



UNIVERSITAT  
JAUME I



Institut Universitari  
de Plaguicides  
i Aigües

***“Seguiment de la pandèmia covid-19  
mitjançant anàlisi de les aigües residuals.  
Estudi pilot en municipis de la província de  
Castelló (COVID\_WASTEWATER)”***

Projecte d'investigació aplicada als recursos  
hídrics a la Comunitat Valenciana  
Exercici 2020

Finançat per la Conselleria d'Agricultura, Desenvolupament  
Rural, Emergència Climàtica i Transició Ecològica

**INFORME FINAL, NOVEMBRE 2020**

## **EQUIP DE TREBALL**

### **Felix Hernández Hernández**

Catedràtic de Química Analítica, director de l'Institut Universitari de Plaguicides i Aigües (IUPA), investigador responsable del projecte

### **Lubertus Bijlsma**

Investigador postdoctoral, IUPA, vicecoordinador grup SCORE

### **Marisa Rebagliato Ruso**

Professora titular de Medicina Preventiva i Salut Pública, Unitat Predepartamental de Medicina

### **Rosa de Llanos Frutos**

Investigadora postdoctoral del Programa Beatriz Galindo, UP Medicina

### **Manuela Barneo Muñoz**

Investigadora postdoctoral UJI, UP Medicina

### **Fernando Martínez García**

Catedràtic de Biologia Cel·lular, UP Medicina

### **Alberto Celma Tirado**

Investigador predoctoral, IUPA

### **Juan Bellido Blasco**

Secció d'Epidemiologia del Centre de Salut Pública de Castelló, Consorci d'Investigació Biomèdica en Xarxa-Epidemiologia i Salut Pública (CIBER-ESP), professor associat, UJI

### **María Barberá Riera**

Investigadora contractada per al projecte

### **Rafael Goterris Cerisuelo**

Investigador contractat per al projecte

## **COL·LABORADORS**

### **Ernesto Santateresa Forcada**

Cap del Departament d'Abocaments, FACSA

### **Nuria Zamorano López**

Tècnica R+D+I, FACSA

## **ÍNDEX**

- 1. Objectius i justificació**
- 2. Introducció**
- 3. Municipis i plantes de tractaments seleccionats**
- 4. Presa de mostres**
- 5. Anàlisi de les mostres**
- 6. Càlculs epidemiològics en aigües residuals**
- 7. Obtenció i tractament de dades epidemiològiques**
- 8. Discussió de resultats**
  - 8.1. Estudis d'estabilitat i conservació de mostres**
  - 8.2. Resultats obtinguts per municipis**
  - 8.3. Aplicació dels principis de l'epidemiologia basada en l'anàlisi de les aigües residuals**
  - 8.4. Mostrejos 4 h versus 24 h**
  - 8.5. Estudi específic de brot detectat a Castelló**
  - 8.6. Estudi comparat amb dades epidemiològiques**
- 9. Reptes i recomanacions**
- 10. Referències**

## **Agraïments**

## 1. OBJECTIUS I JUSTIFICACIÓ

L'anàlisi de les aigües residuals amb finalitats epidemiològics (WBE) ha mostrat ser una aproximació poderosa i útil que permet monitorar hàbits i estils de vida d'una població, com per exemple, el consum de drogues d'abús i noves substàncies psicoactives, fàrmacs, alcohol, tabac, hàbits nutricionals, prevalença de malalties com ara càncer de pròstata, ús d'esteroides anabolitzants i altres agents de dopatge en l'esport, exposició a contaminants com plaguicides o ftalats derivats de plàstics, entre altres camps. Mitjançant la determinació de (bio)marcadors específics excretats en orina o femta, es pot arribar a conèixer les seues concentracions en les aigües residuals urbanes. Si es coneix la seua estabilitat en les aigües i el seu metabolisme, és possible realitzar estimació del consum/exposició de les persones i, finalment, tenint en compte el nombre d'habitants connectats a la xarxa d'aigües residuals, es poden normalitzar les dades (per exemple, g/dia/1000 hab), amb la qual cosa és possible establir comparacions entre poblacions i estimar tendències geogràfiques i en el temps. L'obtenció de dades en temps real i la possibilitat de realitzar estudis sense implicacions ètiques, atés que es pot considerar com un "test anònim" realitzat a una àmplia població, aprofundeixen encara més en la utilitat d'aquesta aproximació. A pesar que es tracta d'una disciplina relativament recent, WBE gaudeix cada vegada de més acceptació mundialment i ja es considera una eina útil i complementària d'altres fonts convencionals, com són la realització d'enquestes i anàlisis/test individuals, o dades policials (en el cas de les drogues).

El projecte realitzat ha sigut coordinat per l'IUPA, Institut d'Investigació de l'UJI que, juntament amb altres sis centres d'investigació europeus, va ser soci fundador del grup SCORE en 2010, el qual ha liderat i coordinat nombrosos estudis basats en WBE arreu del món. A tall d'exemple, les dades subministrades pel grup SCORE en més de seixanta ciutats europees sobre estimació del consum de drogues han passat a formar part de la base de dades de l'European Center for Drugs and Drug Addiction (EMCDDA) des de fa alguns anys, i compten amb el suport d'aquest centre per als seus monitoratges anuals en ciutats europees. Els investigadors de l'IUPA compten, per tant, amb una àmplia trajectòria en l'anàlisi de les aigües residuals amb finalitats epidemiològics, per la qual cosa tenen la capacitat i experiència necessàries per a coordinar el projecte COVID\_WASTEWATER.

L'interés i potencial de WBE, ja demostrat en diverses àrees, justifica la seua exploració en un camp menys estudiat com és el del control de malalties víriques. Les dades existents reforcen la

hipòtesi que l'anàlisi de les aigües residuals pot ser de gran utilitat en el seguiment de la pandèmia covid-19. Estudis recents (**Hart and Halden 2020; Wu et al, 2020**) indiquen que la WBE podria ser en el futur una eina de vigilància epidemiològica molt útil per a fer estimacions comunitàries de la prevalença de la infecció per COVID-19. Existeixen diverses iniciatives col·laboratives per a compartir coneixement i protocols. Alguns exemples són la iniciativa de NORMAN-SCORE (<http://www.normandata.eu/?q=node/361>) i el "COVID WBE global initiative" (<https://www.covid19wbec.org/>). A més, hi ha diversos documents interessants (*dashboards*) que faciliten mapes d'activitat sobre seguiment de SARS-CoV-2 en aigües residuals, on es pot trobar fàcilment si existeix aquesta activitat en l'àrea d'interés (<https://ucmerced.maps.arcgis.com/apps/opsdashboard/index.html#/c778145ea5bb4daeb58d31enlletgisca389082>; <https://sarsaigua.icra.cat/>)

----- o -----

El projecte té per objecte aplicar els **principis i estratègies de l'anàlisi de les aigües residuals amb finalitats (WBE)** a la identificació i quantificació de material gènic del virus **SARS-CoV-2 en aigües residuals** de poblacions de la província de Castelló.

Es pretén **correlacionar** les dades obtingudes sobre virus en aigües residuals **amb indicadors epidemiològics** (nombre de casos confirmats, taxes d'incidència i prevalença) i, mitjançant triangulació de dades, **validar la metodologia usada**.

Per a això, es realitza un seguiment en **municipis seleccionats de la província de Castelló** per a conèixer l'evolució del brot de SARS-CoV-2 a través de l'anàlisi de les aigües residuals preses a l'entrada de les EDAR. Mitjançant la concentració de les mostres, extracció d'RNA i anàlisi per RT-PCR, s'avalua i quantifica la presència del SARS-CoV-2 en aquestes mostres.

Amb les dades obtingudes en aigües residuals es pretén **complementar el diagnòstic** en curs, que està vinculat a la identificació de casos, estudi de contactes i enquestes de seroprevalença.

Com a objectiu últim, es persegueix la utilització de WBE **com a eina de vigilància epidemiològica futura**, útil per a fer estimacions comunitàries de la prevalença de la infecció per SARS-Cov-2 o de futures malalties infeccioses, sense necessitat de realitzar proves massives individuals.

## 2. INTRODUCCIÓ

La pandèmia de la covid-19 originada pel **SARS-CoV-2**, que estem patint tot el planeta, està posant a prova els sistemes sanitaris de tots els països del món, així com els sistemes de vigilància i diagnòstic de la malaltia, a més de suposar una forta crisi econòmica i social, les conseqüències més greus de la qual encara estan per arribar. Davant situacions com l'actual, sorgeixen nombroses mancances, entre les quals cal destacar la dificultat de conèixer, amb dades realistes, l'evolució de la pandèmia en els diversos territoris i en l'àmbit global espanyol, així com el nombre de persones infectades. La vigilància epidemiològica és una eina fonamental, que es basa principalment en estudis de prevalença consolidats en la realització d'anàlisi i test per a conèixer les persones que estan o han estat infectades, en l'estudi dels contactes, i en enquestes realitzades a amplis sectors de la població. Les dificultats que sorgeixen enfront d'una pandèmia són evidents, i, per això, resulta necessari obtenir informació complementària, com la que pot aportar l'anàlisi de les aigües residuals. Aquestes anàlisis poden subministrar dades en temps real sobre la població objecte d'estudi. Prenent mostres compostes en l'entrada d'estació depuradora d'aigües residuals (EDAR), els resultats obtinguts es poden interpretar com un test anònim realitzat a una població, que pot ser de diversos centenars de milers, i fins i tot milions, d'habitants.

Un dels primers estudis, realitzat pel KWR holandès, va detectar el virus SARS-CoV-2 als Països Baixos analitzant l'aigua residual de cinc localitzacions diferents. En aquest estudi es va observar la presència de material genètic del virus tres setmanes abans de reportar-se els primers casos d'infectats amb símptomes a la regió (**Medema et al. 2020**). Els autors van il·lustrar el potencial del control de la càrrega vírica a l'entrada de les EDAR per a detectar de manera precoç la presència del virus en la població. Arran d'aquest estudi, hi ha hagut nombroses iniciatives i projectes, que s'han plasmat en diverses publicacions, jornades, seminaris web i notícies en els mitjans de comunicació, l'enumeració dels quals queda fora dels objectius d'aquest informe. No obstant això, val la pena ressaltar la iniciativa de Bivins i col. (**Bivins et al. 2020**, <https://www.covid19wbec.org/>) per a formar una xarxa col·laborativa global juntament amb Sewage Analysis CORE Group Europe (SCORE), en la qual està integrat l'IUPA de la Universitat Jaume I. Cal destacar també la xarxa NORMAN, que, en col·laboració amb SCORE, ha organitzat un *pan-european survey* per a monitorar SARS-CoV-2 en aigües residuals (<http://www.normandata.eu/?q=node/361>).

En els treballs realitzats, la majoria dels quals s'han anat publicant mentre es realitzava el present projecte, s'ha posat de manifest la utilitat de la informació subministrada a través

d'anàlisi mitjançant PCR del material gènic del virus SARS-CoV-2 per a monitorar l'evolució de la pandèmia (**Ahmed et al., 2020**). Malgrat les nombroses dades que il·lustren la relació entre les anàlisis de les aigües residuals i l'afecció de la pandèmia en la població, encara hi ha moltes incerteses, dades contradictòries i factors no controlats que dificulten la interpretació dels resultats, per la qual cosa es requereixen estudis addicionals per a donar més llum sobre aquesta problemàtica.

L'anàlisi de les aigües residuals amb finalitats epidemiològics (WBE-Wastewater-Based Epidemiology) s'està aplicant cada vegada més com una eina potent capaç de subministrar informació en temps real sobre la població objecte d'estudi. Es tracta d'una disciplina recent, cada vegada més acceptada internacionalment, basada en la determinació de (bio)marcadors adequats i específics que puguin donar informació epidemiològica d'interès sobre la població que vessa les seues aigües residuals a la xarxa de clavegueram. Entre les nombroses dades que pot aportar WBE es troben els relacionats amb l'estil de vida (consum de drogues i noves substàncies psicoactives, alcohol, tabac, fàrmacs, etc.), estat de salut i nutricional, o nivells d'exposició de la població a productes químics i/o biològics.

L'Institut Universitari de Plaguicides i Aigües (IUPA) de la Universitat Jaume I és un dels set membres fundadors de SCORE (<https://score-cost.eu/>), xarxa internacional que reuneix experts de diferents àrees interessats en l'aplicació mesures quantitatives de biomarcadors humans en aigües residuals. El grup SCORE es va crear fa una dècada, i entre els seus socis fundadors també es troba el KWR Water Research Institute neerlandés, esmentat anteriorment per ser pioner en l'estudi de la covid-19 en aigües residuals, (**Medema et al. 2020**). Actualment, SCORE té 39 membres associats, pertanyents a 27 països. Les seues activitats es van dirigir inicialment a l'estimació del consum de drogues d'abús mitjançant monitoratge de les aigües residuals (**Ort et al., 2014; González Mariño et al., 2019**), i posteriorment s'han ampliat a altres camps (consum de fàrmacs, agents dopants, alcohol, tabac, exposició a compostos químics, marcadors de malalties, etc.). Recentment, s'ha començat a explorar l'aplicabilitat de WBE per al monitoratge de virus en aigües residuals amb l'objectiu d'estimar la població afectada en una ciutat (**O'Brien and Xagorarakis 2019; Sims and Kasprzyk-Hordern 2020**), incloent-hi aquelles persones que són asimptomàtiques i les no diagnosticades, que escapen al control clínic.

En el projecte realitzat, que es descriu en aquest informe final, s'ha explorat el potencial de les aigües residuals com a eina complementària als sistemes de control utilitzats actualment, que permetia millorar la vigilància epidemiològica del virus SARS-CoV-2. Per a això, s'ha creat un grup multidisciplinari d'investigadors pertanyents a diverses àrees i especialitats: especialistes en

aplicacions epidemiològiques de les aigües residuals, microbiòlegs, tècnics especialitzats en anàlisis per PCR, enginyers i tècnics d'EDAR, metges epidemiològics.

S'ha realitzat un seguiment de sis municipis de la província de Castelló, mitjançant l'anàlisi de mostres integrades d'aigua residual recollides a l'entrada de l'estació depuradora (EDAR). Les primeres preses de mostres es van realitzar a principis de maig, i a partir de llavors s'han analitzat les aigües a l'entrada de les EDAR, com a mínim, dues vegades a la setmana. També s'han analitzat mostres congelades de l'EDAR de Castelló de la Plana, que estaven disponibles en l'UJI per a altres projectes, i que van ser recollides al març i abril durant el període de confinament. En totes les mostres s'ha analitzat la presència d'àcids nucleics del coronavirus SARS-CoV-2, i se n'ha procedit a la quantificació (còpies gèniques per litre) usant fins a tres gens diana (E, N1, N2). Els resultats quantitius s'han tractat seguint les estratègies i metodologia de treball de WBE, tenint en compte les dades de cabal i el nombre d'habitants de la població en qüestió.

S'ha estudiat la possible correlació entre els nivells de SARS-CoV-2 en aigües residuals i les dades epidemiològiques proporcionades per la Direcció General de Salut Pública de la Generalitat Valenciana. Aquest estudi s'ha pogut portar cap de forma més completa per a Castelló de la Plana i Borriol, municipis les aigües dels quals són tractades en l'EDAR de Castelló, que s'han pres com a models en el present estudi. S'ha calculat una sèrie d'indicadors epidemiològics, corresponents al dia d'inici de símptomes, data de diagnòstic, data de declaració i ingressos, per a avaluar la seua correlació amb els resultats analítics, considerant per a cadascun d'ells diferents finestres temporals. S'ha treballat amb models de sèries temporals per a avaluar millor la evolució temporal de la presència i quantitat de càrrega genètica de SARS-CoV-2 en aigües residuals, i poder comparar-ho amb la incidència de casos per COVID-19, amb la finalitat d'avaluar el desfasament existent entre totes dues sèries temporals i el potencial caràcter anticipant i/o predictiu de l'anàlisi de les aigües residuals.

Per a la realització d'aquest projecte s'ha comptat amb la col·laboració de FACSA, empresa operadora de les EDAR situades en aquestes poblacions. Així mateix, s'ha comptat amb l'autorització dels ajuntaments i de l'Entitat Pública de Sanejament d'Aigües Residuals de la Comunitat Valenciana (EPSAR) per a la presa de mostres, depenent de l'EDAR objecte d'estudi.











### 3. MUNICIPIS I PLANTES DE TRACTAMENT SELECCIONATS

S'han seleccionat sis poblacions de diferents grandàries, característiques socioeconòmiques i taxes inicials d'incidència de la malaltia covid-19, per a les quals s'han recollit mostres setmanalment durant un període de sis mesos. Quatre d'elles (Almassora, Castelló de la Plana, Benicàssim, Vall d'Alba) pertanyen al Departament de Salut de Castelló, i les altres dues (Borriana, Vila-real) al Departament de Salut de la Plana. La inclusió de Benicàssim ha permès avaluar l'impacte del turisme i de la mobilitat de la població a l'estiu. Totes les EDAR objecte d'estudi són explotades per FACSA.

De les sis EDAR seleccionades per a la presa de mostres, cinc són gestionades pels respectius ajuntaments, mentre que la gestió de l'EDAR Almassora correspon a l'EPSAR.

En la **Taula 3.1** es mostra la població estimada connectada a la xarxa de sanejament, segons dades del cens, per a cadascuna de les EDAR.

