

ARTÍCULO ORIGINAL

DETECCIÓN DE VARIANTES DEL SARS-CoV-2 EN AGUAS RESIDUALES DE HOSPITALES EN PERÚ, 2022

Pool Marcos-Carbajal^{1,a}, José Yareta-Yareta^{1,b}, Miguel Otiniano-Trujillo^{1,2,b}, Marco Galarza- Pérez^{3,b}, Abraham Espinoza-Culupu^{4,c}, Jorge L. Ramirez-Melgar^{4,b}, Mario Chambi-Quispe^{5,b}, Néstor Alejandro Luque-Chipana^{6,7,d}, Rosmery Gutiérrez Ajalcraña^{8,e}, Víctor Sucñe Cruz^{9,b}, Segundo Nicolas López Chegne^{10,f}, Diana Santillán Ruiz^{11,f}, Luis Felipe Segura Chavez^{1,f}, Cinthia Esther Sias Garay^{1,g}, Alberto Salazar Granara^{2,d}, Pablo Tsukayama Cisneros^{7,h}, Silvana Teresa Tapia Paniagua^{12,h}, Carmen María González-Domenech^{12,i}

¹ Universidad Peruana Unión, Escuela Profesional Medicina, Laboratorio de Investigación en Biología Molecular, Lima, Perú.

² Universidad San Martín de Porres, Centro de Investigación en Medicina Tradicional y Farmacología, Lima, Perú.

³ Instituto Nacional de Salud, Centro Nacional de Salud Pública, Laboratorio de Biotecnología y Biología molecular, Lima, Perú.

⁴ Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Ciencias Biológicas, Lima, Perú

⁵ Hospital Carlos Monge Medrano, Patología Clínica, Puno, Perú

⁶ Hospital de Ate Vitarte, Unidad de Cuidados Intensivos, Lima, Perú.

⁷ Universidad Peruana Cayetano Heredia, Laboratorio de Genómica Microbiana, Lima, Perú.

⁸ Hospital de Huaycán, Área de Epidemiología, Lima, Perú

⁹ Hospital Regional del Cusco, Patología Clínica, Cusco, Perú.

¹⁰ Hospital Regional de Cajamarca, Patología Clínica, Cajamarca, Perú.

¹¹ Hospital de Tarapoto, Departamento de Anatomía Patológica y Patología Clínica, Tarapoto, Perú

¹² Universidad de Málaga, Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias, Málaga, España.

^a Biólogo, magister en biología molecular; ^b biólogo, bachiller en biología; ^c biólogo, doctor en biotecnología; ^d médico cirujano, doctor en medicina; ^e licenciada en enfermería, bachiller en ciencias de la salud; ^f médico cirujano, especialista en patología clínica; ^g licenciada en educación: lingüística e inglés, bachiller en ciencias de la educación; ^h biólogo, doctor en microbiología; ⁱ licenciada en farmacia, doctor en microbiología.

RESUMEN

Objetivo. Identificar la presencia del virus SARS-CoV-2 en aguas residuales de hospitales en Perú. **Materiales y métodos.** Se recolectaron muestras de agua en los efluentes de nueve hospitales del Perú durante marzo y septiembre de 2022 y se realizó la identificación de SARS-CoV-2 mediante secuenciación Illumina. Las asignaciones de variantes, linajes y clados se llevaron a cabo con las herramientas Illumina y Nextclado. Verificamos si las variantes de SARS-CoV-2 obtenida de las aguas residuales fueron similares a las reportadas por el Instituto Nacional de Salud del Perú procedentes de pacientes durante el mismo período y región. **Resultados.** Dieciocho de las 20 muestras de aguas residuales hospitalarias (90%) proporcionaron secuencias con la calidad suficiente para ser clasificadas como variante Ómicron según la clasificación de la OMS. Entre ellos, seis (30%) fueron asignados por Nextclade a los clados 21K linaje BA.1.1 (n=1), 21 L linaje BA.2 (n=2) y 22B linajes BA.5.1 (n=2) y BA.5.5 (n=1). **Conclusiones.** Se encontraron variantes del SARS-CoV-2 en muestras de aguas residuales hospitalarias y que fueron similares a las reportadas por el sistema de vigilancia en pacientes durante las mismas semanas y áreas geográficas. El monitoreo de aguas residuales podría proporcionar información sobre la variación ambiental y temporal de virus como el SARS-CoV-2.

Palabras clave: Genómica, SARS-CoV-2; Aguas residuales; Secuenciación; Monitoreo epidemiológico basado en aguas residuales (fuente: DeCS BIREME).

