento encargado de coordinar y ejecutar, en conjunto con el Ministerio de Salud Pública, la vigilancia de la calidad del agua en sus diferentes usos y la realización de investigaciones relacionadas con el agua, el ambiente y la salud en Costa Rica.</p>
	<p><b>Universidad de Costa Rica; Instituto de Investigaciones en Salud (INISA):</b> institución líder de investigación en salud a nivel nacional e internacional, caracterizada por su trabajo de alta calidad en investigación científica, docencia y acción social, con impacto en las políticas públicas en salud.</p>

#### 4.1.1 Actores involucrados en el proyecto

**Tabla 2:** Actores involucrados en el Proyecto

Nombre	Cargo
Ing. Luís Ernesto Arteaga	Gerente General - Cooperativa de Servicios de Agua Potable y Alcantarillado Plan Tres Mil – COOPLAN R.L.
Ing. Luis Arturo Copa Calle	Jefe de Control de Calidad PTAR COOPLAN R.L.
PhD. María Teresa Álvarez	Docente - Investigadora jefe del Área Bioquímica Molecular - Universidad Mayor de San Andrés.
MSc. Marcelo F. Gutierrez Valverde	Docente - Investigador responsable del Área de Bioquímica Molecular - Universidad Mayor de San Andrés.
MSc. Esdenka Pérez Cascales	Gerente General - Laboratorio BIOSCIENCE SRL
PhD. Natalia Montellano Duran	Directora de la carrera de Ingeniería en Biotecnología Universidad Católica Boliviana “San Pablo” UCB
PhD. Pablo Cesar Rivera	Director de Investigación Agua, Ambiente y Salud – Laboratorio Nacional de Aguas del Instituto Costarricense de Acueductos y Alcantarillado - AYA
MSc. Luz Chacón Jiménez	Investigadora Sección Infección - Nutrición, INISA
MSc. Kenia Barrantes Jiménez	Investigadora Sección Infección - Nutrición, INISA
Lic. Luis César Rivera Montero	Investigadora Sección Infección - Nutrición, INISA
Lic. Solimar Colque Taboada	Practicante Cooperación Alemana GIZ
Abelardo Hermógenes Mamani Tacachira	Practicante Cooperación Alemana GIZ
Jhennyfer Cruz Mendez	Practicante Cooperación Alemana GIZ
Flavia Andrea Justiniano Zarraga	Practicante Cooperación Alemana GIZ

Además de la presencia del personal dependiente de la Cooperación Alemana GIZ tanto en Bolivia como en Costa Rica, como ejecutores del Proyecto en todas sus fases.

Nombre	Cargo
Carmen Nuria Marka Arias	Asesora Gobernabilidad y Gestión Interinstitucional Responsable CoTriSan - OE 2C00
Astrid Sieglinde Michels Estrada	(Programmleiter/Responsable CoTriSan - OE 2C00
Antonio Macchiavelli	Experto Senior en Saneamiento GIZ/PERIAGUA

Luis Arley Zúñiga Picado	Asesor técnico Cooperación Triangular para el Saneamiento Bolivia – Costa Rica – Alemania (CoTriSan)
Karol Vivancos Flores	Asesora Técnica para los Programas Periagua III y Cooperación Triangular para el Saneamiento Bolivia Costa Rica - Alemania (CoTriSan)
Susana Jaramillo	Asesora técnica en Gestión de Saneamiento-OE 2C00 GIZ/CoTriSan - PERIAGUA III

## 5 ANÁLISIS Y SISTEMATIZACIÓN DEL PROYECTO

### 5.1 Planificación inicial del Proyecto

Para el desarrollo del “Sistema de alerta temprana para la detección de SARS-CoV-2 en aguas residuales” se generaron procesos e indicadores con sus respectivas actividades en respuesta al cumplimiento a los objetivos del proyecto, como se puede observar en la Tabla 2.

**Tabla 3:** Planificación CoTriSan – Línea de acción SAT SARS-CoV-2

Proceso	Indicadores	Actividades
Las autoridades en ambos países cuentan con un diseño del sistema de Alerta Temprana para detección de SARS-CoV-2 y respuesta al COVID-19 en aguas residuales.	Al menos 2 propuestas piloto de sistemas (1 por país) de alerta temprana para detección de SARS-CoV-2 y respuesta al COVID-19 en aguas residuales.	Contacto oficial con instituciones y generación de compromisos (convenios de ejecución)
		Definición de roles institucionales
		Identificación de condiciones previas para el área de intervención
		Identificación área de intervención
		Selección de centros de monitoreo
		Integrar el sistema con el sector salud
		Modelación digital de los sistemas de estudio (monitoreo, seguimiento y gestión de datos)
		Selección de áreas estratégicas para la toma de muestras
	Desarrollo de protocolos para la toma de muestras y análisis de laboratorio clínico para la detección y respuesta al COVID-19 en aguas residuales.	Recopilación/identificación y adaptación de información existente sobre protocolos internacionales y sistemas de gestión para laboratorios de biología molecular
		Conocer la capacidad instalada actual del/los laboratorios
		Seleccionar laboratorio para pruebas PCR, (evaluar requerimientos de equipamiento)
		Desarrollo de protocolo/guía sobre toma de muestras
		Toma de muestras en el sistema modelado
	Al menos 20 personas capacitadas (10 por país) para el	Evaluación de la aplicación de metodologías de detección cualitativas, cuantitativas y/o mixtas para el Sistema de Alerta Temprana.
		Entrenamientos virtuales: toma de muestras, análisis laboratorios (incluye desarrollo de procesos didácticos para respaldo de las capacitaciones)

Proceso	Indicadores	Actividades
	desarrollo de análisis y toma de muestras de agua residual.	Capacitaciones in situ para el intercambio de experiencias, metodologías, secuencias operativas y protocolos institucionales entre Bolivia y Costa Rica
		Evaluación de las personas capacitadas sobre su aprendizaje (y aporte teórico-práctico a la sistematización del conocimiento)
		Sistematización y gestión del conocimiento de avances y resultados

### 5.1.1 Valoración del cumplimiento de indicadores del Proyecto

**Indicador 1:** Implementación de 2 propuestas piloto de sistemas de alerta temprana para detección de SARs-CoV-2 y respuesta al COVID-19 en aguas residuales.

**Tabla 4:** Acciones de cumplimiento del Indicador 1

Indicador	Actividades programadas	Acciones ejecutadas
Al menos 2 propuestas piloto de sistemas (1 por país) de alerta temprana para detección de SARS-CoV-2 y respuesta al COVID-19 en aguas residuales.	Contacto oficial con instituciones y generación de compromisos (convenios de ejecución)	Reuniones sostenidas con el Ministerio de Salud, Secretaría Departamental de Salud, Servicio Departamental de Salud Santa Cruz – SEDES, Secretaría Municipal de Salud (Santa Cruz de la Sierra), Laboratorios legalmente establecidos, Laboratorios especializados en Biología Molecular, Universidad Mayor de San Andrés – Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas, Universidad Católica Boliviana San Pablo, Cooperativa de Servicios Públicos Agua Potable y Alcantarillado Plan Tres mil COOPLAN R.L. Una vez realizado el acuerdo con las instituciones interesadas en ser parte del proyecto, se procedió a realizar cartas de intención, convenios interinstitucionales, iniciando la ejecución del proyecto con la designación de atribuciones y funciones específicas a las contrapartes involucradas. Además de sostener reuniones con Instituciones Costarricenses: Laboratorio Nacional de Agua del AyA y con el INISA de la Universidad de Costa Rica, como las contrapartes del Proyecto.
	Definición de roles institucionales	Definición y establecimiento de roles y funciones posterior a las reuniones sostenidas, firmas de carta de intención y convenios, con las siguientes instituciones: Cooperativa de Servicios Públicos Agua Potable y Alcantarillado Plan Tres mil COOPLAN R.L., Laboratorio de Diagnóstico e Investigación BIOSCIENCE SRL, Universidad Católica Boliviana “San Pablo” Unidad Académica Santa Cruz – Carrera

Indicador	Actividades programadas	Acciones ejecutadas
		Ingeniería en Biotecnología, Universidad Mayor de San Andrés – Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas, establecimiento de roles y funciones en el marco del Proyecto.
	Identificación de condiciones previas para el área de intervención	Se realizaron visitas a las diferentes instituciones que formaron parte del proyecto; verificando su capacidad operativa en cuanto a la disponibilidad y buen estado de equipos que faculden el procesamiento y análisis molecular de las muestras, para establecer los protocolos y metodologías estandarizadas. En primer lugar, se visitó el área de servicio (zona de intervención con el proyecto – Plan Tres Mil) y las instalaciones del Laboratorio de la Cooperativa de Servicios Públicos Agua Potable y Alcantarillado Plan Tres mil COOPLAN R.L., después el Laboratorio de la carrera de Ingeniería en Biotecnología de la Universidad Católica Boliviana y por último el Laboratorio de Diagnóstico Molecular e Investigación BIOSCIENCE SRL., quienes contribuyeron a través de sus instalaciones, personal operativo y designación de tiempo para el desarrollo del proyecto en todas sus fases.
	Identificación área de intervención	Se estableció como área de intervención y ejecución del proyecto el área de Prestación de servicio de la Cooperativa de Servicios Públicos Agua Potable y Alcantarillado Plan Tres Mil COOPLAN R.L., ciudadela del Plan Tres Mil, Municipio de Santa Cruz de la Sierra.
	Selección de centros de monitoreo	El modelamiento hidráulico del área de intervención de la Cooperativa de Servicios Públicos de Agua Potable y Alcantarillado Plan Tres – COOPLAN R.L., ha simulado la hidrodinámica de colectores (tuberías de recolección de aguas residuales) con diámetros desde 150 mm hasta el emisario de 1200 mm. Este último es el que conduce el agua residual desde la red, hasta la Planta de Tratamiento de Aguas Residuales (PTAR), ubicada a aproximadamente 12 kilómetros en el sector Sudeste del área de prestación de servicios. Lo que facultó definir las cámaras de inspección establecidas como puntos priorizados para la toma de muestra de agua residual.
	Integrar el sistema con el sector salud	Se efectuaron diversas reuniones con las diferentes instituciones gubernamentales de los tres niveles de estado dando a conocer

Indicador	Actividades programadas	Acciones ejecutadas
	<p>Modelación digital de los sistemas de estudio (monitoreo, seguimiento y gestión de datos)</p>	<p>el alcance del proyecto y metodología de intervención.</p> <p>En el sistema Informático de seguimiento denominado Centro de Control y Monitoreo (CCM) se registran los resultados de la medición de los parámetros determinados <i>in situ</i>: Temperatura, Potencial de Hidrógeno pH, Conductividad Eléctrica, Oxígeno Disuelto, Sólidos Disueltos Totales - TDS, Altura del agua (tirante hidráulico), otros parámetros fisicoquímicos a ser determinados en laboratorio: Demanda Química de Oxígeno DQO, Demanda Bioquímica de Oxígeno DBO<sub>5</sub> y parámetros microbiológicos indicadores de contaminación fecal: Coliformes Termotolerantes.</p> <p>Adicionalmente, se registran resultados de concentración de los genomas virales obtenidos a través del análisis del agua residual mediante procedimientos RT-qPCR y LAMP (anteriormente descritos). Los datos correlacionados, permiten generar gráficas estadísticas por semana de la concentración viral y su prevalencia en las áreas de estudio.</p>
	<p>Selección de áreas estratégicas para la toma de muestras</p>	<p>Estos se determinaron en base al modelo hidráulico realizado previo a la ejecución de la fase operativa del proyecto, cinco puntos definidos para la toma de muestras de agua residual. Los dos puntos del extremo Sur (CP 113 y C 747) corresponderá a la medición de los parámetros moleculares de las dos cuencas principales del sistema de alcantarillado sanitario de las EPSAs COOPLAN y SAJUBA, los otros tres puntos corresponden a las subcuencas mayores (CP130, N158 y N669), abarcando en su totalidad toda el área servida con Alcantarillado Sanitario de la ciudadela del Plan Tres Mil.</p> <p>En el caso de Costa Rica ya contaba con un área de intervención definida por el Laboratorio Nacional de Aguas del Instituto Costarricense de Acueductos y Alcantarillado - AYA, donde los puntos de análisis seleccionadas para las pruebas con la metodología RT-qPCR fueron centros de agrupación o instalaciones donde diferentes ramificaciones sanitarias concordaban para luego llevar sus afluentes unificados a la PTAR Los Tajos.</p>

Indicador	Actividades programadas	Acciones ejecutadas
	Sistemas de Alerta temprana en la detección de SARS-CoV-2 y respuesta al COVID-19 en aguas residuales en el país de Bolivia y Costa Rica.	Bajo la metodología presentada por Costa Rica a Bolivia y conforme a la experiencia obtenida por la Universidad Mayor de San Andrés a nivel local, ambos países cuentan con un Sistema de Alerta temprana para la detección de SARS-CoV-2 y respuesta al COVID-19 en aguas residuales, con procedimientos y metodologías estandarizadas.