**Taula 3.1.- Dades rellevants relatives a les sis poblacions i plantes de tractament d'aigües residuals estudiades**

Municipi	Població (cens)	Cabal mitjà (m <sup>3</sup> /dia)	Manera de mostreig <sup>c</sup>
<b>Almassora</b> (39.93202, -0.05641)	 26270	8376	T (50 ml/ 60 min)
<b>Benicàssim</b> (40.04838, 0.06773)	 18192	6823	T (50 ml/ 15 min)
<b>Borriana</b> (39.85922, -0.08435)	 34683	14242	T (50 ml/ 15 min)
<b>Castelló i Borriol</b> (39.98579, -0.00453)	 177088	40543	T (50 ml/ 15 min)
<b>Vall d'Alba</b> (40.15072, -0.01042)	 2807	528	T (50 ml/ 15 min)
<b>Vila-real</b> (39.93857, -0.06827)	 18937 <sup>b</sup>	3410	T (50 ml/ 15 min)

<sup>a</sup> Cens de 2019 per l'Institut Nacional d'Estadística (<https://www.ine.es/jaxit3/tabla.htm?t=2865&L=0>)

<sup>b</sup> Només una part de Vila-real està coberta. La població s'ha estimat sobre la base de les dades obtingudes d'EPSAR (<http://www.epsar.gva.es/sanejament/instalaciones/list-en-servicio.aspx>)

<sup>c</sup> Manera de mostreig: T = Proporcional al Temps (volum mostrejat/freqüència del mostreig)

#### 4. PRESA DE MOSTRES

És la primera etapa, i una de les més crítiques de tot el procés aplicat en WBE. La mostra ha de ser representativa i generalment es recull en l'entrada de l'estació depuradora d'aigües residuals (EDAR). L'ideal per a estudis amb finalitats epidemiològics basats en l'anàlisi de les aigües residuals és prendre mostres compostes/integrades i, si el mostrejador automàtic ho permet, recollir nombroses alíquotes en funció del temps, cabal o volum d'efluent per a compensar, tant com siga possible, les variacions contínues de cabal que es produeixen (**Figura 4.1**).

En la majoria d'aplicacions de WBE es prenen mostres compostes de 24 hores. No obstant això, en el cas de la COVID-19 existeixen certs dubtes sobre l'estabilitat i possible degradació del material genètic del virus SARS-CoV-2 al llarg del seu trànsit per la xarxa de clavegueram. Per això, en aquesta investigació s'han pres mostres compostes de 4 hores en tots els municipis, recollides entre les 8- 12 hores. Es considera que en aquesta franja del temps hi ha una major probabilitat que la població faça ús dels serveis i, per tant, s'estima que la concentració de la mostra siga major. Això, a més, permet iniciar l'anàlisi de les mostres el mateix dia de la recollida. Addicionalment a les mostres compostes de 4 hores, s'han pres mostres compostes de 24 hores en els municipis de Castelló i Borriana, amb la finalitat de comparar i avaluar els resultats del mostreig en aquestes dues franges de temps (i.e. 4 *versus* 24 hores). Les EDARs del present estudi han col·laborat desinteressadament prenent mostres (proporcionals al temps) amb alíquotes recollides en intervals curts de temps, ja que com més gran és l'interval de temps, major és la incertesa a l'hora d'estimar la incidència del virus en la població.

En aquest estudi, s'han pres cada 15 minuts en totes les EDAR, excepte a Almassora, que va prendre les alíquotes cada 60 minuts, la qual cosa suposa un total de 16 submostres (alíquotes) individuals en un període de 4 hores. Aquestes alíquotes, s'han mesclat finalment per a originar una única mostra composta per a les anàlisis, que és la que es transporta al laboratori.

La presa de mostres es va iniciar a principis de maig, i des de llavors es venen analitzant les aigües a l'entrada de les EDARs dues vegades per setmana (dimarts i divendres) fins a finals d'octubre. A part dels mostrejos periòdics esmentats, s'ha reaccionat amb promptitud enfront d'alguns brots que han sorgit, recollint mostres d'aigua residual en els sectors afectats, a més de les mostres a l'entrada de l'EDAR associada. Amb això, es pretén avaluar l'impacte d'aquests brots sobre els resultats, així com la possibilitat de sectoritzar els mostrejos en el futur per a fitar les àrees afectades.

Els recipients per a prendre i conservar les mostres han sigut de polietilè d'alta densitat (HDPE),

ja que els possibles additius/substàncies que puguen trobar-se en aquest material no interfereixen en les anàlisis realitzades, al mateix temps que es facilita la conservació de les mostres, si fora necessari, en congelador. Les mostres es van transportar al laboratori el mateix dia del mostreig per a minimitzar possibles problemes de degradació. La recollida de les mostres i el transport al laboratori es va fer en neveres portàtils (tipus nevera de camp), afegint alguns blocs de líquid congelador per a mantindre-les a baixa temperatura.

Amb l'objectiu d'estudiar l'estabilitat sota diferents condicions de conservació, durant les primeres setmanes es van recollir quatre mostres per dia de mostreig en les EDARs de Castelló i Borriana. D'aquestes quatre mostres, el laboratori de destinació va emmagatzemar tres dels pots a 4 °C, mentre que el quart es va congelar a -20 °C. Les mostres a 4 °C són les que s'han utilitzat per a diferents proves en el laboratori (ex. Estudi de diferents mètodes de preconcentració, estabilitat a diferents temps de conservació, etc.).

L'estreta col·laboració amb les EDARs de les ciutats estudiades ha sigut essencial per a poder obtenir informació de les poblacions (sovint pel cens de llars connectades a les xarxes de clavegueram), sobre el disseny de les xarxes de clavegueram, la dada del cabal mitjà d'aigües residuals durant les hores de mostreig, les anàlisis globals de paràmetres de la qualitat de les aigües residuals, com ara DBO, DQO, N total, P total i temperatura, entre altres. Per a facilitar l'obtenció de la informació necessària, es va dissenyar una base de dades i un qüestionari creat originalment pel Dr. Christoph Ort de l'EAWAG Suïssa, en nom de la xarxa SCORE (<https://score-cost.eu/>). Aquest qüestionari va ser simplificat i traduït per la Dra. Núria Zamorano López (FACSA) i el Dr. Lubertus Bijlsma (UJI) per a adaptar-lo al present projecte. El qüestionari s'ha dissenyat per a simular una entrevista entre els professionals del tractament d'aigua, els operaris i treballadors de les plantes de tractament i els investigadors de la Universitat, amb la finalitat d'obtenir la major informació possible sobre la mena de captació associat a l'EDAR. Les preguntes es van agrupar segons aspectes específics del sistema de tractament d'aigües i categoritzats segons la seua importància. Aquesta estratègia ens va permetre:

- avaluar les característiques de la captació,
- comprendre les dinàmiques de la captació d'aigua residual,
- adaptar el protocol de mostreig a les necessitats del projecte.

Finalment, l'estreta coordinació entre investigadors de la Universitat i tècnics i responsables de les EDARs ha sigut crucial per a la presa adequada de mostres representatives, el seu emmagatzematge i el trasllat als laboratoris. La **Taula 4.1** resumeix la informació més rellevant

relativa als mostrejos realitzats

**Taula 4.1: Resum del mostreig dut a terme**

<b>Característiques de les mostres</b>	Mostra composta/integrada de 4 hores (addicionalment també 24 hores per a Castelló i Borriana)
<b>Període de mostreig</b>	8-12 hores (per a mostres de 24 hores: 12am – 12am)
<b>Mostres proporcionals al temps</b>	Cada 15 min (excepte Almassora, cada 60 min)
<b>Número de submostres (alíquotes)</b>	4 x 500 ml (total 2 L)
<b>Característiques dels recipients</b>	Polietilè d'alta densitat, HDPE
<b>Etiquetatge de les mostres</b>	COVIDWW-Nom EDAR- ANEU Mostra
<b>Registre</b>	Enquesta i base de dades (Excel) per a cada EDAR
<b>Dies recomanats de mostreig</b>	Dos dies a la setmana: marts i divendres
<b>Manteniment de les mostres</b>	Frigorífic, 4 °C
<b>Enviament de mostres al laboratori</b>	Si era possible, el mateix dia.

**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).

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 <sup>1</sup>	Flow meter <sup>2</sup>
Continuous	flow-proportional		Pump with speed control (proportional to external flow signal) <sup>3</sup>	Yes
	constant		Pump	No
Discrete	T: time-proportional		Standard auto-sampler	No
	F: flow-proportional		Auto-sampler with adjustable sampling volume <sup>4</sup> (proportional to external flow signal)	Yes
	V: volume-proportional		Auto-sampler totaling an external flow signal up to a predefined volume <sup>5</sup> and then triggering a sample	Yes
g: grab sample	Take one (or a number of) grab sample		Scoop, no power supply.	No



<sup>1</sup> Indicates what equipment is required besides sampling bottles, hose and power supply.  
<sup>2</sup> 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.  
<sup>3</sup> 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.  
<sup>4</sup> Sampling volume of individual samples needs to be checked for linear behavior over the whole range of discharge in the sewer.  
<sup>5</sup> Check variation of individual sample size.

**Figura 4.1:** Descripció de maneres de mostreig

*L'ideal és prendre mostres compostes, recollint el major nombre d'aliquotes possible dependent del temps (T), cabal (F), o volum (V) per a compensar les variacions contínues de cabal (Referència: Ort C., Lawrence M.G., Rieckermann J. and Joss A. (2010) Environmental Science & Technology 44 (16), 6024–6035).*

## 5. ANÀLISI DE LES MOSTRES

En la metodologia utilitzada per a la concentració de les mostres d'aigües, extracció d'RNA víric i la seua posterior anàlisi per RT-qPCR, s'han tingut en compte, tant durant la manipulació de les aigües com en concentrat d'aquestes, les recomanacions generals de bioseguretat establides per als laboratoris de nivell 2 de contenció biològica (NCB2) (tota la informació pot trobar-se en [https://www.who.int/topics/medical\\_waste/manual\\_bioseguiridad\\_laboratori.pdf](https://www.who.int/topics/medical_waste/manual_bioseguiridad_laboratori.pdf)).

Una vegada rebudes les mostres compostes d'aigües en el laboratori d'anàlisi es va procedir a dividir el volum d'aigua en diferents alíquotes (vegeu la presa de mostra). Per a l'estudi d'estabilitat, es van obtindre quatre alíquotes de 200 ml, que van ser emmagatzemades a dues temperatures diferents (4 °C i -20 °C) i a diferents temps de conservació, fins a la seua anàlisi. A totes aquestes alíquotes, més l'anàlitzada el mateix dia de la presa de mostra (200 ml), se'ls va afegir 5µL del cep de mengovirus vMCO CECT 10000 (10.000 unitats infectives), com a control de procés (**Randazzo et al, 2020**).

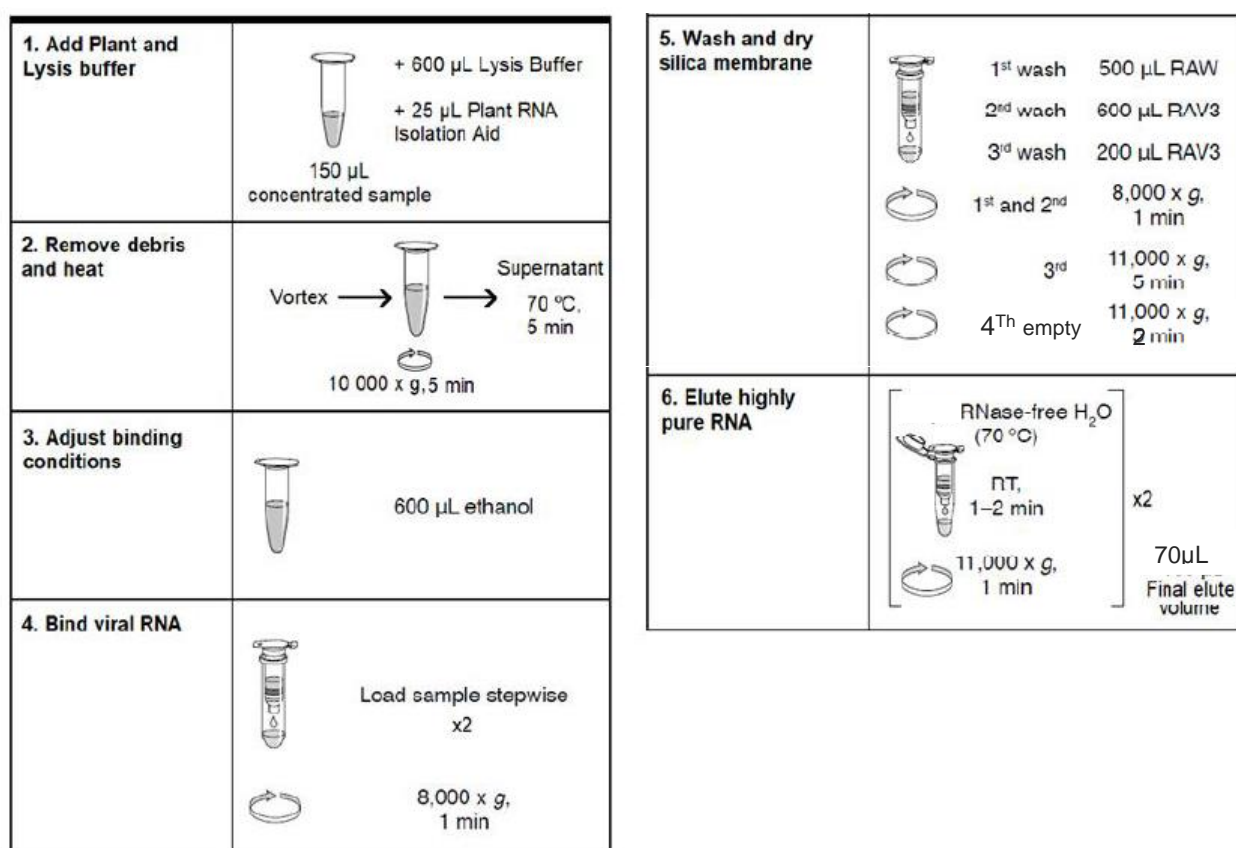
A continuació, es va procedir a la concentració de les mostres mitjançant el mètode d'absorció i precipitat per alumini, tal com es descriu en **Randazzo et al (2020)**. Breument, es va ajustar el pH de les mostres d'aigua a 6 amb HCl 12M. Una vegada ajustat el pH, es va afegir 2 ml d'AlCl<sub>3</sub> al 4 % (solució preparada en el moment) i es van agitar manualment les mostres durant uns minuts. Posteriorment, es va ajustar de nou el pH de les aigües a pH 6 amb NaOH 0.1M o 1M, depenent del pH de cada mostra d'aigua. A continuació, es van agitar les mostres en un agitador orbital durant 15 min a 150 rpm, procedint després a la seua centrifugació a 1700 g, durant 20 minuts. Després del centrifugat, es va eliminar el sobrenedant i el pèl·let resultant es va resuspendre en 10ml d'una solució "beef extract" al 3 %. Els tubs es van mantindre en agitació constant en un agitador orbital durant 10 minuts a 200 rpm. Posteriorment, es van centrifugar a 1900 g durant 30 minuts. Finalment, el pèl·let recollit es va resuspendre en 1 ml d'una solució tampó de fosfat salí (PBS 1X). El concentrat recollit es va dividir en alíquotes per a la seua congelació a -20 °C i posterior extracció del RNA.

### Extracció d'RNA dels concentrats d'aigües



El procés que es descriu a continuació es va dur a terme en una cabina de seguretat CSB de classe II, per a garantir que qualsevol pas en què es puguen generar aerosols es realitze en condicions de màxima seguretat.

Per a l'extracció d'RNA es van prendre 150 µL de la mostra concentrada i es van seguir les especificacions del kit d'extracció comercial NucleoSpin RNA virus Kit (Macherey Nagel) i les modificacions indicades en **Randazzo et al (2020)** (la **Figura 5.1** mostra gràficament els passos seguits en aquest procés).



**Figura 5.1.** Esquema gràfic de la metodologia utilitzada per a l'extracció de l'RNA de les mostres (kit de NucleoSpin) adaptades de **Randazzo et al 2020**

L'RNA extret de cada mostra es va eluir en 70 µL d'aigua lliure de RNAases i es va mantindre a 4 °C, per a procedir immediatament a la seua anàlisi mitjançant RT-PCR.

## Detecció i anàlisi de l'RNA viral extret dels concentrats de mostres

La detecció de la presència d'RNA víric es va portar a terme utilitzant el termociclador StepOne Plus de Applied Biosystem amb un programa específic per a la Reacció de Cadena de la Polimerasa en Temps Real a partir d'RNA —en un sol pas— (RT-PCR). Es van utilitzar tres dianes víriques específiques per a SARS-CoV-2: fragments de N1, N2 i E (**CDC, 2019**). A més, en cada RT-qPCR es va incloure la detecció del mengovirus, com a control de l'eficiència del procés de concentració i extracció (**Costafreda et al., 2006**). Al seu torn, en totes les RT-qPCR es va incloure un control negatiu (aigua lliure de RNAses utilitzada en el procés d'extracció de l'RNA) i els controls positius corresponents per a l'obtenció de la corba patró usada per a la quantificació de les mostres. Per a la diana dels gens N1 i N2, es va utilitzar el 2019-nCoV\_N\_Positive Control (IDT, ref.10006625). Per a la diana E, es va usar el 2019-nCoV\_E Positive Control (IDT, ref. 10006896). Per al mengovirus, es va utilitzar una mostra d'RNA extret del cep vMCO CECT 10000.