DETECTION OF SARS-CoV-2 VARIANTS IN HOSPITAL WASTEWATER IN PERU, 2022

ABSTRACT

Objective. Identify the presence of the SARS-CoV-2 virus in wastewater from hospitals in Peru. **Materials and methods.** Water samples were collected in the effluents of nine hospitals in Peru during March and September 2022 and identification of SARS-CoV-2 was performed using Illumina sequencing. Variant, lineage and clade assignments were carried out using the Illumina and Nextclado tools. We verified whether the SARS-CoV-2 variants obtained from wastewater were similar to those reported by the National Institute of Health of Peru from patients during the same period and region. **Results.** Eighteen of the 20 hospital wastewater samples (90%) provided sequences of sufficient quality to be classified as an Omicron variant according to the WHO classification. Among them, six (30%) were assigned by Nextclade to clades 21K lineage BA.1.1 (n=1), 21L lineage BA.2 (n=2), and 22B lineages BA.5.1 (n=2) and BA.5.5 (n=1). **Conclusions.** SARS-CoV-2 variants were found in hospital wastewater samples and were similar to those reported by the surveillance system in patients during the same weeks and geographic areas. Wastewater monitoring could provide information on the environmental and temporal variation of viruses such as SARS-CoV-2.

Keywords: Genomics, SARS-CoV-2; Wastewater; Sequencing; Wastewater-Based Epidemiological Monitoring (source: MeSH NLM).

Citar como. Marcos-Carbajal P, Yareta-Yareta J, Otiniano-Trujillo M, Galarza- Pérez M, Espinoza-Culupu A, Ramirez-Melgar JL, et al. Detección de variantes del SARS-CoV-2 en aguas residuales de hospitales en Perú, 2022. *Rev Peru Med Exp Salud Publica.* 2024;41(2). doi: 10.17843/rpmpesp.2024.412.13484.

Correspondencia. Pool Marcos Carbajal; poolmarcos@upeu.edu.pe

Recibido. 25/11/2023

Aprobado. 06/03/2024

En línea. 14/05/2024



This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International

Copyright © 2024, Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública

INTRODUCCIÓN

Los virus de ARN, como el ébola, la gripe, el dengue, el zika y el SARS-CoV-2, evolucionaron rápidamente con una acumulación constante de mutaciones en sus genomas ^(1,2). Esta característica puede utilizarse para hacer inferencias epidemiológicas e identificar los factores de riesgo asociados a los eventos de transmisión que ocurren en poblaciones susceptibles ^(1,3). Desde diciembre de 2019, se ha generado una gran cantidad de genomas de SARS-CoV-2 en todo el mundo y se han depositado en repositorios públicos (i.e., GISAID, Genbank), lo que nos permite rastrear, casi en tiempo real, la evolución de este virus ⁽²⁻⁵⁾. Sin embargo, solo encontramos estudios sobre los patrones de transmisión en sus poblaciones locales de unos pocos países europeos y norteamericanos ^(6,7).

Latinoamérica ha generado más de 100 000 genomas, especialmente de Brasil, Chile, Perú, Colombia, Ecuador y Uruguay ^(2,5). Por ejemplo, el Instituto Nacional de Salud (INS) en colaboración con el Centro Nacional de Epidemiología, Prevención y Control de Enfermedades del Ministerio de Salud (CDC-MINSA) en el Perú, han generado más de 54506 genomas de SARS-CoV-2 para el 2024 (<https://gisaid.org/>) confirmando la circulación de una miríada de variantes desde el inicio de la pandemia de COVID-19 (i.e., lambda, gamma, alfa, delta, mu, zeta, épsilon, etc. y otros. (<https://nextstrain.org/ncov/gisaid/21L/south-america/1m>) ⁽⁸⁻¹¹⁾.

De forma complementaria a la detección clínica, la vigilancia ambiental de los virus, especialmente los relacionados con la viabilidad y la potencial infectividad como el SARS-CoV-2, podría actuar como una herramienta útil para predecir brotes oportunos de enfermedades y emitir una alerta rápida por parte de las autoridades sanitarias ^(12,13). En ese sentido, las muestras de aguas residuales son una fuente de información no invasiva y económica para investigar la propagación de diferentes variantes genéticas del SARS-CoV-2 dentro de una comunidad ^(14,15). La secuenciación masiva y el análisis metagenómico nos permitirían detectar el virus e identificar las variantes circulantes del SARS CoV-2 al mismo tiempo.

