

Accepted Manuscript / Manuscrito Aceptado

Title Paper/Título del artículo:

Detección de SARS-CoV-2 en sistemas de drenaje de autobuses y terminal de autobuses en México

Detection of SARS-CoV-2 in drainage systems from tourist buses and bus station in Mexico

Authors/Autores: Medrano-Félix, J. A., Lira-Morales, J. D., González-López, I., González-Gómez, J. P., Castro-del Campo, N. C., Martínez-Rodríguez, C.I., Gómez-Gil, B., Chaidez, C.

ID: e1631

DOI: <https://doi.org/10.15741/revbio.11.e1631>

Received/Fecha de recepción: January 24th 2024

Accepted /Fecha de aceptación: May 21th 2024

Available online/Fecha de publicación: June 14th 2024

Please cite this article as/Como citar este artículo: Medrano-Félix, J. A., Lira-Morales, J. D., González-López, I., González-Gómez, J. P., Castro-del Campo, N. C., Martínez-Rodríguez, C.I., Gómez-Gil, B., Chaidez, C. (2024). Detection of SARS-CoV-2 in drainage systems from tourist buses and bus station in Mexico. *Revista Bio Ciencias*, 11, e1631. <https://doi.org/10.15741/revbio.11.e1631>

This is a PDF file of an unedited manuscript that has been accepted for publication. As a service to our customers we are providing this early version of the manuscript. The manuscript will undergo copyediting, typesetting, and review of the resulting proof before it is published in its final form. Please note that during the production process errors may be discovered which could affect the content, and all legal disclaimers that apply to the journal pertain.

Este archivo PDF es un manuscrito no editado que ha sido aceptado para publicación. Esto es parte de un servicio de Revista Bio Ciencias para proveer a los autores de una versión rápida del manuscrito. Sin embargo, el manuscrito ingresará a proceso de edición y corrección de estilo antes de publicar la versión final. Por favor note que la versión actual puede contener errores de forma.

Artículo original

Detección de SARS-CoV-2 en sistemas de drenaje de autobuses y terminal de autobuses en México

Detection of SARS-CoV-2 in drainage systems from tourist buses and bus station in Mexico

SARS-CoV-2 en autobuses/SARS-CoV-2 in Buses

Medrano-Félix, J. A.¹, Lira-Morales, J. D.², González-López, I.², González-Gómez, J. P.², Castro-del Campo, N. C.², Martínez-Rodríguez, C.¹, Gómez-Gil, B.³, Chaidez, C.².

¹Investigadoras e Investigadores por México-Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C., Carretera a Eldorado km. 5.5, campo El Diez, zip code 80110, Culiacán, Sinaloa, México. ²Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C., Coordinación Regional Culiacán, Laboratorio Nacional para la Investigación en Inocuidad Alimentaria (LANIA). Carretera a Eldorado km. 5.5, campo El Diez, zip code 80110, Culiacán, Sinaloa, México. ³Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C., Coordinación Regional Mazatlán, Avenida Sábalo Cerritos s/n, zip code 82112, Mazatlán, Sinaloa, México.

***Corresponding Author:**

Cristóbal Chaidez, Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C., Coordinación Regional Culiacán, Laboratorio Nacional para la Investigación en Inocuidad Alimentaria (LANIA). Carretera a Eldorado km. 5.5, campo El Diez, zip code 80110, Culiacán, Sinaloa, México. Email: chaqui@ciad.mx

RESUMEN

El transporte público (aéreo, marítimo y terrestre) puede albergar individuos potencialmente positivos para COVID-19, por lo que la epidemiología basada en agua residual puede emplearse para evitar su propagación. El presente estudio se enfocó en rastrear la presencia de SARS-CoV-2 en agua residual de tanques sépticos de autobuses provenientes de destinos nacionales e internacionales, así como en el sistema de drenaje de una terminal de autobuses. La detección se realizó mediante el protocolo de PCR-Tiempo Real establecido por el Centro para el Control y Prevención de Enfermedades de los Estados Unidos. SARS-CoV-2 fue detectado en 8.88 % de las muestras de autobuses y el sistema de drenaje de la terminal (4 de 45). Las muestras positivas se secuenciaron y se identificaron las variantes Delta y Ómicron como las más prevalentes. Nuestros resultados demuestran que la epidemiología basada en aguas residuales (WBE) provee una herramienta sensible y confiable para identificar la presencia de individuos positivos para COVID-19 que arriban en autobuses a una ciudad. Asimismo, la WBE acoplada a secuenciación de genomas completos puede servir como alerta temprana para el rastreo y despliegue de medidas preventivas ante la introducción de variantes de preocupación.

PALABRAS CLAVE:

SARS-CoV-2, COVID-19, Agua Residual, Autobuses, Variantes de preocupación

ABSTRACT

Any means of public transportation (aircraft, ships, and buses) may carry potentially COVID-19-positive individuals thus, wastewater-based epidemiology should be implemented to avoid further spread. The present study was performed from February 04th to April 22nd, 2022 during the fourth COVID-19 wave in Mexico, and focused on tracing the presence of SARS-CoV-2 in wastewater from holding tanks of national and international route buses, as well as the drainage system at the bus station. Testing was performed by the RT-PCR protocol established by the United States Center for Disease Control and Prevention. SARS-CoV-2 was detected in 8.88 % of the wastewater samples from buses and drainage systems (4 of 45). Positive samples were sequenced, and Delta and Omicron were among the most prevalent variants. Our results show that wastewater-based epidemiology (WBE) provides a reliable and sensitive tool for spotting the possible presence of COVID-19-positive individuals arriving by bus to a city. Also, the WBE coupled with whole-genome sequencing may serve as an early warning to trace and display preventative measures upon the introduction of variants of concern.

KEYWORDS:

SARS-CoV-2, variants of concern, wastewater, buses.