**Indicador 2:** Desarrollo de protocolos para la toma de muestras y análisis de laboratorio clínico para la detección y respuesta al COVID-19 en aguas residuales.

**Tabla 5:** Acciones de cumplimiento del Indicador 2

Indicador	Actividades programadas	Acciones ejecutadas
Desarrollo de protocolos para la toma de muestras y análisis de laboratorio clínico para la detección y respuesta al COVID-19 en aguas residuales.	Recopilación/identificación y adaptación de información existente sobre protocolos internacionales y sistemas de gestión para laboratorios de biología molecular	Revisión general y específica de protocolos internacionales (países que efectuaron la vigilancia epidemiológica en aguas residuales) con relación a la toma de muestra, sedimentación, concentración y procesamiento molecular, con referencia base de la metodología aplicada en Costa Rica aprobada por la Organización Panamericana de Salud - OPS.
	Conocer la capacidad instalada actual del/los laboratorios	Se verifico la capacidad de cada laboratorio tanto en el departamento de Santa Cruz (Laboratorio BIOSCIENCE, Laboratorio de Biotecnología - UCB) como en La Paz (Laboratorio de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas - UMSA), disponibilidad de equipos y compromiso en la ejecución del proyecto en sus distintas fases.
	Seleccionar laboratorio para pruebas PCR, (evaluar requerimientos de equipamiento)	Se valoro la capacidad operativa de cada laboratorio respecto a la disponibilidad de equipos tanto en la ciudad de La Paz y Santa Cruz, los cuales facultaban la detección de los genes RdRp, E, N1 y N2 bases genéticas y moleculares del COVID-19.
	Desarrollo de protocolo/guía sobre toma de muestras	Se desarrollo la guía instructiva del Sistema de Alerta Temprana para la Detección de SARS-COV-2 en aguas residuales implementado en Bolivia. La cual describe procedimiento de toma de muestras, análisis de parámetros, in situ, básicos y moleculares. Además de procedimientos efectuados del modelado del Alcantarillado Sanitario, Sistemas de procesamiento de datos y la métodos de validación estadística de los

Indicador	Actividades programadas	Acciones ejecutadas
		procedimientos empleados en el proyecto con la correlación de los distintos parámetros empleados, los in situ, básicos, complementarios con los moleculares. En el caso de Costa Rica ya contaba con la "Guía para el análisis y la cuantificación del SARS-CoV-2 en aguas residuales, 2021", siendo un actor fundamental en la estandarización de metodología aplicada en Bolivia.
	Toma de muestras en el sistema modelado	La fase operativa del proyecto duro 6 meses, con una frecuencia de toma de muestras de forma semanal, habiéndose determinado el patrón horario óptimo en la etapa de calibración del modelo, por el análisis de gráficas de cargas microbiológicas en las aguas residuales de los colectores del sistema, por lo que se generaría en estos horarios una mayor concentración de la carga contaminante.
	Evaluación de la aplicación de metodologías de detección cualitativas, cuantitativas y/o mixtas para el Sistema de Alerta Temprana.	Colecta de muestras de aguas residuales. Procedimiento de toma de muestra de agua residual Procedimiento de colecta, codificado y transporte de muestras de agua residual, análisis de parámetros in situ y básicos y análisis de parámetros moleculares, bajo los siguientes procedimientos: <ul style="list-style-type: none"> <li>- Concentración de las muestras,</li> <li>- Extracción del ácido nucleico (RNA)</li> <li>- Concentración y Cuantificación viral,</li> <li>- Extracción del ácido nucleico (RNA)</li> <li>- Transcripción inversa del RNA,</li> <li>- Reacción en cadena de la polimerasa a través de RT-qPCR (genes N1, N1, E y RdRp) y aplicación de RT-LAMP.</li> </ul>

**Indicador 3:** Al menos 20 personas capacitadas (10 por país) para el desarrollo de análisis y toma de muestras de agua residual.

**Tabla 6:** Acciones de cumplimiento del Indicador 3

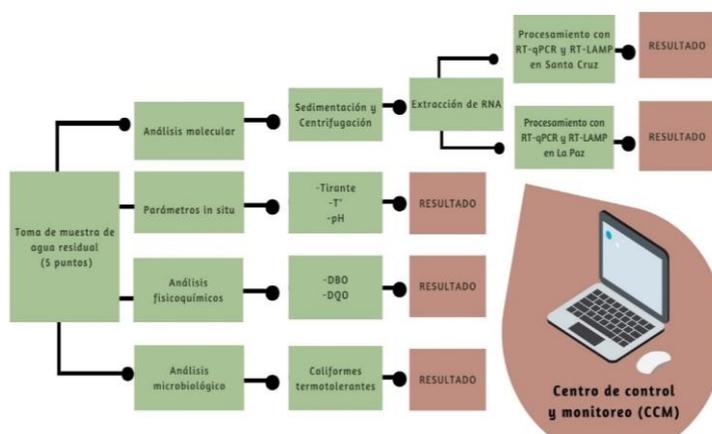
Indicador	Actividades programadas	Acciones ejecutadas
Al menos 20 personas capacitadas (10 por país) para el desarrollo de análisis y toma de muestras de agua residual.	Entrenamientos virtuales: toma de muestras, análisis laboratorios (incluye desarrollo de procesos didácticos para respaldo de las capacitaciones)	Se efectuaron en fecha 09 al 10 de diciembre del 2021, intercambios de experiencia y conocimiento respecto a la metodología y protocolos de detección de SARS-CoV-2 en aguas residuales implementado en Costa Rica para conocimiento de Bolivia.
	Capacitaciones in situ para el intercambio de	Del 13 al 17 de diciembre del 2021, personal especializado en Biología Molecular de la

Indicador	Actividades programadas	Acciones ejecutadas
	experiencias, metodologías, secuencias operativas y protocolos institucionales entre Bolivia y Costa Rica	Universidad Mayor de San Andrés capacitaron a personal de COOPLAN, BIOSCIENCE y la Universidad Católica Boliviana en temas referentes a metodologías, secuencias operativas y protocolos de toma de muestras, concentrado y análisis molecular de las aguas residuales. De igual forma se efectuaron las capacitaciones presenciales en Costa Rica para aplicación del método RT-LAMP de detección de SARS-CoV-2 en aguas residuales, con presencia de personal laboratorio Nacional de Agua dependiente del AYA, Instituto de Investigaciones en Salud (INISA) de la Universidad de Costa Rica.
	Evaluación de las personas capacitadas sobre su aprendizaje (y aporte teórico-práctico a la sistematización del conocimiento)	El 17 y 18 de junio del 2022, se efectuó de parte de los especialistas de la UMSA la valoración y ajustes de los procedimientos empleados en la fase operativa del proyecto, en presencia de todas las contrapartes: COOPLAN, BIOSCIENCE, UCB y representantes de la GIZ.
	Sistematización y gestión del conocimiento de avances y resultados	Se efectuó la sistematización del Proyecto de Cooperación Triangular para el Saneamiento en todas sus líneas de acción, exponiendo las acciones efectuadas y resultados obtenidos.

## 6 METODOLOGÍA IMPLEMENTADA DE DETECCIÓN DE SARS-COV-2

La metodología implementada para la detección de SAR-CoV-2 en aguas residuales se resume en las siguientes fases y acciones presentados en la Figura 1.

Figura 1



Fuente: Elaboración propia

El precedente esquema se resume en los siguientes pasos:

- a. Colecta de muestras de aguas residuales.
- b. Análisis fisicoquímicos, microbiológicos y moleculares.
- c. Sedimentación y centrifugación de la muestra de agua residual.
- d. Extracción de RNA viral.
- e. Procesamiento de las muestras mediante RT-qPCR con detección de los genes RdRp, E, N1 y N2.
- f. Aplicación de la técnica RT-LAMP.
- g. Procesamiento y análisis de los resultados en el Centro de Control y Monitoreo.

## **6.1 Fase inicial**

### **6.1.1 Modelamiento hidráulico del Sistema de Alcantarillado Sanitario**

El modelamiento hidráulico del área de intervención de la Cooperativa de Servicios Públicos de Agua Potable y Alcantarillado Plan Tres – COOPLAN R.L., ha simulado la hidrodinámica de colectores (tuberías de recolección de aguas residuales) con diámetros desde 150 mm hasta el emisario de 1200 mm. Este último es el que conduce el agua residual desde la red, hasta la Planta de Tratamiento de Aguas Residuales (PTAR), ubicada a aproximadamente 12 kilómetros en el sector Sudeste del área de prestación de servicios.

El operador reporta un total de 15 830 conexiones y la PTAR cuenta con una capacidad instalada de 1 235 m<sup>3</sup>/hora, con un índice de tratamiento de agua residual de 80,43% (Indicadores AAPS, 2020).

#### **6.1.1.1 Metodología implementada para el modelo hidráulico**

- 1) Recopilación de la información;** referente a la topología de la red de alcantarillado, ubicación de cámaras de inspección, profundidad y sección de la topografía del terreno, caudales de consumo facturado, caudales en la red de alcantarillado, caudales de salida de la Planta de Tratamiento de Aguas Residuales - PTAR o tanques de agua potable, tirante, tensión tractiva y velocidad.
- 2) Procesamiento de la información;** traspaso de la información de los archivos tipo “Shape” en el software de modelación hidráulica SewerGEMS v10.02, procesamiento de demandas (consumo per cápita) para estimar caudales de ingreso al modelo (caudales descargados en la red) y verificar su comportamiento hidráulico, procesamiento para modelación en periodo extendido para la determinación del patrón horario de consumo. En este proceso se obtuvieron dos diferentes tipos de mediciones de parte del operador: 1) los aforos de caudal en la planta de tratamiento de aguas residuales y 2) aforos de mediciones de caudales salidos de las cámaras de inspección de la red de alcantarillado sanitario.
- 3) Corrida del modelo;** reajustes y depuración tanto en la parte de topología de red, como en el cargado de demandas en el modelo, para realizar las corridas al modelo hidráulico.
- 4) Mediciones de campo;** mediciones de campo (aforos de caudal) en puntos significativos de la red, puntos posteriormente propuestos para efectuar las mediciones de detección de genomas virales de SARS-CoV-2.

- 5) **Establecimiento de puntos para toma de muestra:** Para el levantamiento de muestras periódicas para la detección de genomas virales, en primera instancia se efectuó la determinación de los puntos donde se llevará a cabo esta tarea a través de inspecciones, destapado de cámaras, sondeos, etc. Tras reuniones técnicas con el equipo de trabajo, se determinó que algunos de estos puntos sean parte de aquellos donde se realizaron los aforos de caudal siendo los más importantes en temas de concentración de parámetros contaminantes. Asimismo, comprendiendo la metodología del Sistema de Alerta Temprana, se suprimió la toma de puntos en cuencas pequeñas y poco representativas en términos poblacionales.