En este estudio, nos propusimos detectar mediante secuenciación de nueva generación las variantes de SARS-CoV-2 provenientes de diferentes efluentes hospitalarios en Perú, durante marzo y septiembre de 2022. Los datos recuperados fueron cotejados con las variantes circulantes monitoreadas por el sistema de vigilancia del INS del Perú.

MATERIALES Y MÉTODOS

Procedimientos

Las muestras fueron recolectadas en colectores de aguas residuales de nueve hospitales ubicados en seis regiones del Perú (Lima=3, San Martín=1, Puno=2, Cusco=1, Cajamarca=1, La Libertad=1) entre marzo y septiembre de 2022 (Figura 1). Cada

MENSAJES CLAVE

Motivación para el estudio. Contribuir a la vigilancia de las muestras ambientales de procedencia hospitalaria para emitir alertas tempranas ante posibles brotes de enfermedades infecciosas.

Principales hallazgos. La variante Ómicron del virus de la COVID-19 se detectó en aguas residuales de hospitales en Puno, Cuzco y en Cajamarca, esta variante es similar al reportado por Instituto Nacional de Salud del Perú en base a muestras de hisopos nasofaríngeos.

Implicancias. La presencia de la variante Ómicron en las aguas residuales hospitalarias durante la tercera ola de la pandemia debe generar conciencia sobre el sistema de tratamiento antes de que las aguas residuales se viertan en el sistema de alcantarillado público.

hospital fue georreferenciado y en cada punto se tomaron dos muestras en un período de una hora. Las muestras de agua residual se recolectaron pasivamente en botellas de vidrio estériles (1000 mL) y luego se etiquetaron. Las muestras se transportaron en condiciones de cadena de frío a 8 °C y se procesaron en un plazo de 24 horas. Una vez finalizada la extracción de ácidos nucleicos, estos fueron almacenados a -20°C en el laboratorio de biología molecular de la Universidad Peruana Unión, siguiendo las recomendaciones del CDC de EE. UU. (<https://www.cdc.gov/nwss/wastewater-surveillance.html>)

Preparación y pretratamiento de las muestras

Seguimos el protocolo del kit de ácido nucleico total FB236 de Wizard® Enviro Wastewater (Promega Corp, EE. UU.). Brevemente, un total de 40 mL de muestras de aguas residuales homogeneizadas fueron tratadas con 500 µL de proteínasa K, mezcladas por inversión e incubadas durante 30 minutos a temperatura ambiente, luego centrifugadas a 3000 g durante 10 minutos, siguiendo las instrucciones del fabricante. Posteriormente, añadimos 6 mL de tampón de unión 1 y luego 0,5 mL de tampón de unión 2 (ambos incluidos en el mismo kit) y mezclamos bien por inversión. Finalmente, se añadieron 24 mL de isopropanol (Sigma Aldrich Co., St. Louis, MO, Estados Unidos) a cada tubo. La mezcla se pasó a través de la columna PureYield™ Minicolumn, de acuerdo con el mismo protocolo. Para finalizar, las columnas se sometieron a un sistema de vacío, y el contenido total finalmente se eluyó con 1000 µL de agua libre de RNasa/DNasa precalentada (60 °C).

Purificación de ARN y análisis de electroforesis

El fluido obtenido en el paso anterior se purificó para obtener ARN total utilizando las minicolumnas de sílice PureYield™,



Figura 1. Hospitales según región muestreados entre marzo y septiembre de 2022 en Perú

también proporcionadas por el kit de ácido nucleico total FB236 de Wizard® Enviro Wastewater (Promega Corp, EE. UU.), siguiendo las instrucciones del fabricante. El contenido total del eluido se pasó por toda la columna, se lavó y finalmente se recuperó con 70 μ L de agua libre de RNasa/DNasa, a 11000 g durante un minuto, siguiendo las instrucciones del fabricante. Los ARN se cuantificaron por absorbancia a 260 nm utilizando un Nanodrop⁽¹⁶⁾ y la integridad se visualizó en geles de agarosa al 1% (Sigma Aldrich Co, St. Louis, MO, EE. UU.) teñidos con oro Sybr.

ADNc y preparación de bibliotecas y NGS

El ARN total se retrotranscribe a ADNc utilizando cebadores aleatorios, y la preparación de la biblioteca se realizó utilizando el Illumina COVID Seq Kit RUO (Illumina San Diego, California, EE. UU.). Se utilizó el equipo MiSeq (Illumina®) para secuenciar de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La secuenciación fue tercerizada y realizada por Genlab del Perú S.A.C.