Introducción

El virus SARS-CoV-2, es el agente etiológico de la enfermedad COVID-19, la cual fue declarada evento pandémico en marzo de 2020 (WHO, 2020a) debido a su impacto en la salud humana en todo el mundo, llegando a más de 114 países (WHO, 2023). Para febrero de 2023, esta enfermedad había causado alrededor de 757.264.511 casos confirmados y más de 6.850.594 de muertes. A pesar de que el origen del COVID-19 fue en China, específicamente en Wuhan, Hubei, Europa y América fueron las regiones más afectadas (WHO, 2023). La carga de este virus puede atribuirse a su alta transmisibilidad, utilizando varias vías, como el contacto personal, gotitas de saliva, transporte aéreo, fómites, transmisión fecal-oral, transmisión sanguínea, transmisión de madre a hijo y la transmisión de animales a humanos (WHO, 2020b).

Los síntomas de COVID-19 incluyen fiebre o escalofríos, tos, fatiga, dolor de garganta, congestión o secreción nasal, pérdida del gusto o del olfato, neumonía y diarrea. Los virus se transmiten a través de gotitas de saliva y/o heces. Por tal motivo, las aguas residuales son ideales para rastrear el virus o su material genético en comunidades (Ghimire *et al.*, 2021; Megyeri *et al.* 2021; Poeta *et al.*, 2022). En este sentido, la vigilancia de las aguas residuales puede aplicarse como una medida de mitigación adecuada y, por lo tanto, no hay excusa para que un brote se convierta en algo más que un brote. Por ejemplo, la epidemiología basada en aguas residuales (WBE, por sus siglas en inglés) es una herramienta especialmente útil para la alerta temprana de brotes de COVID-19 en grandes comunidades, tal como lo demostraron anteriormente Basavaraju *et al.* (2021). Adicionalmente, las personas que viajan en aviones y cruceros pueden ser monitoreadas de manera discreta e indirecta durante el viaje. Ahmed *et al.* (2020) y Ahmed *et al.* (2022) han evaluado la presencia del virus en vuelos internacionales y/o cruceros con tanques de aguas residuales. De esta manera, en cualquier medio de transporte se pueden aplicar las herramientas de WBE (Ahmed *et al.*, 2020; Ahmed *et al.*, 2022). Los autobuses, por ejemplo, son uno de los principales medios de transporte a nivel mundial. En muchos países, un gran número de personas utilizan los autobuses para desplazarse de una ciudad a otra de manera cotidiana.

De acuerdo con las diferentes opiniones y percepciones sobre la seguridad o el riesgo de transmisión del SARS-CoV-2 en espacios cerrados como el transporte público, se han realizado varios estudios enfocados en la detección de ARN viral en diversas matrices ambientales como

aerosoles, sistemas de filtración de aire, superficies como pasamanos, botones y manijas de asientos en autobuses, estaciones de trenes y autobuses, detectando la presencia del virus en todas las muestras mencionadas (Caggiano *et al.*, 2021; Singh *et al.*, 2021; Hoffman *et al.*, 2022; Gomes da Silva 2022). El desarrollo de este tipo de estudios contribuye a comprender y estimar el riesgo potencial de la presencia de pasajeros conscientes o inconscientes de ser positivos para COVID-19, factor de transmisión del SARS-CoV-2 en el transporte público; por esa razón, el propósito de este estudio fue detectar la presencia de ARN del SARS-CoV-2 en agua residual de tanques contenedores de sanitarios de autobuses nacionales e internacionales.

Material y métodos

Recolección de muestras

Este estudio se realizó del 04 de febrero al 22 de abril de 2022 en Culiacán, Sinaloa, México, en la estación internacional de autobuses, la cual recibe autobuses y pasajeros de casi todos los 32 estados de la República Mexicana, incluyendo algunos destinos internacionales de los Estados Unidos de América, tales como Arizona, California y Nevada. Durante el estudio, que incluyó la cuarta ola de COVID-19 en México, la estación de autobuses mostró una ocupación mensual de 193.718 personas en febrero, 229.900 en marzo y 246.969 en abril; con una ocupación máxima diaria de 13.401 personas, respectivamente. La recolección de muestras comenzó el 4 de febrero y continuó semanalmente hasta el 22 del mismo mes.

En este estudio se analizaron un total de 45 muestras de un litro, las cuales fueron recolectadas estratégicamente del sistema de drenaje de WC principal de la estación de autobuses y del tanque contenedor de sanitarios de autobuses nacionales e internacionales. La selección de los autobuses para la muestra se realizó de la siguiente manera: una recolección inicial de muestras para observar el contenido de los tanques contenedores de los autobuses de viaje preferiblemente largos y sin escala, para garantizar que los tanques no hayan sido previamente lavados o vaciados durante el viaje, con el fin de recolectar muestras con abundancia de materia fecal y descartar todas las muestras con únicamente orina. Otro criterio fue la notoria ausencia de compuestos inactivadores, dicha presencia se evidencia por color y aroma en las aguas residuales, estos criterios para la recolección de muestras se establecieron para aumentar las probabilidades de detectar SARS-CoV-2 en las muestras. Las muestras fueron transportadas en condiciones de refrigeración al laboratorio para su procesamiento.

Concentración de la muestra

La concentración de la muestra se realizó por precipitación utilizando polietilenglicol (PEG 6000) 20%/2,5M NaCl (Sapula *et al.*, 2021). Brevemente, las muestras se purificaron inicialmente por centrifugación a 10.000 g durante 10 min a 4 °C, utilizando frascos estériles de polipropileno de 250 mL. Después de la centrifugación, las muestras se procesaron mediante filtración secuencial por membrana utilizando membranas de nitrocelulosa de 0,65, 0,45 y 0,22 mm de diámetro de poro (Millipore, EE. UU.) acopladas a un sistema de vacío (miliporo, EE. UU.). A partir de la muestra filtrada, se mezcló un volumen de 200 mL con 50 mL de solución de NaCl PEG 6000/2,5 M y centrifugación para una resuspensión final con 2 mL de PBS y centrifugación final a 14.000 g durante 10 min a 4 °C para recuperar el sobrenadante (Lu *et al.*, 2020; Sapula *et al.*, 2021).