Con estas consideraciones, la Figura 6 muestra los cinco puntos definidos para la toma de 5 muestras de agua residual. Los dos puntos del extremo Sur (CP 113 y C 747) corresponderá a la medición de los parámetros moleculares de las dos cuencas principales del sistema de alcantarillado sanitario de COOPLAN y SAJUBA, los otros tres puntos corresponden a las subcuencas mayores (CP1-30, N-158 y N-669).

- 6) **Análisis hidráulico para la obtención de concentraciones:** La dinamización del modelo corresponde a la aplicación de varias herramientas, además del software de modelación. Éste si bien puede simular el comportamiento hidráulico completo a partir de un escenario, no permite la proyección de algunos resultados, como ser el caudal, velocidad o tirante de agua en cada tramo, dado que estos son producto del cálculo de acuerdo con el procesamiento de consumos y descargas cargado al sistema. Sin embargo, para la obtención de cargas contaminantes, es necesario estimar el caudal de flujo al momento de la toma de la muestra.

En este sentido, si la carga contaminante de parámetros está en función a la cantidad de agua que pasa en ese momento por los puntos de control, la medición del tirante de agua en ese instante permitirá, a través de la aplicación de la hidráulica en el modelo calibrado (fórmula de R. Manning), el cálculo del caudal que estaría pasando por estos puntos.

En cuanto a la información de macro medición a través de mediciones de caudal en salidas de tanques de almacenamiento y/o ingresos a la PTAR, se analizó la información recabada por la EPSA, en la etapa de calibración del modelo.

Otras recomendaciones técnicas útiles para calibrar un modelo hidráulico:

- 1) Verificación de la topología de la red de manera sectorizada (pequeñas subcuencas) donde se evalúen las características de los componentes principales de la red, cotas de salida e ingreso de cada tramo, a fin de comparar con los planos as built y verificar la pendiente real de cada tramo.
- 2) Cada área servida de la población puede tener comportamientos de uso diferentes en función al tipo de viviendas o establecimientos que estén en el gar. En este caso, la data de medición de sistemas de agua potable es importante para poder estimar el comportamiento de manera sectorizada en cada sistema o circuito de agua
- 3) Realizar estudios de costumbres de uso del agua potable y verificar posibles valores para el cálculo del coeficiente de retorno.

- 4) Estudio de mediciones en diferentes tramos de la red de alcantarillado para verificar y calcular posibles variaciones de coeficiente de rugosidad y evaluar la incidencia de este valor en las ecuaciones de R. Manning en los tramos de estudio.

## 6.2 Creación del CCM

Para la conformación de la base dinámica de datos, la interpretación de los resultados y el seguimiento histórico de la evolución del virus dentro del área de estudio se ha proyectado conformar un Sistema Informático de seguimiento. El sistema ha sido denominado Centro de Control y Monitoreo (CCM), el cual permite gestionar los datos con la velocidad que requiere un sistema de alerta temprana tanto para la implementación de acciones preventivas como principalmente en la etapa posterior (denominada etapa reactiva).

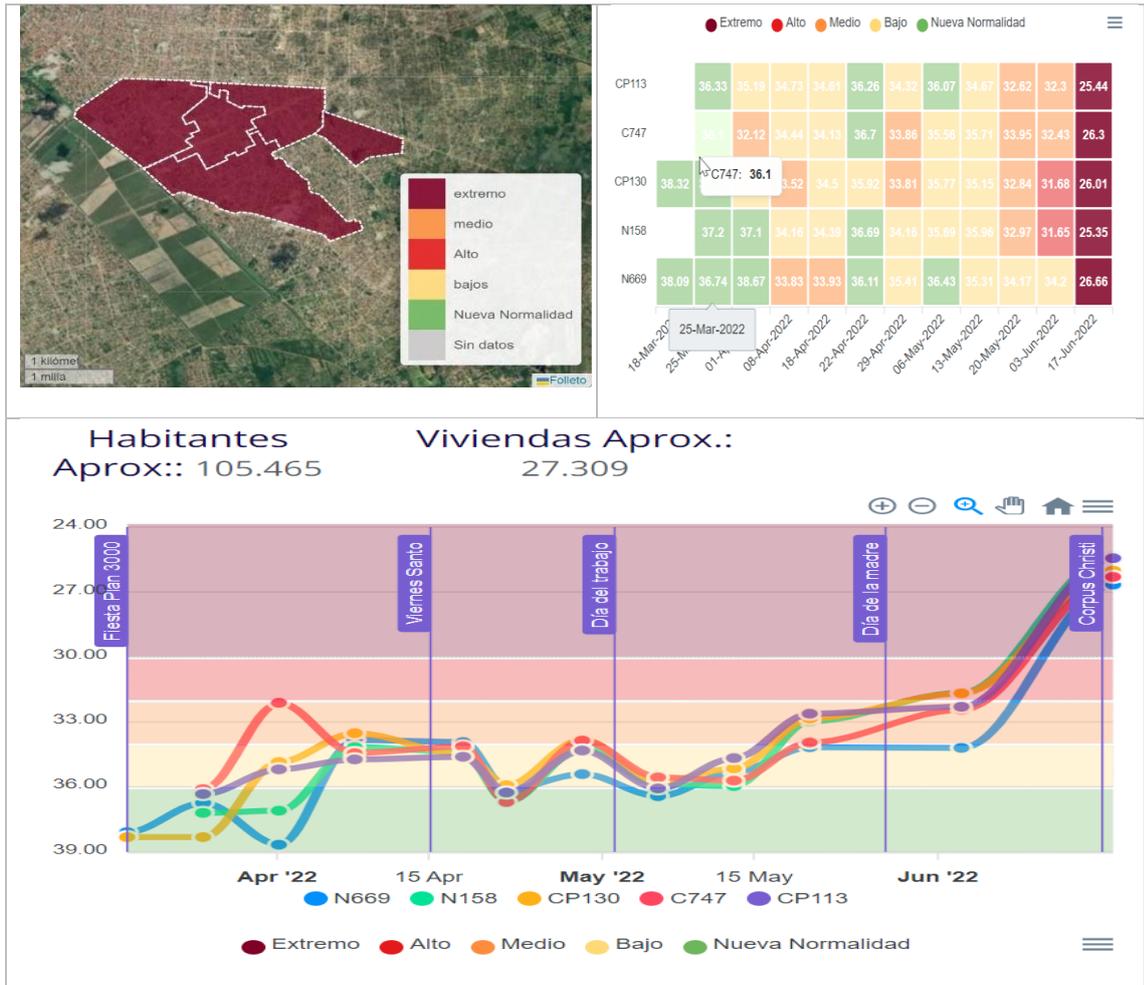
Definidas las condiciones técnicas de la interfaz entre las bases de datos generadas por el modelo hidráulico y las requeridas por la herramienta, se elaboraron diferentes diagramas de entidad relación, diagrama físico de la base de datos, de forma de facultar el manejo fácil e interacción de los datos recogidos por las brigadas de campo (programación front-end). Este proceso se ha llevado a cabo para la generación automática de reportes y su inequívoca interpretación, en función de los criterios científicos generados en el proyecto piloto por los especialistas. Asimismo, se realizaron diagramas UML (estructura y comportamiento) tomando en cuenta los siguientes parámetros: análisis de muestra, método epidemiológico, lectura y reporte de datos.

En el sistema se registran los resultados de la medición de los parámetros determinados *in situ*: Temperatura, Potencial de Hidrógeno pH, Conductividad Eléctrica, Oxígeno Disuelto, Sólidos Disueltos Totales - TDS, Altura del agua (tirante hidráulico), otros parámetros fisicoquímicos a ser determinados en laboratorio: Demanda Química de Oxígeno DQO, Demanda Bioquímica de Oxígeno DBO<sub>5</sub> y parámetros microbiológicos indicadores de contaminación fecal: Coliformes Termotolerantes. Adicionalmente, se registran resultados de concentración de los genomas virales obtenidos a través del análisis del agua residual mediante procedimientos RT-qPCR y LAMP (anteriormente descritos). Los datos correlacionados, permiten generar gráficas estadísticas por semana de la concentración viral y su prevalencia en las áreas de estudio.

**Figura 2:** Centro de Control y Monitoreo – CCM



The image shows a screenshot of the SMART website. At the top left is the SMART logo, which consists of a blue gear-like icon and the word "SMART" in bold. To the right of the logo is a navigation menu with the following items: INICIO, NOTICIAS, APORTES, PREGUNTAS, GALERIA, CONTACTO, and M. Below the navigation menu is a main content area with a white background. On the left side of this area, there is a headline in bold blue text: "EPIDEMIOLOGÍA BASADA EN AGUAS RESIDUALES". Below the headline is a paragraph of text in a smaller font, which reads: "Por primera vez en medio, se ha propiciado una sinergia entre laboratorios de biología molecular, calidad fisicoquímica y bacteriológica de aguas residuales. Los resultados son la base para un análisis probabilístico de datos con el que SMART pretende "adelantarse al virus". Ingeniería biotecnológica, epidemiología, ingeniería sanitaria y estadística, son la base de esta ciencia del futuro, para generar resiliencia en nuestra sociedad." To the right of the text is a photograph showing two people in a laboratory setting. They are wearing white lab coats and blue surgical masks. One person is holding a yellow liquid in a beaker, and the other is holding a test tube. The background is slightly blurred, showing laboratory equipment and other people.



Fuente: Elaboración propia

### 6.2.1 Aplicación móvil digital

Se desarrolló una aplicación móvil para generar trazabilidad en la colecta de las muestras de parámetros in situ, básicos, complementarios y moleculares con vinculación directa al Centro de Control y Monitoreo (CCM), de forma de dar seguimiento en tiempo real de las muestras de agua residual. Dentro de la aplicación móvil todas las instituciones colaboradoras están autorizadas a subir datos, leer resultados y estar informados de todo el proceso operativo dentro del proyecto en sus diferentes fases.

### 6.3 Fase operativa

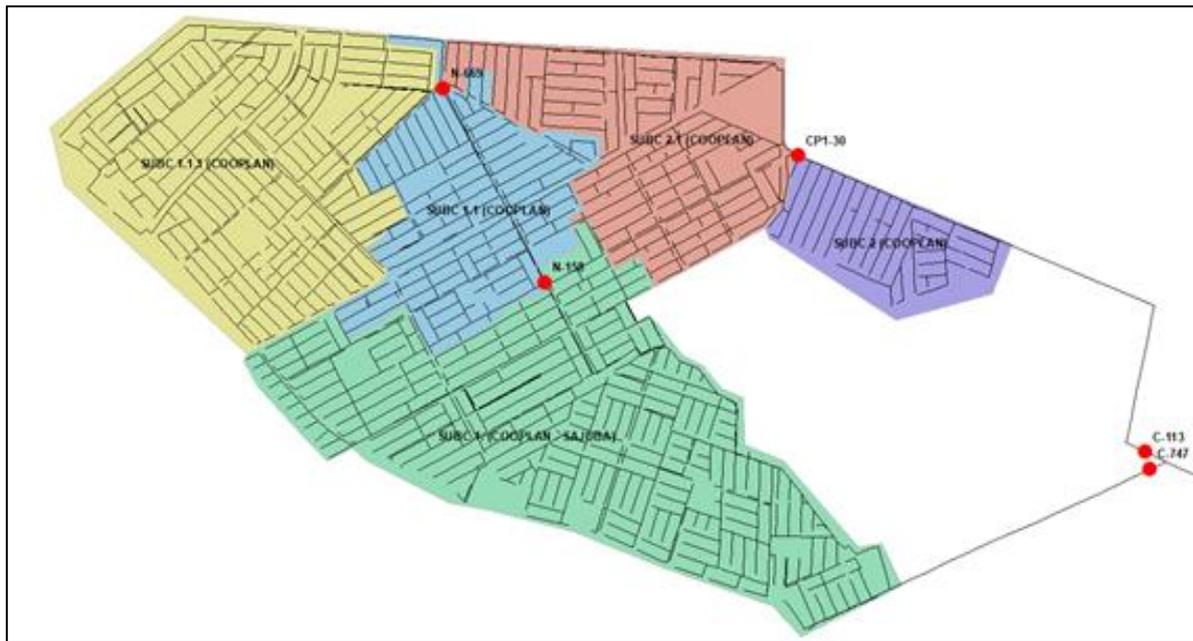
#### 6.3.1 Puntos, frecuencia, codificado de muestras