Análisis bioinformático

La calidad de las lecturas se evaluó mediante un software implementado en el paquete de herramientas Illumina®, con un análisis adicional realizado por los softwares Nextclade y

Pangolin^(17,18). Estos dos programas nos permitieron identificar qué variantes y linajes estaban circulando en el Perú. Adicionalmente, se evaluaron los hallazgos (variantes y linajes) con los de muestras clínicas rastreadas por el INS del Perú durante el mismo periodo y área geográfica (<https://web.ins.gob.pe/es/covid19/secuenciamiento-sars-cov2>).

RESULTADOS

Se obtuvieron secuencias de cada muestra, reuniendo 20 secuencias en total. Sin embargo, los programas Pangolin y Nextclade evaluaron primero su calidad, siendo descartados todos por el primer programa al ser etiquetados como contenido ambiguo o falla, y fueron recuperados seis resultados por el segundo programa. Como se muestra, todas las secuencias con calidad suficiente se asignaron a la variante Ómicron de acuerdo con la etiqueta de la Organización Mundial de la Salud (OMS). Sin embargo, los linajes fueron diversos dentro de los tres clados encontrados: el clado 21K con el linaje BA.1.1 (n=1); el clado 21L con el linaje BA.2 (n=2); y el clado 22B con los linajes BA.5.1 (n=2) y BA.5.5 (n=1) (Tabla 1).

Cuando comparamos los resultados obtenidos de las aguas residuales hospitalarias con las muestras de pacientes monitoreados por el INS durante el mismo periodo, encon-

Tabla 1. Secuencias de linajes SARS-CoV-2 a partir de muestras de aguas residuales en nueve hospitales de Perú 2022.

Hospital (Región)	Nro. de muestra	Georreferenciación		Datos de vigilancia clínica		Muestra de aguas residuales					
		Latitud	Longitud	Semana epidemiológica*	Variantes y linajes predominantes del SARS-CoV-2 (OMS)*	Variante del SARS-CoV-2 (asignación del siguiente clado)	Linaje	Clado			
Hospital Carlos Monge Medrano (Puno)	1	-15.48103444	-70.12079352	24	Ómicron, Linajes BA.2.12.1, BA.4.1, BA.5.1, BA.5.2, BA.4.6, BA.5.1.8	NA					
	2			35	Ómicron, Linajes BA.5, BA.5.1, BA.5.2.1, BA.5.2, BA.5.6				Ómicron	BA.5.1	22B
Hospital Regional Docente de Trujillo (La Libertad)	3	-8.105569975	-79.03658615	24	Ómicron, Linajes BA.2, BA.2.5, BA.4, BA.5, BA.2.12.1, BA.4.1, BA.5.1, BA.2.9	NA					
	4			28	Ómicron, Linajes BA.2, BA.4, BA.2.12.1, BA.4.1, BA.5.1, BA.5.2, BA.4.6				NA		
Hospital de Emergencias de Ate Vitarte (Lima)	5	-12.02584008	-76.91729777	25	Ómicron, Linajes BA.2, BA.4, BA.5, BA.2.12.1	NA					
	6								NA		
	7								NA		
Hospital de Huaycán (Lima)	8	-12.01544188	-76.82024846	19	Ómicron, Linajes BA.1, BA.1.1, BA.2, BA.4, BA.5, BA.2.12.1	NA					
	9								NA		
Hospital Regional de Cusco (Cusco)	10	-13.52354454	-71.95475727	32	Ómicron, Linajes BA.2, BA.4, BA.5, BA.5.2, BA.2.12.1, BA.4.1, BA.5.1, BA.5.1.1, BA.5.2.1, BE.1, BA.4.6, BA.5.6, BA.5.6.1	Ómicron	BA.2	21L			
	11								Ómicron	BA.2	21L
Clínica Americana Juliaca (Puno)	12	-15.49743882	-70.13242485	35	Ómicron, Linajes BA.5, BA.5.1, BA.5.2.1, BA.5.2, BA.5.6	Ómicron	BA.5.5	22B			
	13								Ómicron	BA.5.1	22B
Hospital Regional de Cajamarca (Cajamarca)	14	-7.183099124	-78.48777246	34	Ómicron, Linajes BA.4, BA.5, BA.4.1, BA.5.1, BA.5.2.1, BA.5.2, BA.4.6, BA.5.1.3, BA.5.6, BA.5.1.3, BA.5.6.1	Ómicron	BA.1.1	21K			
	15								NA		
Hospital Sergio Bernales (Lima)	16	-11.91352635	-77.03915675	10	Ómicron, Linajes BA.1, BA.1.1, BA.2	NA					
	17								NA		
Hospital de Tarapoto (San Martín)	18	-6.473262643	-6.473262643	34	Ómicron, Linajes BA.4.1, BA.5.1, BA.5.1.1, BA.5.2.1, BA.5.6.1	NA					
	19								NA		
	20								NA		