Extracción e identificación de ARN por PCR en tiempo real

A partir de las muestras concentradas, la extracción de ARN se realizó utilizando el protocolo basado en columna QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen, Alemania) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La retrotranscripción del ARN viral y la PCR se realizó mediante RT-qPCR de 1 paso GoTaq® utilizando el kit de detección CDC detection 2019-nCov, de acuerdo con las instrucciones

del fabricante utilizando el gen N1 como marcador de SARS-CoV-2 y el marcador RP como control del proceso en cada muestra (Integrated DNA Technologies IDT, USA). La reacción de RT-PCR en tiempo real se realizó en un termociclador CFX 96 (Biorad). Las muestras positivas se procesaron para su posterior secuenciación en CIAD subselección Mazatlán, utilizando el kit Nextera XT para la preparación de bibliotecas genómicas (Illumina, San Diego, CA, EE. UU.) de acuerdo con las instrucciones del fabricante, y secuenciadas por la plataforma Illumina Miniseq (Illumina, San Diego, CA, EE. UU.).

Análisis filogenéticos

A partir de muestras secuenciadas positivas para SARS-CoV-2, se realizó un análisis filogenético para comparar la similitud con otras secuencias distribuidas en México y el estado de Sinaloa. Se realizaron alineaciones múltiples (parámetros predeterminados) y un árbol filogenético (neighbor-joining con un valor de Bootstrap de 1000) con MAFFT 7. El árbol filogenético fue editado con iTOL v6 (Interactive Tree of Life). Los resultados del análisis filogenético se basan en metadatos asociados a 71 secuencias disponibles del 1 al 28 de febrero de 2022 y accesibles en [10.55876/gis8.230131pv](https://doi.org/10.55876/gis8.230131pv) (Tabla complementaria 1).

Resultados y discusión

Detección de SARS-CoV-2 en tanques de retención

Los resultados para los tanques de autobuses, mostraron la presencia del ARN de SARS-CoV-2 en dos muestras de autobuses de origen nacional y un autobús internacional (Figura 1). Los resultados de la presente investigación es la primera investigación enfocada en determinar la presencia de ARN de SARS-CoV-2 en las aguas residuales de los autobuses turísticos. Estudios previos han detectado la presencia de ARN de SARS-CoV-2 en aguas residuales de aviones y cruceros, lo que sugiere que la vigilancia basada en aguas residuales es una herramienta útil para la detección de pasajeros positivos (Ahmed *et al.*, 2020; Ahmed *et al.*, 2022). Sin embargo, es importante establecer como limitación en este estudio que la detección de ARN viral no garantiza necesariamente la presencia de partículas virales infecciosas en los tanques de retención.

La presencia de ARN de SARS-CoV-2 en los tanques contenedores evidencia la existencia de al menos un pasajero infectado con el virus, lo que representa un riesgo potencial para la salud del resto de los pasajeros, dada la transmisibilidad del SARS-CoV-2, en combinación con la ausencia de sistemas filtros HEPA y la acumulación de personas en un espacio cerrado como un autobús por tiempo prolongado. En este sentido, algunos estudios enfocados en la evaluación del riesgo de transmisibilidad del SARS-CoV-2, indican que respirar y hablar por parte de una persona infectada en autobuses públicos puede representar un riesgo potencial de transmisión entre las personas (Bertone *et al.*, 2022). Como sabemos, una persona inicia todo un brote que puede provocar un comportamiento de tipo pandémico si está presente una nueva variante; posteriormente, una semana para incapacitar a una ciudad; un mes en todo el país, y dos meses en todo el mundo (Musa *et al.*, 2020; Arantes *et al.*, 2023; Eales *et al.*, 2023).

Detección de SARS-CoV-2 en sistema de drenaje

Los resultados del sistema de drenaje mostraron la presencia de ARN de SARS-CoV-2 en una sola muestra (1 de 12) (Figura 1). La detección de ARN de SARS-CoV-2 en el sistema de drenaje permite sugerir que al menos una persona infectada estuvo en contacto con los usuarios y empleados de la estación de autobuses, lo que representa un riesgo potencial para la salud de las personas dada la alta transmisibilidad del SARS-CoV-2, la ausencia de sistemas de filtración de aire y el contacto continuo entre personas en una estación de autobuses o dentro de un autobús (Bertone

et al., 2022; Denpetkul *et al.*, 2022). Park y Kim (2021) evaluaron el riesgo de transmisión del SARS-CoV-2 en autobuses públicos, estimando alrededor de 0,609 a 0,909 % de riesgo de nuevas infecciones, los cuales aumentan según la ocupación y los espacios separados en el autobús.

Los resultados de este estudio permiten sugerir que el método de concentración/filtración de PEG es una herramienta útil para la identificación del SARS-CoV-2 en muestras de aguas residuales (Lu *et al.*, 2020; Sapula *et al.*, 2021). Thongpradit *et al.* (2022) sugieren que el método de filtración es sensible para la detección del SARS-CoV-2 en aguas residuales. La presencia de este virus en esta matriz puede verse influenciada o afectada por la temperatura ambiental, independientemente de la capacidad de sedimentación por movimiento browniano, lo que se refiere a una baja prevalencia de COVID-19, siendo útil para el monitoreo de aguas residuales para prevenir la propagación viral en una comunidad (Bivins *et al.*, 2020; Haramoto *et al.*, 2020; D'Aoust *et al.*, 2021; Mitic *et al.*, 2021).