Les condicions per a la preparació de les solucions de les diferents dianes i el programa utilitzat per a la detecció del SARS-CoV-2 i mengovirus mitjançant RT-qPCR es detallen en **les Taules 5.1 i 5.2**

**Taula 5.1. Composició de les diferents reaccions de RT-qPCR.**

	SARS-CoV-2			Control de
	N1	N2	E	procés mengovirus
2x tampó (µl)	5	5	5	5
Takara Ex Taq (µl)	0.2	0.2	0.2	0.2
Prevalga Script Enzyme (µl)	0.2	0.2	0.2	0.2
engreixador directe (µl)	0.75 <sup>a</sup>	0.75 <sup>a</sup>	1 <sup>b</sup>	0.75 <sup>c</sup>
engreixador revers (µl)				
Sonda (µl)				
ROX	-	-	-	-
H <sub>2</sub> 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 Cribratge, 1000 Rxn, IDT, Ref 10006804,

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

c. Engreixadors ( 6.7 µM) i sonda ( 425nM) (Costafreda et al 2006)

**Taula 5.2. Programes de RT-qPCR per a les diferents dianes moleculars usades per a la detecció de SARS-CoV-2 i mengovirus**

		Dianes N1,N2, E i mengovirus		
		Temperatura	temps	cicles
Pas		25 °C	5 min	1
	Retrotranscripció	45 °C	10 segons	1
	Desnaturalització	95 °C	5 segons	45
	PCR	55 °C	34 segons	

### Criteris d'interpretació dels resultats

Es van visualitzar les corbes d'amplificació seguint les instruccions de l'equip de PCR quantitativa, per a determinar presència de Cts (cycle treshold, cicle d'amplificat, segons un llindar de tall) aberrants o erronis. A més, abans de dur a terme l'avaluació dels resultats, es va comprovar que, per a cada diana analitzada, el respectiu control positiu de RT-qPCR era positiu (hi havia amplificació) i el control negatiu resultava negatiu (sense amplificació).

Per a la interpretació dels resultats es van tindre en compte els criteris definits pel Ministeri de Ciència i Innovació (<https://www.miteco.gob.es/es/agua/temas/concesiones-y-autorizaciones/vertidos-de-aguasresiduales/alerta-temprana-covid19/default.aspx>).

Breument, els resultats obtinguts de la RT-qPCR per a detecció del SARS-Cov-2 es van interpretar com a positius o negatius segons s'indica a continuació:

- Dus dianes de SARS-Cov-2 negatives → NEGATIU;
- Dus dianes de SARS-Cov-2 positives → POSITIU;
- Si una diana de SARS-Cov-2 és positiva i l'altra és negativa → POSITIU a confirmar mitjançant RT-qPCR d'una tercera diana:
  - Si la tercera diana dona positiva → POSITIU;
  - Si la tercera diana dona negativa → PRESUMPTE POSITIU.

D'altra banda, els resultats es van considerar vàlids sempre que el percentatge de recuperació del control de procés va ser  $\geq 1\%$ .

### **Criteris de quantificació de les mostres positives**

Únicament es van convertir a còpies genòmiques/L aquells valors de Ct menors de 40 interpolant el Ct de la mostra problema en les rectes patró externes construïdes amb dilucions seriades en base 10 de material de referència quantificat. Cada mostra es va carregar per duplicat, per la qual cosa la quantificació en còpies genòmiques per litre es va donar com a mitjana de les dues rèpliques, amb la seua desviació estàndard.

La recta patró de cada gen ha de complir uns requisits mínims: els punts s'han d'ajustar a una recta amb un coeficient de correlació (R2) mínim de 0,98 ; el pendent de la recta ha d'ajustar-se a una eficiència d'amplificació entre el 80 i el 110 % (ISO 15216-1, 2017).

## 6. CÀLCULS EPIDEMIOLÒGICS EN AIGÜES RESIDUALS

WBE és una disciplina recent que està sent cada vegada més acceptada internacionalment. Per a la seua aplicació, és necessari seleccionar biomarcadors específics que aporten informació epidemiològica sobre la població que descarrega les seues aigües residuals en la xarxa de clavegueram. WBE pot aportar dades útils relacionades amb l'estil de vida (consum de drogues i noves substàncies psicoactives, alcohol, tabac, etc.), salut i estat nutricional, o nivells d'exposició de la població a productes químics o biològics. Una de les aplicacions més interessants, objecte d'estudi en el present informe, és el monitoratge del virus en aigües residuals per a estimar el grau d'afecció en una població, incloent-hi també la que és simptomàtica i les persones no diagnosticades mitjançant controls clínics.

WBE parteix de la base que les persones infectades per SARS-CoV-2 eliminen el virus amb la femta als sistemes de clavegueram urbans. Per això, l'anàlisi de les aigües residuals pot proporcionar informació sobre la concentració de partícules víriques procedents d'aquelles persones que han sigut afectades per la pandèmia en una determinada població. D'altra banda, pot considerar-se que el material genètic del virus que siga estable en aigua residual arribarà pràcticament intacte a l'estació depuradora d'aigües residuals (EDAR), per la qual cosa és raonable assumir que la quantitat excretada de manera col·lectiva es veja reflectida per la càrrega total rebuda en l'EDAR en un determinat interval de temps. La recollida de mostres compostes, representatives per a aquest interval temporal, és, en conseqüència, un dels factors clau en aquest enfocament, ja que permet augmentar la probabilitat de detectar material genètic del virus SARS-CoV-2 en les aigües residuals independentment dels hàbits poblacionals.

La **Figura 6.1** esquematitza el procés dut a terme en WBE, des de la presa de mostra fins al càlcul de la càrrega normalitzada per 1000 habitants d'una població (**Castiglioni et al., 2016**). L'anàlisi de les aigües residuals mitjançant reacció en cadena de la polimerasa (PCR, per les seues sigles en anglés, *Polymerase Chain Reaction*) permet obtindre les còpies gèniques del virus en mostres representatives d'unes hores concretes o d'un dia complet (4 hores o 24 hores, vegeu la secció "Presa de mostres"). A partir de les còpies gèniques (CG) oposades, es pot estimar la quantitat diària d'aquest material genètic del virus en l'aigua residual. Amb les dades obtingudes, es pot, per tant, fer estimacions sobre el nombre de còpies gèniques/dia. Tenint en compte la grandària de la població que aboca les seues aigües a l'EDAR, es poden normalitzar els resultats, (ex. expressant-los en còpies/dia/1000 habitants), la qual cosa permet establir millor possibles comparacions i tendències al llarg del temps.

La càrrega normalitzada en funció de la població (còpies/dia/1000 habitants) es calcula de la següent manera:

$$\text{Càrrega normalitzada} = \frac{(C \times F)}{p}$$

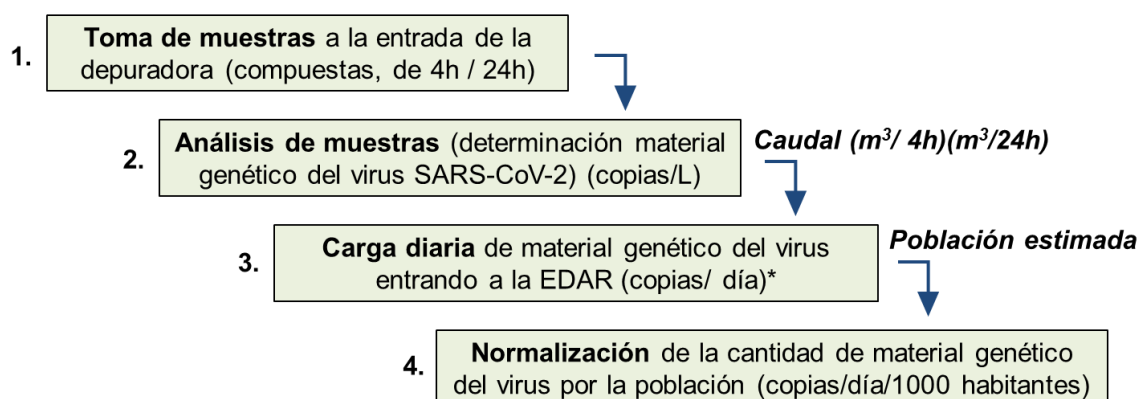
C = nombre de còpies en la mostra d'aigua residual (còpies/L)

F = Flux (cabal) de l'aigua residual (m<sup>3</sup>/dia)

P = població contribuent a la mostra

Encara que el concepte en què es basa WBE és relativament simple, hi ha diversos factors que afecten la incertesa de les dades obtingudes, els quals han de tindre's en compte per a poder implementar aquesta aproximació a gran escala i de manera realista. Els més rellevants són: i) la variabilitat de la càrrega vírica excretada (percentatge variable d'excreció en diferents individus, que a més pot ser diferent durant les diferents fases de la infecció, i també entre afectats i asimptomàtics); ii) aspectes relacionats amb el sistema de clavegueram (grandària de la població/nombre d'habitants que aboca les aigües residuals a l'EDAR, cabal diari d'aigua residual, distància dels focus de contagi fins a l'entrada de l'EDAR); iii) la variació en la concentració del material genètic del virus des de la seua excreció per part dels individus afectats fins a la seua arribada a l'EDAR (estabilitat, degradació, distribució i/o processos d'adsorció que puga experimentar al llarg de la xarxa de sanejament).

**Figura 6.1: Esquema del procés aplicat en l'epidemiologia basada en l'anàlisi d'aigües residuals (WBE)**



\* Per a mostres compostes de 4 hores, l'estimació es fa multiplicant x 6 la dada de còpies /L obtinguda en la mostra (s'estima, per tant, el nombre de còpies/dia)

## 7. OBTENCIÓ I TRACTAMENT DE DADES EPIDEMIOLÒGIQUES

Es va treballar amb les dades procedents de les enquestes epidemiològiques que des dels Centres de Salut Pública es realitzen a cada cas declarat de COVID-19. Aquesta informació va ser facilitada per la Subdirecció General d'Epidemiologia, Vigilància de la Salut i Sanitat Ambiental, de la Direcció General de Salut Pública i Addiccions de la Generalitat Valenciana.

En concret, es va obtindre informació sobre les variables que s'indiquen a continuació: data de diagnòstic, data de declaració, data d'inici de símptomes, centre i data d'ingrés i alta, per a cadascun dels casos de COVID-19 en cadascun dels municipis d'estudi durant el període gener/octubre 2020. Es va treballar en tot moment amb dades anonimitzades.

A partir de la informació epidemiològica proporcionada, es van definir diferents indicadors per a cada municipi, com els corresponents al nombre de casos diaris (segons data de declaració o d'inici de símptomes), així com els referits a ingressos diaris, amb la finalitat d'avaluar la relació de cadascun d'aquests amb els nivells de SARS-CoV-2 detectats al llarg del període d'estudi en les corresponents EDAR. Es va treballar en tot moment amb els casos declarats confirmats.

Atés que la planta de Castelló de la Plana tracta de manera conjunta les aigües residuals d'aquest municipi i les de Borriol, els indicadors epidemiològics per a aquesta planta es van calcular per a totes dues localitats.

Les dades meteorològiques (temperatures i precipitació) es van obtindre de l'estació d'AEMET Almassora-Castelló, i de la xarxa d'estacions que formen part de l'Associació Valenciana de Meteorologia, per a la resta de municipis inclosos en l'estudi.

El període d'estudi va ser el comprés entre el 5 de maig, moment en què es va realitzar la primera presa de mostres, i finals d'octubre.

En el present informe es mostren les dades descriptives dels indicadors epidemiològics en les diferents poblacions d'estudi, els resultats de l'anàlisi comparativa entre aquests indicadors i els nivells de material genètic de SARS-CoV-2 en aigües residuals, així com l'anàlisi específica d'un brot delimitat de COVID-19 que es va produir a la ciutat de Castelló durant el període d'estudi.

L'anàlisi simple de la relació entre els nivells de material genètic de SARS-CoV-2 en aigües residuals (còpies/L dels gens N1, N2 i E) i indicadors epidemiològics (nombre diari de casos

declarats o que van iniciar símptomes) s'ha dut a terme mitjançant representacions gràfiques i test de correlació de Spearman, després de comprovar la no normalitat de les dades. Per a aquestes anàlisis s'estan tenint en compte retards quant al nombre de casos de 0, 7, 14 i 21 dies, atés el caràcter mantingut de l'excreció de SARS-CoV-2 en femta que reporten els estudis clínics. Les dades perdudes i els resultats inferiors al límit de detecció van ser imputats a través del model definit a aquest efecte.

Es presenten les dades corresponents a l'EDAR de Castelló de la Plana, municipi amb major nombre de casos, del qual es va obtenir informació epidemiològica més completa i amb suficient antelació per a la preparació del present informe.



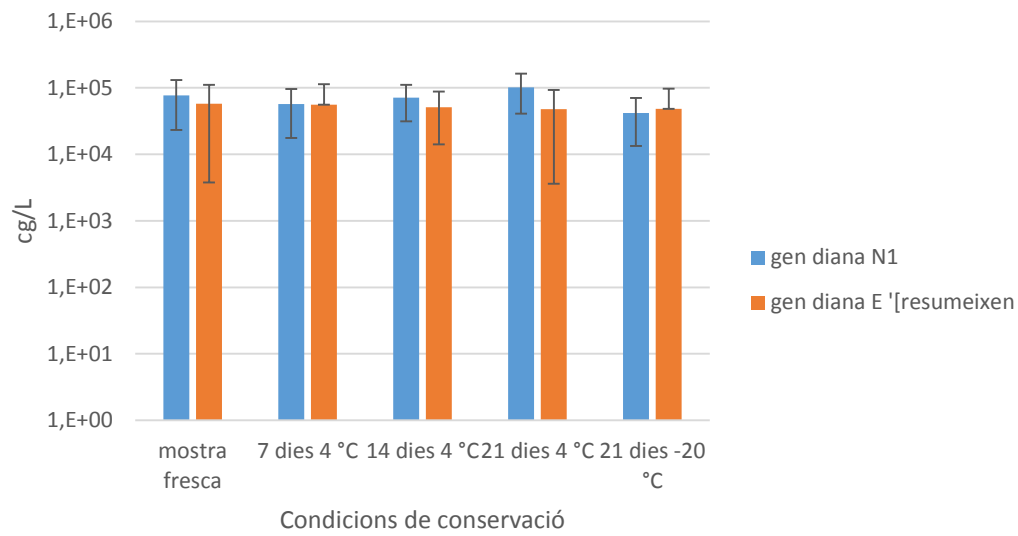
## 8. DISCUSSIÓ DE RESULTATS

### 8.1. ESTUDI D'ESTABILITAT I CONSERVACIÓ DE LES MOSTRES

Un dels punts crítics en WBE és precisament la conservació de les mostres. En el cas particular de la detecció del SARS-CoV-2 no existeix un protocol unificat sobre les condicions òptimes d'emmagatzematge de les mostres d'aigües residuals. S'ha descrit que el virus SARS-CoV-2 pot sobreviure a 20 °C durant dos dies i fins a catorze dies quan la temperatura de conservació disminueix a 4 °C (*Wang et al. , 2005*). No obstant això, existeix poca evidència científica sobre l'estabilitat de l'RNA en mostres d'aigües residuals a diferents temperatures i temps. Per tot això, en el present treball s'ha estudiat l'impacte de la temperatura (4 °C vs. -20 °C) i el temps (0 hores, 7, 14 i 21 dies) sobre l'estabilitat de l'RNA durant el seu emmagatzematge.

En la **Figura 8.1.1**, es representen les dades de la càrrega genètica (cg/L) obtingudes amb els gens diana N1 i E. En l'anàlisi de les mostres també es va incloure el gen diana N2, no obstant això, la detecció del virus va ser negativa per a la majoria de les mostres; per aqueix motiu, no s'inclouen aquestes dades en la figura. Les mostres d'aigües seleccionades per a l'estudi es van dividir en quatre alíquotes de 200 ml a les quals se'ls va afegir 5 µL del cep de mengovirus vMCO CECT 10000 (10.000 unitats infectives), com a control de procés. Una de les mostres va ser processada i analitzada el mateix dia de la presa de mostra (mostra fresca) i la resta de les alíquotes es van emmagatzemar a les condicions de temperatura (4 °C vs. -20 °C) i el temps (0 hores, 7, 14 i 21 dies) fins a la seua anàlisi. Les dades mostren la mitjana i desviació típica de quatre rèpliques seleccionades aleatòriament durant els mesos de setembre i octubre.

Els resultats indiquen que l'estabilitat de l'RNA present en les mostres d'aigües residuals no es veu afectada ni per la temperatura de conservació ni pel temps d'emmagatzematge, almenys fins al màxim de 21 dies estudiats. Per tant, l'emmagatzematge a totes dues temperatures seria igualment adequat per a preservar l'estabilitat del material genètic present en les aigües residuals enfront de l'activitat d'enzims (ex. RNAases) o altres microorganismes (ex. bacteris), que contribueixen a la degradació del material genètic víric. Aquestes dades estan en concordança amb els resultats recentment publicats en els quals detecten RNA (gen diana E) després de 26 dies d'emmagatzematge en mostres d'aigües residuals encebades amb títols alts de SARS-CoV-2 i conservades a 20 °C (*Bivins et al., 2020b*), i després de quinze dies en el cas de mostres d'aigües residuals encebades amb un cep de SARS-CoV-2 inactivat per radiació gamma (*Ahmed et al., 2020b*).



**Figura 8.1.1. Estudi d'estabilitat de l'RNA en mostres d'aigües residuals emmagatzemades a diferents condicions de temperatura i temps.**

## 8.2. RESULTATS OBTINGUTS PER MUNICIPIS

Els resultats obtinguts en les anàlisis realitzades en les aigües residuals de cada municipi i EDAR, des de l'inici dels mostrejos (maig, 2020) fins al final d'aquests (octubre, 2020) es resumeixen en les **Taules 8.2.1-8.2.6**. La evolució de la detecció del virus, representada com la mesura de càrrega vírica (còpies gèniques, cg/L) obtinguda de les dades del gen diana N1, es mostra en la **Figura 8.2.1** per a totes les poblacions estudiades. Finalment, les dades de càrrega vírica (còpies gèniques, cg/L) obtingudes a partir de cada gen diana estudiat (N1, N2 i E) en cada municipi es representen en les **Figures 8.2.2 - 8.2.7**.

Com s'ha indicat en la secció 5, es van utilitzar tres dianes víriques específiques per a SARS-CoV-2: fragments de N1, N2 i E. Les taules mostren les concentracions obtingudes per a cada gen, expressades en còpies/L, en cadascuna de les poblacions.