NA: no asignado

* Asignación según Instituto Nacional de Salud del Perú para el lugar y semana de muestreo. No fue posible recuperar los datos de Puno durante la semana 24 (16/06/2022), por lo que los datos mostrados son de julio de 2022

tramos una similar presencia tanto en la variante donde todas pertenecían a Ómicron, la misma variante circulante en la población peruana, como a los linajes. Solo BA.5.5, no fue reportada por el INS para el área y el momento del muestreo en la región Puno (Tabla 1).

Todas las 14 secuencias, excepto una (WW20) descartada por el software Nextclade debido a su baja calidad, fueron analizadas por las herramientas de Illumina y parecían pertenecer al clado 19A de Ómicron. Sin embargo, este resultado no podía considerarse robusto (las otras herramientas los habían descartado), pero de alguna manera también mostraba la relación subyacente con la variante ómicron.

DISCUSIÓN

La pandemia de COVID-19 en Perú se caracterizó por un mayor número de casos, muertes por millón de habitantes y exceso total de muertes en comparación con otros países de América del Sur⁽¹⁹⁾. Se aducen varias causas para explicar estas cifras, pero principalmente podrían deberse a una estrategia de Salud Pública sin líderes y descoordinada, así como a la falta de infraestructuras^(20,21). Paradójicamente, Perú fue el primer país de América Latina en imponer un confinamiento estricto en 2020, logrando una rápida mejoría de la primera ola de casos en junio de 2020⁽²²⁾. Sin embargo, la relajación de

las restricciones en agosto de 2020 se asoció con una segunda ola a finales de ese año ⁽²¹⁾. El nuevo pico de casos entre diciembre de 2020 y febrero de 2021 volvió a obligar a medidas de restricción y cuarentenas selectivas en las zonas con mayor incidencia de casos. Un año después, el Ministerio de Salud peruano anunció la aparición de una tercera ola, iniciada así en enero de 2022 y extendida hasta abril de 2022 ^(23,24). Este estudio surgió en el contexto de esta tercera ola y tuvo como objetivo detectar las variantes del SARS-CoV-2 a partir de diferentes efluentes hospitalarios en el Perú durante el periodo comprendido entre marzo y septiembre del 2022 y abarcó establecimientos de salud de la costa, selva y sierra, mostrando material genético encontrado en las muestras analizadas de los genotipos, lo que indicaría que para las fechas del estudio estarían circulando los linajes mencionados.

Se han detectado variantes del SARS-CoV-2 a partir de muestras respiratorias en Perú, algunas de ellas variantes de interés (VOI) y otras variantes de preocupación (VOC), según la clasificación de los CDC y la OMS en función de su impacto en la salud pública ^(25,26). Así, en la segunda ola de la pandemia en el Perú se encontraban circulando los linajes Lambda y Gamma. Lambda se enfocó en la región de la costa y sierra, mientras que Gamma en la región de la selva (Loreto) ^(11,27). De hecho, la variante Lambda (C.37) se detectó por primera vez a nivel mundial en el Perú en agosto de 2020. Por otro lado, la tercera ola estuvo dominada por linajes descendientes de Ómicron BA.1 (B.1.1.529), esta variante fue la única encontrada en nuestro estudio. Además, los linajes descendientes encontrados en las muestras de aguas residuales coincidieron con alguno de los detectados por el INS en pacientes de la misma área geográfica y semana de muestreo. Como se ha visto anteriormente en otros estudios, la detección del SARS-CoV-2 en las aguas residuales puede reflejar la propagación de este virus en la comunidad ^(28,29). Además, este enfoque permite observar la transmisión no detectada de variantes del SARS-CoV-2 ⁽³⁰⁾. En ese sentido, hemos encontrado un linaje de Ómicron, BA.5.5 que no fue reportado por el INS para los lugares y periodo de muestreo, pero que podrían haber estado circulando.

La principal limitación de nuestro estudio fue la calidad de las muestras, lo que nos obligó a descartar un número considerable de muestras. Las secuencias de baja calidad, además de la dificultad para estimar la abundancia relativa del linaje en muestras complejas, no son infrecuentes cuando se lleva a cabo la vigilancia de aguas residuales ⁽³¹⁾. La baja prevalencia de diferentes linajes en esas muestras se señala como la razón

principal ⁽³²⁾, lo que probablemente también explique nuestros resultados. Asimismo, el tiempo de muestreo no coincidió con los grandes picos de casos reportados durante la tercera ola y donde se detectaron muchos linajes en la población.