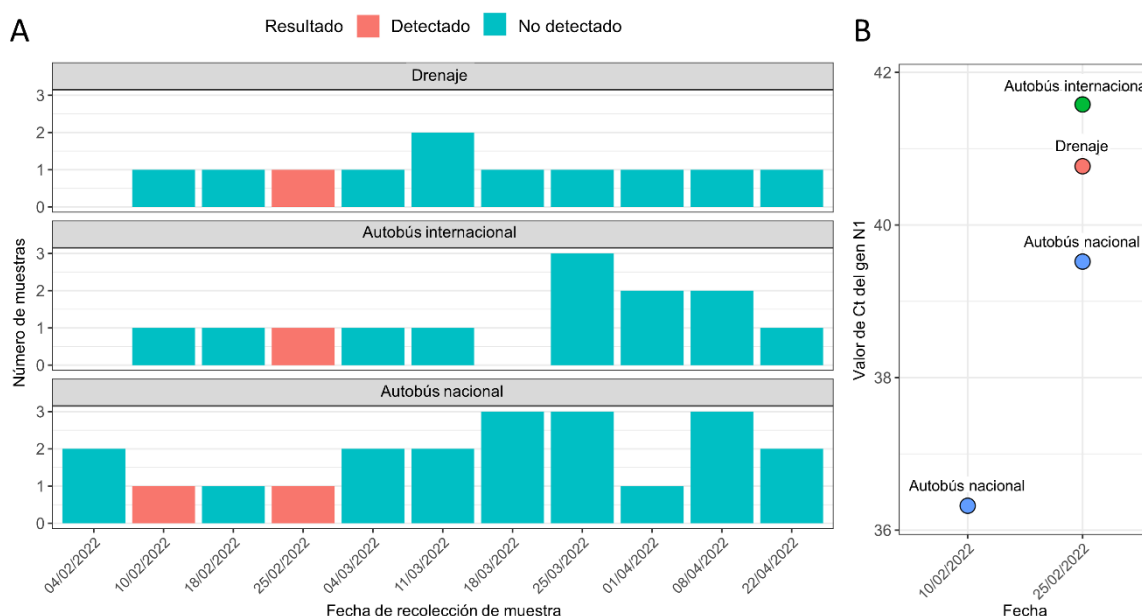


Figura 1.- Detección de ARN del SARS-CoV-2 en aguas residuales en cada fecha de recolección de muestras. A: tipo de muestra (autobús internacional, contenedores de autobuses nacionales y sistema de drenaje de la estación de autobuses), B: Valor de Ct para el gen N1 en muestras positivas, máximo Ct 42 para considerar como positivo.

La presencia de SARS-CoV-2 en el transporte público ha sido ampliamente estudiada a nivel mundial, centrándose en la detección de diferentes tipos de matrices. Hoffman *et al.* (2022) detectaron 5/37 muestras positivas de filtros de aire en autobuses públicos en Seattle, Washington, EE. UU.; sus resultados sugieren que la identificación del ARN de SARS-CoV-2 en los sistemas de filtración de aire del transporte público puede servir como indicador para la detección de la presencia viral, para comprender mejor la transmisión de partículas virales en el transporte público.

En Italia, Caggiano *et al.* (2021) estudiaron la presencia de SARS-CoV-2 en pasamanos, botones de parada y manijas junto a asientos de superficies de autobuses y trenes, detectando un mayor porcentaje de muestras positivas en autobuses (19,3 %) en comparación con trenes (2 %), siendo las manijas cercanas a asientos y botones las superficies más contaminadas, lo que indica la

necesidad de mejorar los procedimientos de saneamiento en el transporte público. Gomes da Silva *et al.* (2022) detectaron la presencia de SARS-CoV-2 en superficies y muestras de aire del sistema de transporte público en Portugal, detectando la presencia de SARS-CoV-2 en 2 muestras de aire, y por el contrario, no fue posible detectar muestras de superficie positivas, sugiriendo que el uso adecuado de mascarillas es efectivo para prevenir la transmisión del SARS-CoV-2 entre las personas en el sistema de transporte público. El porcentaje de muestras positivas en nuestro estudio osciló alrededor del 9 % del total de muestras, lo que coincide con estudios previos que oscilan entre el 2 y el 19 % de muestras positivas, lo que puede suponer un riesgo potencial para los pasajeros en presencia de al menos una persona infectada durante la cuarta ola de COVID-19. Un dato importante para este tipo de estudios es la viabilidad del ARN del SARS-CoV-2 en aguas residuales, el cual es posible detectar durante 62 días aguas residuales, sugiriendo la estabilidad del ARN viral para futuros estudios (Lira-Morales *et al.*, 2023a)

Tsuchihashi *et al.* (2021) detectaron la transmisión del SARS-CoV-2 entre personas durante un recorrido en autobús en Japón, lo que puede ocurrir como producto del contacto directo o indirecto. En dicho estudio fue posible detectar a las personas infectadas en diferentes posiciones de los asientos de los autobuses. Sin embargo, la transmisibilidad de partículas virales por bioaerosoles, como gotitas, puede contribuir a la infección de los pasajeros, independientemente de su ubicación en el autobús. Por esa razón, las empresas de autobuses deben enfatizar sus esfuerzos para mejorar la higiene y el saneamiento, así como la ventilación en los autobuses.

Los estudios apoyan la idea de la utilidad de la detección de ARN viral del SARS-CoV-2 en aguas residuales para realizar estudios epidemiológicos, denominando a esta línea de investigación como "epidemiología basada en aguas residuales". Singh *et al.* (2021) sugieren la importancia de la detección del SARS-CoV-2 en aguas residuales para acelerar el diagnóstico masivo de COVID-19 y el desarrollo de medidas de control como la desinfección en plantas de tratamiento de aguas residuales durante pandemias virales. Basavaraju *et al.* (2021) han sugerido un doble propósito para el estudio del coronavirus en aguas residuales, incluyendo la detección temprana de brotes y la estimación de personas infectadas, para mitigar el impacto de esta enfermedad en una comunidad.

Coronado *et al.* (2021) detectaron la presencia de SARS-CoV-2 en aguas residuales de la Ciudad de México, mostrando la presencia en 6 muestras del río y cinco muestras de agua de riego, relacionando la mayor concentración viral en muestras con la cercanía a la Ciudad de México. González-Reyes *et al.* (2021) sugieren el uso de la epidemiología basada en aguas residuales en combinación con el análisis matemático para el estudio del SARS-CoV-2 en la Ciudad de México para determinar con mayor precisión el rango de positividad para COVID-19 entre las personas. Sus resultados sugieren el estudio de las aguas residuales junto con análisis estadísticos como la simulación Monte Carlo para evaluar la prevalencia de personas infectadas en un escenario espacio temporal como un "método de monitoreo de pandemias".

Cerrada-Romero *et al.* (2022) detectaron ARN del SARS-CoV-2 en muestras de heces en 27 de 62 pacientes con COVID-19, los cuales mostraron positividad hasta 3-4 semanas después de la aparición de los síntomas, curiosamente, detectando valores de ct más bajos para las muestras nasofaríngeas en comparación con las heces. Sin embargo, la detección de material genético no significa la presencia de viriones infecciosos viables, sino que también puede ser una herramienta útil para detectar la propagación de personas infectadas, lo que significa un riesgo potencial para la salud por transmisión del virus como producto del contacto cercano entre personas.