Con base a los resultados del modelamiento hidráulico de la red de Alcantarillado Sanitario del área de servicio de la Cooperativa de Servicios Públicos de Agua Potable y Alcantarillado Plan Tres – COOPLAN R.L., se establecieron 5 puntos representativos de toma de muestras de agua residual ubicados en cámaras de inspección codificadas de la siguiente manera:

Tabla 7: Puntos de toma de muestras

<b>Punto 1</b>	N669
<b>Punto 2</b>	N158
<b>Punto 3</b>	CP130
<b>Punto 4</b>	CP113
<b>Punto 5</b>	C747

**Figura 3:** Puntos para toma de muestra dentro del Sistema de Alcantarillado Sanitario.



**Fuente:** Bellido (2021).

La toma de muestras se ha efectuado con una frecuencia semanal (1 día a la semana), por 6 meses, empleándose como indicador fecal el parámetro Coliformes Termotolerantes y se ha establecido la relación de carga contaminante, a través de la multiplicación de las concentraciones de Coliformes Termotolerantes por el caudal instantáneo de descarga en ese mismo momento. Este procedimiento se ha efectuado en 15 muestras simples (1 cada hora) por un periodo de 15 horas continuas en los dos puntos representativos identificados en la red (Cámaras CP113 y C747), con esta caracterización hidráulica, se identificó el horario óptimo de toma de muestras de agua residual, entre horas 09:00 a 11:00 am.

Cada envase de muestra fue etiquetado con los siguientes datos: fecha, hora de muestreo, código de la cámara de inspección, como se exhibe en la Tabla 7. Asimismo, se siguieron los protocolos de muestreo, cadena de custodia y levantamiento de datos de campo referenciales (coordenadas, condiciones climáticas y responsable de toma de muestra).

**Tabla 8:** Codificación de muestras colectadas



<b>Código cámara</b>	<b>N669</b>
<b>Fecha</b>	<b>29/05/22</b>
<b>Hora</b>	<b>09:00</b>
<b>Código</b>	<b>N6692905220900</b>

**Fuente:** Elaboración propia

### 6.3.2 Materiales, insumos y equipos empleados en la fase operativa

**Tabla 9:** Materiales, insumos, equipos empleados en la fase operativa

<b>Toma de muestras</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Jarra de plástico de 2L</li> <li>▪ Envases esterilizados (1000 ml)</li> <li>▪ Etiquetas, rotulador</li> <li>▪ Conservadora (25 litros)</li> <li>▪ Multiparamétrico</li> <li>▪ Agua destilada</li> <li>▪ Flexómetro</li> </ul>
<b>Concentración viral</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Tubos Falcon (50 ml)</li> <li>▪ Agua destilada</li> <li>▪ Baño maría</li> <li>▪ Macro centrifuga</li> <li>▪ Agitador de tubos Vortex</li> </ul>
<b>Extracción del ácido nucleico (RNA) viral</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Micropipetas 5 a 1000 µl.</li> <li>▪ Tips con filtro de 50, 200 y 1000 µl.</li> <li>▪ Kit de extracción de RNA - IBI SCIENTIFIC.</li> <li>▪ Tubos de 1,5ml.</li> <li>▪ Rotulador.</li> <li>▪ Agitador de tubos Vórtex.</li> <li>▪ Microcentrífuga.</li> <li>▪ Gabinete de Bioseguridad Clase II</li> </ul>
<b>Pre-PCR</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Control negativo (agua libre de RNAsas)</li> <li>▪ Tips de 10 µl desechables con filtros.</li> <li>▪ Micropipeta (1-10 µL).</li> <li>▪ Microtubos de Pre-PCR (50 µL).</li> <li>▪ Máster Mix para los genes RdRp y E (Logix Smart (COVID-K-002)</li> <li>▪ Cabinas con luz UV para PCR</li> </ul>
<b>RT-qPCR (Genes RdRp y E)</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Control positivo</li> <li>▪ Ciclador magnético y computadora</li> <li>▪ Cabinas con luz UV para PCR</li> <li>▪ Muestras de RNA</li> <li>▪ Mix específicas para SARS CoV-2 Logix Smart SARS-CoV-2 (COVID-K-002). Test Kit CO-DIAGNOSTICS, INC.</li> </ul>

<p><b>RT-qPCR (Genes N1 y N2)</b></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Cabinas con luz UV para PCR</li> <li>▪ FIREScript RT cDNA Synthesis KIT 5x HOT FIREPol® Evagreen® Qpcr</li> <li>▪ Combi-Spin, Mini centrífuga/agitador vórtex</li> <li>▪ Applied Biosystems™ Termociclador Veriti™</li> <li>▪ StepOnePlus™ Real-Time PCR System</li> </ul>
<p><b>RT-LAMP</b></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Micropipetas de (1-10 µL; 2-20 µL; 20-200 µL; 100-1000 µL)</li> <li>▪ Tips con filtro (10 µL; 20 µL; 200 µL; 1000 µL)</li> <li>▪ Microplaca</li> <li>▪ Rotulador</li> <li>▪ Incubador IF110 Memmert Single DISPLAY</li> <li>▪ Epoch Microplate Spectrophotometer – BioTek</li> <li>▪ Buffer de LAMP</li> <li>▪ Las absorbancias 430nm (Amarillo) y 560nm (Rojo) en el lector de microplacas (Epoch Microplate Spectrophotometer -BioTek)</li> <li>▪ Primer MIX de LAMP.</li> </ul>
<p><b>Bioseguridad - EPP</b></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Alcohol al 70%</li> <li>▪ Guantes nitrilo</li> <li>▪ Barbijos KN-95</li> <li>▪ Mandil de laboratorio</li> <li>▪ Mandil de laboratorio descartables</li> <li>▪ Máscara de protección facial</li> <li>▪ Cofia</li> <li>▪ Protector de zapatos</li> </ul>

#### **6.4 Análisis de parámetros in situ, básico y complementarios**

##### **6.4.1 Parámetros in situ**

Determinación del tirante hidráulico, efectuando la medición de la distancia vertical del punto más bajo de la sección de la cámara (confluencia de varios colectores) a la superficie libre del agua a través de una varilla metálica introducida de forma vertical, donde se procede a medir con un flexo (cm) la parte humedecida con el agua residual.

##### **6.4.2 Parámetros básicos**

A través del equipo multiparamétrico HI 98494, se mide diferentes parámetros básicos como ser: pH, Conductividad Eléctrica, Oxígeno Disuelto (OD), Temperatura y Sólidos Disueltos Totales (TDS).

##### **6.4.3 Parámetros fisicoquímicos y microbiológicos**

Los parámetros DBO5, DQO y Coliformes Termotolerantes fueron analizados por un laboratorio subcontratado, legalmente establecido.

**Figura 4:** Toma de muestra de agua residual



**A:** Medición de tirante **B:** Parámetros in situ **C:** Etiquetado **D:** Toma de muestra para análisis molecular **E:** Toma de muestra para análisis microbiológicos y fisicoquímicos **F:** Conservación y transporte de la muestra.

## 6.5 Análisis molecular



**Tabla 10:** Fase operativa - Etapas I, II y III

**Etapa I - Concentración de las muestras:** Ver descripción de procedimientos empleados en la tabla 11, 12 y 13.

**Etapa II - Extracción del ácido nucleico (RNA) viral:** Una vez obtenido el pellet de cada punto de muestreo se procede a la extracción del RNA viral, a través del kit IBI-SCIENTIFIC. En caso de no procesar las muestras el mismo día, se debe conservar 200 mg de muestra sólida a - 20 °C, para poder efectuar la extracción del RNA viral.

Condiciones del reactivo antes de trabajar:

Antes de usar verificar si se añadió etanol absoluto al AD Buffer.

Antes de usar verificar si se añadió etanol absoluto al Wash Buffer.

Mezclar todos los reactivos de forma invertida 3 a 5 veces antes de usar.

**Etapa III - Procedimiento de cuantificación viral:** Para la detección molecular del SARS CoV-2 se efectuaron dos técnicas: RT-qPCR y RT-LAMP, las mismas que fueron realizadas en los laboratorios especializados como BIOSCIENCE SRL. en la ciudad de Santa Cruz (amplificación de los genes RdRp y E) y en la Universidad Mayor de San Andrés-Facultad Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas en la ciudad de La Paz (amplificación de los genes N1 y N2).

Condiciones del reactivo antes de trabajar:

Se debe trabajar con las alícuotas del Mix, el mismo se debe usar sobre hielo.

El control negativo y el control positivo se deben trabajar en cabinas de flujo laminar separadas.

**Nota:** Los procedimientos a detalle empleados en cada fase se encuentran descritas en las tablas subsiguientes.

## 6.6 Procedimientos Empleados

Tabla 11: Etapa I

ETAPA I	CONCENTRACION VIRAL			
<b>Paso I:</b> Pasteurización	Llevar las botellas a baño maría durante 90 min a una temperatura de 60 °C.			
<b>Paso II:</b> Concentración de sedimento	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Distribuir la muestra de la botella una vez pasteurizada en 8 tubos de centrifugación de 50 ml y etiquetarlos con los códigos de las botellas.</li> <li>2. Centrifugar los 8 tubos a 5000 revoluciones por minuto por 5 minutos.</li> <li>3. Descartar el sobrenadante.</li> <li>4. Agregar la muestra nuevamente, repetir el procedimiento cuatro veces más, hasta tener una cantidad considerable de sedimento aproximadamente 2 a 5 gr., (En la prueba piloto se observó que el sedimento de 1 litro de muestra de agua residual es suficiente).</li> <li>5. Finalmente, todos los pellets que correspondan al mismo punto de muestreo se deben agrupar en un solo tubo Falcon.</li> <li>6. La muestra está lista para su procesamiento, en caso de no usarla se debe congelar a -20 °C bien etiquetada y en un congelador de muestras biológicas potencialmente contaminadas y que tenga la señal de riesgo biológico.</li> </ol>			

