



UNIVERSITAT
JAUME I



Institut Universitari
de Plaguicides
i Aigües

***“Seguimiento de la pandemia Covid19
mediante análisis de las aguas residuales.
Estudio piloto en municipios de la provincia de
Castellón (COVID_WASTEWATER)”***

Proyecto de investigación aplicada a los recursos
hídricos en la Comunidad Valenciana
Ejercicio 2020

Financiado por la Conselleria de Agricultura, Desarrollo Rural,
Emergencia Climática y Transición Ecológica.

INFORME FINAL, NOVIEMBRE 2020

EQUIPO DE TRABAJO

Felix Hernandez Hernández

Catedrático de Química Analítica, Director Instituto Universitario de Plaguicidas y Aguas (IUPA), Investigador responsable del proyecto

Lubertus Bijlsma

Investigador post-doctoral, IUPA, Vice-coordinador grupo SCORE

Marisa Rebagliato Ruso

Profesora Titular de Medicina Preventiva y Salud Pública, Unidad Pre-departamental Medicina

Rosa de Llanos Frutos

Investigadora post-doctoral del programa Beatriz Galindo, UP Medicina

Manuela Barneo Muñoz

Investigadora post-doctoral UJI, UP Medicina

Fernando Martínez García

Catedrático de Biología Celular, UP Medicina

Alberto Celma Tirado

Investigador pre-doctoral, IUPA

Juan Bellido Blasco

Sección de Epidemiología del Centro de Salud Pública de Castellón, Consorcio de Investigación Biomédica en Red-Epidemiología y Salud Pública (CIBER-ESP), Profesor Asociado, UJI

María Barberá Riera

Investigadora contratada para el proyecto

Rafael Goterris Cerisuelo

Investigador contratado para el proyecto

COLABORADORES

Ernesto Santateresa Forcada

Jefe Departamento Vertidos, FACSA

Nuria Zamorano López

Técnico I+D+i, FACSA

INDICE

- 1. Objetivos y justificación**
- 2. Introducción**
- 3. Municipios y plantas de tratamientos seleccionados**
- 4. Toma de muestras**
- 5. Análisis de las muestras**
- 6. Cálculos epidemiológicos en aguas residuales**
- 7. Obtención y tratamiento de datos epidemiológicos**
- 8. Discusión de resultados**
 - 8.1. Estudios de estabilidad y conservación de muestras**
 - 8.2. Resultados obtenidos por municipios**
 - 8.3. Aplicación de los principios de la epidemiología basada en el análisis de las aguas residuales**
 - 8.4. Muestreos 4h versus 24h**
 - 8.5. Estudio específico de brote detectado en Castellón**
 - 8.6. Estudio comparado con datos epidemiológicos**
- 9. Retos y recomendaciones**
- 10. Referencias**

Agradecimientos

1. OBJETIVOS Y JUSTIFICACIÓN

El análisis de las aguas residuales con fines epidemiológicos (WBE) ha mostrado ser una aproximación poderosa y útil que permite monitorizar hábitos y estilos de vida de una población, como por ejemplo, el consumo de drogas de abuso y nuevas sustancias psicoactivas, fármacos, alcohol, tabaco, hábitos nutricionales, prevalencia de enfermedades como cáncer de próstata, uso de esteroides anabolizantes y otros agentes de dopaje en el deporte, exposición a contaminantes como plaguicidas o ftalatos derivados de plásticos, entre otros campos. Mediante la determinación de (bio)marcadores específicos excretados en orina o heces, se puede llegar a conocer sus concentraciones en las aguas residuales urbanas. Si se conoce su estabilidad en las aguas y su metabolismo, es posible realizar estimación del consumo/exposición de las personas y, finalmente, teniendo en cuenta el número de habitantes conectados a la red de aguas residuales, se pueden normalizar los datos (por ejemplo, g/día/1000 hab), con lo que es posible establecer comparaciones entre poblaciones y estimar tendencias geográficas y en el tiempo. La obtención de datos en tiempo real y la posibilidad de realizar estudios sin implicaciones éticas, pues se puede considerar como un “test anónimo” realizado a una amplia población, ahondan aún más en la utilidad de esta aproximación. A pesar de que se trata de una disciplina relativamente reciente, WBE goza cada vez de mayor aceptación a nivel mundial y ya se considera una herramienta útil y complementaria de otras fuentes convencionales, como son la realización de encuestas y análisis/test individuales, o datos policiales (en el caso de las drogas).

El proyecto realizado ha sido coordinado por el IUPA, Instituto de Investigación de la UJI que, junto con otros seis centros de investigación europeos, fue socio fundador del grupo SCORE en 2010, el cual ha liderado y coordinado numerosos estudios basados en WBE a nivel mundial. A modo de ejemplo, los datos suministrados por el grupo SCORE en más de 60 ciudades europeas sobre estimación del consumo de drogas pasa a formar parte de la base de datos del European Center for Drugs and Drug Addiction (EMCDDA) desde hace varios años, contando con el soporte de dicho centro para sus monitoreos anuales en ciudades europeas. Los investigadores del IUPA cuentan, por tanto, con amplia trayectoria en el análisis de las aguas residuales con fines epidemiológicos, por lo que tienen la capacidad y experiencia necesarias para coordinar el proyecto COVID_WASTEWATER.

El interés y potencial de WBE, ya demostrado en diversas áreas, justifica su exploración en un campo menos estudiado como es el del control de enfermedades víricas. Los datos existentes refuerzan la hipótesis de que el análisis de las aguas residuales puede ser de gran utilidad en el seguimiento de la pandemia Covid-19. Estudios recientes (*Hart and Halden 2020; Wu et al, 2020*) indican que la WBE podría ser en el futuro una herramienta de vigilancia epidemiológica muy útil para hacer estimaciones comunitarias de la prevalencia de la infección por COVID 19. Existen varias iniciativas colaborativas para compartir conocimiento y protocolos. Algunos ejemplos son la iniciativa de NORMAN-SCORE (<http://www.normandata.eu/?q=node/361>) y el “COVID WBE global initiative” (<https://www.covid19wbec.org/>). Además, hay varios documentos interesantes (dashboards) que facilitan mapas de actividad sobre seguimiento de SARS-CoV2 en aguas residuales, donde se puede encontrar fácilmente si existe esta actividad en el área de interés

(<https://ucmerced.maps.arcgis.com/apps/opsdashboard/index.html#/c778145ea5bb4daeb58d31afee389082>; <https://sarsaigua.icra.cat/>)

----- o -----

El proyecto tiene por objeto aplicar los **principios y estrategias del análisis de las aguas residuales con fines (WBE)** a la identificación y cuantificación de material génico del virus **SARS-CoV-2 en aguas residuales** de poblaciones de la provincia de Castellón.

Se pretende **correlacionar** los datos obtenidos sobre virus en aguas residuales **con indicadores epidemiológicos** (número de casos confirmados, tasas de incidencia y prevalencia) y, mediante triangulación de datos, **validar la metodología usada**.

Para ello, se realiza un seguimiento en **municipios seleccionados de la provincia de Castellón** para conocer la evolución del brote de SARS-CoV-2 a través del análisis de las aguas residuales tomadas a la entrada de las EDAR. Mediante la concentración de las muestras, extracción de RNA y análisis por RT-PCR, se evalúa y cuantifica la presencia del SARS-CoV-2 en dichas muestras.

Con los datos obtenidos en aguas residuales se pretende **complementar el diagnóstico** en curso, que está vinculado la identificación de casos, estudio de contactos y encuestas de seroprevalencia.

Como objetivo último, se persigue la utilización de **WBE como herramienta de vigilancia epidemiológica futura**, útil para hacer estimaciones comunitarias de la prevalencia de la

infección por SARS-Cov-2 o de futuras enfermedades infecciosas, sin necesidad de realizar pruebas masivas a nivel individual.

2. INTRODUCCIÓN

La pandemia Covid19 originada por el **SARS-CoV-2**, que estamos sufriendo en todo el planeta, está poniendo a prueba los sistemas sanitarios de todos los países del mundo, así como los sistemas de vigilancia y diagnóstico de la enfermedad, además de suponer una fuerte crisis económica y social, cuyas consecuencias más graves aún están por llegar. Ante situaciones como la actual, surgen numerosas carencias, entre las cuales cabe destacar la dificultad de conocer, con datos realistas, la evolución de la pandemia en los diversos territorios y a nivel global español, así como el número de personas infectadas. La vigilancia epidemiológica es una herramienta fundamental, que se basa principalmente en estudios de prevalencia cimentados en la realización de análisis y test para conocer las personas que están o han estado infectadas, en el estudio de los contactos, y en encuestas realizadas a amplios sectores de la población. Las dificultades que surgen frente a una pandemia son evidentes, y, por ello, resulta necesario obtener información complementaria, como la que puede aportar el análisis de las aguas residuales. Dichos análisis, pueden suministrar datos en tiempo real sobre la población objeto de estudio. Tomando muestras compuestas en la entrada de estación depuradora de aguas residuales (EDAR), los resultados obtenidos se pueden interpretar como un test anónimo realizado a una población, que puede ser de varios cientos de miles, e incluso millones, de habitantes.

Uno de los primeros estudios, realizado por el KWR holandés, detectó el virus SARS-CoV-2 en Países Bajos analizando el agua residual de cinco localizaciones distintas. En este estudio, se observó la presencia de material genético del virus tres semanas antes de reportarse los primeros casos de infectados con síntomas en la región (**Medema et al. 2020**). Los autores ilustraron el potencial del control de la carga vírica a la entrada de las EDAR para detectar de manera precoz la presencia del virus en la población. A raíz de este estudio, ha habido numerosas iniciativas y proyectos, que se han plasmado en diversas publicaciones, jornadas, webinars y noticias en los medios de comunicación, cuya enumeración queda fuera de los objetivos de este informe. No obstante, merece la pena resaltar la iniciativa de Bivins y col. (**Bivins et al. 2020**, <https://www.covid19wbec.org/>) para formar una red colaborativa global junto con Sewage Analysis CORE group Europe (SCORE), en la que está integrado el IUPA de la Universitat Jaume I. Cabe destacar también la red NORMAN, que, en colaboración con SCORE, ha organizado un *pan-european survey* para monitorizar SARS-CoV2 en agua residual (<http://www.normandata.eu/?q=node/361>).

En los trabajos realizados, la mayoría de los cuales se han ido publicando mientras se realizaba el presente proyecto, se ha puesto de manifiesto la utilidad de la información suministrada a través de análisis mediante PCR del material génico del virus SARS-2-CoV para monitorizar la evolución de la pandemia (**Ahmed et al., 2020**). A pesar de los numerosos datos que ilustran la relación entre los análisis de las aguas residuales y la afección de la pandemia en la población, todavía existen muchas incertidumbres, datos contradictorios y factores no controlados que dificultan la interpretación de los resultados, por lo cual se requieren estudios adicionales para dar más luz sobre esta problemática.

El análisis de las aguas residuales con fines epidemiológicos (WBE-Wastewater-Based Epidemiology) se está aplicando cada vez más como una herramienta potente capaz de suministrar información en tiempo real sobre la población objeto de estudio. Se trata de una disciplina reciente, cada vez más aceptada a nivel internacional, basada en la determinación de (bio)marcadores adecuados y específicos que puedan dar información epidemiológica de interés sobre la población que vierte sus aguas residuales a la red de alcantarillado. Entre los numerosos datos que puede aportar WBE, se encuentran los relacionados con el estilo de vida (consumo de drogas y nuevas sustancias psicoactivas, alcohol, tabaco, fármacos, etc), estado de salud y nutricional, o niveles exposición de la población a productos químicos y/o biológicos.

El Instituto Universitario de Plaguicidas y Aguas (IUPA) de la Universidad Jaume I es uno de los siete miembros fundadores de SCORE (<https://score-cost.eu/>), red internacional que reúne a expertos de diferentes áreas interesados en la aplicación medidas cuantitativas de biomarcadores humanos en aguas residuales. El grupo SCORE se creó hace una década, y entre sus socios fundadores también se encuentra el KWR Water Research Institute neerlandés, mencionado anteriormente por ser pionero en el estudio del Covid19 en aguas residuales, (**Medema et al. 2020**). Actualmente, SCORE tiene 39 miembros asociados, pertenecientes a 27 países. Sus actividades se dirigieron inicialmente a la estimación del consumo de drogas de abuso mediante monitoreo de las aguas residuales (**Ort et al., 2014; González Mariño et al., 2019**), y posteriormente se han ampliado a otros campos (consumo de fármacos, agentes dopantes, alcohol, tabaco, exposición a compuestos químicos, marcadores de enfermedades, etc). Recientemente, se ha empezado a explorar la aplicabilidad de WBE para el monitoreo de virus en aguas residuales con el objetivo de estimar la población afectada en una ciudad (**O'Brien and Xagorarakis 2019; Sims and Kasprzyk-Hordern 2020**), incluyendo a aquellas personas que son asintomáticas y a las no diagnosticadas, que escapan al control clínico.

En el proyecto realizado, que se describe en este informe final, se ha explorado el potencial de las aguas residuales como herramienta complementaria a los sistemas de control utilizados actualmente, que permita mejorar la vigilancia epidemiológica del virus SARS-CoV-2. Para ello, se ha creado un grupo multidisciplinar de investigadores pertenecientes a diversas áreas y especialidades: especialistas en aplicaciones epidemiológicas de las aguas residuales, microbiólogos, técnicos especializados en análisis por PCR, ingenieros y técnicos de EDAR, médicos epidemiológicos.

Se ha realizado un seguimiento de 6 municipios de la provincia de Castellón, mediante el análisis de muestras integradas de agua residual recogidas a la entrada de la estación depuradora (EDAR). Las primeras tomas de muestras se realizaron a principios de mayo, y a partir de entonces se han analizado las aguas a la entrada de las EDAR, como mínimo, dos veces a la semana. También se han analizado muestras congeladas de la EDAR de Castelló de la Plana, que estaban disponibles en la UJI para otros proyectos, y que fueron recogidas en marzo y abril durante el periodo de confinamiento. En todas las muestras se ha analizado la presencia de ácidos nucleicos del coronavirus SARS-CoV-2, procediendo a la cuantificación (copias génicas por litro) usando hasta tres genes diana (E, N1, N2). Los resultados cuantitativos se han tratado siguiendo las estrategias y metodología de trabajo de WBE, teniendo en cuenta los datos de caudal y el número de habitantes de la población en cuestión.

Se ha estudiado la posible correlación entre los niveles de SARS-Cov-2 en aguas residuales y los datos epidemiológicos proporcionados por la Dirección General de Salud Pública de la Generalitat Valenciana. Este estudio, se ha podido llevar cabo de forma más completa para Castelló de la Plana y Borriol, municipios cuyas aguas son tratadas en la EDAR de Castelló, que se han tomado como modelos en el presente estudio. Se ha calculado una serie de indicadores epidemiológicos, correspondientes al día de inicio de síntomas, fecha de diagnóstico, fecha de declaración e ingresos, para evaluar su correlación con los resultados analíticos, considerando para cada uno de ellos distintas ventanas temporales. Se ha trabajado con modelos de series temporales para evaluar mejor la evolución temporal de la presencia y cantidad de carga genética de SARS-CoV-2 en aguas residuales, y poder compararlo con la incidencia de casos por COVID-19, con el fin de evaluar el desfase existente entre ambas series temporales y el potencial carácter anticipatorio y/o predictivo del análisis de las aguas residuales.

Para la realización de este proyecto, se ha contado con la colaboración de FACSA, empresa operadora de las EDAR situadas en estas poblaciones. Así mismo, se ha contado con la autorización de los ayuntamientos y de la Entidad Publica de Saneamiento de Aguas Residuales

de la Comunidad Valenciana (EPSAR) para la toma de muestras, dependiendo de la EDAR objeto de estudio.







3. MUNICIPIOS Y PLANTAS DE TRATAMIENTO SELECCIONADOS

Se han seleccionado seis poblaciones de diferentes tamaños, características socio-económicas y tasas iniciales de incidencia de la enfermedad Covid-19, para las que se han recogido muestras semanalmente durante un periodo de 6 meses. Cuatro de ellas (Almassora, Castelló de la Plana, Benicàssim, Vall d'Alba) pertenecen al Departamento de Salud de Castelló, y las otras dos (Borriana, Vila-real) al Departamento de Salud de La Plana. La inclusión de Benicàssim ha permitido evaluar el impacto del turismo y de la movilidad de la población en verano. Todas las EDAR objeto de estudio son explotadas por FACSA.

De las seis EDAR seleccionadas para la toma de muestras, cinco de ellas son gestionadas por los respectivos ayuntamientos, mientras que la gestión de la EDAR Almassora corresponde a la EPSAR.

En la **Tabla 3.1** se muestra la población estimada conectada a la red de saneamiento, según datos del censo, para cada una de las EDAR.

Tabla 3.1.- Datos relevantes relativos a las seis poblaciones y plantas de tratamiento de aguas residuales estudiadas

Municipio	Población (censo ^a)	Caudal promedio (m ³ /día)	Modo de muestreo ^c
Almassora (39.93202, -0.05641)	 26270	8376	T (50 mL/ 60 min)
Benicassim (40.04838, 0.06773)	 18192	6823	T (50 mL/ 15 min)
Borriana (39.85922, -0.08435)	 34683	14242	T (50 mL/ 15 min)
Castelló y Borriol (39.98579, -0.00453)	 177088	40543	T (50 mL/ 15 min)
Vall d'Alba (40.15072, -0.01042)	 2807	528	T (50 mL/ 15 min)
Vila-real (39.93857, -0.06827)	 18937 ^b	3410	T (50 mL/ 15 min)

^a Censo de 2019 por el Instituto Nacional de Estadística (<https://www.ine.es/jaxiT3/Tabla.htm?t=2865&L=0>)

^b Solo un parte de Vila-real está cubierto. La población se ha estimado en base a los datos obtenidos de EPSAR (<http://www.epsar.gva.es/sanejament/instalaciones/list-en-servicio.aspx>)

^c Modo de muestreo: T = Proporcional al Tiempo (volumen muestreado/frecuencia del muestreo)

4. TOMA DE MUESTRAS

Es la primera etapa, y una de las más críticas de todo el proceso aplicado en WBE. La muestra debe ser representativa y generalmente se recoge en la entrada de la estación depuradora de aguas residuales (EDAR). Lo ideal para estudios con fines epidemiológicos basados en el análisis de las aguas residuales es tomar muestras compuestas/integradas y, si el muestreador automático lo permite, recoger numerosas alícuotas en función del tiempo, caudal o volumen de influente para compensar, lo más posible, las variaciones continuas de caudal que se producen (**Figura 4.1**).

En la mayoría de aplicaciones de WBE, se toman muestras compuestas de 24 horas. Sin embargo, en el caso de COVID-19, existen ciertas dudas sobre la estabilidad y posible degradación del material genético del virus SARS-CoV-2 a lo largo de su tránsito por la red de alcantarillado. Por ello, en esta investigación se han tomado muestras compuestas de 4h en todos los municipios, recogidas entre las 8- 12h. Se considera que en esta franja del tiempo hay una mayor probabilidad de que la población haga uso de los servicios y, por tanto, se estima que la concentración de la muestra sea mayor. Esto, además, permite iniciar el análisis de las muestras el mismo día de su recogida. Adicionalmente a las muestras compuestas de 4 h, se han tomado muestras compuestas de 24h en los municipios de Castelló y Borriana, con el fin de comparar y evaluar los resultados del muestreo en estas dos franjas de tiempo (i.e. 4 versus 24 horas). Las EDARs del presente estudio han colaborado desinteresadamente tomando muestras (proporcionales al tiempo) con alícuotas recogidas en intervalos cortos de tiempo, ya que cuanto mayor es el intervalo de tiempo, mayor es la incertidumbre a la hora de estimar la incidencia del virus en la población.

En este estudio, se han tomado cada 15 min en todas las EDAR, excepto en Almassora, que tomó las alícuotas cada 60 minutos, lo que supone un total de 16 sub-muestras (alícuotas) individuales en un periodo de 4 horas. Estas alícuotas, se han mezclado finalmente para originar una única muestra compuesta para los análisis, que es la que se transporta al laboratorio.

La toma de muestras se inició a principios de mayo, y desde entonces se vienen analizando las aguas a la entrada de las EDARs dos veces por semana (martes y viernes) hasta finales de octubre. Aparte de los muestreos periódicos mencionados, se ha reaccionado con prontitud frente a algunos brotes que han surgido, recogiendo muestras de agua residual en los sectores afectados, además de las muestras a la entrada de la EDAR asociada. Con ello, se pretende evaluar el impacto de estos brotes sobre los resultados, así como la posibilidad de sectorizar los

muestreos en el futuro para acotar las áreas afectadas.

Los recipientes para tomar y conservar las muestras han sido de polietileno de alta densidad (HDPE), ya que los posibles aditivos/sustancias que puedan encontrarse en este material no interfieren en los análisis realizados, al tiempo que se facilita la conservación de las muestras, si fuera necesario, en congelador. Las muestras se transportaron al laboratorio el mismo día del muestreo para minimizar posibles problemas de degradación. La recogida de las muestras y el transporte al laboratorio se hizo en neveras portátiles (tipo nevera de campo), añadiendo algunos bloques de líquido congelador para mantenerlas a baja temperatura.

Con el objetivo de estudiar la estabilidad bajo diferentes condiciones de conservación, durante las primeras semanas se recogieron 4 muestras por día de muestreo en las EDARs de Castelló y Borriana. De estas cuatro muestras, el laboratorio de destino almacenó 3 de los botes a 4°C, mientras que el cuarto se congeló a -20°C. Las muestras a 4°C son las que se han utilizado para distintas pruebas en el laboratorio (ej. estudio de diferentes métodos de pre-concentración, estabilidad a distintos tiempos de conservación, etc.).

La estrecha colaboración con las EDARs de las ciudades estudiadas, ha sido esencial para poder obtener información de las poblaciones (a menudo por el censo de hogares conectados a las redes de alcantarillado), sobre el diseño de las redes de alcantarillado, el dato del caudal promedio de aguas residuales durante las horas de muestreo, los análisis globales de parámetros de la calidad de las aguas residuales, tales como DBO, DQO, N total, P total y temperatura, entre otros. Para facilitar la obtención de la información necesaria, se diseñó una base de datos y un cuestionario creado originalmente por el Dr. Christoph Ort del EAWAG Suiza, en nombre de la red SCORE (<https://score-cost.eu/>). Dicho cuestionario fue simplificado y traducido por la Dra. Núria Zamorano López (FACSA) y el Dr. Lubertus Bijlsma (UJI) para adaptarlo al presente proyecto. El cuestionario se ha diseñado para simular una entrevista entre los profesionales del tratamiento de agua, los operarios y trabajadores de las plantas de tratamiento y los investigadores de la universidad, con el fin de obtener la mayor información posible sobre el tipo de captación asociado a la EDAR. Las preguntas se agruparon según aspectos específicos del sistema de tratamiento de aguas y categorizados según su importancia. Esta estrategia nos permitió:

- evaluar las características de la captación
- comprender las dinámicas de la captación de agua residual
- adaptar el protocolo de muestreo a las necesidades del proyecto

Finalmente, la estrecha coordinación entre investigadores de la universidad y técnicos y responsables de las EDARs ha sido crucial para la toma adecuada de muestras representativas, su almacenamiento y el traslado a los laboratorios. La **Tabla 4.1** resume la información más relevante relativa a los muestreos realizados

Tabla 4.1: Resumen del muestreo llevado a cabo

Características de las muestras	Muestra compuesta/integrada de 4h (adicionalmente también 24h para Castelló y Borriana)
Periodo de muestreo	8-12h (para muestras de 24h: 12am – 12am)
Muestras proporcionales al tiempo	Cada 15 min (excepto Almassora, cada 60 min)
Número de sub-muestras (alícuotas)	4 x 500 mL (total 2 L)
Características de los recipientes	Polietileno de alta densidad, HDPE
Etiquetado de las muestras	COVIDWW-Nombre EDAR- ID Muestra
Registro	Encuesta y basa de datos (Excel) para cada EDAR
Días recomendados de muestreo	Dos días a la semana: martes y viernes
Mantenimiento de las muestras	Frigorífico, 4°C
Envío de muestras al laboratorio	Si es posible, el mismo día.