La fortaleza del estudio radica en que es uno de los primeros estudios en reportar variantes del SARS-CoV-2 en aguas residuales de hospitales en Perú. La vigilancia genómica basada en la secuenciación nos proporciona esta importante información para conocer más sobre la transmisión continua del virus hacia la comunidad. Este estudio, tuvo la participación de diferentes investigadores que forman parte de la red de resistencia antimicrobiana y que han aportado su experiencia y conocimiento para lograr los objetivos planteados; siendo necesario el apoyo de diferentes actores e instituciones. A pesar de las limitaciones, nuestro estudio es otro ejemplo de cómo el análisis de secuenciación de aguas residuales podría ser útil como contraparte para la vigilancia viral en pacientes, especialmente en países donde las pruebas clínicas son aún un desafío.

En conclusión, se evidencia la presencia de variantes del SARSCoV-2 en muestras de aguas residuales hospitalarias y que fueron similares a las reportadas por el sistema de vigilancia en pacientes durante las mismas semanas y áreas geográficas en Perú. El monitoreo de aguas residuales contribuye a proporcionar información sobre la variación ambiental y temporal de virus como el SARS-CoV-2.

Agradecimiento. A Roger Albornoz, de la Universidad Peruana Unión por su gestión en lograr el financiamiento, así como a Guillermo Trujillo (GenLab) por su orientación en la preparación de bibliotecas genómicas.

Contribución de los autores. Los autores del estudio declaran que cada uno de ellos cumple con los criterios de autoría del ICMJE.

Roles según CRediT. PMC conceptualización. PMC, JYY, MOT, MGP, AEC, PTC, STP, CGD metodología, software, validación. JYY, MOT, MGP, AEC, JRM, MCHQU, NALCH, RGA, VSC, SNLCH, DSR, LSCH, CSG, ASG, PTC, STP. CGD: PMC, JYY, MOT, MGP, AEC, PTC, STP, CGD investigación, recursos, redacción y elaboración del borrador original. PMC supervisión. PMC, JYY, MOT, MGP, AEC, JRM, MCHQU, NALCH, RGA, VSC, SNLCH, DSR, LSCH, CSG, ASG, PTC, STP, CGD redacción, corrección y edición. Todos los autores aprueban la versión final del artículo.

Financiamiento. Este trabajo contó con el apoyo de la Escuela de Medicina de la Unión Universidad Peruana y GenLab del Perú S.A.C e Illumina Inc. bajo la convocatoria GenLab 2021.

Conflicto de intereses. Los autores declaran no tener ningún conflicto de interés.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Grubaugh ND. Translating virus evolution into epidemiology. *Cell Host & Microbe*. 2022;30:444–8. doi: [10.1016/j.chom.2022.03.006](https://doi.org/10.1016/j.chom.2022.03.006).
2. Chiara M, D'Erchia AM, Gissi C, Manzari C, Parisi A, Resta N, *et al*. Next generation sequencing of SARS-CoV-2 genomes: challenges,