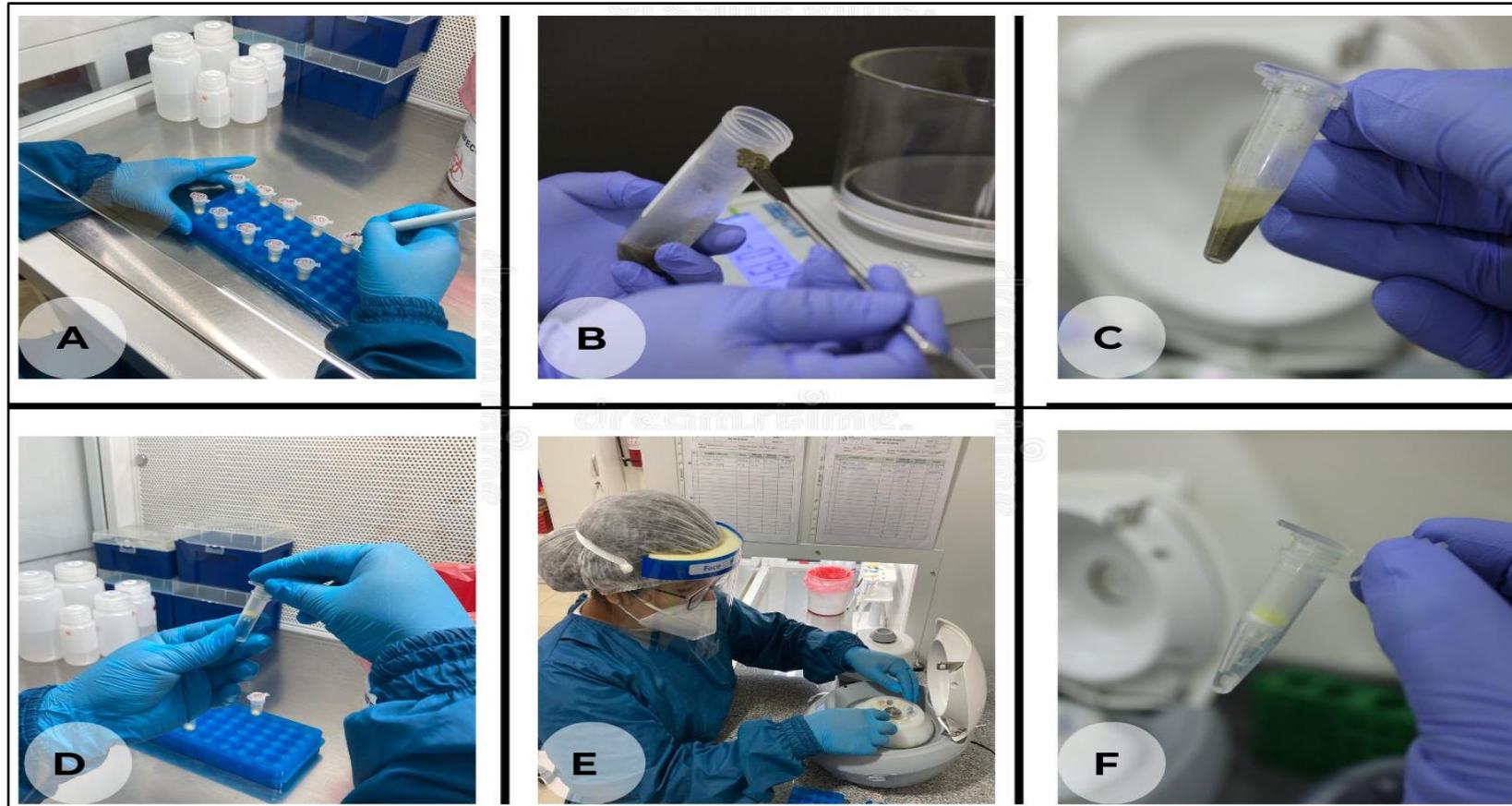
**A:** Baño maría **B:** Fraccionamiento de la muestra **C:** Centrifugación  
**D:** Unión de las muestras en un tubo **E:** Vortex **F:** Obtención del sólido

**Tabla 12: Etapa II**

<b>ETAPA II</b>	<b>EXTRACCIÓN DEL ÁCIDO NUCLEICO (RNA) VIRAL</b>
<b>Paso I:</b> Lisis	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Transfiera 200 mg de muestra a un tubo de centrifuga de 1,5 ml, con la ayuda de una espátula.</li> <li>2. Agregar 200 µl de tampón fosfato salino o buffer fosfato salino (PBS) para evitar que el sólido pueda tapar las columnas durante la extracción de RNA.</li> <li>3. Centrifugar a 5000 rpm durante 1 min</li> <li>4. Transferir 200 µl de la muestra (sobrenadante) a otro tubo de 1,5 ml.</li> <li>5. Agregue 400 µl de VB lisis Buffer a la muestra y luego mezcle con el agitador de tubos Vortex.</li> <li>6. Incubar a temperatura ambiente durante 10 minutos.</li> </ol>
<b>Paso II:</b> Precipitación de los ácidos nucleicos	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Agregue 450 µl de tampón AD Buffer (asegúrese de que se haya agregado etanol) al lisado de muestra.</li> <li>2. Agite vigorosamente el tubo en el Vortex y realice un spin.</li> <li>3. Coloque una columna en un tubo colector de 2 ml.</li> <li>4. Transfiera 600 µl de la mezcla de lisado a la columna.</li> <li>5. Centrifugar a 14000 rpm durante 1 minuto.</li> <li>6. Desechar el contenido líquido y vuelva a colocar la columna VB en el tubo colector de 2 ml.</li> <li>7. Transfiera la mezcla restante a la Columna VB.</li> <li>8. Centrifugar a 14000 rpm durante 1 minuto.</li> <li>9. Deseche el tubo colector de 2 ml que contiene el sobrenadante.</li> <li>10. Transfiera la columna VB a un nuevo tubo colector de 2 ml.</li> </ol>
<b>Paso III:</b> Lavados	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Agregue 400 µl de tampón W1 a la columna y luego centrifugar a 14000 rpm durante 30 segundos.</li> <li>2. Desechar el contenido líquido y vuelva a colocar la columna VB en el tubo de recolector de 2 ml.</li> <li>3. Agregue 600 µl de Wash Buffer a la columna.</li> <li>4. Centrifugar a 14000 rpm durante 30 segundos.</li> <li>5. Desechar el contenido líquido y vuelva a colocar la columna en el tubo colector de 2 ml.</li> <li>6. Centrifugar a 14000 rpm durante 3 minutos para secar la matriz de la columna.</li> </ol>
<b>Paso IV:</b> Elución del RNA viral	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Coloque la columna VB seca en un tubo limpio de 1,5 ml.</li> <li>2. Agregue 50 µl de agua libre de RNAsa al centro de la matriz de la columna.</li> <li>3. Deje reposar durante al menos 3 minutos para garantizar que la matriz absorba el agua libre de RNAsa.</li> <li>4. Centrifugar a 14000 rpm durante 1 minuto para eluir el ácido nucleico purificado.</li> </ol>

5. Obtención de 50  $\mu$ l de RNA viral.

Figura 5: Extracción de RNA viral



**A:** Etiquetar tubos **B:** Sustraer la muestra sólida **C:** PBS y muestra sólida **D:** Uso de columnas de sílice **E:** Centrifugación **F:** Obtención del RNA viral.

**Tabla 13:** Etapa III

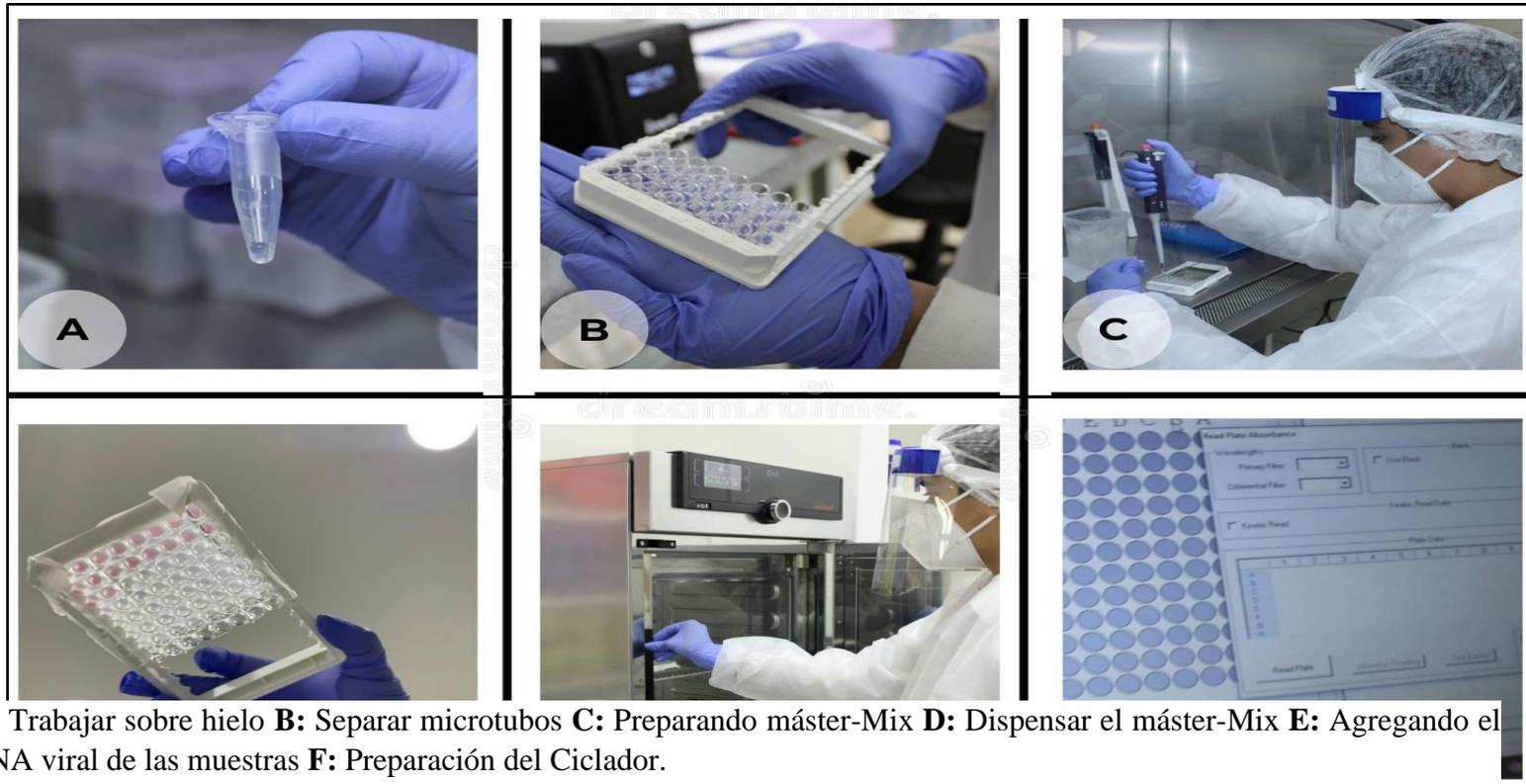
<b>ETAPA III</b>	<b>CUANTIFICACION VIRAL</b>
<b>Paso I:</b> Pre-PCR	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. El efectuar el procedimiento se debe realizar dentro de la cabina de flujo laminar nivel II.</li> <li>2. Descongelar el Mix de PCR y dispensar 5ul a cada microtubo de acuerdo con la cantidad de muestras, incluidos control positivo y control negativo</li> <li>3. Posteriormente se agrega 5 µl de agua libre de RNAsa como control negativo, se cierra el microtubo y se procede al etiquetado.</li> </ol>
<b>Paso II:</b> RT-qPCR (genes RdRp- E)	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Trasladar los microtubos que contienen el Mix a la cabina del área de PCR, en la cual se encuentran las muestras de RNA viral y el control positivo.</li> <li>2. Agregar en orden 5 µl de muestra (extracto de RNA viral) a cada microtubo, cerrar y etiquetar.</li> <li>3. Una vez cerrados los microtubos que contienen el Mix y las muestras, se transfiere el control positivo con 5 µl, se cierra y etiqueta.</li> <li>4. Trasladar los microtubos al Ciclador magnético (previamente se debe abrir el programa y registrar los códigos de las muestras), introducir los microtubos al Ciclador magnético siguiendo el mismo orden registrado en el programa del equipo, realizar una verificación de los códigos de las muestras y controles antes de cerrar el Ciclador</li> <li>5. Una vez realizada la verificación, se procede a dar inicio al programa de amplificación</li> <li>6. Proceder a la lectura e interpretación de los resultados.</li> </ol>
<b>Paso III:</b> RT-qPCR (Genes N1 y N2)	<p><b>Transcripción inversa del RNA</b></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Preparar en la cabina de PCR el material necesario y el kit a utilizar.</li> <li>2. En microtubos de 200 µl añadir 15 µl del mastermix de la Reverso transcripción (FIREScript RT cDNA Synthesis KIT).</li> <li>3. Añadir en orden 5 µl de la muestra (extracto de RNA viral) a cada microtubo, cerrar y etiquetar.</li> <li>4. Trasladar los microtubos al termociclador (Applied Biosystems™ Termociclador Veriti™) (45 minutos: 10 minutos a 25°C, 30 minutos a 60°C, 5 minutos a 80°C)</li> <li>5. Retirar los microtubos para el siguiente paso.</li> </ol> <p><b>Reacción en cadena de la polimerasa</b></p>