Carteni *et al.* (2021) estudiaron la relación entre el transporte público y la ocurrencia de casos de COVID-19 en Italia, detectando una alta correlación de 0,87 entre los contagios de COVID-19 y el uso del transporte público, sugiriendo la necesidad de cuarentena durante al menos dos semanas para las personas infectadas y así disminuir el aumento de casos.

El dato más interesante de este estudio es que, a partir de los resultados, existe una fuerte relación entre el aumento de nuevos casos en 22 días como producto del uso del transporte público

o que los datos relacionados con el transporte público y la aparición de nuevos casos de COVID-19 se reflejarán después de 22 días (Carteni *et al.*, 2021). Sin embargo, existe un tema importante a considerar en la epidemiología basada en aguas residuales, como es la disposición final de las aguas residuales de los tanques contenedores de autobuses, las cuales, al menos en nuestra área de estudio, se liberan directamente en el sistema de drenaje público sin un tratamiento previo de inactivación. Este proceso se puede observar de dos maneras, la primera es la liberación de aguas residuales no tratadas contaminadas con SARS-CoV-2 en la red de drenaje municipal, lo que puede representar un riesgo potencial para la salud de las personas en contacto con estas aguas, y la segunda es la alteración de los valores de ARN del SARS-CoV-2 en las aguas residuales municipales, lo que puede llevar a resultados de estimación no precisos de la presencia de SARS-CoV-2 con el propósito de epidemiología basada en aguas residuales.

Curiosamente, todas las muestras positivas en este estudio se detectaron solo el 10 y 25 de febrero, que fue un mes crítico dado el incremento de casos en México. Para la semana del 14 de febrero se registraron 5 millones 658 mil 047 casos confirmados, mientras que para la semana de febrero se reportaron 5 millones 715 mil 880 casos confirmados, siendo Ómicron la variante predominante. En este sentido, de las cuatro muestras positivas, se secuenció una muestra, depositada en la base de datos GISAID (Elbe *et al.*, 2017; Khare *et al.*, 2021; Shu *et al.*, 2017), y se informó como VOC Omicron (Variant Of Concern), B.1.1.529+BA (Accession ID EPI_ISL_10953115, tipo betacoronavirus, clado GRA, linaje Pango: BA.1.1), que según la base de datos esta variante viral se detectó por primera vez en Botsuana/Hong Kong/Sudáfrica. Con base en datos reportados por GISAID (2022), durante octubre de 2022, existe un registro de VOC Ómicron en México, registrando un total de 32.149 genomas/cepas circulantes, mientras que para el periodo de estudio, los datos de cepa Ómicron en México oscilaron entre el 98.5 % del 5 de febrero y el 100 % del 27 de abril de 2022. Al respecto, la secuencia reportada en este estudio concuerda con la tendencia y la abundancia de la variante Ómicron a nivel mundial, por lo que no fue la excepción para México y el estado de Sinaloa; el comportamiento de las secuencias para esta variante fue muy interesante durante el periodo de este estudio, Lira-Morales *et al.* (2023b) reportaron que la variante Ómicron en México fue predominante desde finales de diciembre de 2021 hasta noviembre de 2022, con el pico más alto en enero, febrero, junio, julio y agosto, lo cual incluyó el periodo de nuestro estudio.

Análisis filogenético del ARN del SARS-CoV-2 en aguas residuales

El análisis filogenético revela la similitud de la secuencia recuperada del agua de los autobuses en este estudio con las reportadas previamente en México. Esta secuencia fue depositada en GISAID (Iniciativa Global para Compartir Todos los Datos de Influenza) con un número de acceso EPI_ISL_10953115 y caracterizada como la variante Ómicron, la cual fue comparada con 71 secuencias, que fueron recuperadas de Sinaloa, México del 1 al 28 de febrero (Figura 2). Curiosamente, las 72 secuencias se identificaron como la variante ómicron, con dos clados principales observados en el árbol filogenético: uno perteneciente al linaje Pango BA.1.15 y el otro a varios linajes Pango. El pariente más cercano de la secuencia reportada en este estudio se encontró en un hisopado de cama de hospital, también de Culiacán, lo que destaca la prevalencia de secuencias similares a pesar de las diferencias en las fuentes de aislamiento dentro de esta ciudad. Las secuencias se distribuyeron por todo el árbol, independientemente de la ubicación y la institución informante, lo que sugiere una distribución homogénea de las cepas de Ómicron entre los individuos en este estado. El transporte público pudo haber servido como una fuente potencial de transmisión de partículas virales entre las poblaciones nacionales y extranjeras que viajan dentro del estado de Sinaloa.

Se han realizado estudios previos para detectar variantes de preocupación en las aguas residuales municipales (Nemudryi *et al.*, 2020). Swift *et al.* (2021) detectaron la presencia de variantes como Iota, Delta y Gamma en aguas residuales de Carolina del Sur, EE. UU., lo que indica que la WBE para el SARS-CoV-2 puede proporcionar señales preliminares de alerta temprana sobre

la presencia de variantes preocupantes en una comunidad; Curiosamente, es notable la detección de ARN viable de SARS-CoV-2 en aguas residuales, a pesar de las limitaciones es posible obtener ARN de calidad suficiente para la secuenciación y detección de mutaciones para identificar variantes de preocupación. Otros estudios han consolidado la importancia de la epidemiología basada en aguas residuales para la detección de SARS-CoV-2, sugiriendo que es posible detectar la presencia de SARS-CoV-2 en espacios reducidos como un dormitorio, incluyendo sintomáticos y asintomáticos, siendo posible la detección de variantes como el sublinaje B.1.5, previamente detectado en Europa. Los resultados de este estudio nos permiten remarcar la necesidad de un monitoreo enfocado en la epidemiología basada en aguas residuales para evaluar la incidencia de patógenos antes de la notificación de casos en una comunidad, lo que puede servir como herramienta para mejores estrategias de acciones preventivas o correctivas, sugiriendo la posibilidad de acoplar WBE con secuenciación de genomas completos (WGS) para rastrear no solo COVID-19, sino también variantes de preocupación.