Table 1. Visualization and brief description of different sampling modes (adapted from ISO Water quality - Sampling - Part 2: Guidance on sampling techniques : ISO 5667-2 1991, 731 ISO, Genève, Switzerland).

Conceptual example				
Sampling mode	Short description (see "Sampling guide" to find out which sampling mode is suitable in which situation).	Illustration (F=Flow in sewer, S=sampling volume)	Specific equipment ¹	Flow meter ²
Continuous				
flow-proportional	Divert a side stream, proportional to the flow in the sewer		Pump with speed control (proportional to external flow signal) ³	Yes
constant	Divert a constant side stream from the sewer		Pump	No
Discrete				
T: time-proportional	Take a constant sample volume at constant time intervals		Standard auto-sampler	No
F: flow-proportional	Make sample volume proportional to the flow in the sewer taking them at constant time intervals		Auto-sampler with adjustable sampling volume ⁴ (proportional to external flow signal)	Yes
V: volume-proportional	Take a constant sample volume at variable time intervals, after a certain volume of wastewater has passed the sampling point		Auto-sampler totaling an external flow signal up to a predefined volume ⁵ and then triggering a sample	Yes
g: grab sample	Take one (or a number of) grab sample		Scoop, no power supply.	No

¹ Indicates what equipment is required besides sampling bottles, hose and power supply.

² Is a flow meter required for taking samples (external flow signal)? To calculate environmental loads from sampled (average) concentrations it always needs a flow meter.

³ Ideally a robust peristaltic pump with fine increments to accurately control speed with external flow signal. Linearity of pump speeds and performance (suction and pressure height) need to be checked for conditions that apply in the field.

⁴ Sampling volume of individual samples needs to be checked for linear behavior over the whole range of discharge in the sewer.

⁵ Check variation of individual sample size.

Figura 4.1: Descripción de modos de muestreo

Lo ideal es tomar muestras compuestas, recogiendo el mayor número de alícuotas posible dependiendo del tiempo (T), caudal (F), o volumen (V) para compensar las variaciones continuas de caudal (Referencia: Ort C., Lawrence M.G., Rieckermann J. and Joss A. (2010) Environmental Science & Technology 44 (16), 6024–6035).

5. ANÁLISIS DE LAS MUESTRAS

En la metodología utilizada para la concentración de las muestras de aguas, extracción de RNA vírico y su posterior análisis por RT-qPCR, se han tenido en cuenta, tanto durante la manipulación de las aguas como en concentrado de las misma, las recomendaciones generales de bioseguridad establecidas para los laboratorios de nivel 2 de contención biológica (NCB2) (toda la información puede encontrarse en https://www.who.int/topics/medical_waste/manual_bioseguridad_laboratorio.pdf).

Una vez recibidas las muestras compuestas de aguas en el laboratorio de análisis, se procedió a dividir el volumen de agua en diferentes alícuotas (ver toma de muestra). Para el estudio de estabilidad, se obtuvieron 4 alícuotas de 200mL, que fueron almacenadas a dos temperaturas diferentes (4°C y -20°C) y a distintos tiempos de conservación, hasta su análisis. A todas estas alícuotas, más la analizada el mismo día de la toma de muestra (200mL), se les añadió 5µL de la cepa de mengovirus vMCO CECT 10000 (10.000 unidades infectivas), como control de proceso (**Randazzo et al, 2020**).

A continuación, se procedió a la concentración de las muestras mediante el método de absorción y precipitado por aluminio, tal y como se describe en **Randazzo et al (2020)**. Brevemente, se ajustó el pH de las muestras de agua a 6 con HCl 12M. Una vez ajustado el pH, se añadió 2mL de AlCl₃ al 4% (solución preparada en el momento) y se agitaron manualmente las muestras durante unos minutos. Posteriormente, se ajustó de nuevo el pH de las aguas a pH 6 con NaOH 0.1M o 1M, dependiendo del pH de cada muestra de agua. A continuación, se agitaron las muestras en un agitador orbital durante 15min a 150rpm, procediendo después a su centrifugación a 1700g, durante 20 minutos. Tras el centrifugado, se eliminó el sobrenadante y el pellet resultante se resuspendió en 10mL de una solución “beef extract” al 3%. Los tubos se mantuvieron en agitación constante en un agitador orbital durante 10min a 200rpm. Posteriormente, se centrifugaron a 1900g durante 30 minutos. Por último, el pellet recogido se resuspendió en 1mL de una solución tampón de fosfato salino (PBS 1X). El concentrado recogido se dividió en alícuotas para su congelación a -20°C y posterior extracción del RNA.

Extracción de RNA de los concentrados de aguas

El proceso que se describe a continuación se llevó a cabo en una cabina de seguridad CSB de clase II, para garantizar que cualquier paso en que se puedan generar aerosoles se realice en condiciones de máxima seguridad.

Para la extracción de RNA, se tomaron 150µL de la muestra concentrada y se siguieron las especificaciones del kit de extracción comercial NucleoSpin RNA virus Kit (Macherey Nagel) y las modificaciones indicadas en **Randazzo et al (2020)** (la **Figura 5.1** muestra gráficamente los pasos seguidos en este proceso).

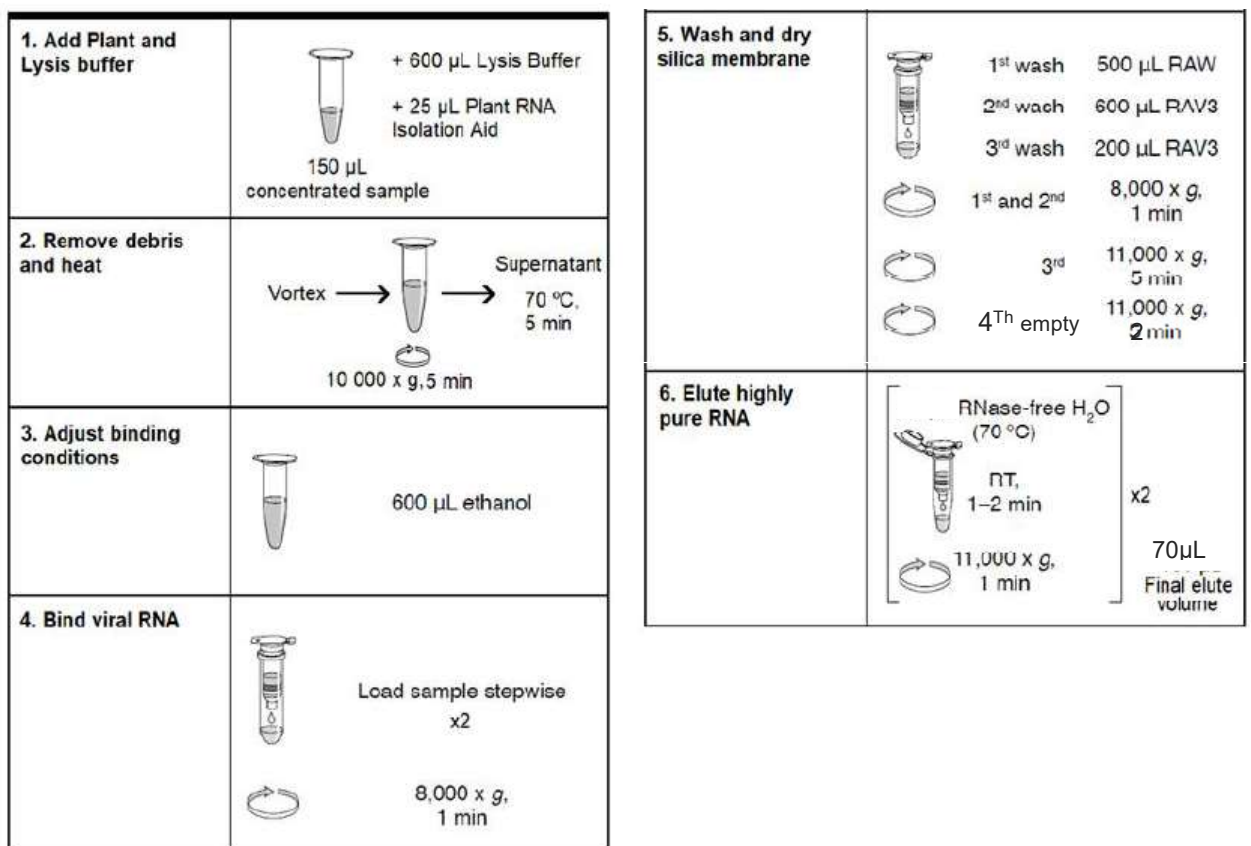


Figura 5.1. Esquema gráfico de la metodología utilizada para la extracción del RNA de las muestras (kit de NucleoSpin) adaptadas de *Randazzo et al 2020*

El RNA extraído de cada muestra se eluyó en 70µL de agua libre de RNAasas y se mantuvo a 4°C, para proceder inmediatamente a su análisis mediante RT-PCR.

Detección y análisis del RNA viral extraído de los concentrados de muestras

La detección de la presencia de RNA vírico se llevó a cabo utilizando el termociclador StepOne Plus de Applied Biosystem con un programa específico para la Reacción de Cadena de la Polimerasa en Tiempo Real a partir de RNA – en un solo paso- (RT-PCR). Se utilizaron tres dianas víricas específicas para SARS-CoV-2: fragmentos de N1, N2 y E (CDC, 2019). Además, en cada RT-qPCR se incluyó la detección del mengovirus, como control de la eficiencia del proceso de concentración y extracción (Costafreda et al., 2006). A su vez, en todas las RT-qPCR se incluyó un control negativo (agua libre de RNAsas utilizada en el proceso de extracción del RNA) y los controles positivos correspondientes para la obtención de la curva patrón usada para la cuantificación de las muestras. Para la diana de los genes N1 y N2, se utilizó el 2019-nCoV_N_Positive Control (IDT, ref.10006625). Para la diana E, se usó el 2019-nCoV_E Positive Control (IDT, ref. 10006896). Para el mengovirus, se utilizó una muestra de RNA extraído de la cepa vMCO CECT 10000.

Las condiciones para la preparación de las soluciones de las diferentes dianas y el programa utilizado para la detección del SARS-CoV-2 y mengovirus mediante RT-qPCR se detallan en las **Tablas 5.1 y 5.2**

Tabla 5.1. Composición de las distintas reacciones de RT-qPCR.

	SARS-CoV-2			Control de proceso
	N1	N2	E	mengovirus
2x tampón (µl)	5	5	5	5
Takara Ex Taq (µl)	0.2	0.2	0.2	0.2
Prime Script Enzyme (µl)	0.2	0.2	0.2	0.2
cebador directo (µl)	0.75 ^a	0.75 ^a	1 ^b	0.75 ^c
cebador reverso (µl)				
Sonda (µl)				
ROX	-	-	-	-
H ₂ O (µl)	0.85	0.85	0.6	0.85
RNA (µl)	3	3	3	3

a. SARS-CoV-2 (2019-nCoV) CDC qPCR Probe Assay, RUO Kit, IDT, Ref. 10006713.

<https://eu.idtdna.com/pages/landing/coronavirus-research-reagents/cdc-assays>

b. E Assay_First Line Screening, 1000 Rxn, IDT, Ref 10006804,

<https://eu.idtdna.com/pages/landing/coronavirus-research-reagents/who-assays>.

c. Cebadores (6.7 µM) y sonda (425nM) (Costafreda et al 2006)

Tabla 5.2. Programas de RT-qPCR para las distintas dianas moleculares usadas para la detección de SARS-CoV-2 y mengovirus

		Dianas N1,N2, E y mengovirus		
		Temperatura	tiempo	ciclos
Paso		25°C	5 min	1
	Retrotranscripción	45°C	10 segundos	1
	Desnaturalización	95°C	5 segundos	45
	PCR	55°C	34 segundos	

Criterios de interpretación de los resultados

Se visualizaron las curvas de amplificación siguiendo las instrucciones del equipo de PCR cuantitativa, para determinar presencia de Cts (cycle treshold, ciclo de amplificado, según un umbral de corte) aberrantes o erróneos. Además, antes de llevar a cabo la evaluación de los resultados, se comprobó que, para cada diana analizada, el respectivo control positivo de RT-qPCR era positivo (había amplificación) y el control negativo resultaba negativo (sin amplificación).

Para la interpretación de los resultados, se tuvieron en cuenta los criterios definidos por el Ministerio de Ciencia e Innovación (<https://www.miteco.gob.es/es/agua/temas/concesiones-y-autorizaciones/vertidos-de-aguasresiduales/alerta-temprana-covid19/default.aspx>).

Brevemente, los resultados obtenidos de la RT-qPCR para detección del SARS-Cov-2 se interpretaron como positivos o negativos según se indica a continuación:

- Dos dianas de SARS-Cov-2 negativas → NEGATIVO;
- Dos dianas de SARS-Cov-2 positivas → POSITIVO;
- Si una diana de SARS-Cov-2 es positiva y la otra es negativa → POSITIVO a confirmar mediante RT-qPCR de una tercera diana:
 - Si la tercera diana da positiva → POSITIVO;
 - Si la tercera diana da negativa → PRESUNTO POSITIVO.

Por otro lado, los resultados se consideraron válidos siempre y cuando el porcentaje de recuperación del control de proceso fue $\geq 1\%$

Criterios de cuantificación de las muestras positivas

Únicamente se convirtieron a copias genómicas/L aquellos valores de Ct menores de 40 interpolando el Ct de la muestra problema en las rectas patrón externas construidas con diluciones seriadas en base 10 de material de referencia cuantificado. Cada muestra se cargó por duplicado, por lo que la cuantificación en copias genómicas por litro se dio como media de las dos réplicas, con su desviación estándar.

La recta patrón de cada gen debe cumplir unos requisitos mínimos: los puntos se deben ajustar a una recta con un coeficiente de correlación (R^2) mínimo de 0,98; la pendiente de la recta debe ajustarse a una eficiencia de amplificación entre el 80 y el 110% (ISO 15216-1, 2017).

6. CÁLCULOS EPIDEMIOLÓGICOS EN AGUAS RESIDUALES

WBE es una disciplina reciente, que está siendo cada vez más aceptada internacionalmente. Para su aplicación, es necesario seleccionar biomarcadores específicos que aporten información epidemiológica sobre la población que descarga sus aguas residuales en la red de alcantarillado. WBE puede aportar datos útiles relacionados con el estilo de vida (consumo de drogas y nuevas sustancias psicoactivas, alcohol, tabaco, etc.), salud y estado nutricional, o niveles de exposición de la población a productos químicos o biológicos. Una de las aplicaciones más interesantes, objeto de estudio en el presente informe, es la monitorización del virus en aguas residuales para estimar el grado de afección en una población, incluyendo también la que es sintomática y las personas no diagnosticadas mediante controles clínicos.

WBE parte de la base de que las personas infectadas por SARS-CoV-2 eliminan el virus con las heces, a los sistemas de alcantarillado urbanos. Por ello, el análisis de las aguas residuales puede proporcionar información sobre la concentración de partículas víricas procedentes de aquellos que han sido afectados por la pandemia en una determinada población. Por otro lado, puede considerarse que el material genético del virus que sea estable en agua residual, llegará prácticamente intacto a la estación depuradora de aguas residuales (EDAR), por lo que es razonable asumir que la cantidad excretada de forma colectiva se vea reflejada por la carga total recibida en la EDAR en un determinado intervalo de tiempo. La recogida de muestras compuestas, representativas para dicho intervalo temporal, es, en consecuencia, uno de los factores clave en este enfoque, ya que permite aumentar la probabilidad de detectar material genético del virus SARS-CoV-2 en las aguas residuales independientemente de los hábitos poblacionales.

La **Figura 6.1** esquematiza el proceso llevado a cabo en WBE, desde la toma de muestra hasta el cálculo de la carga normalizada por 1000 habitantes de una población (**Castiglioni et al., 2016**). El análisis de las aguas residuales mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés, “*Polymerase Chain Reaction*”) permite obtener las copias génicas del virus en muestras representativas de unas horas concretas o de un día completo (4h o 24 h, ver sección “*Toma de muestras*”). A partir de las copias génicas (CG) encontradas, se puede estimar la cantidad diaria de este material genético del virus en el agua residual. Con los datos obtenidos, se puede, por tanto, hacer estimaciones sobre el nº de copias génicas/día. Teniendo en cuenta el tamaño de la población que vierte sus aguas a la EDAR, se pueden normalizar los resultados, (ej. expresándolos en copias/día/1000 habitantes), lo cual permite establecer mejor posibles comparaciones y tendencias a lo largo del tiempo.

La carga normalizada en función de la población (copias/día/1000 habitantes) se calcula en la siguiente manera:

$$\text{Carga normalizada} = \frac{(C \times F)}{p}$$

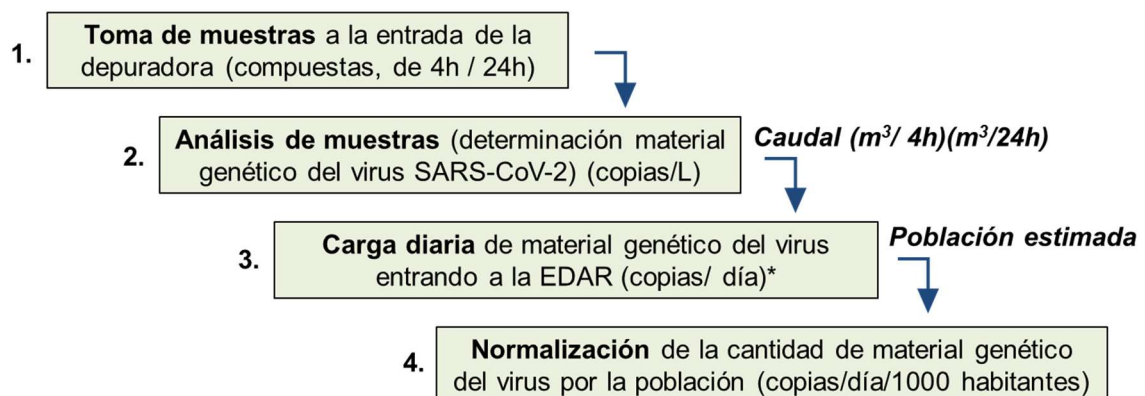
C = número de copias en la muestra de agua residual (copias/L)

F = Flujo (caudal) del agua residual (m³/día)

P = población contribuyendo a la muestra

Aunque el concepto en que se basa WBE es relativamente simple, hay varios factores que afectan a la incertidumbre de los datos obtenidos, los cuales deben tenerse en cuenta para poder implementar esta aproximación a gran escala y de modo realista. Los más relevantes son: i) la variabilidad de la carga vírica excretada (porcentaje variable de excreción en diferentes individuos, que además puede ser distinto durante las diferentes fases de la infección, y también entre afectados y asintomáticos); ii) aspectos relacionados con el sistema de alcantarillado (tamaño de la población/número de habitantes que vierte las aguas residuales a la EDAR, caudal diario de agua residual, distancia de los focos de contagio hasta la entrada de la EDAR); iii) la variación en la concentración del material genético del virus desde su excreción por parte de los individuos afectados hasta su llegada a la EDAR (estabilidad, degradación, distribución y/o procesos de adsorción que pueda experimentar a lo largo de la red de saneamiento).

Figura 6.1: Esquema del proceso aplicado en la epidemiología basada en el análisis de aguas residuales (WBE)



* Para muestras compuestas de 4h, la estimación se hace multiplicando x 6 el dato de copias/L obtenido en la muestra (se estima, por tanto, el número de copias/día)

7. OBTENCIÓN Y TRATAMIENTO DE DATOS EPIDEMIOLÓGICOS

Se trabajó con los datos procedentes de las encuestas epidemiológicas que desde los Centros de Salud Pública se realizan a cada caso declarado de COVID-19. Esta información fue facilitada por la Subdirección General de Epidemiología, Vigilancia de la Salud y Sanidad Ambiental, de la Dirección General de Salud Pública y Adicciones de la Generalitat Valenciana.

En concreto, se obtuvo información sobre las variables que se indican a continuación: fecha de diagnóstico, fecha de declaración, fecha de inicio de síntomas, centro y fecha de ingreso y alta, para cada uno de los casos de COVID-19 en cada uno de los municipios de estudio durante el periodo enero/octubre 2020. Se trabajó en todo momento con datos anonimizados.

A partir de la información epidemiológica proporcionada, se definieron distintos indicadores para cada municipio, como los correspondientes al número de casos diarios (según fecha de declaración o de inicio de síntomas), así como los referidos a ingresos diarios, con el fin de evaluar la relación de cada uno de ellos con los niveles de SARS-CoV-2 detectados a lo largo del periodo de estudio en las correspondientes EDAR. Se trabajó en todo momento con los casos declarados confirmados.

Dado que la planta de Castelló de la Plana trata de manera conjunta las aguas residuales de este municipio y las de Borriol, los indicadores epidemiológicos para esta planta se calcularon para ambas localidades.

Los datos meteorológicos (temperaturas y precipitación) se obtuvieron de la estación de AEMET Almassora-Castellón, y de la red de estaciones que forman parte de la Asociación Valenciana de Meteorología, para el resto de municipios incluidos en el estudio.

El periodo de estudio fue el comprendido entre el 5 de mayo, momento en que se realizó la primera toma de muestras, y finales de octubre.

En el presente informe se muestran los datos descriptivos de los indicadores epidemiológicos en las distintas poblaciones de estudio, los resultados del análisis comparativo entre dichos indicadores y los niveles de material genético de SARS-CoV-2 en aguas residuales, así como el análisis específico de un brote delimitado de COVID-19 que se produjo en la ciudad de Castellón durante el periodo de estudio.

El análisis simple de la relación entre los niveles de material genético de SARS-CoV-2 en aguas residuales (copias/L de los genes N1, N2 y E) e indicadores epidemiológicos (número diario de casos declarados o que iniciaron síntomas) se ha llevado a cabo mediante representaciones gráficas y test de correlación de Spearman, tras comprobar la no normalidad de los datos. Para dichos análisis se están teniendo en cuenta retardos en cuanto al número de casos de 0, 7, 14 y 21 días, dado el carácter mantenido de la excreción de SARS-CoV-2 en heces que reportan los estudios clínicos. Los datos perdidos y los resultados inferiores al límite de detección, fueron imputados a través del modelo definido al efecto.

Se presentan los datos correspondientes a la EDAR de Castelló de la Plana, municipio con mayor número de casos, del que se obtuvo información epidemiológica más completa y con suficiente antelación para la preparación del presente informe.

8. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

8.1. ESTUDIO DE ESTABILIDAD Y CONSERVACIÓN DE LAS MUESTRAS

Uno de los puntos críticos en WBE es precisamente la conservación de las muestras. En el caso particular de la detección del SARS-CoV-2 no existe un protocolo unificado sobre las condiciones óptimas de almacenamiento de las muestras de aguas residuales. Se ha descrito que el virus SARS-CoV-2 puede sobrevivir a 20°C durante 2 días y hasta 14 días cuando la temperatura de conservación disminuye a 4°C (*Wang et al., 2005*). Sin embargo, existe poca evidencia científica sobre la estabilidad del RNA en muestras de aguas residuales a diferentes temperaturas y tiempos. Por todo ello, en el presente trabajo se ha estudiado el impacto de la temperatura (4°C vs -20°C) y el tiempo (0h, 7, 14 y 21 días) sobre la estabilidad del RNA durante su almacenamiento.

En la **Figura 8.1.1**, se representan los datos de la carga genética (cg/L) obtenidos con los genes diana N1 y E. En el análisis de las muestras también se incluyó el gen diana N2, sin embargo, la detección del virus fue negativa para la mayoría de las muestras; por ese motivo, no se incluyen estos datos en la figura. Las muestras de aguas seleccionadas para el estudio se dividieron en 4 alícuotas de 200mL a las que se les añadió 5µL de la cepa de mengovirus vMCO CECT 10000 (10.000 unidades infectivas), como control de proceso. Una de las muestras fue procesada y analizada el mismo día de la toma de muestra (muestra fresca) y el resto de las alícuotas se almacenaron a las condiciones de temperatura (4°C vs -20°C) y el tiempo (0h, 7, 14 y 21 días) hasta su análisis. Los datos muestran la media y desviación típica de 4 réplicas seleccionadas aleatoriamente durante los meses de septiembre y octubre.

Los resultados indican que, la estabilidad del RNA presente en las muestras de aguas residuales no se ve afectada ni por la temperatura de conservación y ni por el tiempo de almacenamiento, al menos hasta el máximo de 21 días estudiados. Por tanto, el almacenamiento a ambas temperaturas sería igualmente adecuado para preservar la estabilidad del material genético presente en las aguas residuales frente a la actividad de enzimas (e.j. RNAasas) u otros microorganismos (e.j. bacterias), que contribuyen a la degradación del material genético vírico. Estos datos están en concordancia con los resultados recientemente publicados en los que detectan RNA (gen diana E) tras 26 días de almacenamiento en muestras de aguas residuales cebadas con títulos altos de SARS-CoV-2 y conservadas a 20°C (*Bivins et al., 2020b*), y tras 15

días en el que caso de muestras de aguas residuales cebadas con una cepa de SARS-CoV-2 inactivada por radiación gamma (*Ahmed et al., 2020b*).

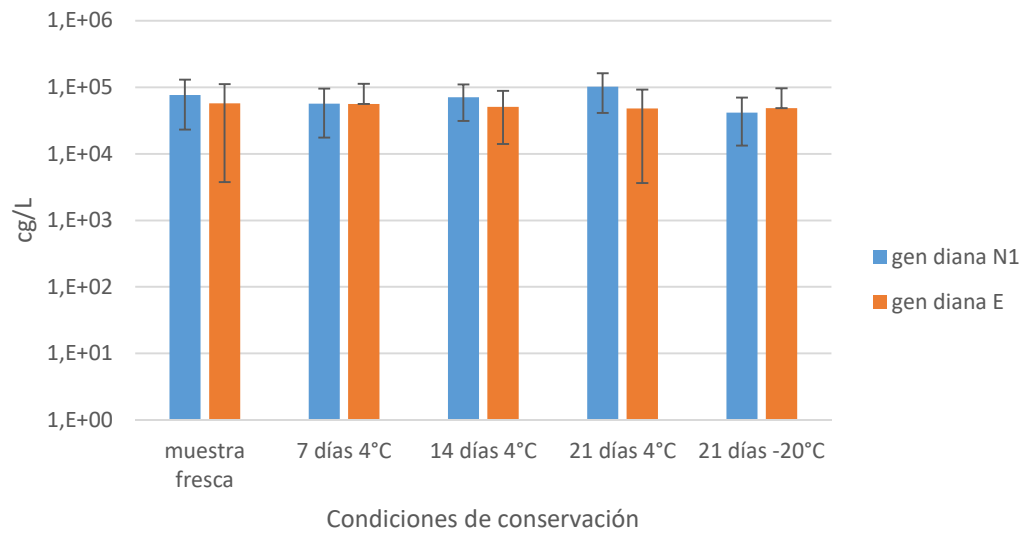


Figura 8.1.1. Estudio de estabilidad del RNA en muestras de aguas residuales almacenadas a diferentes condiciones de temperatura y tiempo.

8.2. RESULTADOS OBTENIDOS POR MUNICIPIOS

Los resultados obtenidos en los análisis realizados en las aguas residuales de cada municipio y EDAR, desde el inicio de los muestreos (mayo, 2020) hasta el final de los mismos (octubre, 2020) se resumen en las **Tablas 8.2.1-8.2.6**. La evolución de la detección del virus, representada como la medida de carga vírica (copias génicas, cg/L) obtenida de los datos del gen diana N1, se muestra en la **Figura 8.2.1** para todas las poblaciones estudiadas. Por último, los datos de carga vírica (copias génicas, cg/L) obtenidos a partir de cada gen diana estudiado (N1, N2 y E) en cada municipio se representan en la **Figuras 8.2.2 - 8.2.7**.

Como se ha indicado en la sección 5, se utilizaron tres dianas víricas específicas para SARS-CoV-2: fragmentos de N1, N2 y E. Las tablas muestran las concentraciones obtenidas para cada gen, expresadas en copias/L, en cada una de las poblaciones.

El análisis de las aguas residuales mediante RT-qPCR para la detección del SARS-CoV-2 ha permitido monitorizar la frecuencia de detección del virus y cuantificar la carga vírica medida como copias génicas por litro (cg/L), en cada uno de los días de muestro y a lo largo del todo el proyecto.

En términos generales, los resultados muestran que la detección de material genético del SARS-CoV-2 en las aguas residuales de todos los municipios fue puntual durante los primeros meses del estudio (mayo-julio), periodo que coincide con el final de la primera ola y comienzo de la desescalada. Únicamente, en los municipios de Castellón y Borriana se observó una mayor frecuencia en la detección vírica, lo cual se corresponde con el hecho de ser las localidades donde mayor incidencia se ha observado de la COVID-19. Hacia finales de julio o principios de agosto, la frecuencia de detección del virus comenzó a aumentar en todos los casos, con valores máximos de carga vírica durante las primeras semanas de septiembre, y se mantuvieron hasta el final del proyecto, salvo excepciones como Vall d'Alba. Este aumento en la detección del virus refleja, sin duda, el comienzo de la segunda ola y con ella el aumento de la incidencia de casos COVID-19 que se ha sufrido durante los meses de septiembre y octubre (**Figuras 8.2.4 y 8.2.5**).

Por otro lado, es muy interesante destacar como los resultados de detección del virus en aguas residuales reflejan ciertas peculiaridades de algunas de las poblaciones estudiadas. Uno de los casos más claro es Benicassim, una localidad muy turística que ve aumentada su población significativamente durante los meses de verano, principalmente por residentes de Castellón y Valencia. El aumento en la frecuencia de detección del virus coincidió con el periodo vacacional,

observándose los valores de carga vírica más elevados durante el mes de agosto. A partir de ese momento se mantuvo la detección del virus en todos los muestreos, observándose una ligera subida de la carga vírica a mediados de septiembre, que disminuyó hasta desaparecer, hasta que a finales de octubre volvieron a detectarse valores elevados de carga vírica, comparables a los máximos observados en agosto (**Figura 8.2.3**). Este aumento de la presencia del SARS-CoV-2 en las aguas residuales de Benicassim podría venir como consecuencia del aumento en la afluencia de visitantes con motivo del puente del 9 de octubre.

Otro caso interesante ha sido la localidad de Vall d'Alba, un pequeño municipio del interior de Castellón, en el que la detección del virus ha sido muy puntual, concentrándose mayoritariamente durante las tres primeras semanas de septiembre, hecho que coincidió con la aparición de un brote. A partir de ese momento, únicamente ha habido detecciones puntuales (**Figura 8.2.7**).

Por último, los resultados obtenidos para Almassora, Burriana, Castellón y Vila-real muestran una mayor frecuencia en la detección del virus a lo largo del proyecto, siendo máxima durante los meses de verano, aunque en estos casos se ha mantenido relativamente constante hasta el final del proyecto. Estos resultados estarían en consonancia con la mayor incidencia de la COVID-19 observada en estas localidades (**Figuras 8.2.2, 8.2.4, 8.2.5 y 8.2.6**).

Tabla 8.2.1. Concentraciones para los genes N1, N2 y E (copias gen /L) en agua residual de Almassora.

Fecha (mm/dd/aa)	N1 (CG/L)	N2 (CG/L)	E (CG/L)
5/12/2020	7900	21749	X
5/15/2020			X
5/19/2020	21565		X
5/22/2020			X
5/26/2020			X
5/29/2020			X
6/2/2020			X
6/5/2020			X
6/9/2020			X
6/12/2020			X
6/16/2020			X
6/19/2020			X
6/23/2020			X
6/26/2020			X
6/30/2020			X
7/3/2020			
7/7/2020			
7/10/2020			
7/14/2020			
7/17/2020			
7/21/2020			
7/24/2020			
7/28/2020			
7/31/2020			
8/4/2020			
8/7/2020			
8/11/2020			
8/14/2020	66568	37783	239450
8/18/2020	35618	39690	295635
8/21/2020	62026	10993	
8/25/2020			
8/28/2020	25712	27160	88541
9/1/2020	172183	85091	96630
9/4/2020	24266	37525	87420
9/8/2020	75495	11863	20057
9/11/2020	448013	204128	468475
9/15/2020			
9/18/2020	160746	80862	94415
9/22/2020	57499	12861	66739
9/25/2020	13327		25479
9/29/2020	36785	38763	10668
10/2/2020	67538	75248	34442
10/6/2020	21478	7135	
10/13/2020	49687		
10/16/2020	29584	22792	80076
10/20/2020	210175	74636	171839
10/23/2020	136004	13595	445181
10/27/2020	101832	85607	
10/31/2020	46317	104821	220959

X: no analizado; Celda vacía: no se detecta

Tabla 8.2.2. Concentraciones para los genes N1, N2 y E (copias gen /L) en agua residual de Benicassim.

Fecha (mm/dd/aa)	N1 (CG/L)	N2 (CG/L)	E (CG/L)
5/12/2020			X
5/15/2020			X
5/19/2020			X
5/22/2020			X
5/26/2020	23238		X
5/29/2020			X
6/2/2020			X
6/5/2020			X
6/9/2020			X
6/12/2020			X
6/16/2020			X
6/19/2020			X
6/23/2020			X
6/26/2020			X
6/30/2020			X
7/3/2020			
7/7/2020			
7/10/2020			
7/14/2020			
7/17/2020			
7/21/2020			
7/24/2020			
7/28/2020			
7/31/2020	11755	17426	
8/4/2020			
8/7/2020	9892	6835	
8/11/2020	12889	7358	
8/14/2020	64915	18998	33354
8/18/2020	194225	178978	368232
8/21/2020	115893	489603	109205
8/25/2020		50730	31651
8/28/2020		34951	33480
9/1/2020	57067	27773	51289
9/4/2020		10552	
9/8/2020	17376	25951	32109
9/11/2020	122617	6538	121563
9/15/2020		16536	61325
9/18/2020	73922	52482	37843
9/22/2020			16622
9/25/2020			
9/29/2020			25544
10/2/2020			4265
10/6/2020			
10/13/2020	21199		3544
10/16/2020			
10/20/2020	79579		53600
10/23/2020	39457	2850	11263
10/27/2020	54329		83907
10/31/2020	99431	262457	479915

X: no analizado; Celda vacía: no se detecta

Tabla 8.2.3. Concentraciones para los genes N1, N2 y E (copias gen /L) en agua residual de Borrana*.

Fecha (mm/dd/aa)	N1 (CG/L)	N2 (CG/L)	E (CG/L)
5/5/2020	70185	29782	X
5/8/2020			X
5/12/2020	7471	26602	X
5/15/2020	24612		X
5/19/2020	17685		X
5/22/2020		14505	X
5/26/2020	22304		X
5/29/2020			X
6/2/2020		6872	X
6/5/2020	20000		X
6/9/2020	46142		X
6/12/2020	50350		X
6/16/2020	27356	16082	X
6/19/2020			X
6/23/2020			X
6/26/2020			X
6/30/2020	7891		X
7/3/2020			
7/7/2020			
7/10/2020			
7/14/2020			
7/17/2020	22063		
7/21/2020			
7/24/2020			
7/28/2020			
7/31/2020	16278	7711	36358
8/4/2020	49141		
8/7/2020			
8/11/2020	40366	37009	
8/14/2020	77460	37937	69116
8/18/2020		39283	226015
8/21/2020	60093	216824	75913
8/25/2020	50786	58459	53490
8/28/2020	42001	26746	165454
9/1/2020	76001	29867	29768
9/4/2020	12162	16627	11536
9/8/2020	94083	144920	130835
9/11/2020	128780		67278
9/15/2020	37178		
9/18/2020	49538	40791	29803
9/22/2020			59550
9/25/2020			22873
9/29/2020			
10/2/2020	67710	59927	38919
10/6/2020	15740	6957	
10/13/2020	33712	6496	6854
10/16/2020		2456	31222
10/20/2020	112845	61384	192835
10/23/2020	38515	3523	136866
10/27/2020	35667	156082	17899
10/31/2020	145751	165466	351714

X: no analizado; Celda vacía: no se detecta; * muestras compuestas de 4h

Tabla 8.2.4. Concentraciones para los genes N1, N2 y E (copias gen /L) en agua residual de Castelló*.

Fecha (mm/dd/aa)	N1 (CG/L)	N2 (CG/L)	E (CG/L)
5/5/2020	21146		X
5/8/2020			X
5/12/2020			X
5/15/2020	33834		X
5/19/2020			X
5/22/2020			X
5/26/2020	36974		X
5/29/2020			X
6/2/2020			X
6/5/2020			X
6/9/2020	12196	5126	X
6/12/2020	66046	20118	X
6/16/2020	84707	22466	X
6/19/2020	14560	15335	X
6/23/2020			X
6/26/2020			X
6/30/2020			X
7/3/2020	31474	4527	
7/7/2020			
7/10/2020	22381		
7/14/2020			
7/17/2020			
7/21/2020			
7/24/2020			
7/28/2020			
7/31/2020			
8/4/2020			
8/7/2020			
8/11/2020	70832	94038	
8/14/2020	65624	86475	105870
8/18/2020			
8/21/2020	231050	378064	177979
8/25/2020	115585	56881	95638
8/28/2020	614547	274947	604315
9/1/2020	483945	181890	129784
9/4/2020	20397	43990	94092
9/8/2020	182297	243094	231012
9/11/2020	1146463	173070	711013
9/15/2020	484279	407977	585139
9/18/2020	231750	73654	62031
9/22/2020	46510	17353	115315
9/25/2020	161221	143775	305421
9/29/2020	37362	19692	79517
10/2/2020	112562	62593	25623
10/6/2020	195834	101382	48280
10/13/2020	105413	12665	13558
10/16/2020		909	22169
10/20/2020	244151	117516	444136
10/23/2020	461883	23989	735961
10/27/2020	18729	425117	812661
10/31/2020	250183	453176	1035988

X: no analizado; Celda vacía: no se detecta; * muestras compuestas de 4h

Tabla 8.2.5. Concentraciones para los genes N1, N2 y E (copias gen/L) en agua residual de Vila-real

Fecha (mm/dd/aa)	N1 (CG/L)	N2 (CG/L)	E (CG/L)
5/12/2020		28678	X
5/15/2020			X
5/19/2020			X
5/22/2020			X
5/26/2020	80542		X
5/29/2020			X
6/2/2020			X
6/5/2020			X
6/9/2020	38504	1785	X
6/12/2020			X
6/16/2020	72015		X
6/19/2020			X
6/23/2020			X
6/26/2020			X
6/30/2020			X
7/3/2020			
7/7/2020			
7/10/2020			
7/14/2020			
7/17/2020			
7/21/2020			
7/24/2020			
7/28/2020			
7/31/2020			
8/4/2020	39122	34851	23653
8/7/2020			
8/11/2020	69907	128819	
8/18/2020			
8/21/2020	46197		
8/25/2020	108073	76173	32680
8/28/2020	203883	78381	75542
9/1/2020	191492	40486	14978
9/4/2020	19199	59493	65475
9/8/2020	75321	110340	93330
9/11/2020	565650	251773	255201
9/15/2020			
9/18/2020	268746	122551	165371
9/22/2020	28901	12791	137041
9/25/2020	94734	19087	127860
9/29/2020	147255	208646	302110
10/2/2020	134114	75002	112826
10/6/2020	27493	13267	2659
10/13/2020			
10/16/2020	44525	914	33726
10/20/2020	325686	191371	427722
10/23/2020	34662	67411	1112390
10/27/2020	117044	466379	309116
10/31/2020	200515	459412	717598

X: no analizado; Celda vacía: no se detecta

Tabla 8.2.6. Concentraciones para los genes N1, N2 y E (copias gen /L) en agua residual de Vall d'Alba.

Fecha (mm/dd/aa)	N1 (CG/L)	N2 (CG/L)	E (CG/L)
5/12/2020			X
5/15/2020			X
5/19/2020			X
5/22/2020			X
5/26/2020			X
5/29/2020			X
6/2/2020			X
6/5/2020			X
6/9/2020			X
6/12/2020	97312		X
6/16/2020			X
6/19/2020			X
6/23/2020			X
6/26/2020			X
6/30/2020			X
7/3/2020			X
7/7/2020			X
7/10/2020			
7/14/2020			
7/17/2020			
7/21/2020			
7/24/2020			
7/28/2020			
7/31/2020	25463	35893	7667
8/4/2020			
8/7/2020			
8/11/2020	18220		
8/14/2020			
8/18/2020		16858	
8/21/2020			
8/25/2020			
8/28/2020			
9/1/2020	9341		
9/4/2020	11980		
9/8/2020	8784		
9/11/2020			
9/15/2020			
9/18/2020	54217	64344	27458
9/22/2020			
9/25/2020			
9/29/2020			
10/2/2020			
10/6/2020			
10/13/2020			
10/16/2020			
10/20/2020			
10/23/2020			
10/27/2020			
10/31/2020			155133

X: no analizado; Celda vacía: no se detecta

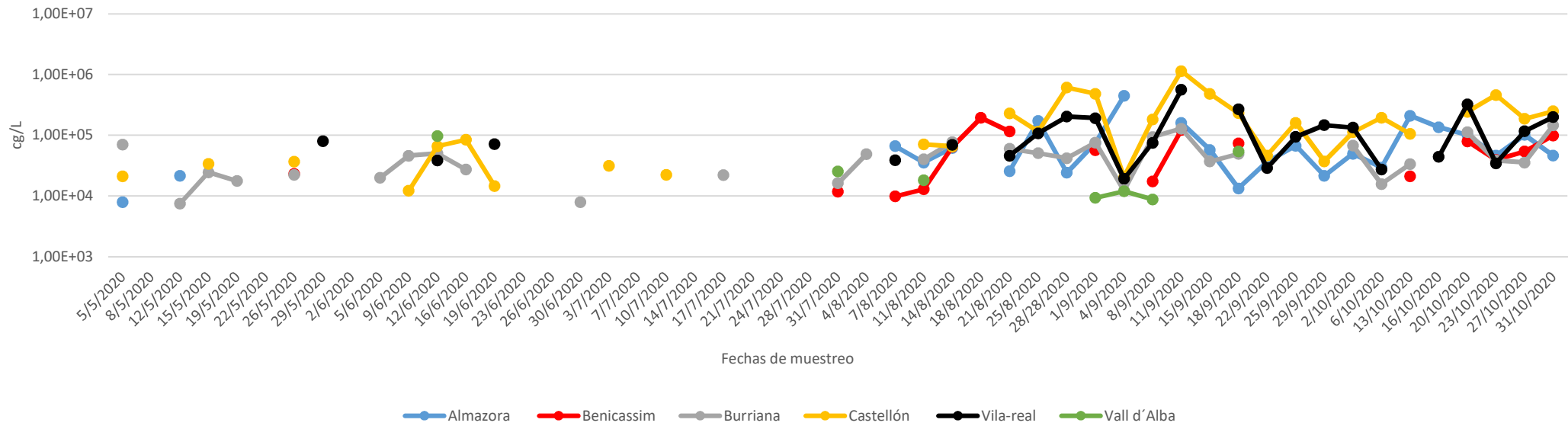


Figura 8.2.1. Evolución temporal de la detección del virus en todos los municipios estudiados. Se muestra la medida de carga vírica (cg/L) obtenida a partir de los datos del gen diana N1

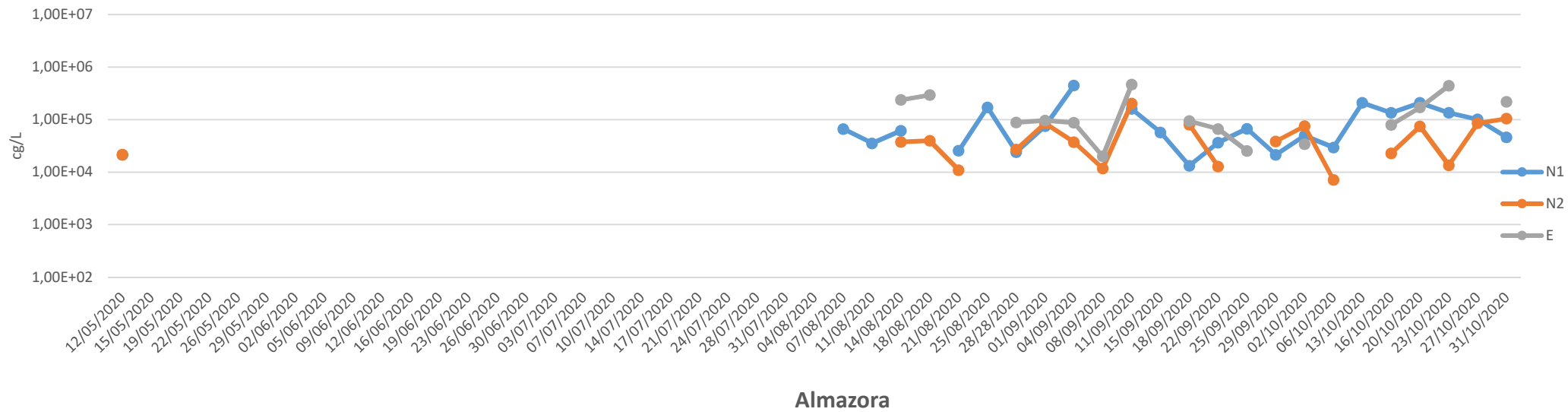


Figura 8.2.2. Representación de los datos de carga vírica (copias genéticas, cg/L) obtenidos a partir de cada gen diana estudiado (N1, N2 y E) en las aguas residuales de Almazora.