	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Preparar cabina de PCR el material necesario y el kit a utilizar</li> <li>2. En microtubos de PCR añadir 15 µl de mastermix de la PCR en tiempo real (5x HOT FIREPol® Evagreen® PCR)</li> <li>3. Agregar 5 µl de muestra (DNA copy) a cada microtubo de PCR.</li> <li>4. En microtubos de PCR aparte de las muestras con 15 µl de mastermix agregar 5 µl del control Positivo y del control negativo (agua libre de nucleasas) y cerrar todos los tubos.</li> <li>5. Preparar la reacción tanto para el gen N como para el gen P.</li> <li>6. Trasladar los microtubos de PCR al termociclador en tiempo real (StepOnePlus™ Real-Time PCR System) configurar el equipo según el protocolo del kit (15 minutos a 95 °C, 45 ciclos de 10 segundos a 90°C y 30 segundos a 58°C)</li> <li>7. Proceder a la lectura e interpretación de los resultados.</li> </ol>
<b>Paso IV:</b> RT-LAMP	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Realizar una lectura de microplaca sin reactivos e irradiar la cabina con luz UV para evitar interferencias y una degradación del RNA, conservar la microplaca siempre tapada para evitar interferencias de Ph (figura 13).</li> <li>2. Identificar los pocillos para cada muestra</li> <li>3. Agregar 12,5µl buffer de LAMP colorimétrico a cada pocillo</li> <li>4. Agregar 2 µl de un preparado de Primers (cebador F3 2uM, cebador B3 2uM, FIP 16uM, BIP 16uM, LoopF 8uM y LoopB 8uM)</li> <li>5. Agregar 1µl de muestra de RNA</li> <li>6. Enrasar hasta 20µl con agua libre de nucleasas</li> <li>7. Incubar la Microplaca a 60°C por 30 minutos en la incubadora (Applied Biosystems™ Termociclador Veriti™)</li> <li>8. Lectura de resultados.</li> </ol>

Figura 1: RT-qPCR (detección de genes RdRp, E, N1 y N2)



**Figura 2:** RT-LAMP (detección de genes RdRp, E, N1 y N2)



**A:** RNA viral para procesamiento **B:** Identificación de pocillos **C:** Agregando reactivos **D:** Incubación de la microplaca  
**E:** Reactivos y muestras **F:** Lectura de resultados.

## 6.7 Procesamiento y análisis de los resultados

Los datos obtenidos fueron procesados de forma semanal, introduciéndolos al Centro de Control y Monitoreo (CCM), resultados del análisis de los parámetros in situ y básicos como ser: Tirante Hidráulico (cm), temperatura, Potencial de Hidrogeno pH, Conductividad Eléctrica, Oxígeno Disuelto, Sólidos Disueltos Totales - TDS (ppm). Parámetros físicos químicos y microbiológicos como ser: Demanda Química de Oxígeno DQO (mg/l), Demanda Bioquímica DBO5, Coliformes Termotolerantes (NMP/100ml), y el análisis molecular mediante la técnica de RT-qPCR Y RT-LAMP efectuada para diversos genes (RdRp, E, N1 y N2) efectuado en los departamentos de Santa Cruz y La Paz, a través de los especialistas en Biología Molecular como contraparte del Proyecto.

### Esquema 1: Areas donde se efectuó el análisis molecular



## 7 VALIDACION DE PROCEDIMIENTOS Y METODOLOGIAS EMPLEADAS

### 7.1 Sitio de estudio

Descripción y delimitación del área de estudio e intervención resultado de la modelación hidráulica de los colectores de aguas residuales que facultaron la identificación de los puntos de toma de muestra, los cuales describen su representatividad, accesibilidad y población servida.

Para el establecimiento de la frecuencia de toma de muestras y metodología de cuantificación de la carga viral de SARS CoV-2 se usó como marcadores moleculares los genes N1, N2, E y RdRp, mediante dos técnicas RT-qPCR y RT-LAMP. Adicionalmente se analizaron parámetros fisicoquímicos y biológicos complementarios a ser de forma de correlacionar el contenido de materia fecal con la carga viral, en nuestro caso fueron empleados como ser TSD, DQO, DBO5 y NMP de Coliformes Termotolerantes (González et al., 2020; Haramoto et al., 2020; Kitajima, 2020).

## 7.2 Construcción de la base de datos

A partir de los datos experimentales y reportes epidemiológicos se construyeron dos bases de datos, la primera describe la carga viral de SARS-CoV-2 en cada punto de muestreo, levantada de forma semanal por el periodo de intervención con el proyecto piloto (Saguti et al., 2021; Wu, Xiao, Zhang, Gu, et al., 2020; Wu, Xiao, et al., 2020).

La segunda base de datos refleja el comportamiento epidemiológico de la pandemia de SARS-CoV-2 durante el mismo periodo de tiempo, considerando el número de casos positivos, personas hospitalizadas y fallecidos por la enfermedad en el área de estudio (Bar-Or et al., 2020; Bogler et al., 2020).

Los datos de la carga viral fueron corregidos respecto a la concentración de heces en aguas residuales estimada con los parámetros fisicoquímicos y biológicos descritos previamente (Peccia et al., 2020; Polo et al., 2020).

## 7.3 Balance de masas

A partir de la primera Base de datos se estimó el número real de personas infectadas en el área de estudio mediante un balance de masas de acuerdo con la siguiente formula:

$$\text{Personas infectadas} = \frac{\left( \frac{\text{Copias de RNA}}{\text{litros de agua residual}} \right) * \left( \frac{\text{litros de agua residual}}{\text{por día}} \right)}{\left( \frac{\text{gramos de heces}}{\text{persona - día}} \right) * \left( \frac{\text{Copias de RNA}}{\text{por gramo de heces}} \right)}$$

Este balance de masas incorpora la incertidumbre de cada variable considerada mediante una simulación de Monte Carlo (F. Ahmed et al., 2021; W. Ahmed et al., 2020). Para esto toma el número de copias como una estimación puntual en cada cámara de inspección y como el máximo y mínimo respecto a una distribución uniforme cuando se considera toda el área de estudio. El flujo diario de aguas residuales de la población estimada se estableció en 100 L/persona/día, como lo descrito para países en vías de desarrollo (Tschärke et al., 2019).

Los gramos de heces por persona fueron modelados respecto al log10 con una distribución normal de media de 2.386 y desviación estándar de 2.115 (Brown et al., 1996; Rose, et al., 2015). Finalmente, el número de copias de RNA por gramo de heces fue modelado con una distribución log-uniforme de 2.56 a 7.67 (Medema et al., 2020). Cada estimación se corrió 10000 veces, obteniéndose la mediada de personas infectadas por día en cada localidad y respecto a todos los marcadores moleculares empleados en el estudio (D'Aoust et al., 2021; Fongaro et al., 2020).

## 7.4 Análisis estadística de los datos obtenidos

### 7.4.1 Correlación

Se estimó la significancia estadística de la correlación existente entre la prevalencia determinada mediante el balance de masas y los descriptores epidemiológicos de la segunda base de datos (W. Ahmed et al., 2020; Medema, Heijnen, et al., 2020). Los p -valor fueron corregidos usando el método Benjamini Hochberg, para una tasa de falso descubrimiento de 0.1 (Chavarria et al., 2020; Wu, Xiao et al., 2020).

La correlación fue empleada para comparar los datos a nivel de marcadores moleculares, en cada área de la zona de estudio y respecto a la utilidad de los factores de corrección.

Adicionalmente se realizaron correlaciones simples entre los resultados obtenidos en las dos metodologías empleadas RT-qPCR y RT-LAMP (Chavarria-Miró et al., 2020; D'Aoust et al., 2021).

#### **7.4.2 Modelo de regresión**

Para determinar el tiempo de latencia entre la detección de la señal en aguas residuales respecto a la señal obtenida por los descriptores epidemiológicos se construyó un modelo de regresión de series temporales, asumiendo una distribución de Poisson para la carga viral de SARS-CoV-2 en aguas residuales, e incluyendo la incertidumbre asociada tomar en cuenta la sobre dispersión y la autocorrelación entre variables explicativas (Li et al., 2021; Peccia et al., 2020; Peccia et al., 2020; Xiao et al., 2021).

Este análisis fue llevado a cabo mediante una aproximación Bayesiana dada las múltiples fuentes de incertidumbre y los factores asociados a la trayectoria de la carga viral que no pueden ser cuantificados directamente, todos los análisis y gráficos fueron realizados en el entorno de programación R (Peccia et al., 2020; R Development Core Team, 2019).

## **8 CAPACITACIONES E INTERCAMBIO DE EXPERIENCIAS**

### **8.1 Intercambio presencial de experiencias entre Costa Rica y Bolivia**

Se efectuaron reuniones virtuales y presenciales entre equipo técnico - científico de Costa Rica (Laboratorio Nacional de Aguas del Instituto Costarricense de Acueductos y Alcantarillado - AYA) y Bolivia (Especialistas en Biología Molecular de los departamentos de Santa Cruz y La Paz), de forma de conocer la metodología de detección y cuantificación de SARS-CoV-2 implementada en Costa Rica bajo la técnica de RT-qPCR. Lo cual facultó y fortaleció al establecimiento de una metodología estandarizada que pueda ser aplicada en el contexto Nacional.

De la misma forma, Bolivia a través de especialistas en Bioquímica Molecular de la Universidad Mayor de San Andrés capacitó de forma presencial a los representantes de Laboratorio Nacional de Aguas del Instituto Costarricense de Acueductos y Alcantarillado - AYA Costa Rica (julio 2022), en la implementación de la técnica de RT-LAMP para la detección de SARS-CoV-2 en aguas residuales.

### **8.2 Entrenamientos virtuales**

En fecha 09 y 10 de diciembre del 2021, la Dra. Teresa Álvarez jefe del Área Bioquímica Molecular - Universidad Mayor de San Andrés – UMSA, presentó la metodología empleada y resultados obtenidos en su investigación “Detección de SARS-CoV-2 en aguas superficiales de la ciudad de La Paz”.

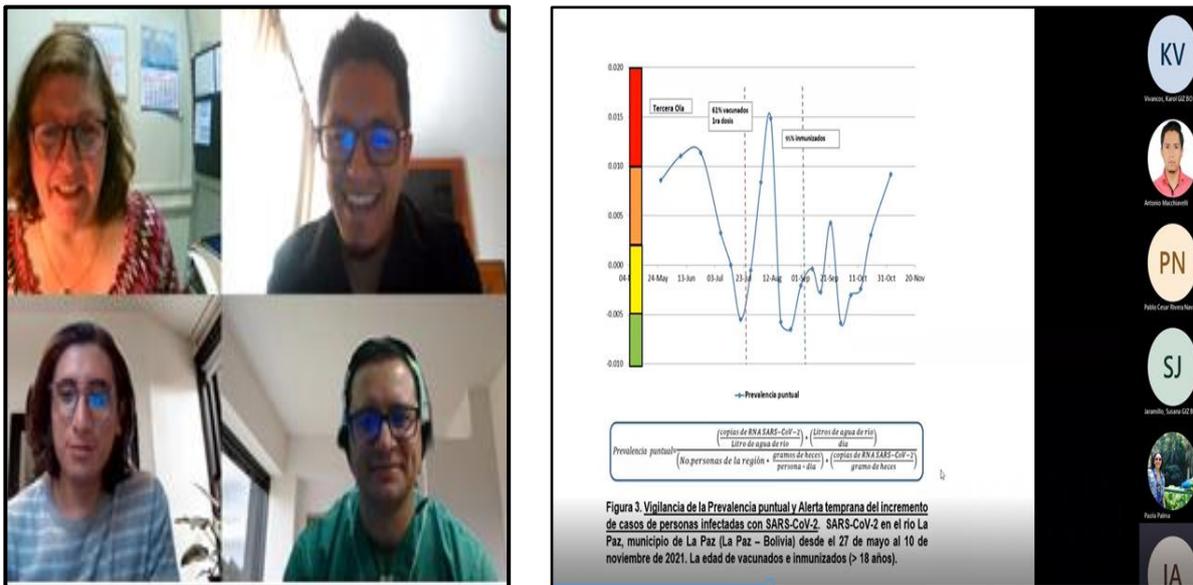
En la misma fecha, representante del Laboratorio Nacional de Aguas del Instituto Costarricense de Acueductos y Alcantarillado - AYA, presentó la metodología análisis y cuantificación de SARS-CoV-2 en aguas residuales implementado en Costa Rica, detallando su aplicabilidad y funcionalidad para los tomadores de decisión a nivel gubernamental.