ARTÍCULO EN PRENSA



Figura 2.- Árbol filogenético de neighbor-joining para las secuencias de SARS-CoV-2 reportadas en GISAID de febrero de 2022 en Sinaloa, México. La secuencia resaltada fue aislada en este estudio.

Conclusiones

El presente estudio revela la presencia de SARS-CoV-2 en autobuses nacionales e internacionales y en una estación de autobuses, lo que pone de manifiesto la importancia del estudio de las aguas residuales para inferir la presencia y distribución de virus y la introducción de nuevas variantes entre las personas para establecer la trazabilidad de los patógenos para escenarios futuros. Adicionalmente, es necesario enfatizar la importancia de las medidas de higiene personal como el lavado de manos, uso de gel desinfectante y cubrebocas, dada la probabilidad de interactuar con pasajeros positivos para SARS-CoV-2 durante su recorrido, lo cual es un alto riesgo para la salud humana dada su transmisibilidad y la dispersión de patógenos entre las personas. El presente estudio sugiere que el rastreo del virus en las aguas residuales es una herramienta confiable y sensible que puede ser útil como sistema de alerta temprana para brotes comunitarios y la introducción de nuevas variantes de virus reproductivos y/o entéricos.

Contribución de los autores

J.A.M.F.- Conceptualización y redacción del borrador original, análisis formal y figuras. J.D.L.M.- Metodología, análisis formal y figuras. I.G.L.- Metodología. J.P.G.G.- Metodología y cifras. N.C.C.- Supervisión, redacción y edición. C.I.M.R.- Metodología. B.G.G.- Metodología. C.C.- Supervisión, redacción y edición.

Financiamiento

Los autores agradecen al Consejo Mexicano de Humanidades, Ciencia y Tecnología (CONAHCYT) por el apoyo financiero, Número de apoyo: 313522 y 321179.

Declaraciones éticas

No aplica.

Declaración de consentimiento informado

No aplica.

Agradecimientos

Agradecemos a todos los contribuyentes de datos, es decir, a los autores y sus laboratorios de origen responsables de la obtención de los especímenes, y a sus laboratorios remitentes por generar la secuencia genética y los metadatos y compartirlos a través de la Iniciativa GISAID, en la que se soporta esta investigación. Los autores agradecen al Consejo Mexicano de Humanidades, Ciencia y Tecnología (CONAHCYT) por el apoyo financiero Número: 313522 y 321179. Los autores también agradecen a Vianey Araceli Verdugo Arredondo por el apoyo técnico.