- applications and opportunities. *Brief Bioinform.* 2021;2:616-630. doi: [10.1093/bib/bbaa297](https://doi.org/10.1093/bib/bbaa297).
3. Quer J, Colomer-Castell S, Campos C, Andrés C, Piñana M, Cortese MF, *et al.* Next-Generation Sequencing for Confronting Virus Pandemics. *Viruses.* 2022; 14(3):600. doi: [10.3390/v14030600](https://doi.org/10.3390/v14030600).
 4. GISAID. GISAID - gisaid.org. [citado el 13 de junio de 2023]. Disponible en: <https://gisaid.org/>.
 5. Chen Z, Azman AS, Chen X, Zou J, Tian Y, Sun R, *et al.* Global landscape of SARS-CoV-2 genomic surveillance and data sharing. *Nat Genet.* 2022;54(4):499-507. doi: [10.1038/s41588-022-01033-y](https://doi.org/10.1038/s41588-022-01033-y).
 6. Islam MR, Hoque MN, Rahman MS, Alam ASMRU, Akther M, Puspou JA, *et al.* Genome-wide analysis of SARS-CoV-2 virus strains circulating worldwide implicates heterogeneity. *Sci Rep.* 2020; 10(1):14004. doi: [10.1038/s41598-020-70812-6](https://doi.org/10.1038/s41598-020-70812-6).
 7. Baker RE, Mahmud AS, Miller IF, Rajeev M, Rasambainarivo F, Rice BL, *et al.* Infectious disease in an era of global change. *Nat Rev Microbiol.* 2022; 20(4):193-205. doi: [10.1038/s41579-021-00639-z](https://doi.org/10.1038/s41579-021-00639-z).
 8. Padilla-Rojas C, Jiménez-Vásquez V, Hurtado V, Mestanza O, Molina IS, Bárcena L, *et al.* Genomic analysis reveals a rapid spread and predominance of lambda (C.37) SARS-COV-2 lineage in Peru despite circulation of variants of concern. *J Med Virol.* 2021;93(12):6845-9. doi: [10.1002/JMV.27261](https://doi.org/10.1002/JMV.27261).
 9. Mestanza O, Lizarraga W, Padilla-Rojas C, Jiménez-Vásquez V, Hurtado V, Molina IS, *et al.* Genomic surveillance of the Lambda SARS-CoV-2 variant in a global phylogenetic context. *J Med Virol.* 2022; 94(10):4689-95. doi: [10.1002/JMV.27889](https://doi.org/10.1002/JMV.27889).
 10. Romero PE, Dávila-Barclay A, Salvatierra G, González L, Cuicapuza D, Solís L, *et al.* The Emergence of Sars-CoV-2 Variant Lambda (C.37) in South America. *Microbiol Spectr.* 2021;9(2):e0078921. doi: [10.1128/Spectrum.00789-21](https://doi.org/10.1128/Spectrum.00789-21).
 11. Vargas-Herrera N, Araujo-Castillo R V, Mestanza O, Galarza M, Rojas-Serrano N, Solari-Zerpa L. SARS-CoV-2 Lambda and Gamma variants competition in Peru, a country with high seroprevalence. *Lancet Reg Health Am.* 2022; 6: 100112. doi: [10.1016/J.lana.2021.100112](https://doi.org/10.1016/J.lana.2021.100112).
 12. Corpuz MVA, Buonerba A, Vigliotta G, Zarra T, Ballesteros F, Campiglia P, *et al.* Viruses in wastewater: occurrence, abundance and detection methods. *Sci Total Environ.* 2020;745:140910. doi: [10.1016/j.scitotenv.2020.140910](https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.140910).
 13. Buonerba A, Corpuz MVA, Ballesteros F, Choo KH, Hasan SW, Korshin G V, *et al.* Coronavirus in water media: Analysis, fate, disinfection and epidemiological applications. *J Hazard Mater.* 2021;415:125580. doi: [10.1016/j.jhazmat.2021.125580](https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.125580).
 14. Khan M, Li L, Haak L, Payen SH, Carine M, Adhikari K, *et al.* Significance of wastewater surveillance in detecting the prevalence of SARS-CoV-2 variants and other respiratory viruses in the community – A multi-site evaluation. *One Health.* 2023;16:100536. doi: [10.1016/J.oneht.2023.100536](https://doi.org/10.1016/J.oneht.2023.100536).
 15. Ahmed W, Angel N, Edson J, Bibby K, Bivins A, O'Brien JW, *et al.* First confirmed detection of SARS-CoV-2 in untreated wastewater in Australia: A proof of concept for the wastewater surveillance of COVID-19 in the community. *Sci Total Environ.* 2020;728:138764. doi: [10.1016/j.scitotenv.2020.138764](https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.138764).
 16. Ahmed W, Simpson SL, Bertsch PM, Bibby K, Bivins A, Blackall LL, *et al.* Minimizing errors in RT-PCR detection and quantification of SARS-CoV-2 RNA for wastewater surveillance. *Sci Total Environ.* 2022; 805:149877. doi: [10.1016/j.scitotenv.2021.149877](https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.149877).