Resultado de este intercambio de experiencias y conocimiento entre los especialistas, se valoraron las condiciones y alcance de las metodologías aplicadas en ambos países (Ver Tabla 13), reforzando sus capacidades y conocimientos al respecto, coadyuvando al desarrollo de la fase operativa del Proyecto.

**Tabla 14:** Experiencias obtenidas en Bolivia y Costa Rica

Costa Rica	Bolivia
Proyecto de detección de SARS-CoV-2 implementado para aguas residuales	Proyecto de detección de SARS-CoV-2 implementado para superficiales con descarga de aguas residuales sanitarias.
Método de concentración: Filtración de membrana de ésteres de nitrocelulosa de 0,45 um, con MgCl <sub>2</sub> .	Método de concentración: Inactivación del virus a 60 °C y sedimentación por centrifugación directa
Extracción de RNA mediante el kit RNeasy PowerWater.	Extracción de RNA mediante el kit IBI-SCIENTIFIC
Técnicas de cuantificación utilizadas: RT-PCR.	Técnicas de cuantificación utilizadas: RT-qPCR y RT-LAMP.
Genes detectados: N1, N2 y N3.	Genes detectados N1 y N2

**Imagen 1 y 2:** Talleres de intercambio de experiencia



### 8.3 Capacitaciones presenciales a nivel local

Especialistas en Bioquímica Molecular de la Universidad Mayor de San Andrés efectuaron un taller presencial en el departamento de Santa Cruz del 13 al 17 de diciembre del 2021, de forma de establecer un espacio de intercambio de conocimiento y experiencias que faculto definir la metodología a implementarse de detección de SARS-CoV-2 en aguas residuales sanitarias, a través de las técnicas de RT qPCR y RT- LAMP, como herramienta metodológica epidemiológica prioritaria para la ejecución del Sistema de Alerta Temprana.

**Imagen 3, 4 y 5:** Capacitaciones en Santa Cruz



Inspección de las cámaras de Alcantarillado Sanitario



Capacitación procedimiento de toma de muestra



Análisis de datos obtenidos en el espectrofotómetro

La segunda capacitación e intercambio de conocimientos entre los distintos actores se realizó el 17 y 18 de junio del 2022, con la finalidad de valorar los resultados obtenidos a medio término de la fase ejecutiva del proyecto, valorar las capacidades obtenidas desde la capacitación inicial, efectuar la compatibilización y estandarización de metodologías empleadas para el análisis molecular a través de las técnicas RT-qPCR y RT-LAMP implementados en el departamento de La Paz y Santa Cruz.

Las instituciones participantes en ambos eventos fueron las siguientes:

- Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas de la Universidad Mayor de San Andrés.
- Cooperativa de Servicio de Agua Potable y Alcantarillado Sanitario Plan Tres Mil COOPLAN R.L.
- LABORATORIO BIOSCIENCIE - Laboratorio de Diagnóstico Molecular e Investigación.
- Universidad Católica Boliviana UCB – Carrera de Ingeniería en Biotecnología.
- Personal Técnico Cooperación Alemana GIZ – CoTriSan.

## 9 DEBILIDADES EN EL DESARROLLO DEL PROYECTO

El Empleo de diferentes kits para análisis en RT-qPCR conllevó a obtener resultados diferenciados en ambos departamentos (Santa Cruz y La Paz), procediéndose a evaluar la sensibilidad del termociclador empleado en el Laboratorio BIOSCIENCE SRL de Santa Cruz para determinar la diferencia de resultados y emplear el mismo Kit InVitrogen para la detección del SARS-CoV-2 en ambos departamentos, de esta forma se uniformizó los datos y estandarizó la metodología empleada, resolviendo la problemática desatada al inicio de la fase operativa. Los Kits empleados en función a la capacidad operativa de cada laboratorio, fueron los siguientes:

**TestKit CO-DIAGNOSTICS:** Empleado los primeros meses del Proyecto en el departamento de Santa Cruz. Sin embargo, este no era muy sensible al momento de detectar el umbral de los ciclos (CT) de otros genes de interés N1 y N2.

**InVitrogen:** El Kit de InVitrogen empleado en el departamento de La Paz, respaldó los resultados positivos obtenidos en la Fase operativa del proyecto, a comparación con los casos clínicos de la 5ta Ola (incremento relevante de casos positivos por COVID-19) siendo más sensible a la hora de detectar el umbral de ciclo (CT). Lo que condujo a establecerse de forma oficial su empleo hasta finalizar la fase operativa del Proyecto en ambos departamentos.

## 10 CONCLUSIONES

El Proyecto facultó el diseño e implementación de un Sistema de Alerta Temprana para detección de SARS-COV-2 en Aguas Residuales, con procedimientos y metodologías estandarizadas por especialistas en el rubro, implementado por primera vez en Bolivia.

Costa Rica a través de los representantes del Laboratorio Nacional de Aguas del Instituto Costarricense de Acueductos y Alcantarillado - AYA, con base a su experiencia y en el marco de la Cooperación triangular fortaleció a Bolivia en el establecimiento y diseño de una metodología de detección de SARS-CoV-2 en aguas residuales.

A través del Centro de Control y Monitoreo (CCM) se logró predecir el incremento sustancial de casos positivos de COVID-19, por la circulación del virus de forma exponencial en las aguas residuales, correlativos a los datos clínicos de quinta ola de la pandemia. Sin embargo, no se logró hacer incidencia en las autoridades de Salud de los distintos Niveles de Estado, para el empleo de los datos obtenidos.

Se ejecutó y dio cumplimiento al 100% los indicadores de la planificación general del Proyecto, teniendo únicamente como punto débil el involucramiento del sector Salud, pese a los esfuerzos de invitación y socialización de actuados efectuados.

La conformación de un equipo multidisciplinario conducido por especialistas en Biología Molecular permitió implementar y dar cumplimiento a cada uno de los objetivos propuestos, macroprocesos, indicadores y acciones especificadas programadas dentro de la CoTriSan – línea de acción SAT SARS-CoV-2. La predisposición de uso de ambientes, equipos y personal operativo de parte de la EPSA COOPLAN, Laboratorio de Diagnóstico e Investigación BIOSCIENCE SRL, UMSA - Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas, UCB – Carrera de Biotecnología fueron aspectos fundamentales para concluir de forma satisfactoria cada fase del Proyecto.

## 11 REFERENCIA BIBLIOGRAFICA

Se detalla toda la referencia Bibliográfica consultada y empleada en el desarrollo de las distintas fases del proyecto.

Arandia-Guzmán, Jaime, & Antezana-Llaveta, Gabriela. (2020). SARS-CoV-2: estructura, replicación y mecanismos fisiopatológicos relacionados con COVID-19. *Gaceta Médica Boliviana*, 43(2), 170-178. Recuperado en 26 de mayo de 2022, de [http://www.scielo.org.bo/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S101229662020000200009&lng=es&tlng=es](http://www.scielo.org.bo/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S101229662020000200009&lng=es&tlng=es).

Avellaneda-Martínez, S., Barrios-Díez, E., Rodríguez-Alcázar, F. J., Redondo-Pérez, N., Río-García, Martín-Gil, B., ... Fernández-Castro, M. (2020). Sistema de Alerta Temprana Covid-19 en la historia electrónica de pacientes hospitalizados. *Ene*, 14(3), [https://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1988-348X2020000300012](https://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1988-348X2020000300012).

Bar-Or, I., Yaniv, K., Shagan, M., Ozer, E., Erster, O., Mendelson, E., . . . Kushmaro, A. (2020). Regressing SARS-CoV-2 sewage measurements onto COVID-19 burden in the population: a proof-of-concept for quantitative environmental surveillance.

Bratanich A. (2015). MERS-CoV: transmisión y el papel de nuevas especies hospederas. *Revista Argentina de microbiología*, 47 (4), 279–281. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2015.11.001>.

Brown, D. M., Butler, D., Orman, N. R., & Davies, J. W. (1996). Gross solids transport in small diameter sewers. *Water Science and Technology*, 33(9), 25-30. doi:10.2166/wst.1996.0168

Bogler, A., Packman, A., Furman, A., Gross, A., Kushmaro, A., Ronen, A., . . . Bar-Zeev, E. (2020). Rethinking wastewater risks and monitoring in light of the COVID-19 pandemic. *Nature sustainability*, 3(12), 981-990. doi:10.1038/s41893-020-00605-2

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>

Chavarria-Miró, G., Anfruns-Estrada, E., Guix, S., Paraira, M., Galofré, B., Sánchez, G., . . . Bosch, A. (2020). Sentinel surveillance of SARS-CoV-2 in wastewater anticipates the occurrence of COVID-19 cases. *medRxiv*, 2020.2006.2013.20129627. doi:10.1101/2020.06.13.20129627

C. Huang, Y. Wang, X. Li, L. Ren, J. Zhao, Y. Hu, et al., Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *Lancet.*, 395 (2020), pp. 497-506.

D. Wang, B. Hu, C. Hu, F. Zhu, X. Liu, J. Zhang, et al., Clinical Characteristics of 138 hospitalized patients with 2019 novel coronavirus-infected pneumonia in Wuhan, China. *JAMA.*, 323 (2020), pp. 1061-1069.

D'Aoust, P. M., Mercier, E., Montpetit, D., Jia, J.-J., Alexandrov, I., Neault, N., . . . Delatolla, R. (2021). Quantitative analysis of SARS-CoV-2 RNA from wastewater solids in communities with low COVID-19 incidence and prevalence. *Water Research*, 188, 116560-116560. doi:10.1016/j.watres.2020.116560

Edmond, C. (2020, July 6). COVID-19: asintomático, pre-sintomático, sintomático explicado. Foro Económico Mundial website: <https://es.weforum.org/agenda/2020/07/asintomatico-presintomatico-sintomatico-cual-es-la-diferencia/>

Escalante-Maldonado, O., Vidal-Anzardo, M., Donaires, F., Solis-Sanchez, G., Gallesi, I., Pampa-Espinoza, L., ... Marques-Simas, P. V. (2021). Estandarización y validación de una prueba molecular RT-LAMP in house para el diagnóstico de SARS-CoV-2. *Revista Peruana de Medicina Experimental Y Salud Pública*, 38(1), 7–16. <https://doi.org/10.17843/rpmesp.2021.381.7154>

Escalera, J., Lizon, N., Maldonado, A., De la Vega, G., Alvarado, L., Balderrama, M., Bonilla, K., Rodríguez, A., & LANCOVID. 2020. Clinical features of the first cases and a cluster of Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) in Bolivia imported from Italy and Spain. January. <https://doi.org/10.1016/j.tmaid.2020.101653>

Guo, Y. R., Cao, Q. D., Hong, Z. S., Tan, Y. Y., Chen, S. D., Jin, H. J., Tan, K. S., Wang, D. Y., & Yan, Y. 2020. The origin, transmission and clinical therapies on coronavirus disease 2019 (COVID-19) outbreak - an update on the status. *Military Medical Research*, 7(1), 11. <https://doi.org/10.1186/s40779-020-00240-0>

Gerba, C. P., & Pepper, I. L. (2019). Microbial Contaminants. In *Environmental and Pollution Science* (3rd ed., pp. 191–217). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814719-1.00013-6>.