Conflicto de interés

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Referencias

- Ahmed, W., Bertsch, P.M., Angel, N., Bibby, K., Bivins, A., Dieners, L., Edson, J., Ehret, J., Gyawali, P., Hamilton, K.A., Hosegood, I., Hugenholtz, P., Jiang, G., Kitajima, M., Sichani, H.T., Shi, J., Shimko, K.M., Simpson, S.L., Smith, W.J.M., Symonds, E.M., Thomas, K.V., Verhagen, R., Zaugg, J., & Mueller, J.F. (2020). Detection of SARS-CoV-2 RNA in commercial passenger aircraft and cruise ship wastewater: a surveillance tool for assessing the presence of COVID-19 infected travellers. *Journal of Travelers Medicine*, 27(5),1-11. <https://doi.org/10.1093/jtm/taaa116>
- Ahmed, W., Bivins, A., Simpson, S.L., Bertsch, P.M., Ehret, J., Hosegood, I., Metcalfe, S.S., Smith, W.J.M., Thomas, K.V., Tynan, J., & Mueller, F.F. (2022). Wastewater surveillance demonstrates high predictive value for COVID-19 infection on board repatriation flights to Australia. *Environment International*, 158,106938. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2021.106938>
- Arantes, I., Bello, G., Nascimento, V., Souza, V., da Silva, A., Silva, D., Nascimento, F., Mejia M., Brandao, J.M., Gonçalves L., Silva, G., Fernandes da Costa, C., Abdalla, L., Santos, V.H., Amorim Ramos, T.C., Piantham, C., Ito, K., Mendoça Siqueira, M., Resende, P.C., Wallau, G.L., Delatorre, E., Gräf, T., & Naveca, F.G. (2023). Comparative epidemic expansion of SARS-CoV-2 variants Delta and Omicron in the Brazilian state of Amazonas. *Nature communications*, 14,2048. <https://doi.org/10.1038/s41467-023-37541-6>
- Basavaraju, S., Aswathanarayan, J.B., Basavegowda, M., & Somanathan, B. (2021). Coronavirus: Occurrence, surveillance and persistence in wastewater. *Environmental Monitoring and Assessment*, 193,508. <https://doi.org/10.1007/s10661-021-09303-8>
- Bertone, M., Mikszewski, A., Stabile, L., Riccio, L., Cortellesa, G., d'Ambrosio, F.R., Papa, V., Morawska, L., & Buonanno, G. (2022). Assessment of SARS-CoV-2 airborne infection transmission risk in public buses. *Geoscience Frontiers* 13(6), 101398. <https://doi.org/10.1016/j.gsf.2022.101398>
- Bivins, A., Greaves, J., Fischer, R., Yinda, K. C., Ahmed, W., Kitajima, M., Munster, V.J., & Bibby, K. (2020). Persistence of SARS-CoV-2 in Water and Wastewater. *Environmental Science & Technology Letters*, 7(12), 937-942. <https://doi.org/10.1021/acs.estlett.0c00730>
- Caggiano, G., Apollonio, F., Triggiano, F., Diella, G., Stefanizzi, P., Lopuzzo, M., D'Ambrosio, M., Bartolomeo, N., Barbuti, G., Sorrenti, G.T., Magarelli, P., Sorrenti, D.P., Marcotrigiano, V., De Gilio, O., & Montagna, M.T. (2021). SARS-CoV-2 in the public transport in Italy. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 18(21), 11415. <https://doi.org/10.3390/ijerph182111415>
- Carteni, A., Di Francesco, L., Henke, I., Marino, T.V., & Falanga, A. (2021). The role of public transport during the second COVID-19 wave in Italy. *Sustainability*, 13(21),11905. <https://doi.org/10.3390/su132111905>
- Cerrada-Romero, C., Berastegui-Cabrera, J., Camacho-Martínez, P., Goikoetxea-Aguirre, J., Pérez-Palacios, P., Santibáñez, S., Blanco-Vidal, M.J., Valiente, A., Alba, J., Rodríguez-Álvarez, R., Pascual, A., Oteo, J.A., Cisneros, J.M., Pachón, G., Casas-Flecha, I., Cordero, E., Pozo, F., & Sánchez-Céspedes, J. (2022). Excretion and viability of SARS-CoV-2 in feces and its association with the clinical outcome of COVID-19. *Scientific Reports*, 12,7379. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-11439-7>
- Coronado, Y., Navarro, R., Mosqueda, C., Valenzuela, V., Pérez, J.P., González-Mendoza, V., de la Torre, M., & Rocha, J. (2021). SARS-CoV-2 in wastewater from Mexico City used for irrigation in the Mezquital Valley: quantification and modeling of geographic dispersion. *Environmental Monitoring*, 68,580-590. <https://doi.org/10.1007/s00267-021-01516-4>
- D'Aoust, P.M., Graber, T.E., Mercier, E., Montpetit, D., Alexandrov, I., Neault, N., Baig, A.T., Mayne, J., Zhang, X., Alain, T., Servos, M.R., Srikanthan, N., MacKenzie, M., Figeys D., Manuel, D., Jüni, P., MacKenzie A., & Delatolla, R. (2021). Catching a resurgence: Increase in SARS-CoV-2 viral RNA identified in wastewater 48 h before COVID-19 clinical tests and 96 h before hospitalizations. *Science of the Total Environment*, 770, 145319. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.145319>
- Denpetkul, T., Pumkaew, M., Sittipunsakda, O., Leangwutiwong, P., Mongkolsuk, S., & Sirikanchana, K. (2022). Effects of face masks and ventilation on the risk of SARS-CoV-2 respiratory transmission in public toilets: a quantitative microbial risk assessment. *Journal of Water and Health*, 20 (2), 300. <https://doi.org/10.2166/wh.2022.190>
- Eales, O., Page, A.J., Tang, S.N., Walters, C.E., Wang, H., Haw, D., Trotter, A.J., Le Viet, T., Foster-Nyarko, E., Prosolek, S., Atchinson, C., Ashby, D., Cooke, G., Barclay, W., Donnelly, C.A., O'Grady, J., Volz, E., The COVID-19 Genomics UK (COG-UK) Consortium, Darzi, A., Ward, H., Elliot, P., & Riley, S. (2023). The use of representative community samples to assess SARS-CoV-2 lineage competition: Alpha outcompetes Beta and wild-type in England from January to March 2021. *Microbial Genomics*, 9,000887. <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000887>
- Elbe, S. & Buckland-Merret, G. (2017). Data, disease and diplomacy: GISAID's innovative contribution to global health. *Global Challenges*, 1(1),33-46. <https://doi.org/10.1002/gch2.1018>
- Ghimire, S., Sharma, S., Patel, A., Budhathoki, R., Chakinala, R., Khan, H., Lincoln, M., & Georgeston, M. (2021). Diarrhea is associated with increased severity of disease in COVID-19: systemic review and metaanalysis. *SN Comprehensive Clinical Medicine*, 3,28-35. <https://doi.org/10.1007/s42399-020-00662-w>
- GISAID, (2022). <https://gisaid.org/hcov19-variants/>. Accession date, October 28th 2022.
- Gomes da Silva, P., Gonçalves, J., Nascimento M.S.J., Sousa, S.I., & Mesquita, J.R. (2022). Detection of SARS-CoV-2 in the indoor and outdoor areas of urban public transport systems of three major cities of Portugal in 2021. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 19(10), 5955. <https://doi.org/10.3390/ijerph19105955>
- González-Reyes, J.R., Hernández-Flores, M.L., Paredes-Zarco, J.E., Téllez-Jurado, A., Fayad-Meneses, O., & Carranza-Ramírez, L. (2021). Detection of SARS-CoV-2 in wastewater northeast of Mexico City: Strategy for monitoring