 17. Aksamentov I, Roemer C, Hodcroft EB, Neher RA. Nextclade: clade assignment, mutation calling and quality control for viral genomes. *Journal of Open Source Software.* 2021;6:3773. doi: [10.21105/joss.03773](https://doi.org/10.21105/joss.03773).
 18. O'Toole Á, Scher E, Underwood A, Jackson B, Hill V, McCrone JT, *et al.* Assignment of epidemiological lineages in an emerging pandemic using the pangolin tool. *Virus Evol.* 2021;7(2):veab064. doi: [10.1093/ve/veab064](https://doi.org/10.1093/ve/veab064).
 19. Fraser B. COVID-19 strains remote regions of Peru. *Lancet.* 2020; 395(10238): 1684. doi: [10.1016/s0140-6736\(20\)31236-8](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(20)31236-8).
 20. Schwalb A, Mares C. The COVID-19 Pandemic in Peru: What Went Wrong?. *Am J Trop Med Hyg.* 2021;104(4):1176-8. doi: [10.4269/AJTMH.20-1323](https://doi.org/10.4269/AJTMH.20-1323).
 21. Herrera-Añazco P, Uyen-Cateriano A, Mezones-Holguín E, Taype-Rondan A, Mayta-Tristán P, Málaga G, *et al.* Some lessons that Peru did not learn before the second wave of COVID-19. *Int J Health Plann Manage.* 2021; 36(3):995-8. doi: [10.1002/spm.3135](https://doi.org/10.1002/spm.3135).
 22. Munayco CV, Tariq A, Rothenberg R, Soto-Cabezas GG, Reyes MF, Valle A, *et al.* Early transmission dynamics of COVID-19 in a southern hemisphere setting: Lima-Peru: February 29th–March 30th, 2020. *Infect Dis Model.* 2020;5:338-345. doi: [10.1016/j.idm.2020.05.001](https://doi.org/10.1016/j.idm.2020.05.001)
 23. COVID-19: Minsa Anuncia confirma tercera ola ante incremento de casos de contagio por la COVID-19. [Citado el 4 de enero de 2022]. Disponible en: <https://www.gob.pe/institucion/minsa/noticias/574040-minsa-confirma-tercera-ola-ante-incremento-de-casos-de-contagio-por-la-covid-19>.
 24. El Peruano. COVID-19: minsa anuncia el fin de la tercera ola de la pandemia en el Perú. [Internet]. [citado el 26 de junio de 2023]. Disponible en: <https://elperuano.pe/noticia/142675-COVID-19-minsa-anuncia-el-fin-de-la-tercera-ola-de-la-pandemia-en-el-peru>.
 25. CDC. Clasificaciones y definiciones de variantes del SARS-CoV-2. [citado el 28 de junio de 2023]. Disponible en: <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/variants/variant-classifications.html>.
 26. OMS. La OMS anuncia etiquetas sencillas y fáciles de decir para las variantes de interés y preocupación del SARS-CoV-2. [citado el 28 de junio de 2023]. Disponible en: <https://www.who.int/news/item/31-05-2021-who-announces-simple-easy-to-say-labels-for-sars-cov-2-variants-of-interest-and-concern>.
 27. Arévalo JS, Uribe-Calampa CS, Jiménez-Silva C, Quiñones-Aguilar M, Bouckaert R, Rebello-Pinho JR. Phylodynamic of SARS-CoV-2 during the second wave of COVID-19 in Peru. *Nat Commun.* 2023;14(1):3557. doi: [10.1038/s41467-023-39216-8](https://doi.org/10.1038/s41467-023-39216-8).
 28. Reynolds LJ, González G, Sala-Comorera L, Martin NA, Byrne A, Fennea S, *et al.* SARS-CoV-2 variant trends in Ireland: Wastewater-based epidemiology and clinical surveillance. *Sci Total Environ.* 2022;838(Pt 2): 155828. doi: [10.1016/j.scitotenv.2022.155828](https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.155828).
 29. Cancela F, Ramos N, Smyth DS, Etchebehere C, Berois M, Rodríguez J, *et al.* Wastewater surveillance of SARS-CoV-2 genomic populations on a country-wide scale through targeted sequencing. *PLoS One.* 2023; 18(4):e0284483. doi: [10.1371/journal.pone.0284483](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0284483).
 30. Karthikeyan S, Levy JI, De Hoff P, Humphrey G, Birmingham A, Jepsen K, *et al.* Wastewater sequencing reveals early cryptic SARS-CoV-2 variant transmisión. *Nature.* 2022;609(7925):101-108. doi: [10.1038/s41586-022-05049-6](https://doi.org/10.1038/s41586-022-05049-6).
 31. Amman F, Markt R, Endler L, Hupfauf S, Agerer B, Schedl A, *et al.* Viral variant-resolved wastewater surveillance of SARS-CoV-2 at national scale. *Nat Biotechnol.* 2022; 40(12):1814-22. doi: [10.1038/s41587-022-01387-y](https://doi.org/10.1038/s41587-022-01387-y).
 32. Brunner FS, Brown MR, Bassano I, Denise H, Khalifa MS, Wade MJ, *et al.* City-wide wastewater genomic surveillance through the successive emergence of SARS-CoV-2 Alpha and Delta variants. *Water Res.* 2022; 226:119306. doi: [10.1016/j.watres.2022.119306](https://doi.org/10.1016/j.watres.2022.119306).