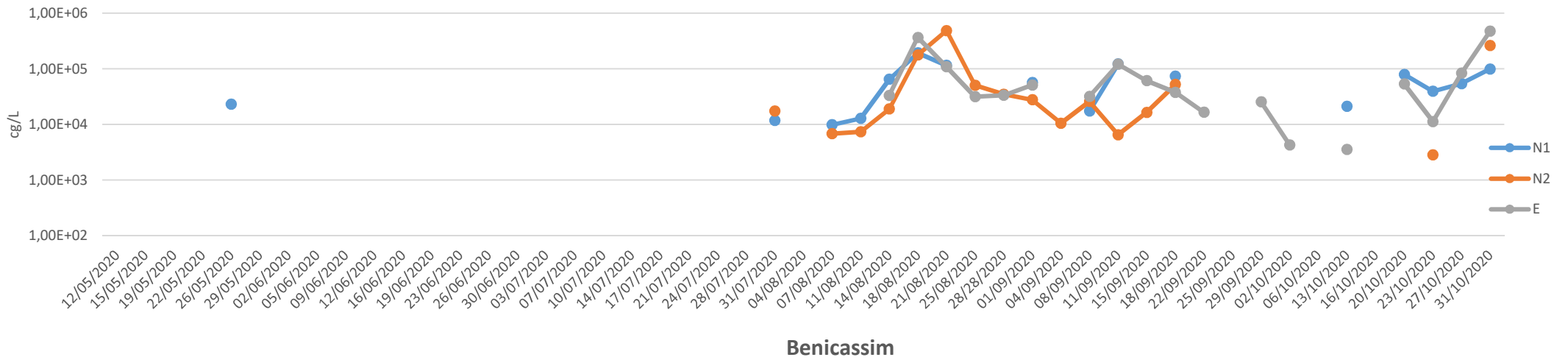


Figura 8.2.3. Representación de los datos de carga vírica (copias genéticas, cg/L) obtenidos a partir de cada gen diana estudiado (N1, N2 y E) en las aguas residuales de Benicassim

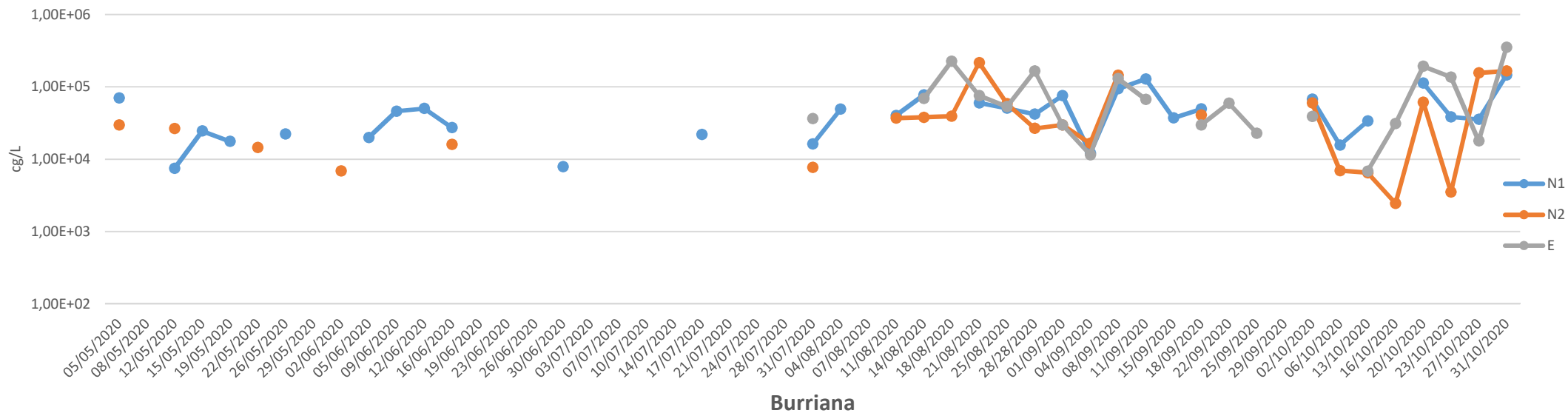


Figura 8.2.4. Representación de los datos de carga vírica (copias genéticas, cg/L) obtenidos a partir de cada gen diana estudiado (N1, N2 y E) en las aguas residuales de Burriana

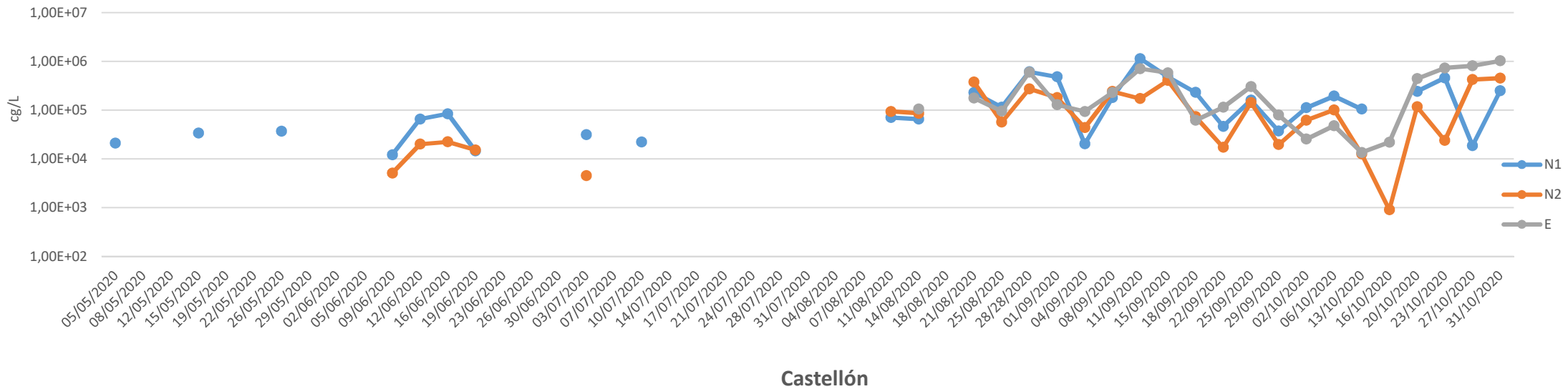


Figura 8.2.5. Representación de los datos de carga vírica (copias genéticas, cg/L) obtenidos a partir de cada gen diana estudiado (N1, N2 y E) en las aguas residuales de Castellón

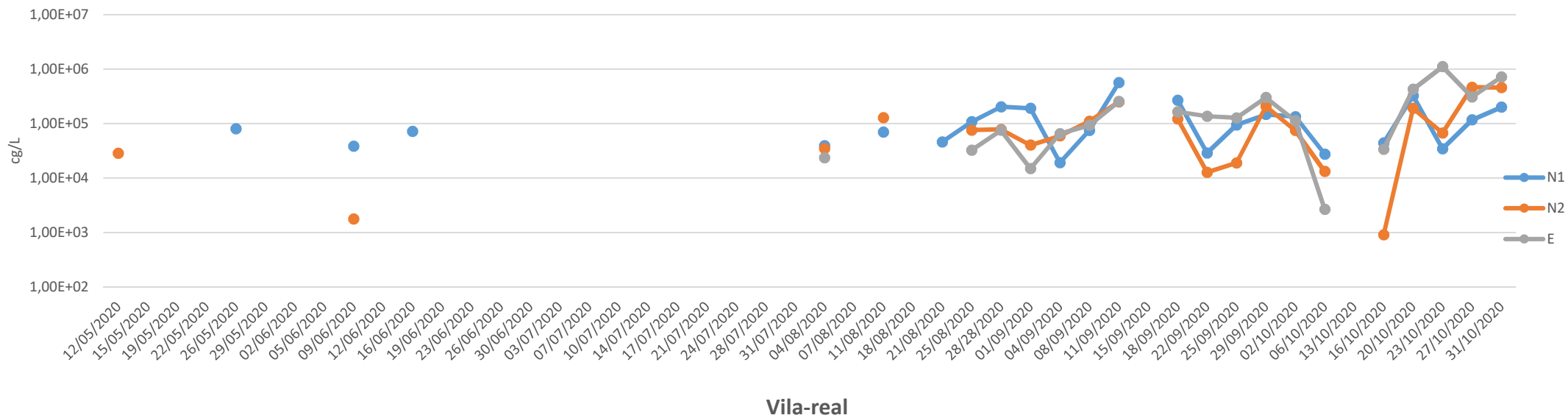


Figura 8.2.6. Representación de los datos de carga vírica (copias genéticas, cg/L) obtenidos a partir de cada gen diana estudiado (N1, N2 y E) en las aguas residuales de Vila-real

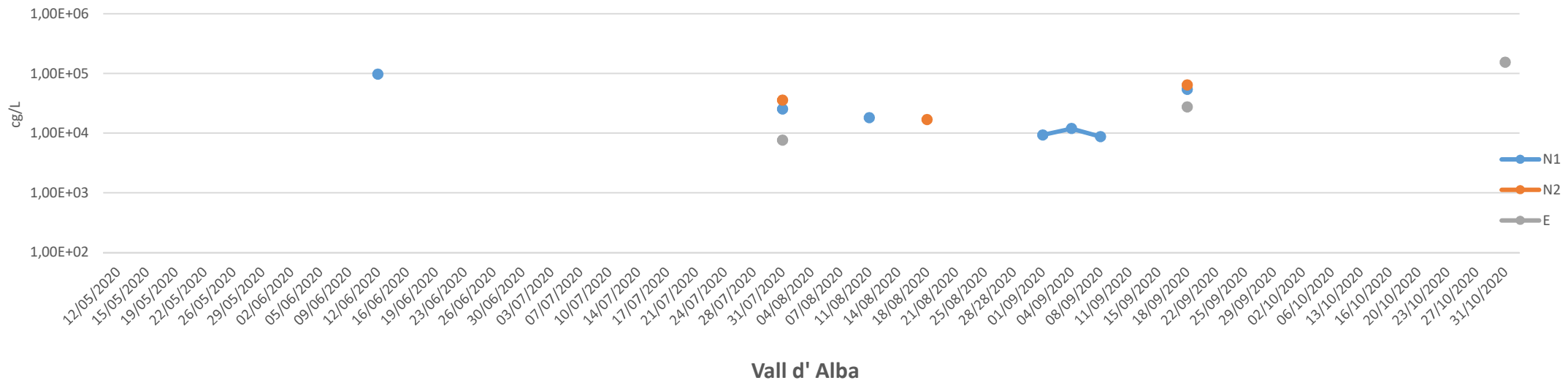


Figura 8.2.7. Representación de los datos de carga vírica (copias genéticas, cg/L) obtenidos a partir de cada gen diana estudiado (N1, N2 y E) en las aguas residuales de Vall d'Alba

8.3. APLICACIÓN DE LOS PRINCIPIOS DE WBE

En la sección 6 de este informe se ha comentado la metodología aplicada en los estudios sobre WBE, desde la toma de muestra hasta el cálculo de la carga normalizada por 1000 habitantes de una población. A partir de las copias génicas encontradas (CG/L), se puede estimar la cantidad diaria de este material genético del virus en el agua residual, expresado como carga en las 4 horas de toma de muestra, teniendo en cuenta los datos del caudal medido. Con los datos obtenidos, se puede finalmente hacer estimaciones sobre el nº de copias génicas/día y, teniendo en cuenta el tamaño de la población asociada a la red de saneamiento, se pueden normalizar los resultados, expresándolos como copias gen/día/1000 habitantes). Este último dato es el que se suele utilizar en los estudios sobre WBE para establecer posibles comparaciones entre poblaciones y tendencias a lo largo del tiempo.

Las **Tablas 8.3.1 - 8.3.6** muestran los resultados obtenidos en los análisis, expresados como copias gen/L en las muestras compuestas de 4h, así como la carga total de material genético del virus en las 4 horas de muestreo, y finalmente el dato de carga normalizada (copias gen/día/1.000 habitantes). La estimación de la carga diaria (copias gen/día) se ha realizado multiplicando x 6 el dato obtenido en las muestras de 4h ($4h \times 6 = 24h$). El número de habitantes asociado a cada EDAR se ha obtenido del censo de 2019, excepto en la EDAR de Almassora, que se ha estimado a partir de la DBO (epsar.gva.es). Los datos mostrados son los correspondientes al gen N1 que fue el que demostró ser más sensible.

Las **Tablas 8.3.7 y 8.3.8** resumen los datos comparados de las cargas y cargas normalizadas para las seis poblaciones estudiadas. A grandes rasgos, se puede observar cómo durante los meses de mayo-julio, en la mayor parte de las poblaciones, no se puede llegar a estimar un valor de carga normalizada pues el número de CG/L del gen N1 en las muestras recogidas en este periodo está por debajo de los límites de detección de la metodología aplicada. Las fechas se corresponden con el descenso en la curva de contagios experimentada después de la primera oleada de contagios en los meses de marzo y abril. Posteriormente, se aprecia un aumento generalizado en los valores de carga normalizada de copias génicas del gen N1 por población en los meses de agosto a octubre, correspondiente al segundo episodio de aumento de contagios. Entre ellos, se puede observar un pico alrededor de mediados del mes de septiembre para las poblaciones de Almassora, Borriana, Castelló y Vila-real.

Entre las poblaciones estudiadas, se puede observar que la que presenta, en general, una mayor carga normalizada del virus es Castelló. Dado que los datos están normalizados por población,

esto indica que la incidencia del virus por habitante es mayor que en el resto de las poblaciones durante los meses estudiados. No obstante, sería necesario tener en cuenta los posibles desplazamientos de personas que trabajan en Castellón, pero que tienen su residencia en otra población cercana, para disponer de mayor información que ayude a interpretar los resultados.

Tabla 8.3.1. Concentración (copias gen /L), carga (copias gen x 10⁹/4h) y carga normalizada (copias gen x 10⁹/día/1000 habitantes) del gen N1 en el agua residual de Almassora

Fecha (mm/dd/aa)	Concentración (CG/L)	Carga (CG x 10 ⁹ /4h)	Carga normalizada* (CG x 10 ⁹ /día/1000 habitantes)
5/12/2020	7900	10	2.3
5/15/2020			
5/19/2020	21565	29	6.7
5/22/2020			
5/26/2020			
5/29/2020			
6/2/2020			
6/5/2020			
6/9/2020			
6/12/2020			
6/16/2020			
6/19/2020			
6/23/2020			
6/26/2020			
6/30/2020			
7/3/2020			
7/7/2020			
7/10/2020			
7/14/2020			
7/17/2020			
7/21/2020			
7/24/2020			
7/28/2020			
7/31/2020			
8/4/2020			
8/7/2020			
8/11/2020			
8/14/2020	66568	83	19.1
8/18/2020	35618	44	9.9
8/21/2020	62026	105	23.9
8/25/2020			
8/28/2020	25712	44	10.0
9/1/2020	172183	163	37.2
9/4/2020	24266	31	7.2
9/8/2020	75495	64	14.6
9/11/2020	448013	431	98.4
9/15/2020			
9/18/2020	160746	171	39.0
9/22/2020	57499	96	22.0
9/25/2020	13327	14	3.1
9/29/2020	36785	65	14.8
10/2/2020	67538	100	22.9
10/6/2020	21478	30	6.9
10/13/2020	49687	63	14.3
10/16/2020	29584	50	11.4

Celda vacía: no se detecta; * Datos habitantes, tomados del censo

Tabla 8.3.2. Concentración (copias gen /L), carga (copias gen x 10⁹/4h) y carga normalizada (copias gen x 10⁹/día/1000 habitantes) del gen N1 en el agua residual de Benicassim.

Fecha (mm/dd/aa)	Concentración (CG/L)	Carga (CG x 10 ⁹ /4h)	Carga normalizada* (CG x 10 ⁹ /día/1000 habitantes)
5/12/2020			
5/15/2020			
5/19/2020			
5/22/2020			
5/26/2020	23238	26	8.5
5/29/2020			
6/2/2020			
6/5/2020			
6/9/2020			
6/12/2020			
6/16/2020			
6/19/2020			
6/23/2020			
6/26/2020			
6/30/2020			
7/3/2020			
7/7/2020			
7/10/2020			
7/14/2020			
7/17/2020			
7/21/2020			
7/24/2020			
7/28/2020			
7/31/2020	11755	12	4.0
8/4/2020			
8/7/2020	9892	11	
8/11/2020	12889	14	4.7
8/14/2020	64915	78	25.8
8/18/2020	194225	206	68.1
8/21/2020	115893	137	45.1
8/25/2020			
8/28/2020			
9/1/2020	57067	52	17.2
9/4/2020			
9/8/2020	17376	17	5.7
9/11/2020	122617	129	42.5
9/15/2020			
9/18/2020	73922	148	48.9
9/22/2020			
9/25/2020			
9/29/2020			
10/2/2020			
10/6/2020			
10/13/2020	21200	22	7.2
10/16/2020			

Celda vacía: no se detecta; * Datos habitantes, tomados del censo

Tabla 8.3.3. Concentración (copias gen /L), carga (copias gen x 10⁹/4h) y carga normalizada (copias gen x 10⁹/día/1000 habitantes) del gen N1 en el agua residual de Borriana.

Fecha (mm/dd/aa)	Concentración (CG/L)	Carga (CG x 10 ⁹ /4h)	Carga normalizada* (CG x 10 ⁹ /día/1000 habitantes)
5/5/2020	70185	159	27.5
5/8/2020			
5/12/2020	7471	14	2.4
5/15/2020	24612	61	10.6
5/19/2020	17685	42	7.3
5/22/2020			
5/26/2020	22304	51	8.9
5/29/2020			
6/2/2020			
6/5/2020	20000	43	7.4
6/9/2020	46142	110	19.1
6/12/2020	50350	120	20.8
6/16/2020	27356	63	11.0
6/19/2020			
6/23/2020			
6/26/2020			
6/30/2020	7891	15	2.7
7/3/2020			
7/7/2020			
7/10/2020			
7/14/2020			
7/17/2020	22063	59	10.2
7/21/2020			
7/24/2020			
7/28/2020			
7/31/2020	16278	43	7.4
8/4/2020	49141	106	18.4
8/7/2020			
8/11/2020	40366	94	16.2
8/14/2020	77460	178	30.8
8/18/2020			
8/21/2020	60093	144	24.9
8/25/2020	50786	119	20.6
8/28/2020	42001	101	17.4
9/1/2020	76001	183	31.7
9/4/2020	12162	25	4.3
9/8/2020	94083	207	35.8
9/11/2020	128780	308	53.3
9/15/2020	37178	94	16.2
9/18/2020	49538	165	28.6
9/22/2020			
9/25/2020			
9/29/2020			
10/2/2020	67710	154	26.6
10/6/2020	15740	37	6.5
10/13/2020	33712	71	12.3
10/16/2020			

Celda vacía: no se detecta; * Datos habitantes, tomados del censo

Tabla 8.3.4. Concentración (copias gen /L), carga (copias gen x 10⁹/4h) y carga normalizada (copias gen x 10⁹/día/1000 habitantes) del gen N1 en el agua residual de Castelló.

Fecha (mm/dd/aa)	Concentración (CG/L)	Carga (CG x 10 ⁹ /4h)	Carga normalizada (CG x 10 ⁹ /día/1000 habitantes)
5/5/2020	21146	135	4.6
5/8/2020			
5/12/2020			
5/15/2020	33834	220	7.5
5/19/2020			
5/22/2020			
5/26/2020	36974	237	8.0
5/29/2020			
6/2/2020			
6/5/2020			
6/9/2020	12196	77	2.6
6/12/2020	66046	406	13.7
6/16/2020	84707	533	18.1
6/19/2020	14560	99	3.4
6/23/2020			
6/26/2020			
6/30/2020			
7/3/2020	31474	218	7.4
7/7/2020			
7/10/2020	22381	141	4.8
7/14/2020			
7/17/2020			
7/21/2020			
7/24/2020			
7/28/2020			
7/31/2020			
8/4/2020			
8/7/2020			
8/11/2020	70832	472	16.0
8/14/2020	65624	424	14.4
8/18/2020			
8/21/2020	231050	1387	47.0
8/25/2020	115585	732	24.8
8/28/2020	614547	4157	140.9
9/1/2020	483945	3391	114.9
9/4/2020	20397	137	4.6
9/8/2020	182297	1287	43.6
9/11/2020	1146463	8413	285.0
9/15/2020	484279	3744	126.9
9/18/2020	231750	2500	84.7
9/22/2020	46510	361	12.2
9/25/2020	161221	1254	42.5
9/29/2020	37362	284	9.6
10/2/2020	112562	899	30.5
10/6/2020	195834	1522	51.6
10/13/2020	105413	850	28.8
10/16/2020			

Celda vacía: no se detecta; * Datos habitantes, tomados del censo

Tabla 8.3.5. Concentración (copias gen /L), carga (copias gen x 10⁹/4h) y carga normalizada (copias gen x 10⁹/día/1000 habitantes) del gen N1 en el agua residual de Vila-real (Vora Riu).

Fecha (mm/dd/aa)	Concentración (CG/L)	Carga (CG x 10 ⁹ /4h)	Carga normalizada (CG x 10 ⁹ /día/1000 habitantes)
5/12/2020			
5/15/2020			
5/19/2020			
5/22/2020			
5/26/2020	80542	47	14.7
5/29/2020			
6/2/2020			
6/5/2020			
6/9/2020	38504	23	7.3
6/12/2020			
6/16/2020	72015	37	11.6
6/19/2020			
6/23/2020			
6/26/2020			
6/30/2020			
7/3/2020			
7/7/2020			
7/10/2020			
7/14/2020			
7/17/2020			
7/21/2020			
7/24/2020			
7/28/2020			
7/31/2020			
8/4/2020	39122	17	5.4
8/7/2020			
8/11/2020	69907	36	11.5
8/18/2020			
8/21/2020	46197	23	7.4
8/25/2020	108073	55	17.5
8/28/2020	203883	124	39.1
9/1/2020	191492	117	37.1
9/4/2020	19199	11	3.4
9/8/2020	75321	45	14.4
9/11/2020	565650	296	93.7
9/15/2020			
9/18/2020	268746	429	136.1
9/22/2020	28901	17	
9/25/2020	94734	53	
9/29/2020	147255	78	
10/2/2020	134114	42	13.4
10/6/2020	27493	16	4.9
10/13/2020			
10/16/2020	44525	26	8.2

Celda vacía: no se detecta; * Datos habitantes, basado en IE-DBO (epsar.gva.es)

Tabla 8.3.6. Concentración (copias gen /L), carga (copias gen x 10⁹/4h) y carga normalizada (copias gen x 10⁹/día/1000 habitantes) del gen N1 en el agua residual de Vall d'Alba.