L'anàlisi de les aigües residuals mitjançant RT-qPCR per a la detecció del SARS-CoV-2 ha permès monitorar la freqüència de detecció del virus i quantificar la càrrega vírica mesurada com a còpies gèniques per litre (cg/L), en cadascun dels dies de mostreig al llarg del tot el projecte.

En termes generals, els resultats mostren que la detecció de material genètic del SARS-CoV-2 en les aigües residuals de tots els municipis va ser puntual durant els primers mesos de l'estudi (maig-juliol), període que coincideix amb el final de la primera ona i començament de la desescalada. Únicament en els municipis de Castelló i Borriana es va observar una major freqüència en la detecció vírica, la qual cosa es correspon amb el fet de ser les localitats on major incidència s'ha observat de la COVID-19. Cap a finals de juliol o principis d'agost, la freqüència de detecció del virus va començar a augmentar en tots els casos, amb valors màxims de càrrega vírica durant les primeres setmanes de setembre, i es van mantindre fins al final del projecte, excepte excepcions com la Vall d'Alba. Aquest augment en la detecció del virus reflecteix, sens dubte, el començament de la segona ona i amb aquesta l'augment de la incidència de casos COVID-19 que s'ha patit durant els mesos de setembre i octubre (**Figures 8.2.4 i 8.2.5**).

D'altra banda, és molt interessant destacar com els resultats de detecció del virus en aigües residuals reflecteixen certes peculiaritats d'algunes de les poblacions estudiades. Un dels casos més clar és Benicàssim, una localitat molt turística que veu augmentada la seua població significativament durant els mesos d'estiu, principalment per residents de Castelló i València. L'augment en la freqüència de detecció del virus va coincidir amb el període vacacional, observant-se els valors de càrrega vírica més elevat durant el mes d'agost. A partir d'aqueix

moment es va mantindre la detecció del virus en tots els mostrejos, i es va observar una lleugera pujada de la càrrega vírica a mitjan setembre, que va disminuir fins a desaparèixer, fins que a la fi d'octubre van tornar a detectar-se valors elevats de càrrega vírica, comparables als màxims observats a l'agost (**Figura 8.2.3**). Aquest augment de la presència del SARS-CoV-2 en les aigües residuals de Benicàssim podria vindre com a conseqüència de l'augment en l'afluència de visitants amb motiu del pont del 9 d'Octubre.

Un altre cas interessant ha sigut la localitat de la Vall d'Alba, un xicotet municipi de l'interior de Castelló, en el qual la detecció del virus ha sigut molt puntual, que s'ha concentrat majoritàriament durant les tres primeres setmanes de setembre, fet que va coincidir amb l'aparició d'un brot. A partir d'aqueix moment, únicament hi ha hagut deteccions puntuals (**Figura 8.2.7**).

Finalment, els resultats obtinguts per a Almassora, Borriana, Castelló i Vila-real mostren una major freqüència en la detecció del virus al llarg del projecte, que va ser màxima durant els mesos d'estiu, encara que en aquests casos s'ha mantingut relativament constant fins al final del projecte. Aquests resultats estarien d'acord amb la major incidència de la COVID-19 observada en aquestes localitats (**Figures 8.2.2, 8.2.4, 8.2.5 i 8.2.6**).

Taula 8.2.1. Concentracions per als gens N1, N2 i E (còpies gen /L) en aigua residual d'Almassora .

Data (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 analitzat; Cel·la buida: no es detecta

Taula 8.2.2. Concentracions per als gens N1, N2 i E (còpies gen /L) en aigua residual de Benicàssim.

Data (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 analitzat; Cel·la buida: no es detecta

Taula 8.2.3. Concentracions per als gens N1, N2 i E (còpies gen /L) en aigua residual de Borriana\*.

Data (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 analitzat; Cel·la buida: no es detecta; \* mostres compostes de 4h

Taula 8.2.4. Concentracions per als gens N1, N2 i E (còpies gen /L) en aigua residual de Castelló \*.

Data (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 analitzat; Cel·la buida: no es detecta; \* mostres compostes de 4h



Taula 8.2.5. Concentracions per als gens N1, N2 i E (còpies gen/L) en aigua residual de Vila-real.

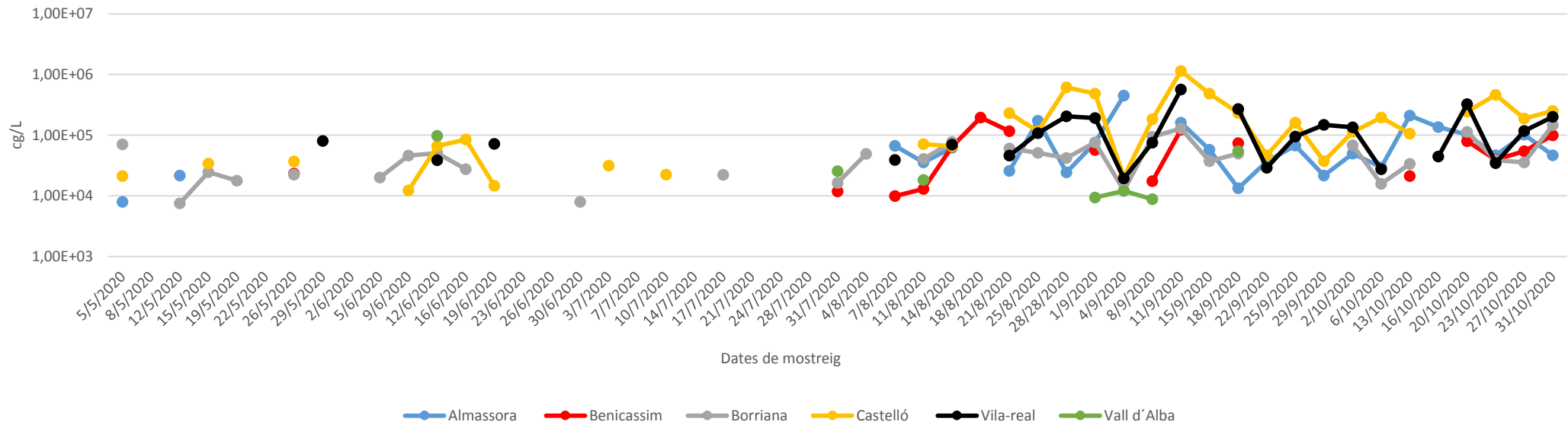
Data (mm/dd/aa)	N1 (CG/L)	N2 (CG/L)	E (CG/L)
5/12/2020		28678	X
5/15/2020			X
5/19/2020			X
5/22/2020			X
5/26/2020	80542		X
5/29/2020			X
6/2/2020			X
6/5/2020			X
6/9/2020	38504	1785	X
6/12/2020			X
6/16/2020	72015		X
6/19/2020			X
6/23/2020			X
6/26/2020			X
6/30/2020			X
7/3/2020			
7/7/2020			
7/10/2020			
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 analitzat; Cel·la buida: no es detecta

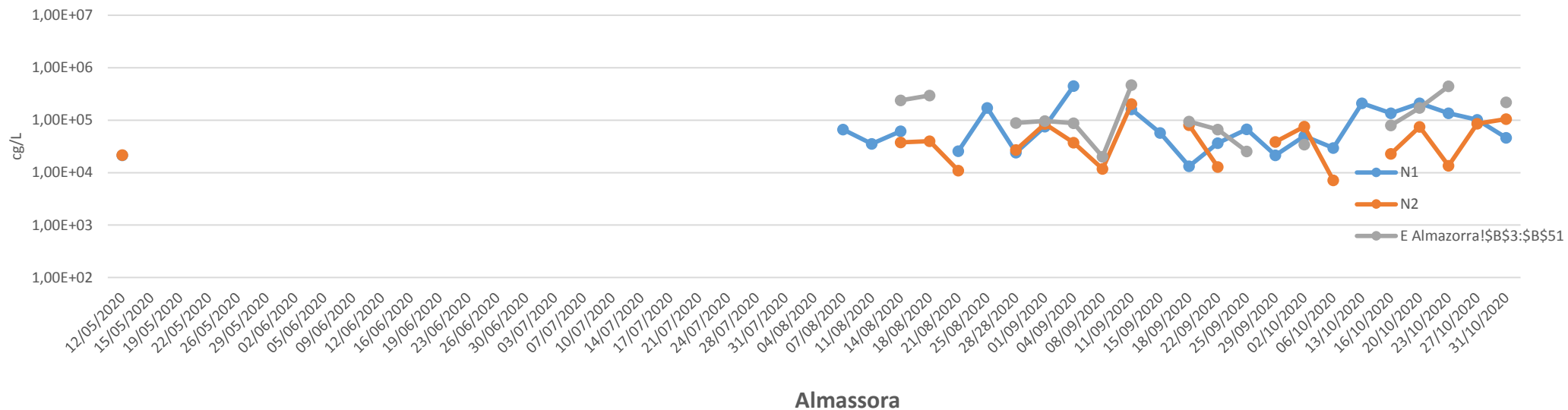
Taula 8.2.6. Concentracions per als gens N1, N2 i E (còpies gen /L) en aigua residual de la Vall d'Alba.

Data (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

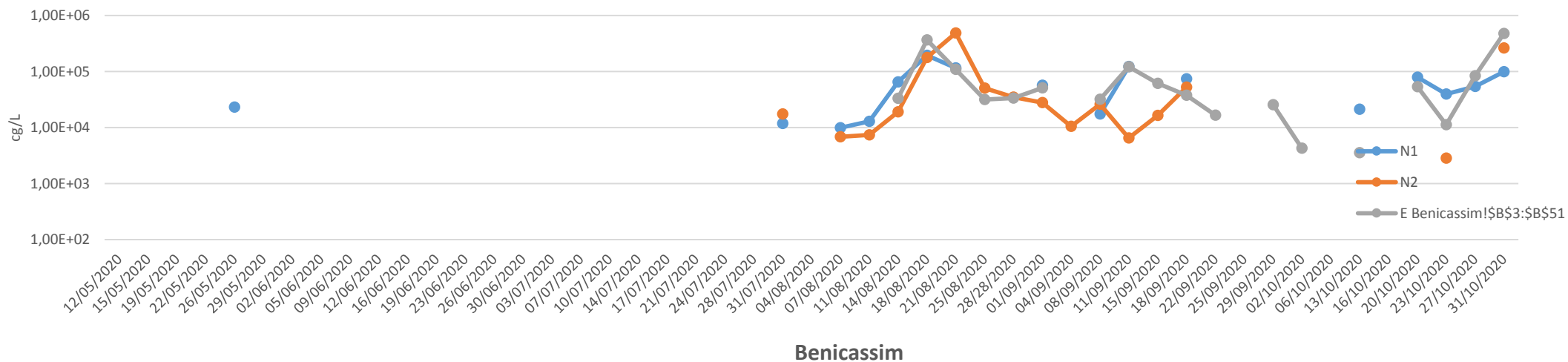
X: no analitzat; Cel·la buida: no es detecta



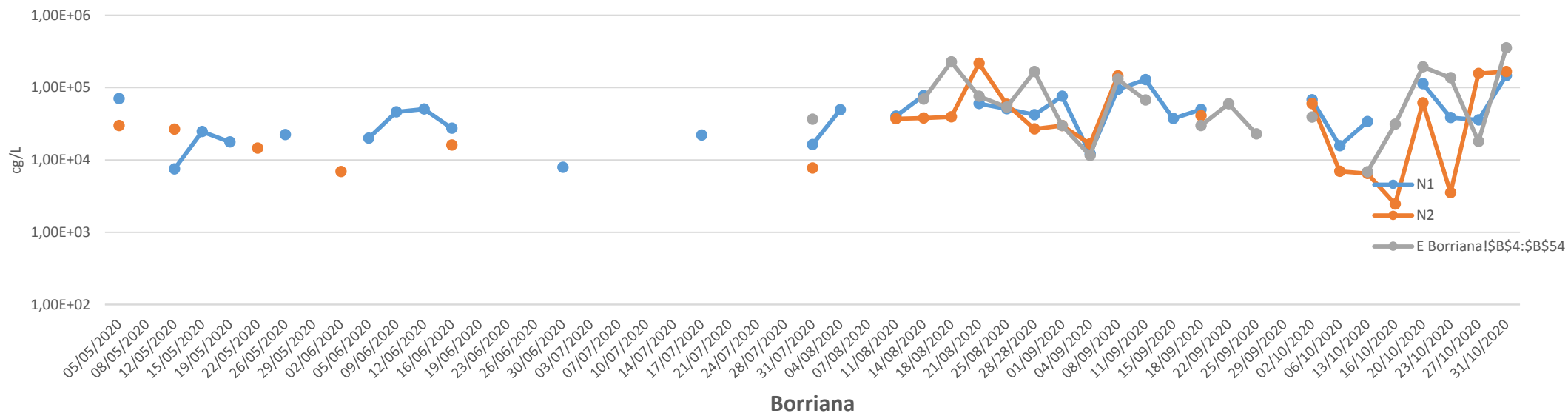
**Figura 8.2.1. Evolució temporal de la detecció del virus en tots els municipis estudiats. Es mostra el mesurament de càrrega vírica (cg/L) obtingut a partir de les dades del gen diana N1**



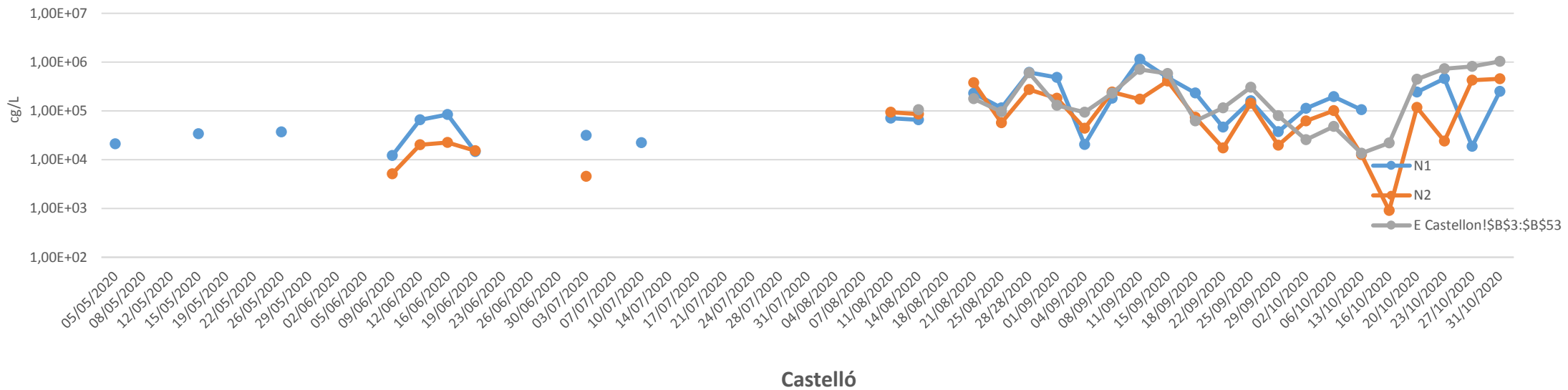
**Figura 8.2.2. Representació de les dades de càrrega vírica (còpies genètiques, cg/L) obtingudes a partir de cada gen diana estudiat (N1, N2 i E) en les aigües residuals d'Almassora .**



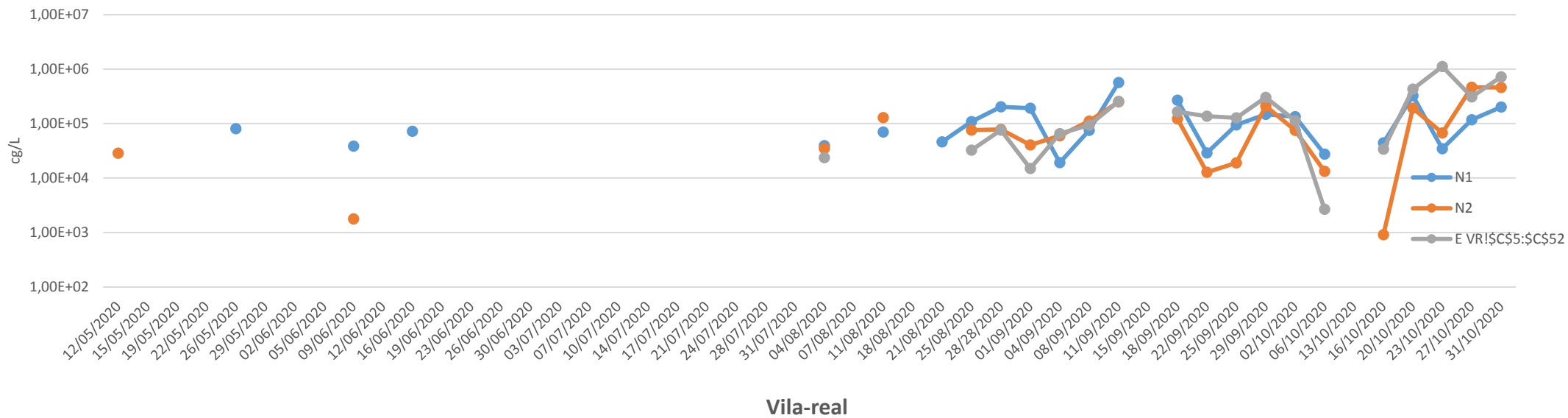
**Figura 8.2.3. Representació de les dades de càrrega vírica (còpies genètiques, cg/L) obtingudes a partir de cada gen diana estudiat (N1, N2 i E) en les aigües residuals de Benicàssim.**



**Figura 8.2.4. Representació de les dades de càrrega vírica (còpies genètiques, cg/L) obtingudes a partir de cada gen diana estudiat (N1, N2 i E) en les aigües residuals de Borriana.**