Gonzalez, R., Curtis, K., Bivins, A., Bibby, K., Weir, M. H., Yetka, K., . . . Gonzalez, D. (2020). COVID-19 surveillance in Southeastern Virginia using wastewater-based epidemiology. *Water Research*, 186, 116296. doi: <https://doi.org/10.1016/j.watres.2020.116296>.

Giraud-Billoud, M., Cuervo, P., Altamirano, J. C., Pizarro, M., Aranibar, J. N., Catapano, A., Cuello, H., Masachessi, G., & Vega, I. A. (2021). Monitoring of SARS-CoV-2 RNA in wastewater as an epidemiological surveillance tool in Mendoza, Argentina. *The Science of the total environment*, 796, 148887. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.148887>.

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. medRxiv. doi: [doi:doi.org/10.1101/2020.06.04.20122747](https://doi.org/10.1101/2020.06.04.20122747).

Hussain, Q. A. (2019). Bacteria: The natural indicator of environmental pollution. In *Freshwater Microbiology: Perspectives of Bacterial Dynamics in Lake Ecosystems* (pp. 393–220). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-817495-1.00010-4>

Keshaviah, A., Hu Xindi, C., & Henry, M. (2021). Developing a Flexible National Wastewater Surveillance System for COVID-19 and Beyond. *Environmental Health Perspectives*, 129(4), 045002. doi:10.1289/EHP8572

Kitajima, M., Ahmed, W., Bibby, K., Carducci, A., Gerba, C. P., Hamilton, K. A., . . . Rose, J. B. (2020). SARS-CoV-2 in wastewater: State of the knowledge and research needs. *Science of The Total Environment*, 739, 139076. doi: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.139076>

Langa, L. S., Sallent, L. V., & Díez, S. R. 2021. Interpretación de las pruebas diagnósticas de la COVID-19. *FMC : Formación médica continuada en atención primaria*, 28(3), 167– 173. <https://doi.org/10.1016/j.fmc.2021.01.005>

Li, G., Fan, Y., Lai, Y., Han, T., Li, Z., Zhou, P., Pan, P., Wang, W., Hu, D., Liu, X., Zhang, Q., & Wu, J. (2020). Coronavirus infections and immune responses. *Journal of medical virology*, 92(4), 424–432. <https://doi.org/10.1002/jmv.25685>

Li, X., Zhang, S., Shi, J., Luby, S. P., & Jiang, G. (2021). Uncertainties in estimating SARS-CoV-2 prevalence by wastewater-based epidemiology. *Chemical Engineering Journal*, 415, 129039. doi:<https://doi.org/10.1016/j.cej.2021.129039>

Medema, G., Heijnen, L., Elsinga, G., Italiaander, R., & Brouwer, A. (2020). Presence of SARS-Coronavirus-2 RNA in Sewage and Correlation with Reported COVID-19 Prevalence in the Early Stage of the Epidemic in The Netherlands. *Environmental Science & Technology Letters*, *acs.estlett.0c00357*. doi:10.1021/acs.estlett.0c00357

Ministerio de Salud y Deportes de Bolivia. 2022. Reporte COVID-19 en Bolivia. Consultado 29 de septiembre de 2022. Disponible en: <https://www.minsalud.gob.bo/es/7025-salud-informa-que-hasta-la-fecha-se-aplicaron-15-074-457-dosis-casos-positivos-llegan-a-55-y-viruela-simica-tiene-112-activos>

M. T. Madigan, J. M. Martinko, J. Parker. Brock . *Biología de los Microorganismos*. 14a (2015) Ed. Prentice Hall-Pearson Education.

Notomi, T. (2000). Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Research*, 28(12), 63e63. <https://doi.org/10.1093/nar/28.12.e63>

Okafor, N. (2011). Environmental Microbiology of Aquatic and Waste Systems. In *Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis* (Vol. 53, Issue 9). <https://doi.org/10.1007/978-94-007-1460-1>

Oliva Marín JE. SARS-CoV-2 origen, estructura, replicación y patogénesis. *Alerta*. 2020;3(2):79-86. DOI: <https://doi.org/10.5377/alerta.v3i2.9619>

Pontificia Universidad Católica de Chile. 2020. Fotografías del Coronavirus bajo el microscopio. Consultado 12 de octubre de 2022. Disponible en: <https://biologia.uc.cl/fotografias-del-coronavirus-bajo-el-microscopio/>

Peccia, J., Zulli, A., Brackney, D. E., Grubaugh, N. D., Kaplan, E. H., Casanovas-Massana, A., . . . Omer, S. B. (2020). Measurement of SARS-CoV-2 RNA in wastewater tracks community infection dynamics. *NATURE BIOTECHNOLOGY*, 38(10), 1164-1167. doi:10.1038/s41587-020-0684-z

Peccia, J., Zulli, A., Brackney, D. E., Grubaugh, N. D., Kaplan, E. H., Casanovas-Massana, A., . . . Omer, S. B. (2020). SARS-CoV-2 RNA concentrations in primary municipal sewage sludge as a leading indicator of COVID-19 outbreak dynamics. *medRxiv*. doi:[doi:10.1101/2020.05.19.20105999](https://doi.org/10.1101/2020.05.19.20105999)

Polo, D., Quintela-Baluja, M., Corbishley, A., Jones, D. L., Singer, A. C., Graham, D. W., & Romalde, J. L. (2020). Making waves: Wastewater-based epidemiology for COVID-19 - approaches and challenges for surveillance and prediction. *Water Research*, 186, 116404-116404. doi:10.1016/j.watres.2020.116404

Proyecto Rodillo. 2022. La situación de la COVID-19 está controlada. Consultado 29 de septiembre de 2022. Disponible en: [https://rodillo.org/estadisticas-coronavirus/bolivia/?gclid=CjwKCAjwhNWZBhB\\_EiwAPzlhNg2LbKkKcJdJRfm5O3mvOtctkyL-j81myPpmNmDUR2wKDL2pgV7g1BoCNEMQAvD\\_Bw](https://rodillo.org/estadisticas-coronavirus/bolivia/?gclid=CjwKCAjwhNWZBhB_EiwAPzlhNg2LbKkKcJdJRfm5O3mvOtctkyL-j81myPpmNmDUR2wKDL2pgV7g1BoCNEMQAvD_Bw)

R Development Core Team. (2019). A language and environment for statistical computing. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing.

Randazzo, W., Cuevas-Ferrando, E., Sanjuán, R., Domingo-Calap, 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>.

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. doi:10.1080/10643389.2014.1000761

Ruiz, D. (2017). incidencia de consideraciones de diseño en cámaras de radiación solar para la eliminación de coliformes. Sánchez, E., Nina, M., Aguirre, P., Arce, M., Toro, N., & Vilela, R. (2014). Amplificación isotérmica mediada por LOOP (LAMP) de ácidos nucleicos en el diagnóstico clínico. *CON-CIENCIA*, 2. [http://www.scielo.org.bo/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S231002652014000100014](http://www.scielo.org.bo/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S231002652014000100014).

Saguti, F., Magnil, E., Enache, L., Churqui, M. P., Johansson, A., Lumley, D., . . . Norder, H. (2021). Surveillance of wastewater revealed peaks of SARS-CoV-2 preceding those of hospitalized patients with COVID-19. *Water Research*, 189, 116620. doi:<https://doi.org/10.1016/j.watres.2020.116620>

Serrano-Cumplido, A., Ruiz Garcia, A., Segura-Fragoso, A., Olmo-Quintana, V., Micó Pérez, R. M., Barquilla-García, A., & Morán-Bayón, A. (2021). Aplicación del valor umbral del número de ciclos (Ct) de PCR en la COVID-19. *Medicina de Familia. SEMERGEN*, 47(5), 337–341. <https://doi.org/10.1016/J.SEMERG.2021.05.003>

Sims, N., & Kasprzyk-Hordern, 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>

Sunny, W., Rashid, L., & Jj, S. (2020). Covid-19 and the digestive system. *Journal of gastroenterology and hepatology*, 35(5). <https://doi.org/10.1111/jgh.15047>

Tscharke, B. J., O'Brien, J. W., Ort, C., Grant, S., Gerber, C., Bade, R., . . . Mueller, J. F. (2019). Harnessing the Power of the Census: Characterizing Wastewater Treatment Plant Catchment Populations for Wastewater-Based Epidemiology. *Environmental Science & Technology*, 53(17), 10303-10311. doi:10.1021/acs.est.9b03447

Tecnologías de la vida. Manual de PCR en tiempo real. <archivo:///G:/Coronavirus/CtvaluesCovid/Ct%20umbral%20art%C3%ADcμLo%20Semergen/real-time-pcr-handbook-life-technologies-update-flr.pdf>

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. *Lancet Gastroenterol. Hepatol.* 5, 434–435. [https://doi.org/10.1016/S2468-1253\(20\)30083-2](https://doi.org/10.1016/S2468-1253(20)30083-2).

Wu, F., Xiao, A., Zhang, J., Gu, X., Lee, W. L., Kauffman, K., . . . Alm, E. (2020). SARS-CoV-2 titers in wastewater are higher than expected from clinically confirmed cases. *medRxiv*, 2020.2004.2005.20051540. doi:10.1101/2020.04.05.20051540

Wu, F., Xiao, A., Zhang, J., Moniz, K., Endo, N., Armas, F., . . . Alm, E. J. (2020). SARS-CoV-2 titers in wastewater foreshadow dynamics and clinical presentation of new COVID-19 cases. medRxiv, 2020.2006.2015.20117747. doi:10.1101/2020.06.15.20117747

Wong, Y.-P. ., Othman, S., Lau, Y.-L. ., Radu, S., & Chee, H.-Y. . (2018). Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): a versatile technique for detection of micro-organisms. Journal of Applied Microbiology, 124(3), 626–643. https://doi.org/10.1111/jam.13647

Xiao, A., Wu, F., Bushman, M., Zhang, J., Imakaev, M., Chai, P. R., . . . Alm, E. J. (2021). Metrics to relate COVID-19 wastewater data to clinical testing dynamics. medRxiv. doi:10.1101/2021.06.10.21258580

Zhu N, Zhang D, Wang W, Li X, Yang B, Song J, et al., A novel coronavirus from patients with pneumonia in China, 2019. N Engl J Med. 2020;382:727-733.

Zhou P, Yang XL, Wang XG, Hu B, Zhang L, Zhang W, et al., A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. Nature. 2020;579:270-273.

Zang, R., Gomez Castro, M.F., McCune, B.T., Zeng, Q., Rothlauf, P.W., Sonnek, N.M., Liu, Z., BrūLois, K.F., Wang, X., Greenberg, H.B., Diamond, M.S., Ciorba, M.A., Whelan, S.P.J., Ding, S., 2020. TMPRSS2 and TMPRSS4 promote SARS-CoV-2 infection of human small intestinal enterocytes Sci. Immunol.

Deutsche Gesellschaft für Internationale Zusammenarbeit (GIZ) GmbH

Proyecto de Cooperación Triangular

Estrategia de Saneamiento en Ciudades Intermedias - CoTriSan

Bolivia – Costa Rica – Alemania

Calle 11 de Calacoto, #8039 casi esquina Sánchez Bustamante

Casilla 11400 – La Paz, Bolivia

E [carmen.marka@giz.de](mailto:carmen.marka@giz.de)

I [www.giz.de](http://www.giz.de)



Implementada por:

**giz** Deutsche Gesellschaft für Internationale Zusammenarbeit (GIZ) GmbH

Estrategia de Saneamiento en Ciudades Intermedias Bolivia – Costa Rica – Alemania (CoTriSan)