Fecha (mm/dd/aa)	Concentración (CG/L)	Carga (CG · 10 ⁹ /4h)	Carga normalizada (CG · 10 ⁹ /día/1000 habitantes)
5/12/2020			
5/15/2020			
5/19/2020			
5/22/2020			
5/26/2020			
5/29/2020			
6/2/2020			
6/5/2020			
6/9/2020			
6/12/2020	97312	8.8	18.8
6/16/2020			
6/19/2020			
6/23/2020			
6/26/2020			
6/30/2020			
7/3/2020			
7/7/2020			
7/10/2020			
7/14/2020			
7/17/2020			
7/21/2020			
7/24/2020			
7/28/2020			
7/31/2020	25463	1.8	3.9
8/4/2020			
8/7/2020			
8/11/2020	18220	1.6	3.5
8/14/2020			
8/18/2020			
8/21/2020			
8/25/2020			
8/28/2020			
9/1/2020	9341	1.0	
9/4/2020	11980	1.2	
9/8/2020	8784	0.8	1.7
9/11/2020			
9/15/2020			
9/18/2020	54217	6.8	14.6
9/22/2020			
9/25/2020			
9/29/2020			
10/2/2020			
10/6/2020			
10/13/2020			
10/16/2020			

Celda vacía: no se detecta; * Datos habitantes, tomados del censo

Tabla 8.3.7. Tabla comparativa de cargas para el gen N1 (copias gen x 10⁹/4h) en muestras compuestas de 4h en los diferentes municipios estudiados

Fecha (mm/dd/aa)	Almassora	Benicassim	Borriana	Castelló	Vila-real	Vall d'Alba
5/5/2020	-	-	159	135	-	-
5/8/2020	-	-			-	-
5/12/2020	10		14			
5/15/2020			61	220		
5/19/2020	29		42			
5/22/2020						
5/26/2020		26	51	237	47	
5/29/2020						
6/2/2020						
6/5/2020			43			
6/9/2020			110	77	23	
6/12/2020			120	406		8.8
6/16/2020			63	533	37	
6/19/2020				99		
6/23/2020						
6/26/2020						
6/30/2020			15			
7/3/2020				218		
7/7/2020						
7/10/2020				141		
7/14/2020						
7/17/2020			59			
7/21/2020						
7/24/2020						
7/28/2020						
7/31/2020		12	43			1.8
8/4/2020			106		17	
8/7/2020		11				
8/11/2020		14	94	472	36	1.6
8/14/2020	83	78	178	424	-	
8/18/2020	44	206				
8/21/2020	105	137	144	1387	23	
8/25/2020			119	732	55	
8/28/2020	44		101	4157	124	
9/1/2020	163	52	183	3391	117	1.0
9/4/2020	31		25	137	11	1.2
9/8/2020	64	17	207	1287	45	0.8
9/11/2020	431	129	308	8413	296	
9/15/2020			94	3744		
9/18/2020	171	148	165	2500	429	6.8
9/22/2020	96			361	17	
9/25/2020	14			1254	53	
9/29/2020	65			284	78	
10/2/2020	100		154	899	42	
10/6/2020	30		37	1522	16	
10/13/2020	63	22	71	850		
10/16/2020	50				26	

-: no hay muestra; dato no disponible

Celda vacía: No se detecta

Tabla 8.3.8. Tabla comparativa de cargas normalizadas para el gen N1 (copias gen N1 x 10⁹/día/1000 habitantes) en los municipios estudiados

Fecha (mm/dd/aa)	Almassora	Benicassim	Borriana	Castelló	Vila-real	Vall d'Alba
5/5/2020	-	-	27.5	4.6	-	-
5/8/2020	-	-			-	-
5/12/2020	2.3		2.4			
5/15/2020			10.6	7.5		
5/19/2020	6.7		7.3			
5/22/2020						
5/26/2020		8.5	8.9	8.0	14.7	
5/29/2020						
6/2/2020						
6/5/2020			7.4			
6/9/2020			19.1	2.6	7.3	
6/12/2020			20.8	13.7		18.8
6/16/2020			11.0	18.1	11.6	
6/19/2020				3.4		
6/23/2020						
6/26/2020						
6/30/2020			2.7			
7/3/2020				7.4		
7/7/2020						
7/10/2020				4.8		
7/14/2020						
7/17/2020			10.2			
7/21/2020						
7/24/2020						
7/28/2020						
7/31/2020		4.0	7.4			3.9
8/4/2020			18.4		5.4	
8/7/2020						
8/11/2020		4.7	16.2	16.0	11.5	3.5
8/14/2020	19.1	25.8	30.8	14.4	-	
8/18/2020	9.9	68.1				
8/21/2020	23.9	45.1	24.9	47.0	7.4	
8/25/2020			20.6	24.8	17.5	
8/28/2020	10.0		17.4	140.9	39.1	
9/1/2020	37.2	17.2	31.7	114.9	37.1	
9/4/2020	7.2		4.3	4.6	3.4	
9/8/2020	14.6	5.7	35.8	43.6	14.4	1.7
9/11/2020	98.4	42.5	53.3	285.0	93.7	
9/15/2020			16.2	126.9		
9/18/2020	39.0	48.9	28.6	84.7	136.1	14.6
9/22/2020	22.0			12.2		
9/25/2020	3.1			42.5		
9/29/2020	14.8			9.6		
10/2/2020	22.9		26.6	30.5	13.4	
10/6/2020	6.9		6.5	51.6	4.9	
10/13/2020	14.3	7.2	12.3	28.8		
10/16/2020	11.4					

-: no hay muestra; dato no disponible

Celda vacía: No se detecta

8.4. MUESTREOS DE 4 HORAS Y DE 24 HORAS

La recogida de muestras puntuales es la práctica más común descrita en la literatura científica para la investigación de SARS-CoV-2 en aguas residuales (*Alygizakis et al. 2020*). Sin embargo, de esta manera no se puede tener en cuenta el caudal de aguas residuales influentes utilizado comúnmente para compensar las variaciones continuas de caudal y que permite calcular la carga diaria, o al menos, durante las horas de muestreo. Esta limitación puede evitarse mediante la recolección de muestras compuestas de varias horas para asegurar su representatividad y reducir así las incertidumbres asociados al cálculo retrospectivo. SCORE recomienda la toma de muestras compuestas de 24h para la mayoría de aplicaciones; por ejemplo, estimación del consumo de drogas de abuso, fármacos, alcohol, tabaco, etc. (<https://score-cost.eu/>), teniendo en cuenta que los perfiles de excreción pueden variar significativamente a lo largo del día o días debido a los cortos tiempos de vida media de los biomarcadores.

En una etapa inicial del presente trabajo, se tenía poco conocimiento de la estabilidad y el periodo de vida media de SARS-CoV-2, por lo que la idea principal fue focalizar el muestreo a lo largo de la mañana. La razón de esta estrategia reside que la población es más propensa a defecar por la mañana, por lo que las muestras más concentradas podrían obtenerse durante estas horas del día. Además, esto permitió al laboratorio llevar a cabo los análisis en el mismo día de la colección de la muestra, tan solo unas horas después del muestreo minimizando la posible degradación de los restos víricos. Sin embargo, la frecuencia de los movimientos intestinales se ha demostrado que puede variar sustancialmente tanto inter-individuos (desde una vez en 4 días hasta 3 veces al día) como intra-individuos (debido a episodios de estreñimiento, ciclo menstrual y/o el uso de anticonceptivos orales). Así pues, podían perderse pulsos de concentración relevantes y no ser recolectados, si el muestro se centra sólo en un periodo específico del día (*Medema et al. 2020*).

Por todo lo indicado, en esta investigación se decidió recoger tanto muestras compuestas de 4h (de 8 a 12 a.m. del día X) como de 24h (de 8 am del día X a 8 a.m del día X+1) en poblaciones seleccionadas. El estudio comparado se ha realizado en las EDAR de Castelló y Borriana, tomando las dos muestras cada uno de los días de muestreo realizados a lo largo del estudio. Ambas muestras han sido analizadas y sus resultados comparados. El estudio cuantitativo comparado solo se ha podido realizar a partir de resultados positivos, por lo que todas aquellas muestras que resultaron negativas al virus, no han podido ser utilizadas en dicha comparación. A pesar de ello, se ha dispuesto de un buen número de datos para llevar a cabo la comparación.

Las **Tablas 8.4.1 (Castelló)** y **Tabla 8.4.2 (Borriana)** muestran las cargas diarias (copias gen/día) para los tres genes (N1, N2, E) calculadas a partir del dato obtenido en las muestras de 4h (multiplicando por 6 la carga calculada para dicha muestra) así como en las muestras de 24h tomadas el mismo día.

**Tabla 8.4.1 A: Carga diaria 4h vs 24h calculada para los genes N1, N2 y E (copias gen x 10⁹/día)
Castelló Mayo – Julio 2020.**

Fecha (mes/día/año)	Carga N1/día (muestra 4h)*	Carga N1/día (muestra 24h)	Carga N2/día (muestra 4h)*	Carga N2/día (muestra 24h)	Carga E/día (muestra 4h)*	Carga E/día (muestra 24h)
5/12/2020					X	X
5/15/2020	1321				X	X
5/19/2020					X	X
5/22/2020					X	X
5/26/2020	1422	3794		189	X	X
5/29/2020					X	X
6/2/2020					X	X
6/5/2020					X	X
6/9/2020	460		193	375	X	X
6/12/2020	2433	12124	741		X	X
6/16/2020	3198	5823	848		X	X
6/19/2020	596		628		X	X
6/23/2020					X	X
6/26/2020		162	22		X	X
6/30/2020		308	36		X	X
7/3/2020	1309		188			
7/7/2020						
7/10/2020	844					
7/14/2020						
7/17/2020		1291				
7/21/2020						
7/24/2020						
7/28/2020						
7/31/2020		752				391

* El valor indicado resulta de multiplicar x 6 la carga calculada para la muestra de 4h (=24h)

X = no analizado

**Tabla 8.4.1.B. Carga diaria 4h vs 24h calculada para los genes N1, N2 y E (Copias gen x 10⁹/día)
Castelló Agosto – Octubre 2020.**

Fecha (mes/día/año)	Carga N1/día (muestra 4h)*	Carga N1/día (muestra 24h)	Carga N2/día (muestra 4h)*	Carga N2/día (muestra 24h)	Carga E/día (muestra 4h)*	Carga E/día (muestra 24h)
8/4/2020						
8/7/2020		955		910		
8/11/2020	2832		3759			
8/14/2020	2547		3356		4109	
8/18/2020		18775		15561		50336
8/21/2020	8323		13619		6412	
8/25/2020	4392	40193	2161	7186	3634	5748
8/28/2020	24944	38927	11160	29922	24529	36319
9/1/2020	20346	23875	7647	12502	5456	9662
9/4/2020	822	1500	1773	1352	3793	2383
9/8/2020	7721	5743	10296	4701	9784	5535
9/11/2020	50476	79048	7620	6930	31304	36546
9/15/2020	22467	22797	18927	33006	27146	34892
9/18/2020	14998	3091	4767	5283	4014	925
9/22/2020	2168	1502	809	188	5375	2156
9/25/2020	7524	5415	6710	3059	14253	7118
9/29/2020	1705	1694	899	854	3629	3481
10/2/2020	5394	2692	3000	2620	1228	1940
10/6/2020	9133	2624	4728	1046	2252	569
10/13/2020	5098	3671	613	1229	656	476
10/16/2020		970		294		947

* El valor indicado resulta de multiplicar x 6 la carga calculada para la muestra de 4h (=24h)

**Tabla 8.4.2.A. Carga diaria 4h vs 24h calculada para los genes N1, N2 y E (Copias gen x 10⁹/día)
Borriana Mayo – Julio 2020.**

Fecha (mes/día/año)	Carga N1/día (muestra 4h)*	Carga N1/día (muestra 24h)	Carga N2/día (muestra 4h)*	Carga N2/día (muestra 24h)	Carga E/día (muestra 4h)*	Carga E/día (muestra 24h)
5/22/2020			208		X	X
5/26/2020	307	964	40		X	X
5/29/2020				14	X	X
6/2/2020		1029	112		X	X
6/5/2020	257				X	X
6/9/2020	662	78	3		X	X
6/12/2020	722				X	X
6/16/2020	380	124	13		X	X
6/19/2020		100			X	X
6/23/2020					X	X
6/26/2020				26	X	X
6/30/2020	92				X	X
7/3/2020						
7/7/2020						
7/10/2020		481				
7/14/2020						
7/17/2020	354					
7/21/2020						
7/24/2020						
7/28/2020						
7/31/2020	258	111	122		576	410

* El valor indicado resulta de multiplicar x 6 la carga calculada para la muestra de 4h (=24h)

X = no analizado

**Tabla 8.4.2.B. Carga diaria 4h vs 24h calculada para los genes N1, N2 y E (Copias Gen x 10⁹/día)
Borriana Agosto – Octubre 2020.**

Fecha (mes/día/año)	Carga N1/día (muestra 4h)*	Carga N1/día (muestra 24h)	Carga N2/día (muestra 4h)*	Carga N2/día (muestra 24h)	Carga E/día (muestra 4h)*	Carga E/día (muestra 24h)
8/4/2020	638					
8/7/2020						
8/11/2020	562		516			
8/14/2020	1067		523		952	
8/18/2020		271	580	108	3337	2393
8/21/2020	862	674	3110	973	1089	470
8/25/2020	714	919	822	306	752	409
8/28/2020	604	914	385	290	2379	474
9/1/2020	1099	892	432	409	431	
9/4/2020					142	390
9/8/2020	1241	6208	1911	5936	1725	3731
9/11/2020	1847	745		469	965	2480
9/15/2020	562	501	773	113	26	356
9/18/2020	992	992	817	258	597	1357
9/22/2020						
9/25/2020						
9/29/2020						
10/2/2020	923	660	817	539	531	254
10/6/2020	224		99			
10/13/2020	426	735	82	199	87	
10/16/2020					458	148

* El valor indicado resulta de multiplicar x 6 la carga calculada para la muestra de 4h (=24h)

La **Figura 8.4.1** muestra la carga de copias de genes de N1, N2 y E en muestras de 4h (azul) y de 24h (naranja) en Castelló (izquierda) y Borriana (derecha). Se observa una alta variabilidad y no parece haber diferencias significativas al comparar 4h vs. 24h. Los perfiles resultantes parecen semejantes, de forma que, con ambos tipos de muestras, las cargas obtenidas muestran las mismas tendencias en cuanto a la carga vírica, lo que se podría interpretar como que ambas dan el mismo tipo de información. Y esto ocurre para los tres genes, N1, N2 y E.

Sin embargo, los resultados no han sido concluyentes en cuanto a la mejor forma de muestreo. Las muestras de 4h son más rápidas de tomar, requieren menos tiempo de atención a los muestreadores y pueden analizarse el mismo día del muestreo, al tiempo que se minimizan las posibles degradaciones del material vírico analizado. Sin duda, un muestreo de 4h es logísticamente más sencillo que uno de 24h. Sin embargo, su representatividad es menor que la de las muestras de 24h. Estas últimas, son las habitualmente tomadas en estudios WBE, pero podrían correr el riesgo de una mayor degradación al estar más tiempo las diferentes alícuotas tomadas con un control menos riguroso de la temperatura, e incluso sin control alguno, lo que puede ser especialmente importante en los meses de verano

Son necesarios más estudios con el fin de obtener más información sobre el perfil de excreción del SARS-CoV-2 y sobre la infraestructura de las redes de alcantarillado ya que, por ejemplo, la distancia entre el punto de vertido/deposición y el punto de muestreo puede jugar un papel importante en los resultados.

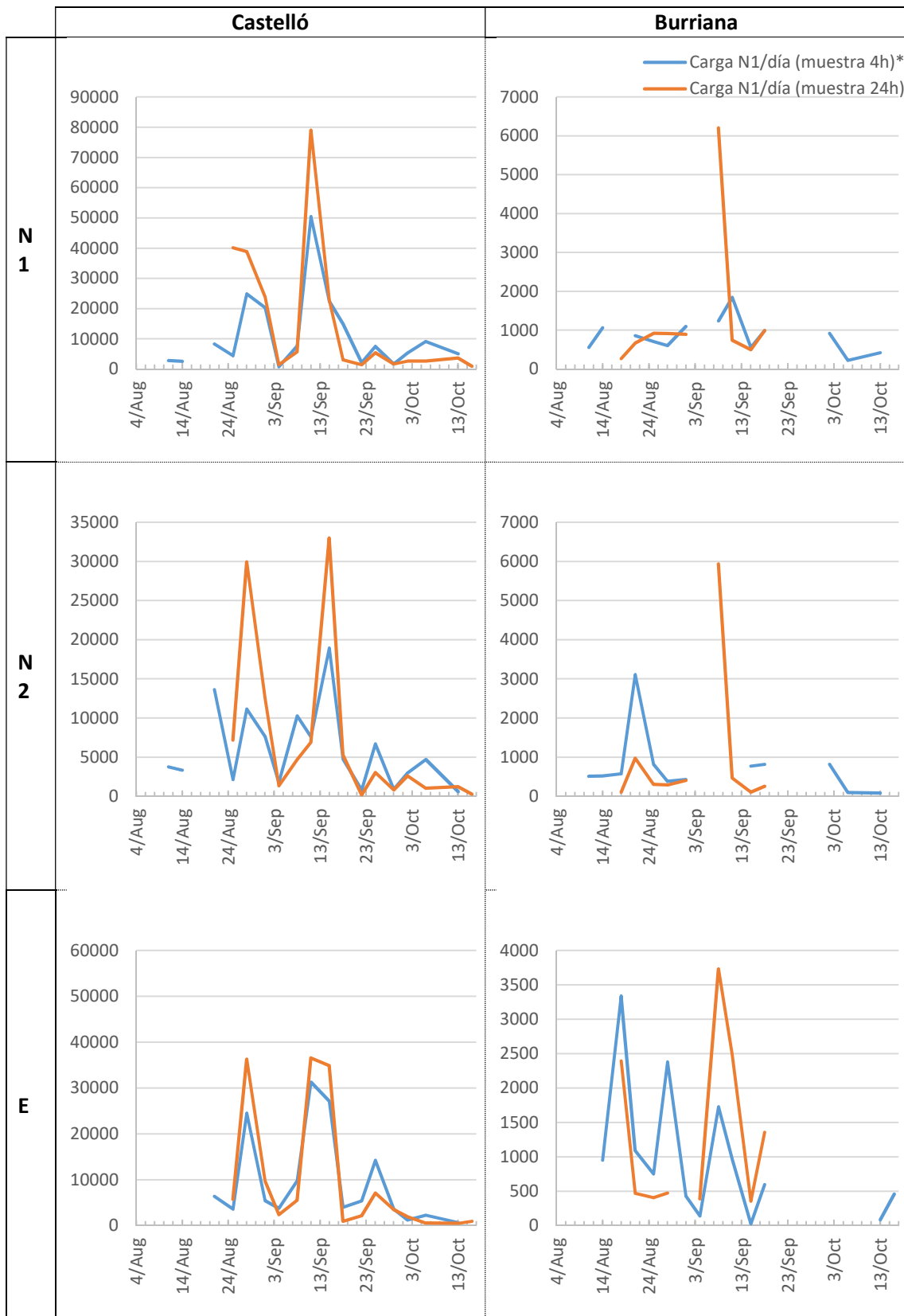


Figura 8.4.1. Comparación de cargas diarias (copias gen x 10⁹/día) estimadas a partir de muestras compuestas de 4h y de 24h

8.5. ESTUDIO ESPECÍFICO DE UN BROTE DETECTADO EN CASTELLÓN

La coincidencia de un brote de COVID-19 a finales de junio en Castelló de la Plana, junto con la posibilidad de realización de muestreos complementarios en distintos puntos de la red de alcantarillado, llevaron a la puesta en marcha de un seguimiento específico de los niveles de SARS-CoV-2 en las aguas residuales de la población afectada por este brote. Se aprovechó la oportunidad para estudiar los niveles del virus en las aguas residuales de zonas con presencia conocida de casos y para comparar las posibles diferencias entre la detección y cuantificación de SARS-CoV-2 en la proximidad de sus viviendas y los resultados a la entrada de la EDAR.

- **MATERIAL Y MÉTODOS**

Área de estudio

El estudio se llevó a cabo en Castelló de la Plana (171.728 hab, INE 2019). La EDAR del municipio, situada al este del núcleo urbano, tiene un caudal medio de 36 403 m³/día y sirve a un total de 159.258 habitantes equivalentes (EPSAR, 2019). Durante el periodo de estudio, prestó servicio además al municipio vecino de Borriol (5.360 habitantes) y según la demanda, también a Benicàssim (18.192 habitantes), municipio turístico próximo.

El trabajo se centró en los dos barrios del municipio afectados por el brote, el barrio 1, ubicado al sudoeste, y el barrio 2, situado en la zona norte (**Figura 8.5.1**), separados ambos por una distancia próxima a los 3 Km.

Periodo de estudio

El estudio en aguas residuales se inició el 7 de julio y se mantuvo hasta el 7 de agosto de 2020, coincidiendo con un periodo próximo al fin de las restricciones derivadas de la primera ola de COVID-19 y, fuera del brote, con una baja incidencia de casos en la zona.

Obtención de los datos epidemiológicos

Se trabajó con los datos incluidos en las encuestas epidemiológicas realizadas desde el Centro de Salud Pública de Castellón, derivadas de la búsqueda activa de casos. Estas encuestas disponen de información personal de cada paciente (edad, sexo), aspectos clínicos (fecha de inicio de síntomas, fecha de diagnóstico, asintomático, ingreso en hospital) e información sobre los desplazamientos realizados y contacto con casos, entre otros. Los criterios de definición de caso, fueron los recomendados por el Ministerio de Sanidad a fecha 7 de julio de 2020.

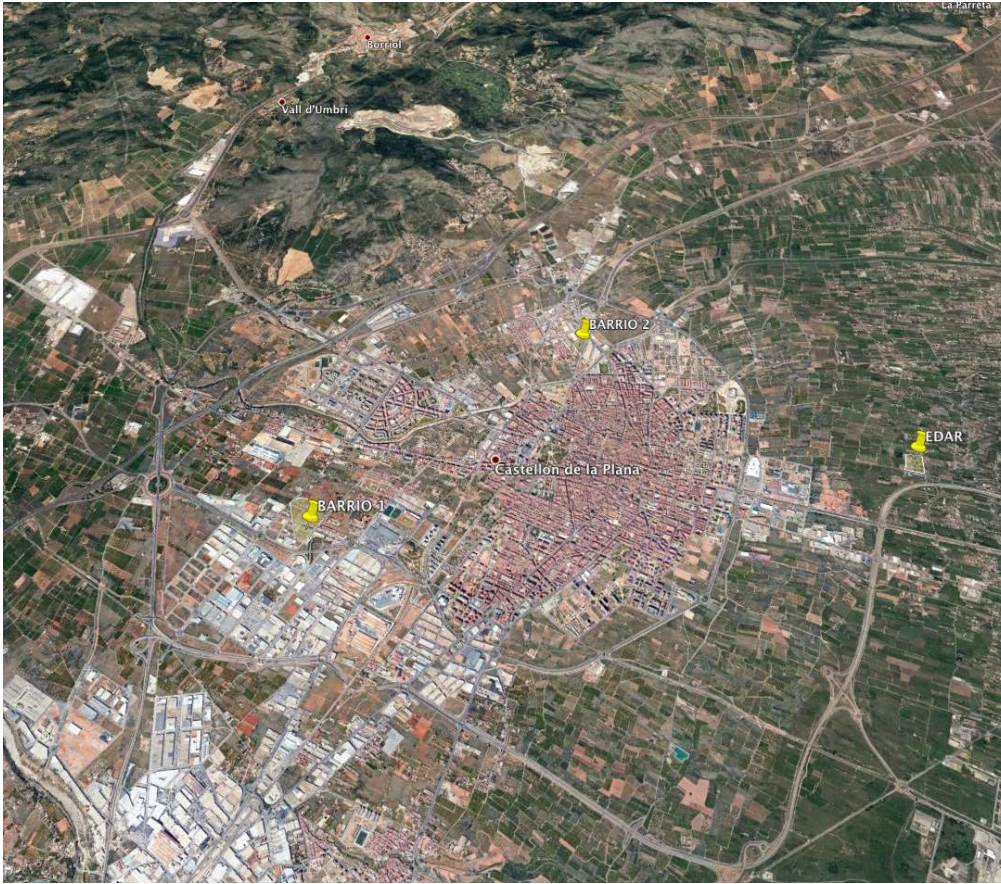


Figura 8.5.1. Ubicación de los barrios de estudio y de la EDAR de Castelló de la Plana

Toma de muestras

Se tomaron un total de 33 muestras compuestas, a razón de 2 semanales (martes y viernes). En cada uno de los puntos de muestreo ubicados en los barrios de estudio se tomaron 10 muestras compuestas de 4 horas, en horario de 8:00-12:00 am. En el influente de la EDAR se tomaron los mismos días un total de 13 muestras, de las cuales 8 de ellas fueron muestras compuestas de de 4 horas (8:00-12:00 am) y 5 muestras compuestas de 24 horas (8:00-8:00 am). El volumen de cada muestra fue de 2 litros y estuvo formada por 6 submuestras puntuales, espaciadas aproximadamente 45 minutos entre ellas.