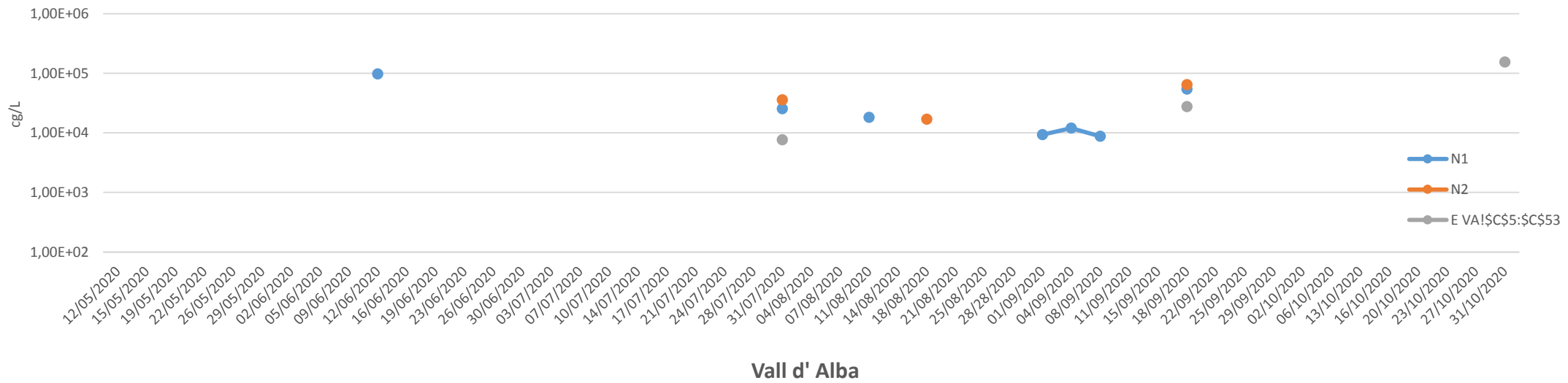


**Figura 8.2.5. Representació de les dades de càrrega vírica (còpies genètiques, cg/L) obtingudes a partir de cada gen diana estudiat (N1, N2 i E) en les aigües residuals de Castelló.**



**Figura 8.2.6. Representació de les dades de càrrega vírica (còpies genètiques, cg/L) obtingudes a partir de cada gen diana estudiat (N1, N2 i E) en les aigües residuals de Vila-real.**





**Figura 8.2.7. Representació de les dades de càrrega vírica (còpies genètiques, cg/L) obtingudes a partir de cada gen diana estudiat (N1, N2 i E) en les aigües residuals de la Vall d'Alba**

### 8.3. APLICACIÓN DELS PRINCIPIS DE WBE

En la secció 6 d'aquest informe s'ha comentat la metodologia aplicada en els estudis sobre WBE, des de la presa de mostra fins al càlcul de la càrrega normalitzada per 1000 habitants d'una població. A partir de les còpies gèniques oposades (CG/L), es pot estimar la quantitat diària d'aquest material genètic del virus en l'aigua residual, expressat com a càrrega en les 4 hores de presa de mostra, tenint en compte les dades del cabal mesurat. Amb les dades obtingudes, es pot finalment fer estimacions sobre el nombre de còpies gèniques/dia i, tenint en compte la grandària de la població associada a la xarxa de sanejament, es poden normalitzar els resultats, expressant-los com a còpies (gen/dia/1000 habitants). Aquesta última dada és la que se sol utilitzar en els estudis sobre WBE per a establir possibles comparacions entre poblacions i tendències al llarg del temps.

Les **Taules 8.3.1 - 8.3.6** mostren els resultats obtinguts en les anàlisis, expressats com a còpies gen/L en les mostres compostes de 4 hores, així com la càrrega total de material genètic del virus en les 4 hores de mostreig, i finalment la dada de càrrega normalitzada (còpies gen/dia/1.000 habitants). L'estimació de la càrrega diària (còpies gen/dia) s'ha realitzat multiplicant x 6 la dada obtinguda en les mostres de 4 hores (4 h x 6= 24 h). El nombre d'habitants associat a cada EDAR s'ha obtingut del cens de 2019, excepte en l'EDAR d'Almassora, que s'ha estimat a partir de la DBO ([epsar.gva.es](http://epsar.gva.es)). Les dades mostrades són les corresponents al gen N1, que va ser el que va demostrar ser més sensible.

Les **Taules 8.3.7 i 8.3.8** resumeixen les dades comparades de les càrregues i càrregues normalitzades per a les sis poblacions estudiades. A grans trets, es pot observar com durant els mesos de maig -juliol, en la major part de les poblacions, no es pot arribar a estimar un valor de càrrega normalitzada perquè el nombre de CG/L del gen N1 en les mostres recollides en aquest període està per davall dels límits de detecció de la metodologia aplicada. Les dates es corresponen amb el descens en la corba de contagis experimentada després de la primera onada de contagis en els mesos de març i abril. Posteriorment, s'aprecia un augment generalitzat en els valors de càrrega normalitzada de còpies gèniques del gen N1 per població en els mesos d'agost a octubre, que corresponen al segon episodi d'augment de contagis. Entre aquests, es pot observar un pic al voltant de mitjans del mes de setembre per a les poblacions d'Almassora, Borriana, Castelló i Vila-real.

Entre les poblacions estudiades es pot observar que la que presenta, en general, una major càrrega normalitzada del virus és Castelló. Atés que les dades estan normalitzades per població,

això indica que la incidència del virus per habitant és major que en la resta de les poblacions durant els mesos estudiats. No obstant això, seria necessari tindre en compte els possibles desplaçaments de persones que treballen a Castelló, però que tenen la seua residència en una altra població pròxima, per a disposar de més informació que ajude a interpretar els resultats.

**Taula 8.3.1. Concentració (còpies gen /L), càrrega (còpies gen x 10<sup>9</sup>/4h) i càrrega normalitzada (còpies gen x 10<sup>9</sup>/dia/1000 habitants) del gen N1 en l'aigua residual d'Almassora.**

Data (mm/dd/aa)	Concentració (CG/L)	Càrrega (CG x 10 <sup>9</sup> /4h)	Càrrega normalitzada* (CG x 10 <sup>9</sup> /dia/1000 habitants)
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

Cel·la buida: no es detecta; \* Dades habitants, preses del cens

**Taula 8.3.2. Concentració (còpies gen /L), càrrega (còpies gen x 10<sup>9</sup>/4h) i càrrega normalitzada (còpies gen x 10<sup>9</sup>/dia/1000 habitants) del gen N1 en l'aigua residual de Benicàssim .**

Data (mm/dd/aa)	Concentració (CG/L)	Càrrega (CG x 10 <sup>9</sup> /4h)	Càrrega normalitzada* (CG x 10 <sup>9</sup> /dia/1000 habitants)
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			

Cel·la buida: no es detecta; \* Dades habitants, preses del cens

**Taula 8.3.3. Concentració (còpies gen /L), càrrega (còpies gen x 10<sup>9</sup>/4h) i càrrega normalitzada (còpies gen x 10<sup>9</sup>/dia/1000 habitants) del gen N1 en l'aigua residual de Borriana**

Data (mm/dd/aa)	Concentració (CG/L)	Càrrega (CG x 10 <sup>9</sup> /4h)	Càrrega normalitzada* (CG x 10 <sup>9</sup> /dia/1000 habitants)
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			

Cel·la buida: no es detecta; \* Dades habitants, preses del cens

**Taula 8.3.4. Concentració (còpies gen /L), càrrega (còpies gen x 10<sup>9</sup>/4h) i càrrega normalitzada (còpies gen x 10<sup>9</sup>/dia/1000 habitants) del gen N1 en l'aigua residual de Castelló .**

Data (mm/dd/aa)	Concentració (CG/L)	Càrrega (CG x 10 <sup>9</sup> /4h)	Càrrega normalitzada (CG x 10 <sup>9</sup> /dia/1000 habitants)
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			

Cel·la buida: no es detecta; \* Dades habitants, preses del cens

**Taula 8.3.5. Concentració (còpies gen /L), càrrega (còpies gen x 10<sup>9</sup>/4h) i càrrega normalitzada (còpies gen x 10<sup>9</sup>/dia/1000 habitants) del gen N1 en l'aigua residual de Vila-real (vora riu).**

Data (mm/dd/aa)	Concentració (CG/L)	Càrrega (CG x 10 <sup>9</sup> /4h)	Càrrega normalitzada (CG x 10 <sup>9</sup> /dia/1000 habitants)
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

Cel·la buida: no es detecta; \* Dades habitants, basades en IE-DBO (epsar.gva.es)



**Taula 8.3.6. Concentració (còpies gen /L), càrrega (còpies gen x 10<sup>9</sup>/4h) i càrrega normalitzada (còpies gen x 10<sup>9</sup>/dia/1000 habitants) del gen N1 en l'aigua residual de la Vall d'Alba.**

Data (mm/dd/aa)	Concentració (CG/L)	Càrrega (CG · 10 <sup>9</sup> /4h)	Càrrega normalitzada (CG · 10 <sup>9</sup> /dia/1000 habitants)
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			

Cel·la buida: no es detecta; \* Dades habitants, preses del cens

**Taula 8.3.7. Taula comparativa de càrregues per al gen N1 (còpies gen x 10<sup>9</sup>/4h) en mostres compostes de 4 hores en els diferents municipis estudiats**

<b>Data (mm/dd/aa)</b>	<b>Almassora</b>	<b>Benicàssim</b>	<b>Borriana</b>	<b>Castelló</b>	<b>Vila-real</b>	<b>Vall d'Alba</b>
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 hi ha mostra; dada no disponible

Cel·la buida: No es detecta

**Taula 8.3.8. Taula comparativa de càrregues normalitzades per al gen N1 (còpies gen N1 x 10<sup>9</sup>/dia/1000 habitants) en els municipis estudiats**

<b>Data (mm/dd/aa)</b>	<b>Almassora</b>	<b>Benicàssim</b>	<b>Borriana</b>	<b>Castelló</b>	<b>Vila-real</b>	<b>Vall d'Alba</b>
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 hi ha mostra; dada no disponible

Cel·la buida: No es detecta

#### 8.4. MOSTREJOS DE 4 HORES I DE 24 HORES

La recollida de mostres puntuals és la pràctica més comuna descrita en la literatura científica per a la investigació de SARS-CoV-2 en aigües residuals (*Alygizakis et al. 2020*). No obstant això, d'aquesta manera no es pot tindre en compte el cabal d'aigües residuals efluents utilitzat comunament per a compensar les variacions contínues de cabal i que permet calcular la càrrega diària, o almenys, durant les hores de mostreig. Aquesta limitació pot evitar-se mitjançant la recollida de mostres compostes de diverses hores per a assegurar-ne la representivitat i reduir així les incerteses associats al càlcul retrospectiu. SCORE recomana la presa de mostres compostes de 24 hores per a la majoria d'aplicacions; per exemple, estimació del consum de drogues d'abús, fàrmacs, alcohol, tabac, etc. (<https://score-cost.eu/>), tenint en compte que els perfils d'excreció poden variar significativament al llarg del dia o dies a causa dels curts temps de vida mitjana dels biomarcadors.

En una etapa inicial del present treball es tenia poc coneixement de l'estabilitat i el període de vida mitjana de SARS-CoV-2, per la qual cosa la idea principal va ser focalitzar el mostreig al llarg del matí. La raó d'aquesta estratègia resideix que la població és més propensa a defecar al matí, per la qual cosa les mostres més concentrades podrien obtindre's durant aquestes hores del dia. A més, això va permetre al laboratori dur a terme les anàlisis en el mateix dia de la col·lecció de la mostra, tan sols unes hores després del mostreig, minimitzant la possible degradació de les restes víriques. No obstant això, la freqüència dels moviments intestinals s'ha demostrat que pot variar substancialment tant interindividus (des d'una vegada en 4 dies fins a 3 vegades al dia) com intraindividus (a causa d'episodis de restrenyiment, cicle menstrual i/o l'ús d'anticonceptius orals). Així doncs, podien perdre's polsos de concentració rellevants i no ser recol·lectats si la mostra se centra només en un període específic del dia (*Medema et al. 2020*).

Per tot l'indicat, en aquesta investigació es va decidir recollir tant mostres compostes de 4 hores (de 8 a 12 a. m. del dia X) com de 24 hores (de 8 a. M. del dia X a 8 a. M. del dia X+1) en les poblacions seleccionades. L'estudi comparat s'ha realitzat en les EDAR de Castelló i Borriana, prenent les dues mostres cadascun dels dies de mostreig realitzats al llarg de l'estudi. Totes dues mostres han sigut analitzades i els seus resultats comparats. L'estudi quantitatiu comparat només s'ha pogut realitzar a partir de resultats positius, per la qual cosa totes aquelles mostres que van resultar negatives al virus no han pogut ser utilitzades en aquesta comparació. Malgrat això, s'ha disposat d'un bon nombre de dades per a dur a terme la comparació.

Les **Taules 8.4.1 (Castelló)** i **Taula 8.4.2 (Borriana)** mostren les càrregues diàries (còpies gen/dia) per als tres gens (N1, N2, E) calculades a partir de la dada obtinguda en les mostres de 4 hores (multiplicant per 6 la càrrega calculada per a aquesta mostra) així com en les mostres de 24 hores preses el mateix dia.

**Taula 8.4.1 A: Càrrega diària 4h vs. 24h calculada per als gens N1, N2 i E (còpies gen x 10<sup>9</sup>/dia)  
Castelló maig – juliol 2020.**

Data (mes/dia/any)	Càrrega N1/dia (mostra 4h)*	Càrrega N1/dia (mostra 24h)	Càrrega N2/dia (mostra 4h)*	Càrrega N2/dia (mostra 24h)	Càrrega E/dia (mostra 4h)*	Càrrega E/dia (mostra 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 indicat resulta de multiplicar x 6 la càrrega calculada per a la mostra de 4 hores (=24h)

X = no analitzat

**Taula 8.4.1.B. Càrrega diària 4h vs. 24h calculada per als gens N1, N2 i E (Còpies gen x 10<sup>9</sup>/dia)  
Castelló agost – octubre 2020.**

<b>Data (mes/dia/any)</b>	<b>Càrrega N1/dia (mostra 4h)*</b>	<b>Càrrega N1/dia (mostra 24h)</b>	<b>Càrrega N2/dia (mostra 4h)*</b>	<b>Càrrega N2/dia (mostra 24h)</b>	<b>Càrrega E/dia (mostra 4h)*</b>	<b>Càrrega E/dia (mostra 24h)</b>
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 indicat resulta de multiplicar x 6 la càrrega calculada per a la mostra de 4 hores (=24h)

**Taula 8.4.2.A. Càrrega diària 4h vs. 24h calculada per als gens N1, N2 i E (Còpies gen x 10<sup>9</sup>/dia)  
Borriana maig – juliol 2020.**

Data (mes/dia/any)	Càrrega N1/dia (mostra 4h)*	Càrrega N1/dia (mostra 24h)	Càrrega N2/dia (mostra 4h)*	Càrrega N2/dia (mostra 24h)	Càrrega E/dia (mostra 4h)*	Càrrega E/dia (mostra 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 indicat resulta de multiplicar x 6 la càrrega calculada per a la mostra de 4 hores (=24h)  
X = no analitzat

**Taula 8.4.2.B. Càrrega diària 4h vs. 24h calculada per als gens N1, N2 i E (Còpies Gen x 10<sup>9</sup>/dia)  
 Borriana agost – octubre 2020.**

Data (mes/dia/any)	Càrrega N1/dia (mostra 4h)*	Càrrega N1/dia (mostra 24h)	Càrrega N2/dia (mostra 4h)*	Càrrega N2/dia (mostra 24h)	Càrrega E/dia (mostra 4h)*	Càrrega E/dia (mostra 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 indicat resulta de multiplicar x 6 la càrrega calculada per a la mostra de 4 hores (=24h)



La **Figura 8.4.1** mostra la càrrega de còpies de gens de N1, N2 i E en mostres de 4 hores (blava) i de 24 hores (taronja) a Castelló (esquerra) i Borriana (dreta). S'observa una alta variabilitat i no sembla haver-hi diferències significatives en comparar 4 hores vs. 24 hores. Els perfils resultants semblen semblants, de manera que, amb tots dos tipus de mostres, les càrregues obtingudes mostren les mateixes tendències quant a la càrrega vírica, la qual cosa es podria interpretar com que ambdues donen el mateix tipus d'informació. I això ocorre per als tres gens, N1, N2 i E.

No obstant això, els resultats no han sigut concloents quant a la millor forma de mostreig. Les mostres de 4 hores són més ràpides de prendre, requereixen menys temps d'atenció als mostrejadors i poden analitzar-se el mateix dia del mostreig, al mateix temps que es minimitzen les possibles degradacions del material víric analitzat. Sens dubte, un mostreig de 4 hores és logísticament més senzill que un de 24 hores. No obstant això, la seua representativitat és menor que la de les mostres de 24 hores. Aquestes últimes són les habitualment preses en estudis WBE, però podrien córrer el risc d'una major degradació en estar més temps les diferents alíquotes preses amb un control menys rigorós de la temperatura, i fins i tot sense cap control, la qual cosa pot ser especialment important en els mesos d'estiu.

Són necessaris més estudis amb la finalitat d'obtindre més informació sobre el perfil d'excreció del SARS-CoV-2 i sobre la infraestructura de les xarxes de clavegueram ja que, per exemple, la distància entre el punt d'abocat/ deposició i el punt de mostreig pot tindre un paper important en els resultats.