- and prevalence of COVID-19. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 18(16), 8547. <https://doi.org/10.3390/ijerph18168547>
- Haramoto, E., Malla, B., Thakali, O., & Kitajima, M. (2020). First environmental surveillance for the presence of SARS-CoV-2 RNA in wastewater and river water in Japan. *Science of The Total Environment*, 737, 140405. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.140405>
- Hoffman, J.S., Hirano, M., Panpradist, N., Breda, J., Ruth, P., Xu, Y., Lester, J., Nguyen, B.H., Ceze, L., & Patel, S.N. (2022). Passively sensing SARS-CoV-2 RNA in public transport buses. *Science of the Total Environment*, 821, 152790. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.152790>
- Khare, S., Gurry, C., Freitas, L., Schultz, M. B., Bach, G., Diallo, A., Akite, N., Ho, J., Lee, R.T.C., Yeo, W., GISAID Core Curation Team, & Maurer-Stroh, S. (2021). GISAID's role in pandemic response. *China CDC weekly*, 3(49), 1049-1051. <https://doi.org/10.46234/ccdcw2021.255>
- Lira-Morales, J.D., Medrano-Félix, J.A., Martínez-Rodríguez, C.I., Castro-del Campo, N., & Chaidez C. (2023a) Disminución del RNA de SARS-CoV-2 en matrices acuáticas ambientales. *Revista Biociencias*, 10 e1529. <https://doi.org/10.15741/revbio.10.e1529>
- Lira-Morales, J.D., López-Cuevas, O., Medrano-Félix, J.A., González-Gómez, J.P., González-López, I., Castro-del Campo, N., Gomez-Gil, B., & Chaidez, C. (2023b) Genomic Surveillance of SARS-CoV-2 in México: Three Years since Wuhan, China's First Reported Case. *Microorganisms*, 5, 2223. <https://doi.org/10.3390/v15112223>
- Lu, D., Huang, Z., Luo, J., Zhang, X., & Sha, S. (2020). Primary concentration- The critical step in implementing the wastewater based epidemiology for the COVID-19 pandemic: A mini-review. *Science of the Total Environment*, 747, 141245. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.141245>
- Megyeri, K., Dernovics, A., Al-Luhaibi Z.I., & Rosztóczy. (2021). COVID-19-associated diarrhea. *World Journal of Gastroenterology*, 27 (23), 3208-3222. <https://dx.doi.org/10.3748/wjg.v27.i23.3208>
- Mitic, V., Lazovic, G., Milosevic, D., Ristanovic, E., Simeunovic, D., Tsay, C., Milosevic, M., & Vlahovic, C. (2021). Brownian fractal nature coronavirus motion. *Modern Physics Letters B*, 35 (4), 2150076. <https://doi.org/10.1142/S0217984921500767>
- Musa, S.S., Zhao, S., Wang, M.H., Habib, A.G., Mustapha, U.T., & He, D. (2020). Estimation of exponential growth rate and basic reproduction number of the coronavirus disease 2019 (COVID-19) in Africa. *Infectious Diseases of Poverty*, 9, 96. <https://doi.org/10.1186/s40249-020-00718-y>
- Nemudryi, A., Nemudraia, A., Wiegand, T., Surya, K., Buyukyoruk, M., Cicha, C., Vanderwood, K.K., Wilkinson, R., & Wiedenheft, B. (2020). Temporal detection and phylogenetic detection of SARS-CoV-2 in municipal wastewater. *Cell Reports Medicine*, 1(6), 100098. <https://doi.org/10.1016/j.xcrm.2020.100098>
- Park, J., & Kim, G. (2021). Risk of COVID-19 infection in public transportation: The development of a model. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 18(23), 12790. <https://doi.org/10.3390/ijerph182312790>
- Poeta, M., Cioffi, V., Buccigrossi, V., Corcione, F., Peltrini, R., Amoresano, A., Magurano, F., Viscardi, M., Fusco, G., Tarallo, A., Damiano, C., Lo Vecchio, A., Bruzzese, E., & Guarino, A. (2022). SARS-CoV-2 causes secretory diarrhea with an enterotoxin-like mechanism, which is reduced by diosmectite. *Heliyon*, 8(8), e10246. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e10246>
- Sapula, S.A., Whittall, J.J., Pandopulos, A.J., Gerber, C., & Venter, H. (2021). An optimized and robust PEG precipitation method for detection of SARS-CoV-2 in wastewater. *Science of the Total Environment*, 785, 147270. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.147270>
- Singh, S., Kumar, V., Kapoor, D., Dhanjal, D.S., Bhatia, S., Singh, N., Romero, R., Ramamurthy, P.C., & Singh, J. (2021). Detection and disinfection of COVID-19 virus in wastewater. *Environmental Chemistry Letters*, 19, 1917-1933. <https://doi.org/10.1007/s10311-021-01202-1>
- Shu, Y., & McCauley, J. (2017). GISAID: from vision to reality. *EuroSurveillance*, 22(13), <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2017.22.13.30494>
- Swift, C.L., Isanovic, M., Correa Velez, K. E., & Norman, S. (2021). Community-level SARS-CoV-2 sequence diversity revealed by wastewater sampling. *Science of the Total Environment*, 801, 149691. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.149691>
- Thongpradit, S., Prasongtanakij, S., Srisala, S., Kumsang, Y., Chanprasertyothin, S., Boonkongchuen, P., Pitidhamabhorn, D., Manomaipiboon, P., Somchaiyanon, P., Chandanachukala, S., & Hirunrueng, T. (2022). A simple method to detect SARS-CoV-2 in wastewater at low virus concentration. *Journal of Environmental and Public Health*, 2022, 4867626. <https://doi.org/10.1155/2022/4867626>
- Tsuchihashi, Y., Yamagishi, T., Suzuki, M., Sekizuka, T., Kuroda, M., Itoi, T., Matsumura, A., Yamada, N., Ishii, Y., Kawamura, N., Hitomi, Y., Hiroshima, T., Azuma, K., Saito, K., & Kawanishi, N. (2021). High attack rate of SARS-CoV-2 infections during a bus tour in Japan. *Journal of Travel Medicine*, 28, 8. <https://doi.org/10.1093/jtm/taab111>
- World Health Organization [WHO]. (2020a). WHO Director-General's opening remarks at the media briefing on COVID-19 - 11 March 2020. <https://www.who.int/director-general/speeches/detail/who-director-general-s-opening-remarks-at-the-media-briefing-on-covid-19---11-march-2020>. Accession date, October 26th 2022.
- World Health Organization [WHO]. (2020b). Transmission of SARS-CoV-2: implications for infection prevention precautions. <https://www.who.int/news-room/commentaries/detail/transmission-of-sars-cov-2-implications-for-infection-prevention-precautions>. Accession date, February 22nd 2023.
- World Health Organization [WHO]. (2023). WHO Coronavirus (COVID-19) dashboard. <https://covid19.who.int>. Accession date, February 24th 2023.

TABLA SUPLEMENTARIA

Disponibilidad de datos

Identificador GISAID: EPI_SET_230131pv

doi: [10.55876/gis8.230131pv](https://doi.org/10.55876/gis8.230131pv)

Todas las secuencias del genoma y los metadatos asociados en este conjunto de datos se publican en la base de datos EpiCoV de GISAID. Para ver los contribuyentes de cada secuencia individual con detalles como el número de acceso, el nombre del virus, la fecha de recopilación, el laboratorio de origen y el laboratorio de envío y la lista de autores, visite [10.55876/gis8.230131pv](https://gisaid.org/gis8.230131pv)

Captura de datos

- EPI_SET_230131pv se compone de 72 secuencias de genoma individuales.
- Las fechas de recolección van desde el 01-02-2022 al 28-02-2022;
- Los datos se recopilaron en 1 país y territorio;
- Todas las secuencias de este conjunto de datos se comparan con hCoV-19/Wuhan/WIV04/2019 (WIV04), la secuencia de referencia oficial empleada por GISAID (EPI_ISL_402124). Obtenga más información en <https://gisaid.org/WIV04>

*Información traducida del archivo generado de GISAID para el archivo "supplemental table"