Los puntos de muestreo en cada barrio se seleccionaron priorizando la proximidad a los domicilios de los afectados. Sus características se incluyen en la **Tabla 8.5.1.**

Tabla 8.5.1. Características de los puntos de muestreo

BARRIO	BARRIO 1	BARRIO 2
Distancia del foco activo* al punto de toma de muestras	20 m	118 m
Distancia del foco activo a la EDAR	4 124 m	9 224 m
Nº de bombeos intermedios	1	2
Tiempo de tránsito desde foco activo a EDAR	115 min	256 min
Velocidad media	0,6 m/s	0,6m/s

* Se consideraron como focos activos las viviendas con mayor concentración de casos: unos bloques de viviendas en el barrio 1, con 9 casos, y un domicilio en el barrio 2, con 14 casos.

Procesado, extracción y análisis de las muestras

Las aguas se sometieron a un proceso de concentración, mediante un protocolo basado en la adsorción y precipitación por aluminio. Para determinar la eficacia de todo el proceso y dar validez a los resultados, las muestras fueron cebadas con la cepa de mengovirus (MgV) vMCO (CECT100000), según ISO 10705-3:2003, ISO15216-1:2017.

La extracción de RNA y el análisis por RT-qPCR, se realizaron siguiendo procedimientos validados y/o recomendados. Se utilizaron cebadores y sondas específicos N1, N2 y E, que codifican para distintas regiones específicas de la nucleocápside del SARS-CoV-2, así como el plásmido control (2019-nCoVNP). Se puede encontrar más información sobre procesado y análisis de las muestras en la sección 5.

- **RESULTADOS**

Aspectos epidemiológicos

El brote se notificó el 27 de junio y se cerró aproximadamente un mes después. Se diagnosticaron un total de 37 casos, con similar proporción de hombres/mujeres y con un rango de edad comprendido entre los 2 y los 65 años. Ninguno de los afectados requirió hospitalización.

El origen del brote se vinculó a los casos previos declarados en Lleida (municipio a 240 Km) y se diseminó principalmente por los 2 barrios incluidos en el estudio, siendo 14 los casos del barrio 1 y 16 los del barrio 2. A todas las personas afectadas se les indicó la necesidad de aislamiento en sus domicilios (14 días). Cabe señalar la particularidad de que 9 de los casos del barrio 1

residían en los mismos bloques de pisos y que en el barrio 2, hasta 14 personas estuvieron confinadas en la misma casa, lo que fue determinante para la elección de las acometidas de muestreo (Tabla 8.5.1).

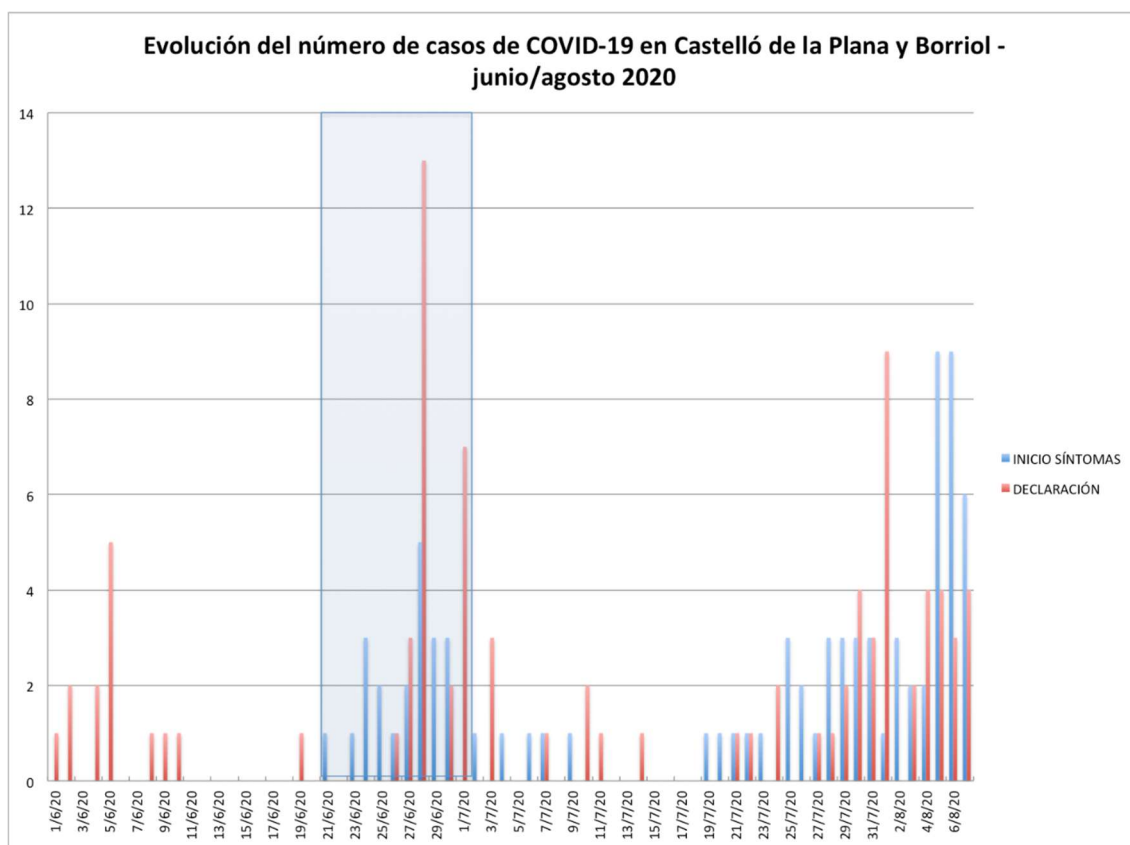


Figura 8.5.2. Evolución del número de casos declarados de residentes en el municipio de Castelló de la Plana y Borriol, 1 de junio- 7 de agosto 2020. En rojo, según fecha de declaración y en azul, según fecha de inicio de síntomas (cuando disponible). Sombreado en azul, el periodo de inicio de síntomas de los casos del brote.

En la **Figura 8.5.2** puede observarse la evolución del número de casos desde el inicio del mes de junio hasta el fin de los muestreos en aguas residuales para los municipios conectados de manera continua a la EDAR de Castellón. Se muestran los casos declarados confirmados, tanto según fecha de declaración como fecha de inicio de síntomas. En el gráfico puede observarse la concentración de los casos correspondientes al brote a finales del mes de junio.

Resultados analíticos

Se determinó y cuantificó la presencia de SARS-CoV-2 en la proximidad de los casos en ambos barrios. En el barrio 2, únicamente amplificó el gen N1, mientras que en el barrio 1 lo hicieron N1 y N2. El gen E no fue detectado en ninguna de las muestras tomadas en la proximidad de los casos. Los niveles obtenidos en aguas residuales para los genes N1 y N2 se muestran en las **Tablas 8.5.2 y 8.5.3** respectivamente, tanto para las muestras tomadas en cada barrio como para las correspondientes al influente de la EDAR municipal.

Los valores obtenidos fueron más elevados en el barrio 1, en donde el 14 de julio, se alcanzaron las 645.654 copias genómicas/l para el gen N1. Por su parte, en el barrio 2 la concentración máxima alcanzada fue de 67.608 copias genómicas/l, registrada el primer día de muestreo.

Tabla 8.5.2. Niveles de SARS-CoV-2 (copias genómicas/l) detectados en las muestras de aguas residuales en los distintos puntos de muestreo. Gen N1.

FECHA MUESTREO	BARRIO 1	BARRIO 2	INFLUENTE EDAR 4 H	INFLUENTE EDAR 24 H
7/7/20	446 683	67 608	ND	-
10/7/20	ND	ND	22 387	-
14/7/20	645 654	35 481	ND	-
17/7/20	ND	30 199	ND	34 674
21/7/20	ND	ND	ND	ND
24/7/20	ND	ND	-	ND
28/7/20	ND	ND	ND	-
31/7/20	ND	ND	-	19 055
4/8/20	ND	ND	ND	23 442
7/8/20	ND	ND	-	-

*ND: No detectado

Tabla 8.5.3. Niveles de SARS-CoV-2 (copias genómicas/l) detectados en las muestras de aguas residuales en los distintos puntos de muestreo. Gen N2.

FECHA MUESTREO	BARRIO 1	BARRIO 2	INFLUENTE 4 H	INFLUENTE 24 H
7/7/20	162 181	ND	ND	-
10/7/20	ND	ND	ND	-
14/7/20	147 910	ND	ND	-
17/7/20	17 378	ND	ND	ND
21/7/20	ND	ND	-	ND
24/7/20	ND	ND	-	ND
28/7/20	ND	ND	ND	-
31/7/20	ND	ND	-	ND
4/8/20	ND	ND	ND	22 387
7/8/20	ND	ND	-	-

*ND: No detectado; -: Sin muestra.

De manera general, con el paso del tiempo se observó en las muestras tomadas en la proximidad de los afectados una disminución progresiva en los niveles de SARS-CoV-2. Las muestras de 4 horas tomadas en el influente de la EDAR fueron todas negativas, a excepción de la del 10 de julio, en donde se encontró una concentración próxima a las 22.000 copias genómicas/l (gen N1). Por su parte, en las muestras de 24 horas hubo un mayor número de determinaciones positivas, localizadas sobre todo al final del periodo de estudio.

• DISCUSIÓN

En el presente estudio se detectó y cuantificó SARS-CoV-2 en las aguas residuales tomadas en la proximidad de 2 grupos de afectados por un mismo brote, llevándose a cabo un seguimiento de sus niveles hasta la completa negativización de las muestras. La detección en los puntos de muestreo próximos a los afectados no se correspondió con la detección en las muestras tomadas de manera simultánea (muestras de 4 horas) en el influente de la EDAR.

A pesar de ser ligeramente inferior el número de casos residentes en la proximidad del punto de muestreo del barrio 1, las mayores concentraciones obtenidas y el hecho de la detección de 2 genes (N1 y N2) frente a una única diana detectada en el barrio 2 (N1), podría explicarse en parte por la ubicación del punto de muestreo. En el primero de los barrios, pudo muestrearse a tan solo 20 metros de los bloques de residencia de gran parte de los afectados (9 casos),

mientras que en el barrio 2, a pesar de la importante concentración de casos en una única vivienda (14 casos), la estructura de la red de alcantarillado hizo que fuera necesario muestrear a una distancia mayor de la misma. Este hecho apoya la importancia de la elección del punto de muestreo, que resulta clave para reducir los sesgos en la información obtenida derivados de la posible degradación del material genético y la dilución de la muestra. El número de asintomáticos fue similar en ambas ubicaciones, situándose próximo al 25 % de los casos y no hubo constancia de un importante número de afectados que padeciesen diarrea. No obstante, hay que tener en cuenta las incertidumbres relacionadas con el porcentaje de pacientes que excretan el virus por heces, en qué cantidad lo hacen o la influencia de factores como la edad y horarios de excreción de los afectados, lo que también pudo repercutir en los resultados obtenidos.

Otro factor a considerar para la interpretación de los resultados es el hecho de que la toma de muestras se prolongó más allá del periodo de cuarentena establecido a los casos, con lo que las condiciones iniciales tan favorables y contraladas para el estudio, no se mantuvieron a lo largo del mismo. Las muestras tomadas desde el 14 de julio en el barrio 2, fueron representativas de 7 pacientes, pues los otros 7 que estuvieron allí aislados partieron a su domicilio habitual en otro municipio. El resto de casos, residentes en los domicilios donde permanecieron en cuarentena, también vieron aumentada su movilidad tras el segundo y tercer día de muestreo. No obstante, esto no impidió detecciones positivas posteriores en los puntos de muestreo.

En este estudio, se ha podido obtener información sobre la relación entre la concentración de SARS-CoV-2 en aguas residuales y el número de personas afectadas, en la proximidad de sus viviendas, y en distintos momentos tras el inicio de síntomas. A pesar de que los muestreos no se iniciaron de manera inmediata tras la declaración de los casos, en las primeras muestras pudo detectarse la presencia del virus en la proximidad de los afectados y se observó cómo de manera general los valores detectados fueron disminuyendo con el tiempo. Las primeras muestras de agua residual, de fecha 7 de julio, se tomaron en un momento en el que los casos declarados en la proximidad del punto de muestreo del barrio 1, ascendían a 8, habiendo iniciado síntomas todos ellos en los últimos 14 días. En el mismo momento, en el barrio 2, ya habían sido declarados los 14 casos correspondientes a la misma vivienda, 12 de los cuales habían iniciado síntomas en las últimas 2 semanas (**Tablas complementarias 8.5.4 y 8.5.5**). La negativización de las muestras en los barrios se observó el 21 de julio, cuando ya no hubo casos que iniciaran síntomas en la proximidad de los puntos de muestreo durante los 21 días anteriores a la toma de muestras. Estos resultados irían en consonancia con los derivados de los estudios clínicos de

excreción de SARS-CoV-2, que reportan periodos de excreción que pueden alcanzar las 3 o 4 semanas tras el inicio de síntomas.

Llama la atención la no detección del virus el día 10 de julio, cuando sí se detectó en fechas anteriores y posteriores, en niveles especialmente importantes en el barrio 1. Una posible explicación se centraría en las exhaustivas medidas de limpieza y desinfección que, como consecuencia del brote, se llevaron a cabo por parte de la administración pública durante esa semana en la zona, junto con, probablemente, el incremento de la limpieza doméstica, que pudo tener su influencia en la muestra correspondiente. Sin embargo, cabría igualmente tener en consideración todas las incertidumbres enumeradas con anterioridad que podrían afectar a la detección del virus en aguas residuales.

El momento en el que se realizó el estudio, muy próximo al levantamiento de las restricciones derivadas de la primera ola (21/06/20), propició la comparación de los resultados obtenidos en los barrios con los del influente de la EDAR, pues durante los 14 días anteriores al comienzo del estudio en aguas residuales, se contabilizaron 27 casos declarados en la zona, casi la totalidad vinculados al brote (Datos a 06/07/20: Fuente: gav san) (**Figura 8.5.3**). Sin embargo, a pesar de haberse demostrado la eliminación de SARS-CoV-2 por heces en los afectados por el brote, no se determinó mayoritariamente su presencia en las muestras tomadas en paralelo en la EDAR. Durante el periodo de estudio, cabe señalar que no se registraron lluvias importantes que pudieran afectar a los resultados obtenidos, pero, cabe referir nuevamente que son distintas las incertidumbres relacionadas con la excreción y la degradación del virus. La información derivada del estudio hace plantearse cuestiones sobre el número mínimo de casos necesarios para la detección en la EDAR de estudio, o sobre el hecho de que los datos en influente tomado a la entrada de la EDAR pudieran estar relacionados mayormente con ciertas áreas del municipio, más próximas a la misma.



Figura 8.5.3. Comparación de los resultados obtenidos en aguas residuales (copias gen/L) en los distintos puntos de muestreo los días con determinaciones positivas en los barrios de estudio, con indicación de los casos declarados (n) asociados a cada punto y los casos declarados en los últimos 14 días (n 14 días) en los municipios de Castelló de la Plana y Borriol. Se marca con * cuando los casos ya no estuvieron confinados.

Los resultados positivos al final del periodo de estudio en influente de la EDAR, sí se correspondieron con un incremento en el número de casos declarados en la zona, pues a principios de agosto se registraron los valores más altos de casos declarados en los últimos 14 días en la zona. No obstante, el 17 de julio, se cuantificó SARS-CoV-2 en el punto de muestreo del barrio 2 y en el influente de la EDAR, en la muestra de 24 horas, con un número bastante inferior de casos declarados en el municipio. A las incertidumbres ya mencionadas habría que añadir en este caso, la influencia del efecto del turismo en el municipio vecino de Benicàssim, pues parte de sus aguas residuales se trataron en la EDAR de Castelló de la Plana.

La principal orientación que se le ha dado a la determinación de SARS-CoV-2 en aguas residuales es la relacionada con su potencial carácter anticipatorio al incremento en el número de casos a nivel poblacional, así como para la realización de pruebas en entornos de riesgo particularmente elevado en los que se pueda obtener una rápida respuesta, como residencias de la tercera edad

o prisiones. En este trabajo, sin embargo, se aprecia su utilidad como herramienta complementaria para la gestión de ciertos brotes, cuyos casos puedan circunscribirse a un territorio delimitado, en la medida de lo posible, en un perímetro cuyas aguas residuales puedan ser recogidas, o canalizadas, por colectores específicos. En el caso de estudio, los resultados de la vigilancia ambiental fueron una herramienta útil de la que dispusieron los epidemiólogos a lo largo del brote, que permitió, dadas sus características, darlo por concluido con mayores garantías.

Tabla complementaria 8.5.4. Evolución de los casos asociados al punto de muestreo del barrio 1 según fecha de inicio de síntomas

MUESTRA	CASOS DECLARADOS (N)	CASOS INICIO SÍNTOMAS (N) ¹	IS07 ²	IS014 ³	IS021 ⁴	IS028 ⁵
7/7/20	8	8	1	8	8	8
10/7/20	8	8	0	8	8	8
14/7/20	8	8	0	6	8	8
17/7/20	8	8	0	1	8	8
21/7/20	9	9	1	1	2	9
24/7/20	9	9	1	1	1	7
28/7/20	9	9	0	1	1	2
31/7/20	9	9	0	1	1	1
4/8/20	9	9	0	0	1	1
7/8/20	9	9	0	0	1	1

¹A los casos asintomáticos se les ha asignado la fecha de diagnóstico (30/06 y 20/07)

²IS07: sumatorio de los casos que iniciaron síntomas el día del muestreo y los 7 anteriores

³IS014: sumatorio de los casos que iniciaron síntomas el día del muestreo y los 14 anteriores

⁴IS021: sumatorio de los casos que iniciaron síntomas el día del muestreo y los 21 anteriores

⁵IS028: sumatorio de los casos que iniciaron síntomas el día del muestreo y los 28 anteriores

Tabla complementaria 8.5.5. Evolución de los casos asociados al punto de muestreo del barrio 2 según fecha de inicio de síntomas

MUESTRA	CASOS DECLARADOS (N)	CASOS INICIO SÍNTOMAS (N)¹	IS07²	IS014³	IS021⁴	IS028⁵
7/7/20	14	14	0	12	14	14
10/7/20	14	14	0	10	14	14
14/7/20*	14	14	0	0	7	7
17/7/20	14	14	0	0	5	7
21/7/20	14	14	0	0	0	6
24/7/20	14	14	0	0	0	5
28/7/20	14	14	0	0	0	0
31/7/20	14	14	0	0	0	0
4/8/20	14	14	0	0	0	0
7/8/20	14	14	0	0	0	0

¹A los casos asintomáticos se les ha asignado la fecha de diagnóstico (27/06 y 28/06 (3))

²IS07: sumatorio de los casos que iniciaron síntomas el día del muestreo y los 7 anteriores

³IS014: sumatorio de los casos que iniciaron síntomas el día del muestreo y los 14 anteriores

⁴IS021: sumatorio de los casos que iniciaron síntomas el día del muestreo y los 21 anteriores

⁵IS028: sumatorio de los casos que iniciaron síntomas el día del muestreo y los 28 anteriores

*7 de los casos parten a su municipio de residencia

8.6. ESTUDIO COMPARADO CON DATOS EPIDEMIOLÓGICOS

Estudio descriptivo

El municipio con mayor número de casos de COVID-19 a lo largo del periodo de estudio fue Castelló de la Plana, donde se superaron los 2.200 casos declarados a final del mes de octubre. Sin embargo, Borriana fue el más afectado con 1.360 casos por 100.000 habitantes. Almassora, Benicàssim y Vila Real presentaron incidencias acumuladas comprendidas entre los 995 y 1.188 casos/100.000 habitantes, mientras que Vall d'Alba fue el municipio menos afectado, con 13 casos entre sus 2.800 habitantes censados.

En los municipios con un número importante de casos, la proporción de mujeres y hombres afectados fue similar y el porcentaje de asintomáticos declarados estuvo comprendido entre el 21 % de Borriana y el 30 % de Vila Real. En estos municipios, las medianas de edad estuvieron comprendidas entre los 40 años de Castelló de la Plana y los 51 de Borriana. En la **Tabla 8.6.1** puede consultarse información más detallada sobre los casos declarados en cada municipio.

En la **Tabla 8.6.2** se muestra información sobre el número y características demográficas de las personas que ingresaron por COVID-19 procedentes de cada una de las zonas de estudio. Puede igualmente observarse la mayor afección que sufrió el municipio de Borriana, en donde requirieron hospitalización el 33 % de los casos.

En la **Figura 8.6.1** se muestra la evolución semanal de la incidencia acumulada a lo largo del periodo de estudio, pudiéndose observar el incremento en el número de casos durante las primeras semanas (primera ola), su estabilización posterior (derivada del confinamiento) y la nueva subida experimentada aproximadamente tras la semana 32. La información sobre la evolución del número de casos diarios según fecha de inicio de síntomas, se presenta para cada municipio en la **Figura 8.6.2**.

Tabla 8.6.1. Casos de COVID-19 confirmados en los municipios cubiertos por cada EDAR. Incidencia acumulada, características demográficas e información sobre presencia de síntomas. Enero-octubre, 2020

EDAR	Municipios	IA ¹	Casos confirmados de COVID-19			
			Característica	Total	Mujeres	Hombres
Almassora	Almassora	1187,7	Sexo (n) (%)	312	156 (50)	156 (50)
			Edad (mediana)	42	41	43
			Asintomáticos (n) (%)	84 (26,9)	37 (44)	47 (56)
Benicàssim	Benicàssim	994,9	Sexo (n) (%)	181	84 (46,4)	97 (53,6)
			Edad (mediana)	43	44,5	41
			Asintomáticos	45 (24,9)	15 (33,3)	30 (66,7)
Borriana	Borriana	1360,9	Sexo (n) (%)	472	242 (51,3)	230 (48,7)
			Edad (mediana)	51	51	50
			Asintomáticos	101 (21,4)	59 (58,4)	42 (41,6)
Castelló de la Plana	Castelló de la Plana Borriol	1249,7	Sexo (n) (%)	2213	1171 (52,9)	1042 (47,1)
			Edad (mediana)	40	39	41
			Asintomáticos	578 (26,1)	309 (53,5)	269 (46,5)
Vall D'Alba	Vall d'Alba	463,1	Sexo (n) (%)	13	3 (23,1)	10 (76,9)
			Edad (mediana)	37	37	35,5
			Asintomáticos	5 (38,5)	1 (20)	4 (80)
Vila-Real	Vila-Real	1167,2	Sexo (n) (%)	594	313 (52,7)	281 (47,3)
			Edad (mediana)	46	48	43
			Asintomáticos	182 (30,6)	106 (58,2)	76 (41,8)

n (%) calculado sobre el total de casos con información en esa variable; ¹IA: Incidencia acumulada/100 000 habitantes a 27/10/2020. Población (INE, 2019). Asintomáticos sobre el total de casos confirmados.