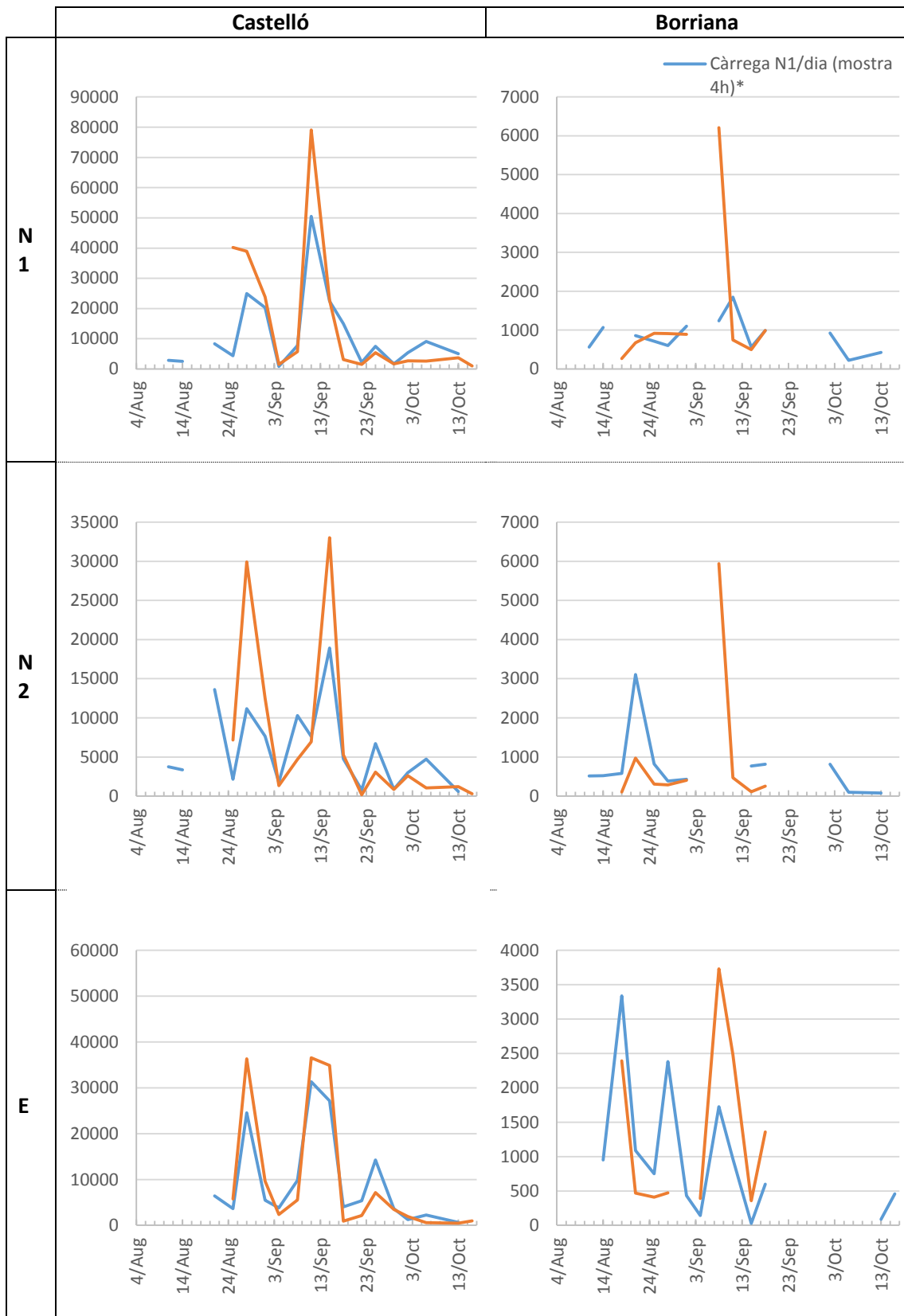


Figura 8.4.1. Comparació de càrregues diàries (còpies gen x 10<sup>9</sup>/dia) estimades a partir de mostres compostes de 4 hores i de 24 hores

## 8.5. ESTUDI ESPECÍFIC D'UN BROT DETECTAT A CASTELLÓ

La coincidència d'un brot de COVID-19 a finals de juny a Castelló de la Plana, juntament amb la possibilitat de realització de mostrejos complementaris en diferents punts de la xarxa de clavegueram, van portar a la posada en marxa d'un seguiment específic dels nivells de SARS-CoV-2 en les aigües residuals de la població afectada per aquest brot. Es va aprofitar l'oportunitat per a estudiar els nivells del virus en les aigües residuals de zones amb presència coneguda de casos i per a comparar les possibles diferències entre la detecció i quantificació de SARS-CoV-2 en la proximitat dels seus habitatges i els resultats a l'entrada de l'EDAR.

- **MATERIAL I MÈTODES**

### *Àrea d'estudi*

L'estudi es va dur a terme a Castelló de la Plana (171.728 hab, INE 2019). L'EDAR del municipi, situada a l'est del nucli urbà, té un cabal mitjà de 36 403 m<sup>3</sup>/dia i serveix a un total de 159.258 habitants equivalents (EPSAR, 2019). Durant el període d'estudi, va prestar servei a més al municipi veí de Borriol (5.360 habitants) i segons la demanda, també a Benicàssim (18.192 habitants), municipi turístic pròxim.

El treball es va centrar en els dos barris del municipi afectats pel brot, el barri 1, situat al sud-oest, i el barri 2, situat en la zona nord (**Figura 8.5.1**), separats tots dos per una distància pròxima als 3 Km.

### *Període d'estudi*

L'estudi en aigües residuals es va iniciar el 7 de juliol i es va mantindre fins al 7 d'agost de 2020, coincidint amb un període pròxim a la fi de les restriccions derivades de la primera ona de COVID-19 i, fora del brot, amb una baixa incidència de casos en la zona.

### *Obtenció de les dades epidemiològiques*

Es va treballar amb les dades incloses en les enquestes epidemiològiques realitzades des del Centre de Salut Pública de Castelló, derivades de la cerca activa de casos. Aquestes enquestes disposen d'informació personal de cada pacient (edat, sexe), aspectes clínics (data d'inici de símptomes, data de diagnòstic, asimptomàtic, ingrés en hospital) i informació sobre els desplaçaments realitzats i contacte amb casos, entre altres. Els criteris de definició de cas van ser els recomanats pel Ministeri de Sanitat en data 7 de juliol de 2020.



**Figura 8.5.1. Ubicació dels barris d'estudi i de l'EDAR de Castelló de la Plana**

### *Presa de mostres*

Es van prendre un total de 33 mostres compostes, a raó de dues setmanals (dimarts i divendres). En cadascun dels punts de mostreig situats en els barris d'estudi es van prendre deu mostres compostes de 4 hores, en horari de 8.00-12.00 a. m. En l'efluent de l'EDAR es van prendre els mateixos dies un total de 13 mostres, de les quals 8 d'elles van ser mostres compostes de 4 hores (8.00-12.00 a. m.) i 5 mostres compostes de 24 hores (8.00-8.00 a. m.). El volum de cada mostra va ser de 2 litres i va estar formada per 6 submostres puntuals, espaiades aproximadament 45 minuts entre elles.

Els punts de mostreig en cada barri es van seleccionar prioritant la proximitat als domicilis de les persones afectades. Les seues característiques s'inclouen en la **Taula 8.5.1.**

**Taula 8.5.1. Característiques dels punts de mostreig**

<b>BARRI</b>	<b>BARRI 1</b>	<b>BARRI 2</b>
Distància del focus actiu* al punt de presa de mostres	20 m	118 m
Distància del focus actiu a l'EDAR	4 124 m	9 224 m
Nombre de bombaments intermedis	1	2
Temps de trànsit des de focus actiu a EDAR	115 min	256 min
Velocitat mitjana	0,6 m/s	0,6m/s

\* Es van considerar com a focus actius els habitatges amb major concentració de casos: uns blocs de cases en el barri 1, amb 9 casos, i un domicili en el barri 2, amb 14 casos.

#### *Processament, extracció i anàlisi de les mostres*

Les aigües es van sotmetre a un procés de concentració mitjançant un protocol basat en l'adsorció i precipitació per alumini. Per a determinar l'eficàcia de tot el procés i donar validesa als resultats, les mostres van ser encebades amb el cep de mengovirus (MgV) vMCO (CECT100000), segons ISO 10705-3.2003, ISO15216-1.2017.

L'extracció d'RNA i l'anàlisi per RT-qPCR es van realitzar seguint procediments validats i/o recomanats. Es van utilitzar engreixadors i sondes específics N1, N2 i E, que codifiquen per a diferents regions específiques de la nucleocàpsida del SARS-CoV-2, així com el plasmidi control (2019-nCoVNP). Es pot trobar més informació sobre processament i anàlisi de les mostres en la secció 5.

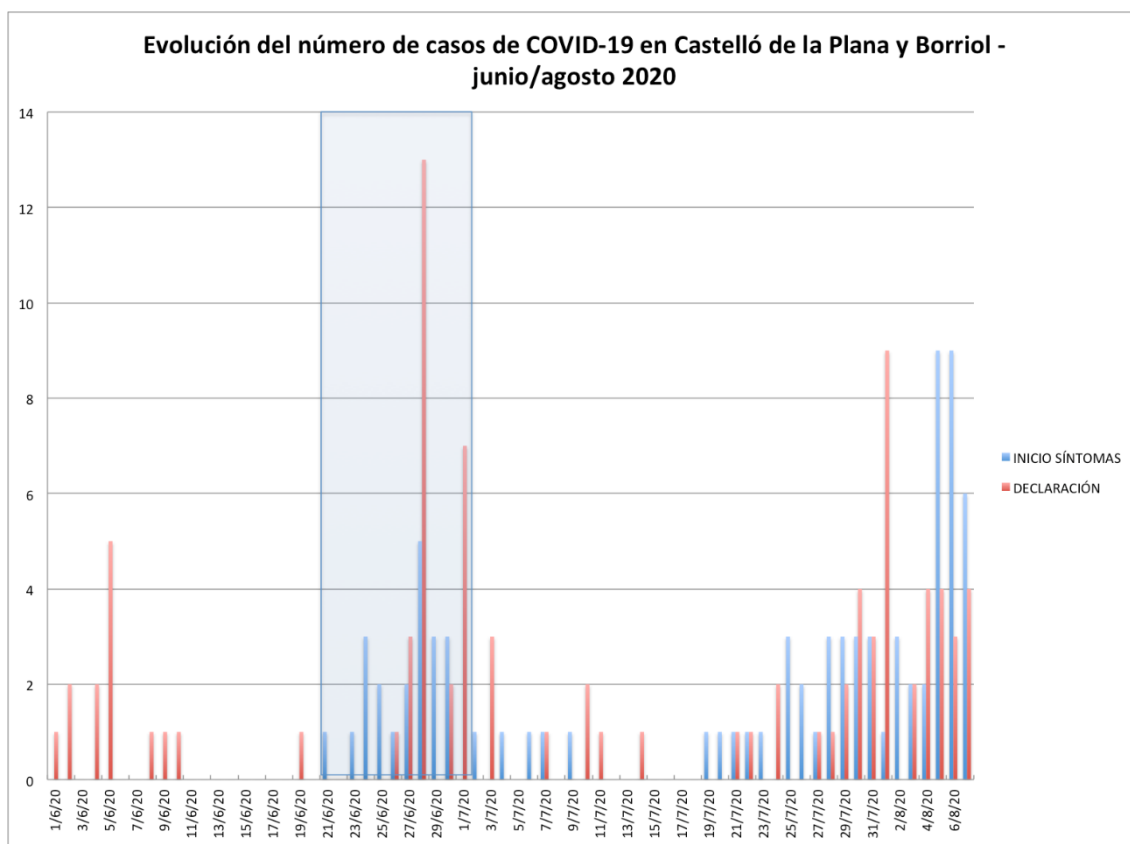
- **RESULTATS**

#### *Aspectes epidemiològics*

El brot es va notificar el 27 de juny i es va tancar aproximadament un mes després. Es van diagnosticar un total de 37 casos, amb similar proporció d'homes/dones i amb un rang d'edat comprès entre els 2 i els 65 anys. Cap de les persones afectades va requerir hospitalització.

L'origen del brot es va vincular als casos previs declarats a Lleida (municipi a 240 Km) i es va disseminar principalment pels dos barris inclosos en l'estudi, amb 14 casos en el barri 1 i 16 en el barri 2. A totes les persones afectades se'ls va indicar la necessitat d'aïllament en els seus domicilis (14 dies). Cal assenyalar la particularitat que 9 dels casos del barri 1 residien en els

mateixos blocs de pisos i que en el barri 2, fins a 14 persones van estar confinades en la mateixa casa, la qual cosa va ser determinant per a l'elecció de les escomeses de mostreig (**Taula 8.5.1**).



**Figura 8.5.2. Evolució del nombre de casos declarats de residents en el municipi de Castelló de la Plana i Borriol, 1 de juny- 7 d'agost 2020. En roig, segons data de declaració i en blau, segons data d'inici de símptomes (quan estava disponible). Ombreig en blau, el període d'inici de símptomes dels casos del brot.**

En la **Figura 8.5.2** pot observar-se l'evolució del nombre de casos des de l'inici del mes de juny fins a la fi dels mostrejos en aigües residuals per als municipis connectats de manera contínua a l'EDAR de Castelló. Es mostren els casos declarats confirmats, tant segons data de declaració com data d'inici de símptomes. En el gràfic pot observar-se la concentració dels casos corresponents al brot al final del mes de juny.

Es va determinar i va quantificar la presència de SARS-CoV-2 en la proximitat dels casos en tots dos barris. En el barri 2, únicament va amplificar el gen N1, mentre que en el barri 1 ho van fer N1 i N2. El gen E no va ser detectat en cap de les mostres preses en la proximitat dels casos. Els nivells obtinguts en aigües residuals per als gens N1 i N2 es mostren en les **Taules 8.5.2 i 8.5.3** respectivament, tant per a les mostres preses en cada barri com per a les corresponents a l'efluent de l'EDAR municipal.

Els valors obtinguts van ser més elevats en el barri 1, on el 14 de juliol, es va arribar a les 645.654 còpies genòmiques/l per al gen N1. Al seu torn, en el barri 2 la concentració màxima assolida va ser de 67.608 còpies genòmiques/l, registrada el primer dia de mostreig.

**Taula 8.5.2. Nivells de SARS-CoV-2 (còpies genòmiques/l) detectats en les mostres d'aigües residuals en els diferents punts de mostreig. Gen N1.**

<b>DATA MOSTREIG</b>	<b>BARRI 1</b>	<b>BARRI 2</b>	<b>EFLUENT EDAR 4 H</b>	<b>EFLUENT EDAR 24 H</b>
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 detectat

**Taula 8.5.3. Nivells de SARS-CoV-2 (còpies genòmiques/l) detectats en les mostres d'aigües residuals en els diferents punts de mostreig. Gen N2.**

DATA MOSTREIG	BARRI 1	BARRI 2	EFLUENT 4 H	EFLUENT 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 detectat; -: Sense mostra.

De manera general, amb el pas del temps es va observar en les mostres preses en la proximitat de les persones afectades una disminució progressiva en els nivells de SARS-CoV-2. Les mostres de 4 hores preses en l'efluent de l'EDAR van ser totes negatives, a excepció de la del 10 de juliol, on es va trobar una concentració pròxima a les 22.000 còpies genòmiques/l (gen N1). Al seu torn, en les mostres de 24 hores va haver-hi un major nombre de determinacions positives, localitzades sobretot al final del període d'estudi.

- **DISCUSSIÓ**

En el present estudi es va detectar i va quantificar SARS-CoV-2 en les aigües residuals preses en la proximitat de dos grups d'afectats per un mateix brot, i es va dur a terme un seguiment dels seus nivells fins a la completa negativització de les mostres. La detecció en els punts de mostreig pròxims a les persones afectades no es va correspondre amb la detecció en les mostres preses de manera simultània (mostres de 4 hores) en l'efluent de l'EDAR.

Malgrat ser lleugerament inferior el nombre de casos residents en la proximitat del punt de mostreig del barri 1, les majors concentracions obtingudes i el fet de la detecció de 2 gens (N1 i N2) enfront d'una única diana detectada en el barri 2 (N1), podria explicar-se en part per la ubicació del punt de mostreig. En el primer dels barris va poder mostrejar-se a tan sols 20 metres dels blocs de residència de gran part dels afectats (9 casos), mentre que en el barri 2, malgrat la important concentració de casos en un únic habitatge (14 casos), l'estructura de la xarxa de clavegueram va fer que fora necessari mostrejar a una distància major d'aquesta. Aquest fet



dona suport a la importància de l'elecció del punt de mostreig, que resulta clau per a reduir els biaixos en la informació obtinguda derivats de la possible degradació del material genètic i la dilució de la mostra. El nombre d'asimptomàtics va ser similar en totes dues ubicacions, situant-se pròxim al 25 % dels casos i no va haver-hi constància d'un important nombre d'afectats que patiren diarrea. No obstant això, cal tindre en compte les incerteses relacionades amb el percentatge de pacients que excreten el virus per femta, en quina quantitat ho fan o la influència de factors com l'edat i horaris d'excreció dels afectats, la qual cosa també va poder repercutir en els resultats obtinguts.

Un altre factor que cal considerar per a la interpretació dels resultats és el fet que la presa de mostres es va prolongar més enllà del període de quarantena establert en els casos, amb la qual cosa les condicions inicials tan favorables i controlades per a l'estudi, no es van mantindre al llarg d'aquest. Les mostres preses des del 14 de juliol en el barri 2, van ser representatives de 7 pacients, perquè els altres 7 que van estar aïllats allí van partir al seu domicili habitual en un altre municipi. La resta de casos, residents en els domicilis on van romandre en quarantena, també van veure augmentada la seua mobilitat després del segon i tercer dia de mostreig. No obstant això, això no va impedir deteccions positives posteriors en els punts de mostreig.

En aquest estudi s'ha pogut obtenir informació sobre la relació entre la concentració de SARS-CoV-2 en aigües residuals i el nombre de persones afectades, en la proximitat dels seus habitatges, i en diferents moments després de l'inici de símptomes. A pesar que els mostrejos no es van iniciar de manera immediata després de la declaració dels casos, en les primeres mostres va poder detectar-se la presència del virus en la proximitat dels afectats i es va observar com de manera general els valors detectats van anar disminuint amb el temps. Les primeres mostres d'aigua residual, de data 7 de juliol, es van prendre en un moment en el qual els casos declarats en la proximitat del punt de mostreig del barri 1 ascendien a 8, havent iniciat símptomes tots ells en els últims 14 dies. En el mateix moment, en el barri 2, ja havien sigut declarats els 14 casos corresponents al mateix habitatge, 12 dels quals havien iniciat símptomes en les últimes dues setmanes (**Taules complementàries 8.5.4 i 8.5.5**). La negativització de les mostres en els barris es va observar el 21 de juliol, quan ja no va haver-hi casos que iniciaren símptomes en la proximitat dels punts de mostreig durant els 21 dies anteriors a la presa de mostres. Aquests resultats serien concordants amb els derivats dels estudis clínics d'excreció de SARS-CoV-2, que reporten períodes d'excreció que poden aconseguir les tres o quatre setmanes després de l'inici de símptomes.

Crida l'atenció la no detecció del virus el dia 10 de juliol, quan si es va detectar en dates anteriors i posteriors, en nivells especialment importants en el barri 1. Una possible explicació se centraria en les exhaustives mesures de neteja i desinfecció que, com a conseqüència del brot, es van dur a terme per part de l'administració pública durant aqueixa setmana en la zona, juntament amb, probablement, l'increment de la neteja domèstica, que va poder tindre la seua influència en la mostra corresponent. No obstant això, podríem igualment tindre en consideració totes les incerteses enumerades amb anterioritat que podrien afectar la detecció del virus en aigües residuals.

El moment en el qual es va realitzar l'estudi, molt pròxim a l'alçament de les restriccions derivades de la primera ona (21/06/20), va propiciar la comparació dels resultats obtinguts en els barris amb els de l'efluent de l'EDAR, perquè durant els catorze dies anteriors al començament de l'estudi en aigües residuals, es van comptabilitzar 27 casos declarats en la zona, quasi la totalitat vinculats al brot (Dades a 06/07/20: Font: gav san) (**Figura 8.5.3**). No obstant això, malgrat haver-se demostrat l'eliminació de SARS-CoV-2 per femta en els afectats pel brot, no es va determinar majoritàriament la seua presència en les mostres preses en paral·lel en l'EDAR. Durant el període d'estudi, cal assenyalar que no es van registrar pluges importants que pogueren afectar els resultats obtinguts, però, cal referir novament que són diferents les incerteses relacionades amb l'excreció i la degradació del virus. La informació derivada de l'estudi fa plantejar-se qüestions sobre el nombre mínim de casos necessaris per a la detecció en l'EDAR d'estudi, o sobre el fet que les dades en efluent preses a l'entrada de l'EDAR puguen estar relacionats majorment amb certes àrees del municipi, més pròximes a aquesta.



**Figura 8.5.3. Comparació dels resultats obtinguts en aigües residuals (còpies gen/L) en els diferents punts de mostreig els dies amb determinacions positives en els barris d'estudi, amb indicació dels casos declarats (n) associats a cada punt i els casos declarats en els últims 14 dies (n 14 dies) en els municipis de Castelló de la Plana i Borriol. Es marca amb \* quan els casos ja no van estar confinats.**

Els resultats positius al final del període d'estudi en efluent de l'EDAR, sí que es van correspondre amb un increment en el nombre de casos declarats en la zona, perquè a principis d'agost es van registrar els valors més alts de casos declarats en els últims catorze dies en la zona. No obstant això, el 17 de juliol es va quantificar SARS-CoV-2 en el punt de mostreig del barri 2 i en l'efluent de l'EDAR, en la mostra de 24 hores, amb un nombre bastant inferior de casos declarats en el municipi. A les incerteses ja esmentades caldria afegir en aquest cas la influència de l'efecte del turisme en el municipi veí de Benicàssim, perquè part de les seues aigües residuals es van tractar en l'EDAR de Castelló de la Plana.

La principal orientació que se li ha donat a la determinació de SARS-CoV-2 en aigües residuals és la relacionada amb el seu potencial caràcter anticipant a l'increment en el nombre de casos a nivell poblacional, així com per a la realització de proves en entorns de risc particularment elevat en els quals es puga obtenir una ràpida resposta, com a residències de la tercera edat o presons. En aquest treball, no obstant això, s'aprecia la seua utilitat com a eina complementària

per a la gestió de certs brots, els casos dels quals puguen circumscriure's a un territori delimitat, en la mesura que siga possible, en un perímetre les aigües residuals del qual puguen ser recollides, o canalitzades, per col·lectors específics. En el cas d'estudi, els resultats de la vigilància ambiental van ser una eina útil de la qual van disposar els epidemiòlegs al llarg del brot, que va permetre, ateses les seues característiques, donar-lo per conclòs amb majors garanties.

**Taula complementària 8.5.4. Evolució dels casos associats al punt de mostreig del barri 1 segons data d'inici de símptomes**

MOSTRA	CASOS DECLARATS (N)	CASOS INICI SÍMPTOMES (N) <sup>1</sup>	IS07 <sup>2</sup>	IS014 <sup>3</sup>	IS021 <sup>4</sup>	IS028 <sup>5</sup>
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

<sup>1</sup>Als casos asimptomàtics se'ls ha assignat la data de diagnòstic (30/06 i 20/07)

<sup>2</sup>IS07: sumatori dels casos que van iniciar símptomes el dia del mostreig i els 7 anteriors

<sup>3</sup>IS014: sumatori dels casos que van iniciar símptomes el dia del mostreig i els 14 anteriors

<sup>4</sup>IS021: sumatori dels casos que van iniciar símptomes el dia del mostreig i els 21 anteriors

<sup>5</sup>IS028: sumatori dels casos que van iniciar símptomes el dia del mostreig i els 28 anteriors

**Taula complementària 8.5.5. Evolució dels casos associats al punt de mostreig del barri 2 segons data d'inici de símptomes**

MOSTRA	CASOS DECLARATS (N)	CASOS INICI SÍNTOMAS (N) <sup>1</sup>	IS07 <sup>2</sup>	IS014 <sup>3</sup>	IS021 <sup>4</sup>	IS028 <sup>5</sup>
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

<sup>1</sup>Als casos asimptomàtics se'ls ha assignat la data de diagnòstic (27/06 i 28/06 (3))

<sup>2</sup>IS07: sumatori dels casos que van iniciar símptomes el dia del mostreig i els 7 anteriors

<sup>3</sup>IS014: sumatori dels casos que van iniciar símptomes el dia del mostreig i els 14 anteriors

<sup>4</sup>IS021: sumatori dels casos que van iniciar símptomes el dia del mostreig i els 21 anteriors

<sup>5</sup>IS028: sumatori dels casos que van iniciar símptomes el dia del mostreig i els 28 anteriors

\*7 dels casos parteixen al seu municipi de residència

## 8.6. ESTUDI COMPARAT AMB DADES EPIDEMIOLÒGIQUES

### *Estudi descriptiu*

El municipi amb major nombre de casos de COVID-19 al llarg del període d'estudi va ser Castelló de la Plana, on es van superar els 2.200 casos declarats a final del mes d'octubre. No obstant això, Borriana va ser el més afectat amb 1.360 casos per 100.000 habitants. Almassora, Benicàssim i Vila Real van presentar incidències acumulades compreses entre els 995 i 1.188 casos/100.000 habitants, mentre que la Vall d'Alba va ser el municipi menys afectat, amb 13 casos entre els seus 2.800 habitants censats.

En els municipis amb un nombre important de casos, la proporció de dones i homes afectats va ser similar i el percentatge d'asintomàtics declarats va estar comprés entre el 21 % de Borriana i el 30 % de Vila-real. En aquests municipis, les mitjanes d'edat van estar compreses entre els 40 anys de Castelló de la Plana i els 51 de Borriana. En **la Taula 8.6.1** pot consultar-se informació més detallada sobre els casos declarats en cada municipi.

En la **Taula 8.6.2** es mostra informació sobre el nombre i característiques demogràfiques de les persones que van ingressar per COVID-19 procedents de cadascuna de les zones d'estudi. Pot igualment observar-se la major afecció que va patir el municipi de Borriana, on van requerir hospitalització el 33 % dels casos.

En la **Figura 8.6.1** es mostra l'evolució setmanal de la incidència acumulada al llarg del període d'estudi, i es pot observar l'increment en el nombre de casos durant les primeres setmanes (primera onada), la seua estabilització posterior (derivada del confinament) i la nova pujada experimentada aproximadament després de la setmana 32. La informació sobre l'evolució del nombre de casos diaris segons data d'inici de símptomes, es presenta per a cada municipi en la **Figura 8.6.2**.

**Taula 8.6.1. Casos de COVID-19 confirmats en els municipis coberts per cada EDAR. Incidència acumulada, característiques demogràfiques i informació sobre presència de símptomes. Gener-octubre, 2020**

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

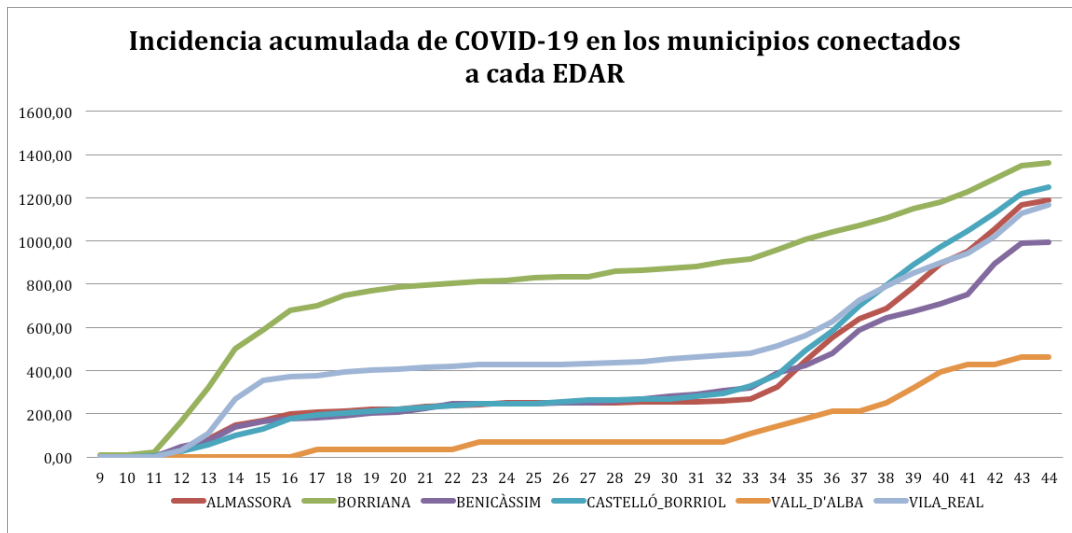
n (%) calculat sobre el total de casos amb informació en aqueixa variable; <sup>1</sup>IA: Incidència acumulada/100 000 habitants a 27/10/2020. Població (INE, 2019). Asimptomàtics sobre el total de casos confirmats.

**Taula 8.6.2. Casos de COVID-19 que han requerit hospitalització en els municipis connectats a cada EDAR. Gener-octubre, 2020**

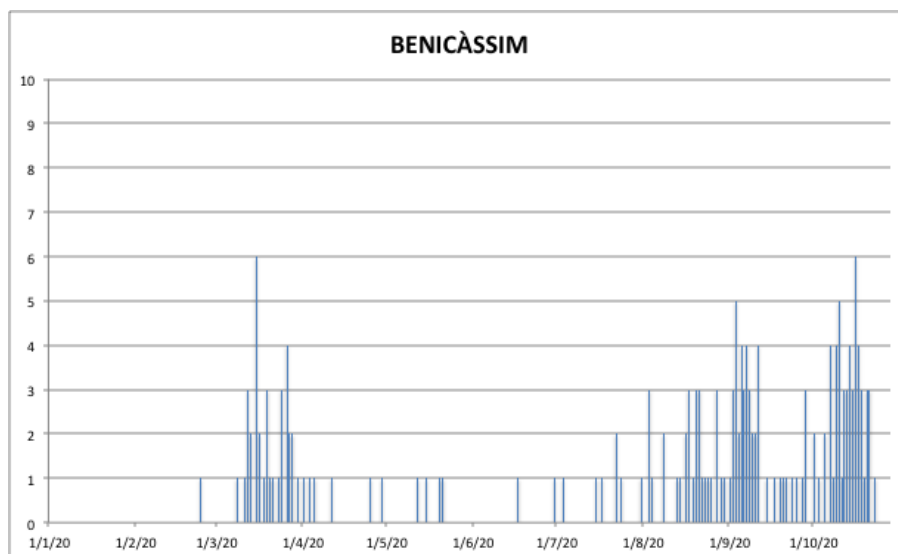
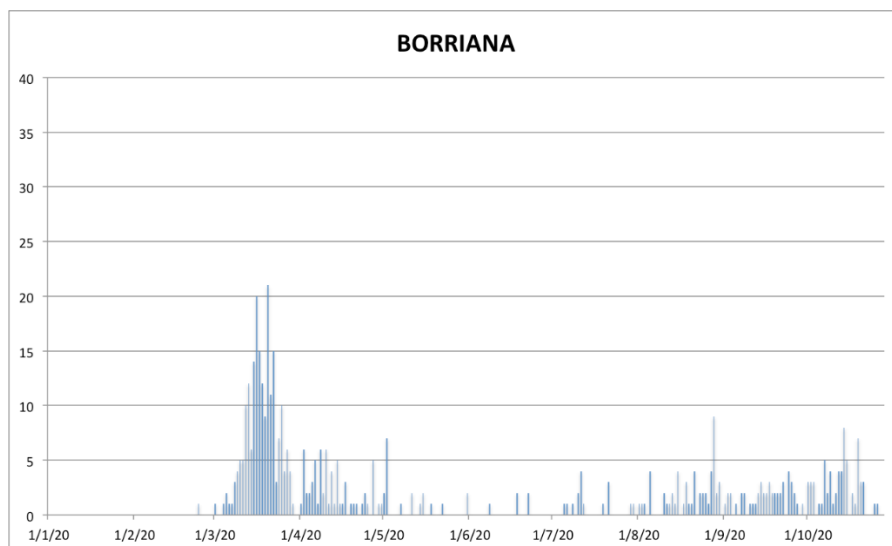
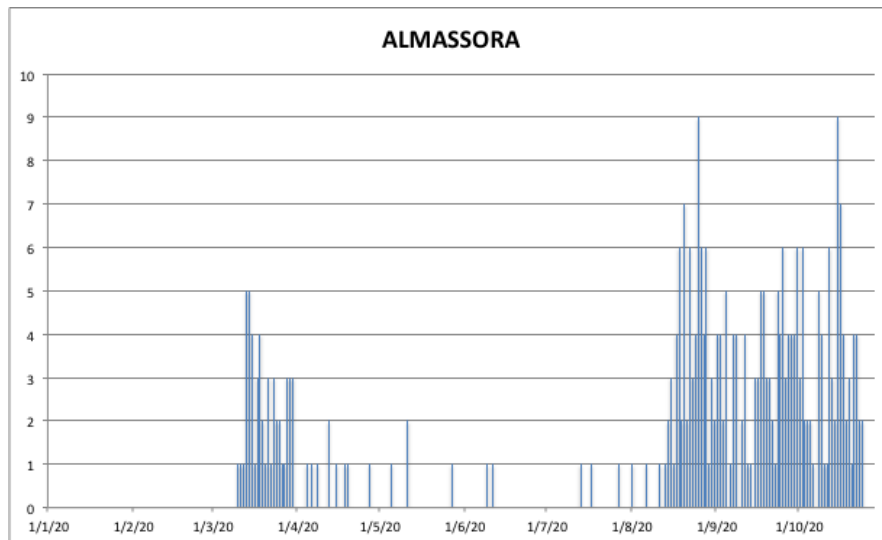
EDAR	Municipis	Ingressos per COVID-19			
		Característica	Total (n) (%)	Dones	Homes
Almassora	Almassora	Sexe (n) (%)	39 (12,5)	13 (33,3)	26 (66,7)
		Edat (mitjana)	62	62,5	62
Benicàssim	Benicàssim	Sexe (n) (%)	21 (11,6)	7 (33,3)	14 (66,7)
		Edat (mitjana)	65	62	70
Borriana	Borriana	Sexe (n) (%)	158 (33,5)	72 (45,6)	86 (54,4)
		Edat (mitjana)	66	63,5	66
Castelló de la Plana	Castelló de la Plana	Sexe (n) (%)	264 (11,9)	119( 45,1)	145 (54,9)
	Borriol	Edat (mitjana)	63	65	63
Vall d'Alba	Vall d'Alba	Sexe (n) (%)	0	-	-
		Edat (mitjana)	-	-	-
Vila Real	Vila Real	Sexe (n) (%)	109 (18,4)	51 (46,8)	58 (53,2)
		Edat (mitjana)	65	64	66

n (%) calculat sobre el total de casos confirmats.