Tabla 8.6.2. Casos de COVID-19 que han requerido hospitalización en los municipios conectados a cada EDAR. Enero-octubre, 2020

EDAR	Municipios	Ingresos por COVID-19			
		Característica	Total (n) (%)	Mujeres	Hombres
Almassora	Almassora	Sexo (n) (%)	39 (12,5)	13 (33,3)	26 (66,7)
		Edad (mediana)	62	62,5	62
Benicàssim	Benicàssim	Sexo (n) (%)	21 (11,6)	7 (33,3)	14 (66,7)
		Edad (mediana)	65	62	70
Borriana	Borriana	Sexo (n) (%)	158 (33,5)	72 (45,6)	86 (54,4)
		Edad (mediana)	66	63,5	66
Castelló de la Plana	Castelló de la Plana	Sexo (n) (%)	264 (11,9)	119(45,1)	145 (54,9)
	Borriol	Edad (mediana)	63	65	63
Vall D'Alba	Vall d'Alba	Sexo (n) (%)	0	-	-
		Edad (mediana)	-	-	-
Vila Real	Vila Real	Sexo (n) (%)	109 (18,4)	51 (46,8)	58 (53,2)
		Edad (mediana)	65	64	66

n (%) calculado sobre el total de casos confirmados.

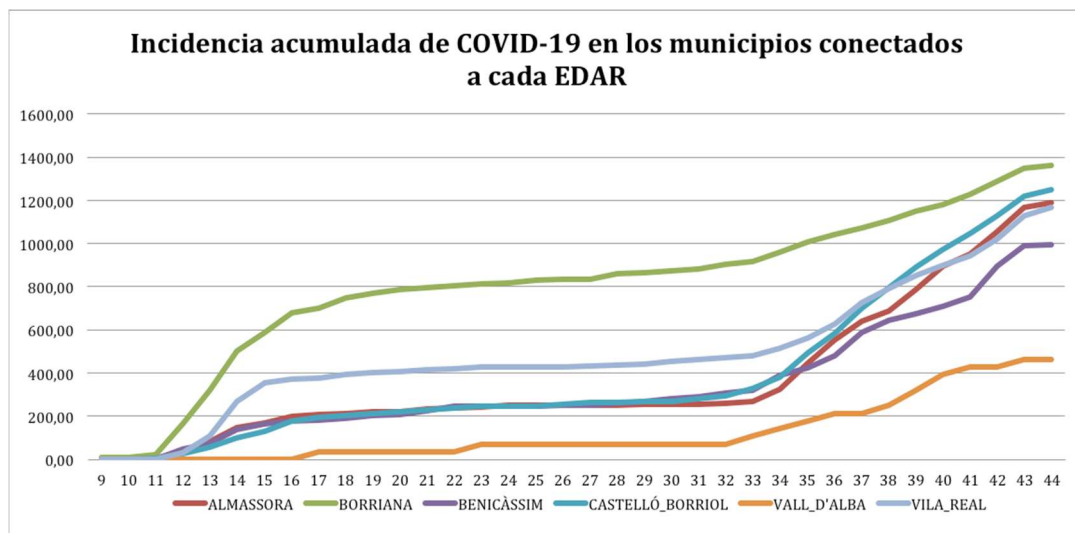


Figura 8.6.1. Evolución de la incidencia acumulada (casos declarados confirmados/100 000 habitantes) de COVID-19 en los municipios conectados a cada EDAR. Semana 9-44, 2020

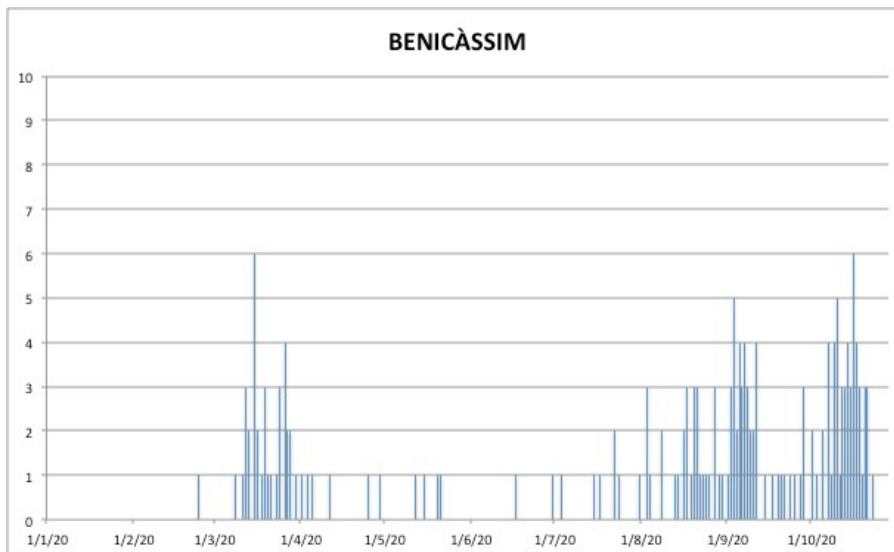
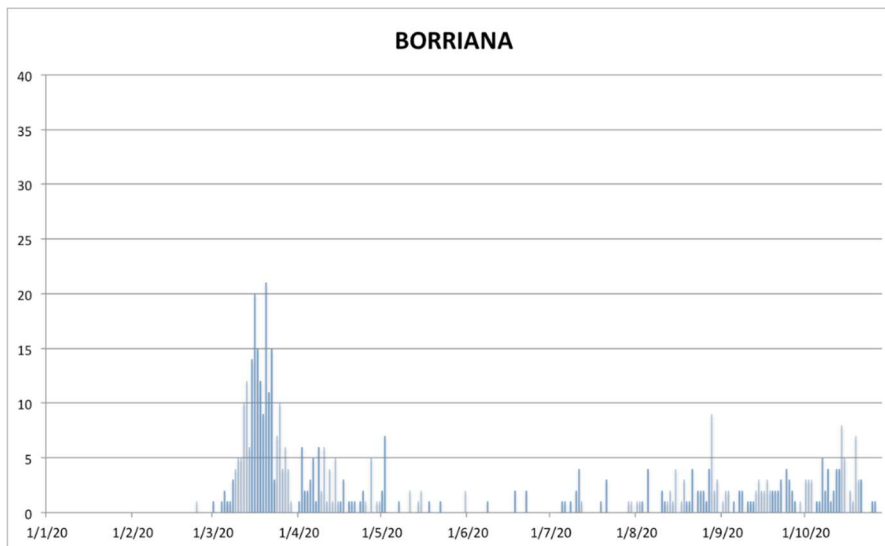
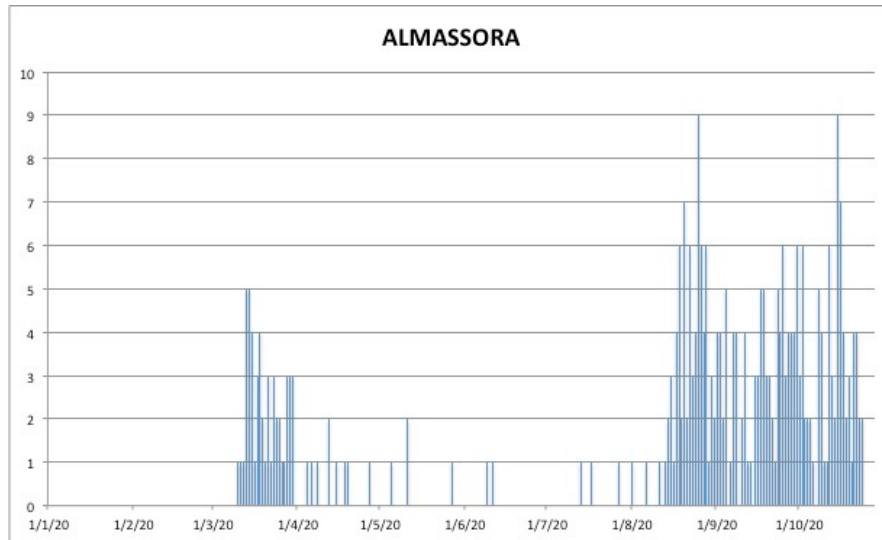


Figura 8.6.2. Casos diarios confirmados de COVID-19 por fecha de inicio de síntomas en los municipios conectados a cada EDAR. Enero-octubre, 2020.

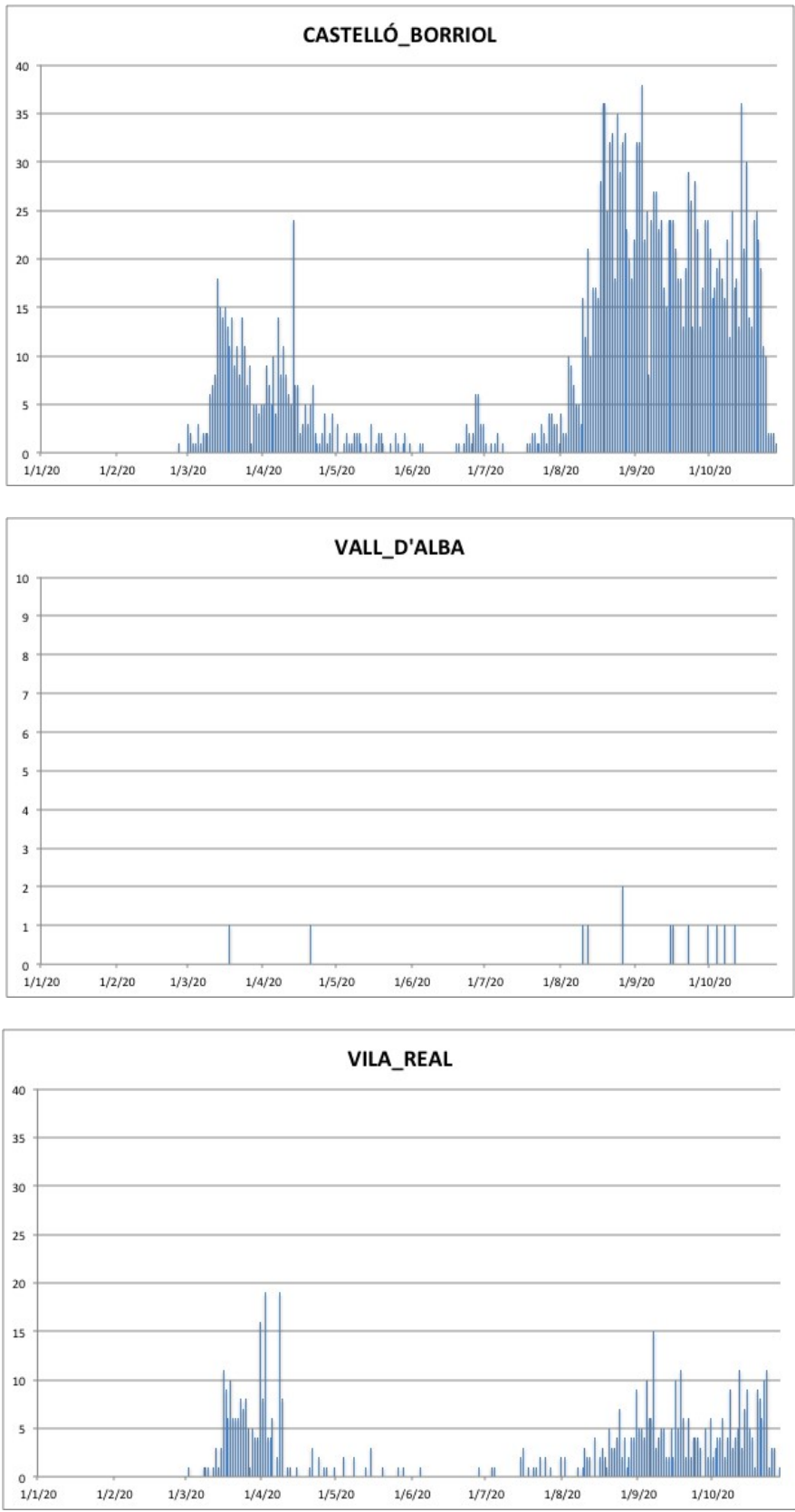


Figura 8.6.2 cont. Casos diarios confirmados de COVID-19 por fecha de inicio de síntomas en los municipios conectados a cada EDAR. Enero-octubre, 2020.

Representación gráfica conjunta de los casos y niveles detectados en aguas residuales de Castelló de la Plana

Se ha hecho un estudio detallado de los resultados obtenidos en la ciudad de Castellón, por ser el municipio del que se dispone de mayor número de datos en aguas residuales y de datos epidemiológicos, obtenidos con antelación suficiente como para poder ser evaluados. De este modo, Castellón se ha tomado como modelo en el estudio realizado.

En las **Figuras 8.6.3, 8.6.4 y 8.6.5** se representan conjuntamente el número de casos declarados durante los últimos 14 días y los niveles cuantificados de SARS-CoV-2 en la EDAR de Castelló de la Plana. Se muestra una figura para cada uno de los genes empleados en el estudio.

La toma de muestras se inició el día 5 de mayo, correspondiendo ya a la fase final de bajada de la curva de la primera ola. De manera general y para los 3 genes se observa que, hasta principios de agosto, cuando se inició el incremento progresivo de casos de la curva epidémica de la segunda ola, hubo numerosas muestras en las que no se detectó el virus (representados como 0), o bien con niveles bajos de cuantificación, lo que es coherente con la menor incidencia de casos registrada durante esta época. También en los tres genes mostrados puede comprobarse el importante incremento y el mantenimiento de la detección durante la segunda ola, con los niveles más altos encontrados próximos y antecediendo al pico.

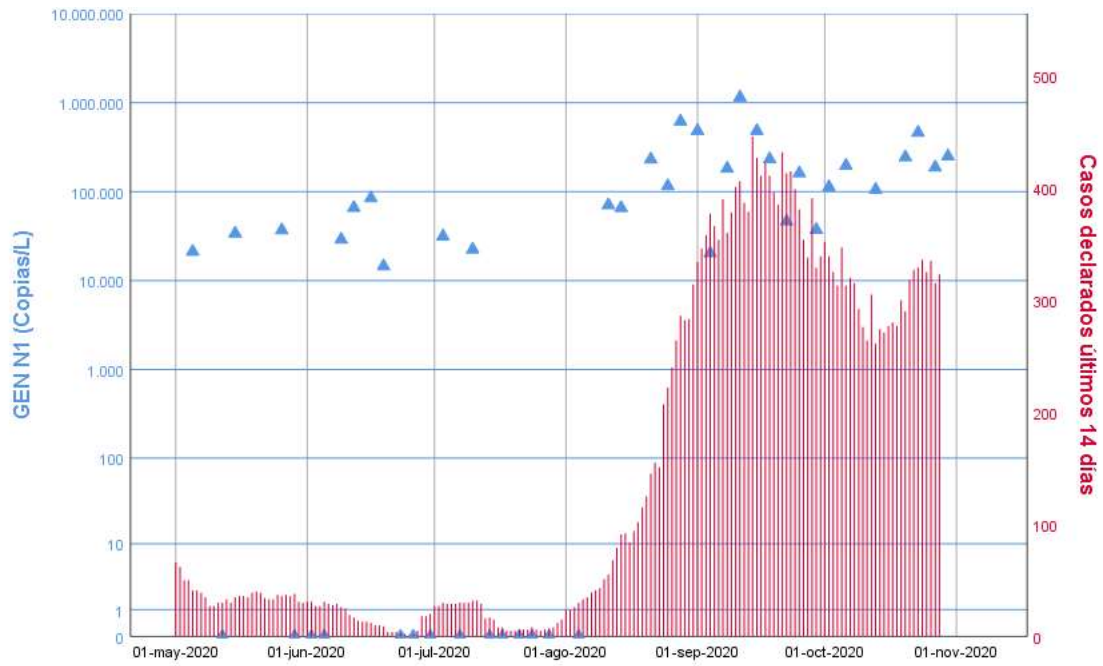


Figura 8.6.3. Distribución de material genético de SARS-CoV-2 (Gen N1) en aguas residuales de la EDAR de Castelló de la Plana, según número de casos declarados en los últimos 14 días (1 de mayo – 30 octubre 2020)

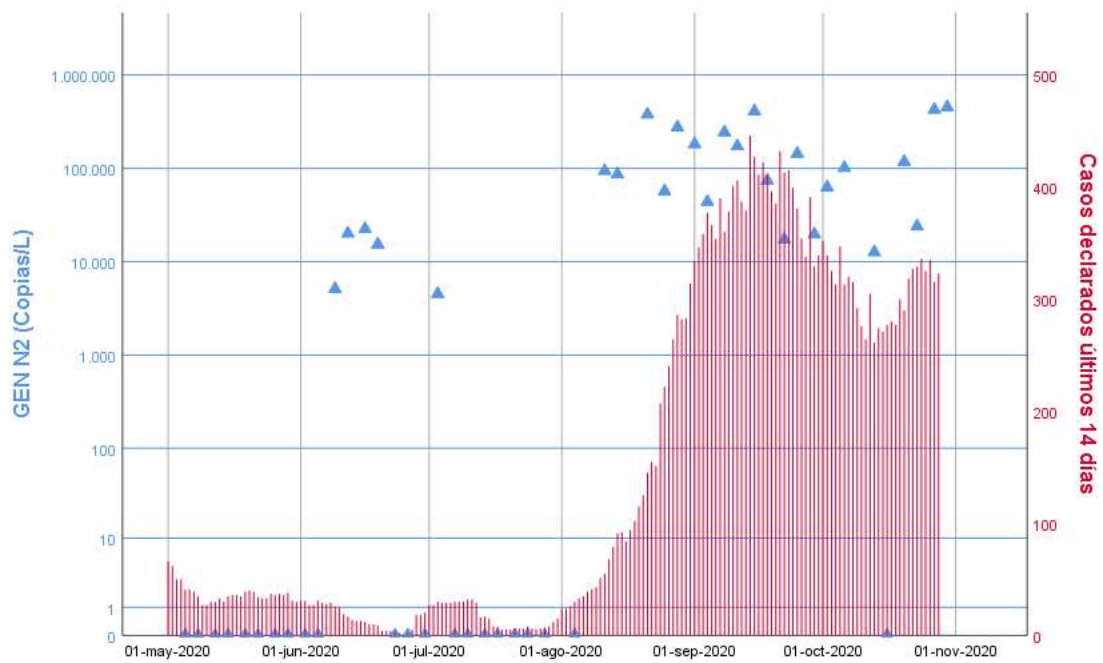


Figura 8.6.4. Distribución de material genético de SARS-CoV-2 (Gen N2) en aguas residuales de la EDAR de Castelló de la Plana, según número de casos declarados en los últimos 14 días (1 de mayo – 30 octubre 2020)

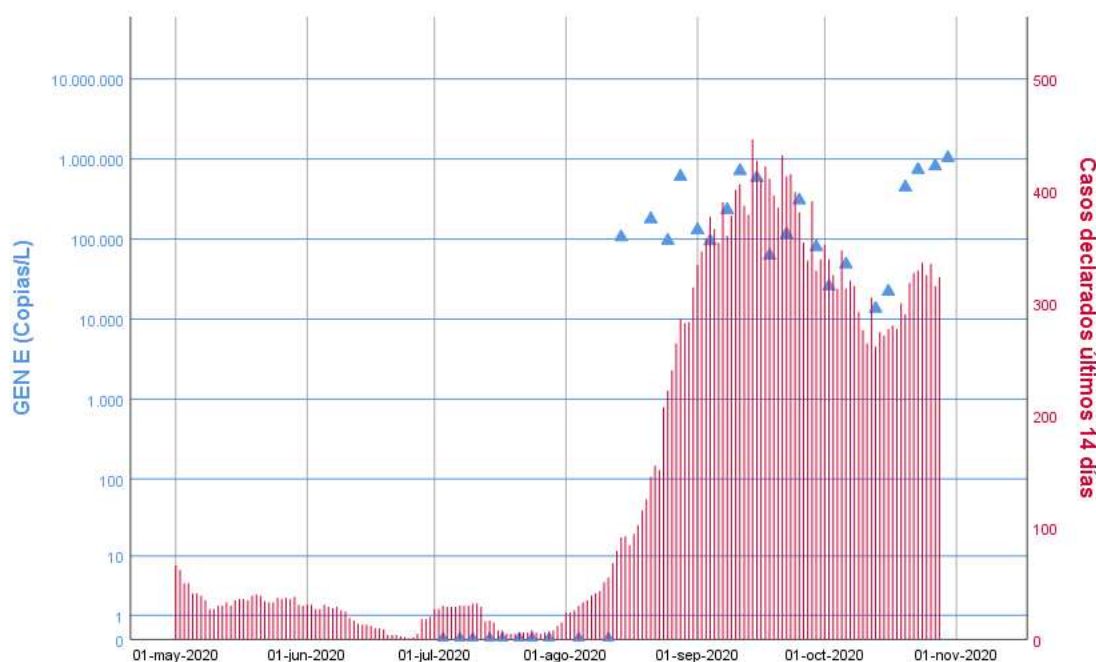


Figura 8.6.5. Distribución de material genético de SARS-CoV-2 (Gen E) en aguas residuales de la EDAR de Castelló de la Plana, según número de casos declarados en los últimos 14 días (1 de mayo – 30 octubre 2020).

Análisis de correlación

Como puede observarse en la tabla siguiente, cuando se estudió la relación entre los niveles de SARS-CoV-2 detectados en las aguas residuales de la EDAR de Castelló de la Plana y el número de casos de COVID-19, se obtuvieron buenas correlaciones, del orden del 0,60-0,70, tanto para el número de casos según fecha de declaración como según fecha de inicio de síntomas.

Cabe señalar que los mejores resultados para el gen N1, que se ha detectado con mayor frecuencia, se obtuvieron cuando se trabajó con la totalidad de casos que iniciaron síntomas y/o fueron declarados el día del muestreo y los 14 anteriores. Esto es coherente con la evidencia disponible derivada de estudios clínicos realizados en heces de pacientes, de los que se desprende que la excreción de SARS-CoV-2 por vía fecal presenta una duración de 4-11 días (mediana), pudiendo llegar a eliminarse más allá de 3 o 4 semanas desde el inicio de síntomas. De ahí la importancia de no considerar la eliminación a través de heces como algo puntual y relacionado únicamente con el día de declaración o de inicio de síntomas.

Tabla 8.6.3. Correlaciones de Spearman entre las mediciones en aguas residuales y el número de casos según fecha de declaración (empleando retardos de 0, 7, 14 y 21 días), utilizando todos los datos disponibles (2020-05-05 hasta 2020-10-13). Castelló de la Plana

	Lag 0	Lag 7	Lag 14	Lag 21
log(copias/l N1)	0,64 (0,43; 0,78)	0,70 (0,51; 0,82)	0,72 (0,54; 0,83)	0,70 (0,51; 0,82)
log(copias/l N2)	0,64 (0,43; 0,78)	0,67 (0,47; 0,80)	0,64 (0,43; 0,78)	0,60 (0,38; 0,76)
log(copias/l E)	-	-	-	-

Tabla 8.6.4. Correlaciones de Spearman entre las mediciones en aguas residuales y el número de casos según fecha de inicio de síntomas (empleando retardos de 0, 7, 14 y 21 días), utilizando todos los datos disponibles (2020-05-05 hasta 2020-10-13). Castelló de la Plana

	Lag 0	Lag 7	Lag 14	Lag 21
log(copias/l N1)	0,61 (0,39; 0,76)	0,62 (0,41; 0,77)	0,64 (0,44; 0,79)	0,64 (0,43; 0,78)
log(copias/l N2)	0,71 (0,53; 0,83)	0,68 (0,49; 0,81)	0,68 (0,49; 0,81)	0,66 (0,45; 0,79)
log(copias/l E)	-	-	-	-

9. RETOS Y RECOMENDACIONES

A partir del trabajo realizado, con la experiencia adquirida en el desarrollo del presente proyecto, se pueden resaltar algunos aspectos de interés sobre los retos a los que se enfrenta una investigación de este tipo, y las recomendaciones para futuros trabajos que puedan desarrollarse sobre esta temática.

El control de la pandemia producida por el coronavirus SARs-2-CoV a través el análisis de las aguas residuales puede llegar a convertirse en una importante herramienta que ayude a conocer con cierta antelación la aparición de nuevos casos, con las ventajas derivadas de poder aplicar estrategias de control con anticipación a la aparición de síntomas en personas infectadas, prevenir la extensión de brotes, y conocer la evolución de la población infectada en una población concreta. Una sectorización en la toma de muestras por barrios o zonas geográficas, en función de la existencia de colectores y de la disponibilidad para el muestreo, podría ser de gran utilidad para acotar las zonas más afectadas, y como ayuda para dar por finalizados determinados brotes en zonas concretas de una ciudad.

Ahora bien, si las ventajas de esta aproximación son evidentes, también existen **limitaciones y retos** que no deben ignorarse. La principal limitación es debida a los factores de incertidumbre que afectan a los resultados obtenidos, y que son difíciles de cuantificar (*Castiglioni et al., 2013*). En cualquier caso, se debe tener en cuenta que en todos los sistemas de vigilancia epidemiológica existe un sesgo de detección (diagnostico), tal como se ha observado en el caso que nos ocupa de la Cvid-19, lo que se produce como consecuencia de la falta de disponibilidad de tests, de los criterios de clasificación y colapso de los sistemas (con retraso de la notificación, variable según autonomías y países), por lo que, si bien la aproximación WBE está sujeta a incertidumbres, no es menos cierto que los sistemas de vigilancia epidemiológica también lo están. De ahí, que la complementariedad de ambas aproximaciones sea uno de los puntos a destacar en este estudio.

Entre estos factores se encuentran:

- 1) Representatividad de las muestras, que está íntimamente ligada al modo de muestreo, pues se trata de sistemas dinámicos con flujos discontinuos de aguas residuales, con resultados que dependen de la excreción del virus, a través de las heces principalmente, de las personas infectadas. Existe una gran variabilidad en las concentraciones de material génico del virus en función del punto de la red donde se tome la muestra y de cómo se haga el muestreo. Para minimizar esta incertidumbre, lo ideal es tomar

muestras compuestas de varias horas, o incluso de un día completo, pero aun así existen dudas al respecto y no parece haber un consenso internacional sobre el muestreo. Lo que resulta evidente es que las muestras puntuales o recogidas durante un espacio corto de tiempo (ej. 1 hora) no son suficientemente representativas y están sujetas a incertidumbres muy altas (*Ahmed et al., 2020c*). La toma de alícuotas que componen la muestra compuesta final debería realizarse cada poco tiempo, idealmente cada 5 o 10 min, para minimizar las incertidumbres, pero logísticamente no siempre es posible en las EDAR, por lo que finalmente suele depender de las posibilidades de cada planta, y en la práctica suelen realizarse cada 20 o 30 min, e incluso cada hora.

- 2) Relacionado con el punto anterior está la estabilidad en el tiempo del material analizado, la conservación de la muestra y la posible degradación que pudiera ocurrir hasta el momento de los análisis. El procesamiento de las muestras y análisis el mismo día del muestreo es lo ideal, pero no siempre es posible, por lo que en estos casos debe establecerse un protocolo sobre el modo y condiciones de conservación de las muestras.
- 3) El punto donde se realiza la toma de muestras es también un aspecto relevante. Aunque en la mayor parte de estudios se realiza en la entrada de la EDAR, también pueden muestrearse puntos intermedios de la red, aprovechando los colectores que puedan existir. Nuestra experiencia es que puede detectarse un brote en una zona concreta de la ciudad mediante análisis del agua residual tomada en puntos cercanos al foco de infección, mientras que análisis realizados en paralelo en muestras tomadas a la entrada de la EDAR pueden no reflejar el aumento en el virus. La cercanía de la muestra al lugar donde viven las personas afectadas hace que las posibilidades de degradación del virus a lo largo de las conducciones sean mucho menores. La distancia desde los focos de infección hasta la entrada de la EDAR y los (kilo)metros recorridos por el agua residual afectarán a los resultados y deberán tenerse en cuenta a la hora de interpretarlos. Cabe señalar que en puntos intermedios de la red suele ser más complicada la toma de muestras compuestas, y que no siempre es posible instalar muestreadores automáticos, por lo que muchas veces se recurre a la toma de varias muestras puntuales que finalmente se mezclan en una sola muestra compuesta.
- 4) La medida precisa del caudal del agua durante el periodo de muestreo es otro aspecto a destacar. Este dato es necesario para poder calcular la carga diaria, expresada en copias gen/día. Es importante que este dato sea fiable y que esté sujeto lo menos posible a incertidumbres.

- 5) La normalización de datos en agua residual requiere conocer el número de habitantes que vierte sus aguas a la red, para expresar los resultados finales como copias/día/1.000 habitantes. Este dato es también causa de incertidumbres, sobre todo en poblaciones en las que hay mucho movimiento de trabajadores, que durante unas horas están en una población, pero regresan a sus hogares al final de la jornada laboral. Se suelen usar los datos proporcionados por el censo, que reflejarían la población estática, pero existen otras posibilidades como son los cálculos estimativos a partir de parámetros como la DBO o la DQO, o también a partir del consumo de agua potable. Estos últimos, pueden ser de utilidad para reflejar los movimientos de población, es decir la población dinámica asociada a una ciudad.
- 6) La estimación del número de infectados es francamente complicada y está sujeta a una alta incertidumbre. No parece existir acuerdo internacional sobre el valor medio del virus excretado en las heces, ni sobre el momento en que empieza y finaliza la excreción. Transformar el dato proporcionado por WBE, expresado en copias/día/1.000 habitantes, en número estimado de infectados es uno de los mayores retos. Seguramente, con la realización de nuevos estudios y publicación de datos que puedan reportarse en el futuro próximo, habrá mayor información al respecto y se podrá mejorar dicha estimación.
- 7) Desde el punto de vista de los análisis, existen algunos aspectos que deben resaltarse. Cabe destacar que no existe consenso sobre la metodología a seguir. En estos momentos, la literatura muestra la existencia de una amplia variedad de opciones para llevar a cabo pasos claves como son la concentración de la muestra (ej, ultrafiltración, precipitación con PEG, cloruro de aluminio, etc), la extracción del RNA o sobre los genes diana a utilizar para la detección del SARS-CoV-2 en aguas residuales. Cada uno de estos puntos son claves en la detección del virus y puede tener un efecto importante en el resultado final. Por ello, existe la necesidad de establecer un protocolo estandarizado y globalmente adoptado, que permita comparar resultados entre diferentes estudios y minimizar así posibles interpretaciones incorrectas.
- 8) La correlación de datos proporcionados por los análisis de aguas residuales con los datos epidemiológicos disponibles no es sencilla. Existen varios tipos de datos epidemiológicos que pueden ser utilizados según las fuentes y la base sobre la que se ha construido la información, y cada uno de ellos tiene sus ventajas y limitaciones. Aunque la información referente a la fecha de declaración de los casos es fácilmente accesible a

través de la web COVID de la Conselleria de Sanitat y de estadísticas rutinarias del Sistema de Vigilancia Epidemiológica, esta fecha presenta un mayor retraso respecto al inicio de la excreción del virus por heces, la cual se aproxima más al inicio de síntomas. Sin embargo, el número de casos según esta última fecha es más difícil de obtener, ya que generalmente tiene que extraerse de la encuesta epidemiológica y requiere las autorizaciones pertinentes, además de no poder definirse en el caso de pacientes asintomáticos. En los análisis realizados hasta el momento no hemos encontrado diferencias importantes entre la utilización de un indicador u otro.

- 9) Una cuestión práctica de relevancia es hasta qué punto los análisis de aguas residuales permiten anticipar una respuesta y tomar acciones preventivas antes de que empiecen a aparecer los datos clínicos/epidemiológicos sobre casos de infección. Según los datos preliminares obtenidos en este estudio, parece observarse una detección en aguas residuales coherente con los datos epidemiológicos. No obstante, resultaría adecuado estudiar con mayor profundidad los datos obtenidos para el desarrollo y validación de un modelo de predicción, teniendo en cuenta el ajuste por variables relacionadas con el efluente, así como otros posibles determinantes ambientales y socio-demográficos de las zonas de estudio.

Sobre la base del estudio realizado, pueden hacerse algunas **recomendaciones** para futuros trabajos.

Muestreo e información de la EDAR.

Es fundamental la recogida de muestras compuestas por varias alícuotas, que deberían tomarse, idealmente, con una frecuencia de entre 20 y 30 min. La experiencia adquirida en este proyecto nos indica que la toma de muestras compuestas de 4h, entre de 8 a 12h, puede ser suficiente, no habiéndose observado tendencias o diferencias significativas con los resultados obtenidos en muestras compuestas de 24h, recogidas de 8 a.m. a 8 a.m. del día siguiente.

Por otro lado, es importante disponer de datos de caudal, lo más precisos posible, durante el periodo de muestreo con el fin de poder estimar la carga diaria en una población, expresada en copia gen/día.

La normalización de resultados, expresados en copia gen/día/1.000 habitantes, permite una mejor visualización del problema, al relacionarlos con el número de habitantes

conectados a la red de saneamiento. Disponer de datos de censo actualizado es primordial, para conocer la población estática, pero aun así se recomienda usar otros parámetros que permiten realizar estimaciones para tener una información más completa de la situación, como pueden ser la DBO, DQO y incluso el consumo de agua potable. Estos últimos parámetros permitirían estimar la población dinámica y reflejarían los movimientos de población durante el periodo de estudio.

Conservación de la muestra hasta su análisis.

Los resultados obtenidos indican que no es crítica la conservación de la muestra hasta 21 días, y que puede conservarse en frigorífico a 4 °C, o también en congelador a -18 °C, no habiéndose observado una degradación significativa en el material vírico analizado.

Análisis de las muestras

Los análisis realizados para la detección del material vírico en las muestras de aguas residuales evidencian la importancia de implementar un protocolo adecuado y estandarizado para la concentración de la muestra y el análisis posterior de la misma por RT-qPCR. En nuestro caso, se ha seguido el protocolo definido por el Ministerio de Ciencia e Innovación, desarrollado por el equipo de la Dra. Gloria Sánchez (CSIC), lo que ha permitido comparar resultados entre distintas EDARs y laboratorios. Es importante resaltar la necesidad de utilizar al menos tres genes dianas para confirmar la presencia del virus en agua. En este trabajo, los genes diana N1, N2 y E han mostrado gran sensibilidad, teniendo en cuenta el protocolo de concentración de muestra utilizado y el kit de extracción de RNA empleado, por lo que puede recomendarse su uso.

Datos epidemiológicos.

Para validar los resultados obtenidos mediante el análisis de las aguas residuales de una población con fines epidemiológicos se requiere un estudio comparado detallado con los datos epidemiológicos correspondientes a dicha población, tal como se ha realizado en este trabajo. La fecha de declaración de los casos es generalmente más fácilmente accesible, aunque presenta un mayor retraso respecto al inicio de la excreción del virus por heces, la cual se aproxima más al inicio de síntomas. Se recomienda no obstante profundizar en el establecimiento de los indicadores epidemiológicos que guarden una mejor correlación con los niveles de SARS-CoV-2 en aguas residuales, así como en la

evaluación de las distintas ventanas temporales que permitan considerar la excreción mantenida a través de las heces.

Una vez realizada dicha validación, si se siguen escrupulosamente las recomendaciones y protocolos de trabajo de la aproximación WBE, con los datos obtenidos en las aguas residuales se puede obtener información relevante sobre la incidencia del virus y su evolución. Con diseños de muestreo adecuados, sería posible acotar zonas afectadas, y usar WBE como herramienta complementaria para la gestión de ciertos brotes, al tiempo que permitiría dar un brote por concluido con mayores garantías ante la ausencia repetida del material génico del virus en las aguas residuales.

Dada la coherencia entre datos sobre virus en aguas residuales y los datos epidemiológicos disponibles, se recomienda elaborar un modelo de predicción, teniendo en cuenta las variables relacionadas con el agua residual y los factores socio-demográficos de las zonas de estudio. Dicho modelo podría ser de gran utilidad para anticipar una respuesta y tomar acciones preventivas antes de que empiecen a aparecer casos de infección a gran escala en una determinada población.

10. REFERENCIAS

- N. Alygizakis, A.N. Markou, N.I. Rousis, A. Galani, M. Avgeris, P.G. Adamopoulos, A. Scorilas, E.S. Lianidou, D. Paraskevis, S. Tsiodras, A. Tsakris, M.-A. Dimopoulos, N.S. Thomaidis (2020), "Analytical methodologies for the detection of SARS-CoV-2 in wastewater: Protocols and future perspectives", *Trends Anal. Chem.*
<https://doi.org/10.1016/j.trac.2020.116125>
- W. Ahmed, N. Angel, J. Edson, K. Bibby, A. Bivins, J.W. O'Brien, P.M. Choi, M. Kitajima, S.L. Simpson, J. Li, B. Tschärke, R. Verhagen, W.J.M. Smith, J. Zaugg, L. Dierens, P. Hugenholtz, K.V. Thomas, J.F. Mueller (2020) "First confirmed detection of SARS-CoV-2 in untreated wastewater in Australia: A proof of concept for the wastewater surveillance of COVID-19 in the community" *Sci. Total Environ.* doi: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.138764>.
- W. Ahmed, P.M. Bertsch, K. Bibby, E. Haramoto, J. Hewitt, F. Huygens, P. Gyawali, A. Korajkic, S. Riddell, S.P. Sherchan, S.L. Simpson, K. Sirikanjana, E.M. Symonds, R. Verhagen, S.S. Vasan, M. Kitajima, A. Bivins (2020b), "Decay of SARS-CoV-2 and surrogate murine hepatitis virus RNA in untreated wastewater to inform application in wastewater based epidemiology", *Environ. Res.* 191: 110092.
- W. Ahmed, A. Bivins, P.M. Bertsch, K. Bibby, P. Gyawali, S.P. Sherchan, S.L. Simpson, K.V. Thomas, R. Verhagen, M. Kitajima, J.F. Mueller, A. Korajkic (2020c), "Intraday variability of indicator and pathogenic viruses in 1-h and 24-h composite wastewater samples: implications for wastewater-based epidemiology", *Environmental Research*,
<https://doi.org/10.1016/j.envres.2020.110531>.
- A. Bivins, D. North, A. Ahmad, W. Ahmed, F. Been, P. Bhattacharya, L. Bijlsma, A.B. Boehm, J. Brown, G. Buttiglieri, V. Calabro, A. Carducci, S. Castiglioni, Z. Cetecioglu Gurol, S. Chakraborty, F. Costa, S. Curcio, F.L. de los Reyes III, J. Delgado Vela, K. Farkas, X. Fernandez-Casi, C. Gerba, D. Gerrity, R. Gonzalez, E. Haramoto, A. Harris, P.A. Holden, Md. Tahmidul Islam, D. L. Jones, B. Kasprzyk-Hordern, M. Kitajima, N. Kotlarz, M. Kumar. G. La Rosa, F. Malpei, S.L. McLellan, G. Medema, J. Scott Meschke, J. Mueller, R.J. Newton, R.T. Noble, A. van Nuijs, T. Alex Perkins, A.J. Pickering, J. Rose, A. Smith, L. Stadler, C. Stauber, K.V. Thomas, T. van der Voorn, K. Wigginton, K. Zhu, K. Bibby (2020) "Wastewater-Based Epidemiology of COVID-19: Global Collaborative to Maximize Impact", *Environ. Sci. Technol.*, 54, 13, 7754-7757
- Bivins A., et al. (2020b), "Persistence of SARS-CoV-2 in water and wastewater" *Environ. Sc. Technol. Letter*, doi: <https://doi.org/10.1021/acs.estlett.0c00730>

- S. Castiglioni, L. Bijlsma, A. Covaci, E. Emke, F. Hernández, M. Reid, C. Ort, A.L.N. van Nuijs, P. De Voogt, E. Zuccato **(2013)**, "Evaluation of uncertainties associated with the determination of community drug use through the measurement of sewage drug biomarkers", *Environ. Sci. Technol*, 47, 1452-146
- S. Castiglioni, L. Bijlsma, A. Covaci, E. Emke, C. Harman, F. Hernández, B. Kasprzyk-Hordern, C. Ort, A.L.N. van Nuijs, P.de Voogt, E. Zuccato **(2016)**, "Estimating community drug use through wastewater analysis", Chapter 1, pp 17-35, in *Assessing illicit drugs in wastewater: advances in wastewater-based drug epidemiology, EMCDDA Insights 22, Publications Office of the European Union, Luxembourg*
- Costafreda M.I., Bosch A., Pintó R.M., 2006. "Development, evaluation, and standardization of a realtime TaqMan reverse transcription-PCR assay for quantification of hepatitis A virus in clinical and shellfish samples". *Appl. Environ. Microbiol.* *72*, 3846-3855
- I. González-Mariño, J. A. Baz-Lomba, N. A. Alygizakis, M.J. Andrés-Costa, R. Bade, L. P. Barron, F. Been, J.D. Berset, L. Bijlsma, I. Bodík, A. Brenner, A.L. Brock, D.A. Burgard, E. Castrignanò, C. E. Christophoridis, A. Covaci, P.de Voogt, D. A. Devault, M.J. Dias, E. Emke, D. Fatta-Kassinos, G. Fedorova, K. Fytianos, C. Gerber, R. Grabic, S. Grüner, T. Gunnar, E. Hapeshi, E. Heath, B. Helm, F. Hernández, A. Kankaanpaa, S. Karolak, B. Kasprzyk-Hordern, I. Krizman-Matic, F. Yin Lai, W. Lechowicz, A. Lopes, M. López de Alda, E. López-García, A. S.C. Löve, N. Mastroianni, G. L. McEneff, R.Montes, K. Munro, T. Nefau, H. Oberacher, J. W. O'Brien, K. Olafsdottir, Y. Picó, B. G. Plósz , F. Polesel, C. Postigo, J. B. Quintana¹, P. Ramin, M. J. Reid, J. Rice, R. Rodil, I. Senta, S. M. Simões, M.M. Sremacki, K. Styszko, S. Terzic, N. S. Thomaidis, K.V. Thomas, B.J. Tschärke, A.L.N. van Nuijs, V. Yargeau, Ettore Zuccato, S. Castiglioni, C. Ort **(2019)**, "Spatio-temporal assessment of illicit drug use at large scale: evidence from seven years of international wastewater monitoring", *Addiction*, *115*:109-120
- O.E. Hart, R.U. Halden **(2020)**. "Computational analysis of SARSCoV-2/COVID-19 surveillance by wastewater-based epidemiology locally and globally: Feasibility, economy, opportunities and challenges", *Sci. Total Environ.* <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.138875>
- G. Medema, L. Heijnen, G. Elsinga, R. Italiaander **(2020)** "Presence of SARS-Coronavirus-2 in sewage", *medRxiv*, doi: <https://doi.org/10.1101/2020.03.29.20045880>.
- G. Medema, F. Been, L. Heijnen, S. Petterson **(2020b)**. "Implementation of environmental surveillance for SARS-CoV-2 virus to support public health decisions: Opportunities and challenges". *Current Opinion Environ. Sci. Health* *17*: 49-71

- E. O'Brien, I. Xagorarakis (2019). "A water-focused one-health approach for early detection and prevention of viral outbreaks", *One Health. Apr 20;7: 100094. doi: 10.1016/j.onehlt.2019.100094.*
- C. Ort, A. van Nuijs, J.D. Berset, L. Bijlsma, S. Castiglioni, A. Covaci, P. de Voogt, E. Emke, D. Fatta-Kassinos, P. Griffiths, F. Hernandez, I. Gonzalez-Marino, R. Grabic, B. Kasprzyk-Hordern, N. Mastroianni, A. Meierjohann, T. Néfau, M. Östman, Y. Pico, I. Racamonde, M. Reid, J. Slobodnik, S. Terzic, N. Thomaidis, K. Thomas (2014), "Spatial differences and temporal changes in illicit drug use in Europe quantified by wastewater analysis" *Addiction, 109, 1338-1352*
- Ort C., Lawrence M.G., Rieckermann J. and Joss A. (2010). "Sampling for pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) and Illicit Drugs in Wastewater systems: Are your conclusions valid? A critical review". *Environ. Sci. Technol. 44 (16), 6024–6035*
- W. Randazzo, P. Truchado., E. Cuevas-Ferrando, P. Simón, A. Allende, G. Sánchez (2020). "SARS-CoV-2 RNA in wastewater anticiated COVID-19 occurrence in a low prevalence area". *Water Res. 181:115942*
- N. Sims, B. Kasprzyk-Hordern (2020). "Future perspectives of wastewater-based epidemiology: Monitoring infectious disease spread and resistance to the community level". *Environ Int. 2020 Apr 4; 139:105689. doi:10.1016/j.envint.2020.105689.*
- X.W. Wang, J.S. Li, T.K. Guo, B. Zhen, Q.X. Kong, B. Yi, Z. Li, N. Song, M. Jin, W.J. Xiao, X.M. Zhu, C.Q. Gu, J. Yin, W. Wei, W. Yao, C. Liu, J.F. Li, G.R. Ou, M.N. Wang, T.Y. Fang, G.J. Wang, Y.H. Qiu, H.H. Wu, F.H. Chao, J.W. Li et al. (2005), "Concentration and detection of SARS coronavirus in sewage from Xiao Tang Shan Hospital and the 309th Hospital", *J. Virol. Methods, 128: 156-161*
- F.Q. Wu, A. Xiao, J.B. Zhang, X.Q. Gu, W.L. Lee, K. Kauffman, W.P. Hanage, M. Matus, N. Ghaeli, N. Endo, C. Duvallet, K. Moniz, T.B. Erickson, P.R. Chai, J. Thompson, E.J. Alm (2020) "SARS-CoV-2 titers in wastewater are higher than expected from clinically confirmed cases" *medRxiv, doi: https://doi.org/10.1101/2020.04.05.20051540.*

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido posible gracias a la ayuda recibida de la Dirección General de Agua, de la Consellería de Medio Ambiente, Desarrollo Rural, Emergencia Climática y Transición Ecológica, Generalitat Valenciana, para la ejecución en 2020 de proyectos de investigación aplicados a los recursos hídricos en el Comunidad valenciana. El equipo de trabajo quiere agradecer a dicha Consellería, y en particular al Director General del Agua, el haber apostado por un proyecto como este cuando aún no se sabía con certeza las posibilidades que ofrecían las aguas residuales en el control de la pandemia. La confianza en nuestro equipo de trabajo para llevar a cabo una investigación compleja y difícil, con fuertes implicaciones sociales y en el campo de la salud, ha sido un estímulo para llevar a buen término la investigación.

Mención especial merece el grupo FACSA, y los integrantes de esta empresa que han participado en el desarrollo del trabajo, por su dedicación e implicación, y por las ideas y datos que nos han suministrado, de gran relevancia en esta investigación. Igualmente importante, ha sido la desinteresada colaboración de los responsables y técnicos de las EDAR, que no sólo han facilitado los muestreos, sino que también han aportado numerosos datos sobre parámetros químicos y datos relativos a la propia EDAR, necesarios para la interpretación de los resultados obtenidos.

También queremos agradecer a los ayuntamientos de Castelló, Borriana, Benicassim, Vilarreal y Vall d'Alba la autorización para realizar las tomas de muestra de las EDAR de estas poblaciones, y a la EPSAR la autorización para muestrear las aguas residuales de la población de Almassora.