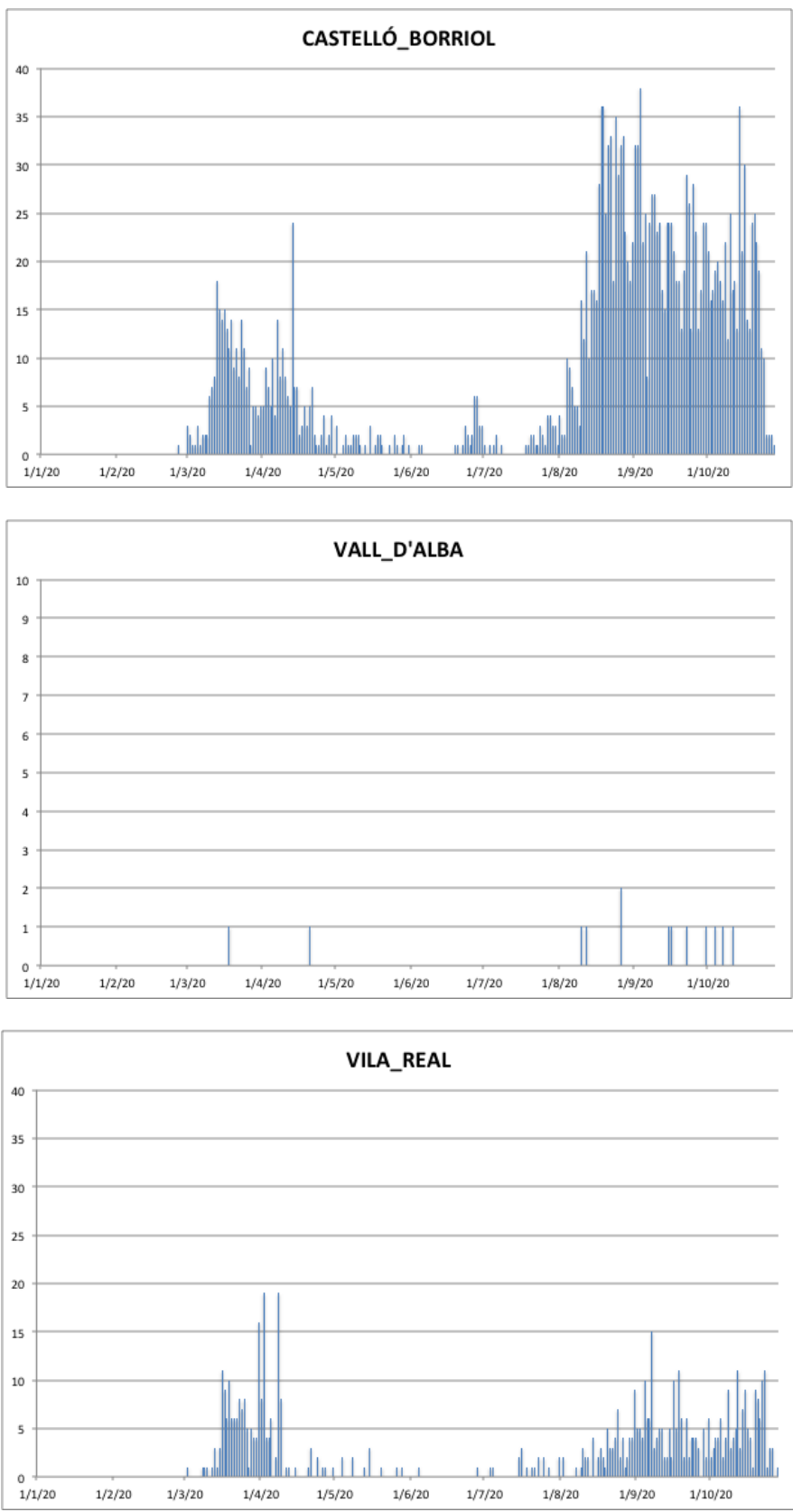




**Figura 8.6.1. Evolució de la incidència acumulada (casos declarats confirmats/100 000 habitants) de COVID-19 en els municipis connectats a cada EDAR. Setmana 9-44, 2020**



**Figura 8.6.2. Casos diaris confirmats de COVID-19 per data d'inici de símptomes en els municipis connectats a cada EDAR. Gener-octubre, 2020.**



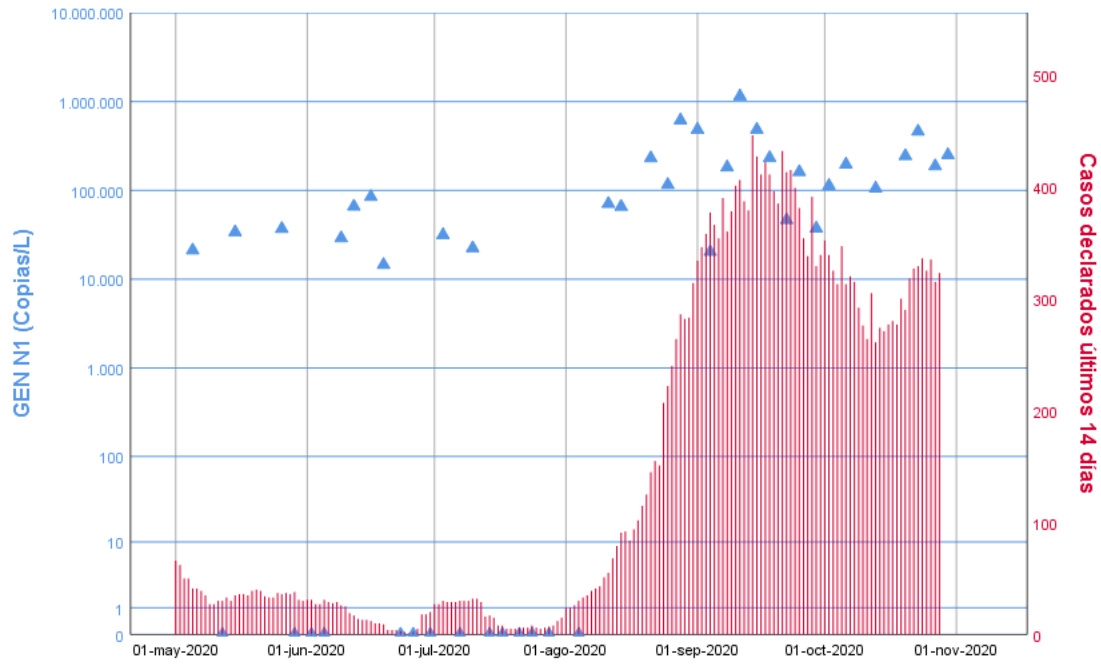
**Figura 8.6.2 cont. Casos diaris confirmats de COVID-19 per data d'inici de símptomes en els municipis connectats a cada EDAR. Gener-octubre, 2020.**

### ***Representació gràfica conjunta dels casos i nivells detectats en aigües residuals de Castelló de la Plana***

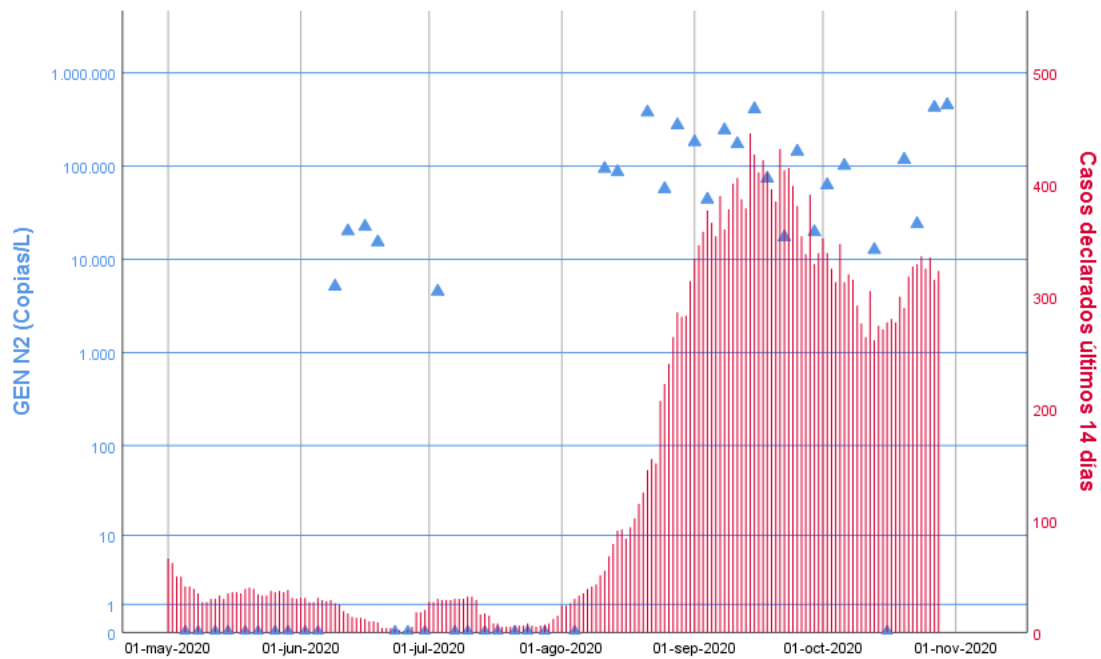
S'ha fet un estudi detallat dels resultats obtinguts a la ciutat de Castelló, per ser el municipi del qual es disposa de major nombre de dades en aigües residuals i de dades epidemiològiques, obtingudes amb antelació suficient com per a poder ser avaluats. D'aquesta manera, Castelló s'ha pres com a model en l'estudi realitzat.

En les **Figures 8.6.3, 8.6.4 i 8.6.5** es representen conjuntament el nombre de casos declarats durant els últims catorze dies i els nivells quantificats de SARS-CoV-2 en l'EDAR de Castelló de la Plana. Es mostra una figura per a cadascun dels gens emprats en l'estudi.

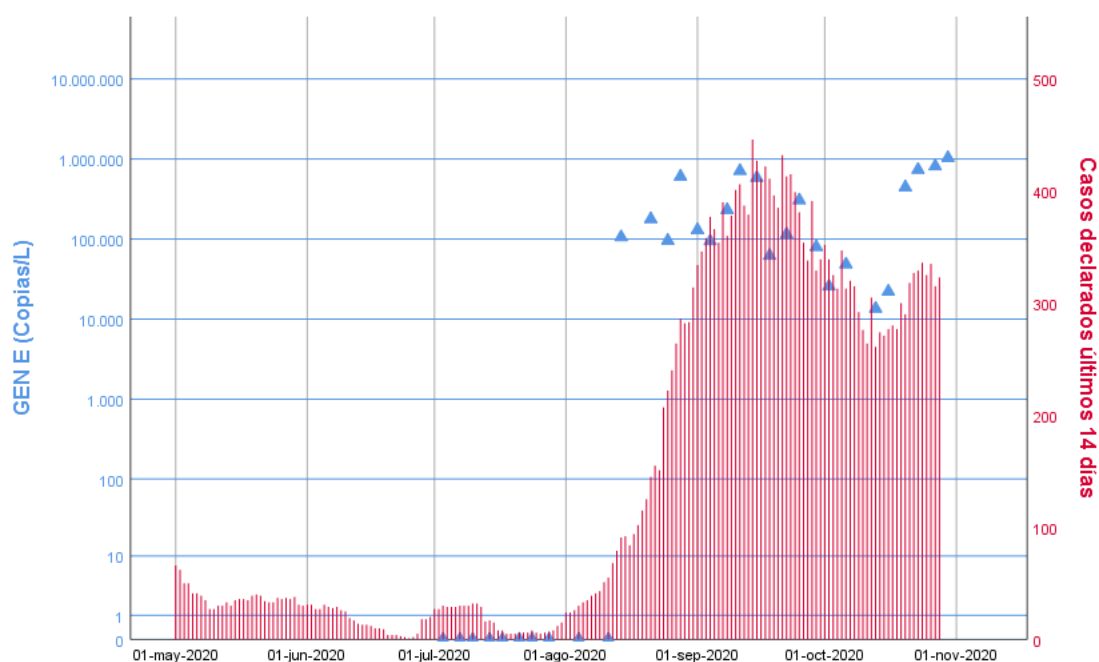
La presa de mostres es va iniciar el dia 5 de maig, corresponent ja a la fase final de baixada de la corba de la primera onada. De manera general i per als tres gens s'observa que, fins a principis d'agost, quan es va iniciar l'increment progressiu de casos de la corba epidèmica de la segona onada, va haver-hi nombroses mostres en les quals no es va detectar el virus (representats com 0), o bé amb nivells baixos de quantificació, la qual cosa és coherent amb la menor incidència de casos registrada durant aquesta època. També en els tres gens mostrats pot comprovar-se l'important increment i el manteniment de la detecció durant la segona onada, amb els nivells més alts oposats pròxims i antecedint al pic.



**Figura 8.6.3. Distribució de material genètic de SARS-CoV-2 (Gen N1) en aigües residuals de l'EDAR de Castelló de la Plana, segons nombre de casos declarats en els últims 14 dies (1 de maig – 30 octubre 2020)**



**Figura 8.6.4. Distribució de material genètic de SARS-CoV-2 (Gen N2) en aigües residuals de l'EDAR de Castelló de la Plana, segons nombre de casos declarats en els últims 14 dies (1 de maig – 30 octubre 2020)**



**Figura 8.6.5. Distribució de material genètic de SARS-CoV-2 (Gen E) en aigües residuals de l'EDAR de Castelló de la Plana, segons nombre de casos declarats en els últims 14 dies (1 de maig – 30 octubre 2020).**

#### *Anàlisi de correlació*

Com pot observar-se en la taula següent, quan es va estudiar la relació entre els nivells de SARS-CoV-2 detectats en les aigües residuals de l'EDAR de Castelló de la Plana i el nombre de casos de COVID-19, es van obtenir bones correlacions, de l'ordre del 0,60-0,70, tant per al nombre de casos segons data de declaració com segons data d'inici de símptomes.

Cal assenyalar que els millors resultats per al gen N1, que s'ha detectat amb major freqüència, es van obtenir quan es va treballar amb la totalitat de casos que van iniciar símptomes i/o van ser declarats el dia del mostreig i els catorze anteriors. Això és coherent amb l'evidència disponible derivada d'estudis clínics realitzats en femta de pacients, dels quals es desprèn que l'excreció de SARS-CoV-2 per via fecal presenta una duració de 4-11 dies (mitjana), i poden arribar a eliminar-se més enllà de 3 o 4 setmanes des de l'inici de símptomes. D'ací la importància de no considerar l'eliminació a través de femta com una cosa puntual i relacionada únicament amb el dia de declaració o d'inici de símptomes.

**Taula 8.6.3. Correlacions de Spearman entre els mesuraments en aigües residuals i el nombre de casos segons data de declaració (emprant retards de 0, 7, 14 i 21 dies), utilitzant totes les dades disponibles (2020-05-05 fins a 2020-10-13). Castelló de la Plana**

	<b>Lag 0</b>	<b>Lag 7</b>	<b>Lag 14</b>	<b>Lag 21</b>
log(còpies/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(còpies/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(còpies/l E)	-	-	-	-

**Taula 8.6.4. Correlacions de Spearman entre els mesuraments en aigües residuals i el nombre de casos segons data d'inici de símptomes (emprant retards de 0, 7, 14 i 21 dies), utilitzant totes les dades disponibles (2020-05-05 fins a 2020-10-13). Castelló de la Plana**

	<b>Lag 0</b>	<b>Lag 7</b>	<b>Lag 14</b>	<b>Lag 21</b>
log(còpies/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(còpies/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(còpies/l E)	-	-	-	-

## 9. REPTES I RECOMANACIONS

A partir del treball realitzat, amb l'experiència adquirida en el desenvolupament del present projecte, es poden ressaltar alguns aspectes d'interés sobre els reptes als quals s'enfronta una investigació d'aquest tipus, i les recomanacions per a futurs treballs que puguin desenvolupar-se sobre aquesta temàtica.

El control de la pandèmia produïda pel coronavirus SARs-2-CoV a través l'anàlisi de les aigües residuals pot arribar a convertir-se en una important eina que ajude a conèixer amb certa antelació l'aparició de nous casos, amb els avantatges derivats de poder aplicar estratègies de control amb anticipació a l'aparició de símptomes en persones infectades, previndre l'extensió de brots, i conèixer l'evolució de la població infectada en una població concreta. Una sectorització en la presa de mostres per barris o zones geogràfiques, en funció de l'existència de col·lectors i de la disponibilitat per al mostreig, podria ser de gran utilitat per a fitar les zones més afectades, i com a ajuda per a donar per finalitzats determinats brots en zones concretes d'una ciutat.

Ara bé, si els avantatges d'aquesta aproximació són evidents, també existeixen **limitacions i reptes** que no han d'ignorar-se. La principal limitació és deguda als factors d'incertesa que afecten els resultats obtinguts, i que són difícils de quantificar (*Castiglioni et al., 2013*). En qualsevol cas, s'ha de tindre en compte que en tots els sistemes de vigilància epidemiològica existeix un biaix de detecció (diagnòstic), tal com s'ha observat en el cas que ens ocupa de la covid-19, la qual cosa es produeix com a conseqüència de la falta de disponibilitat de tests, dels criteris de classificació i col·lapse dels sistemes (amb retard de la notificació, variable segons autonomies i països), per la qual cosa, si bé l'aproximació WBE està subjecta a incerteses, no és menys cert que els sistemes de vigilància epidemiològica també ho estan. D'ací que la complementarietat de totes dues aproximacions siga un dels punts que cal destacar en aquest estudi.

Entre aquests factors es troben:

- 1) Representativitat de les mostres, que està íntimament lligada a la manera de mostreig, perquè es tracta de sistemes dinàmics amb fluxos discontinus d'aigües residuals, amb resultats que depenen de l'excreció del virus, a través de la femta principalment, de les persones infectades. Hi ha una gran variabilitat en les concentracions de material gènic del virus en funció del punt de la xarxa on es prenga la mostra i de com es faça el mostreig. Per a minimitzar aquesta incertesa, l'ideal és prendre mostres compostes de



diverses hores, o fins i tot d'un dia complet, però així i tot hi ha dubtes sobre aquest tema i no sembla haver-hi un consens internacional sobre el mostreig. El que resulta evident és que les mostres puntuals o recollides durant un espai curt de temps (ex. 1 hora) no són prou representatives i estan subjectes a incerteses molt altes (**Ahmed et al., 2020c**). La presa d'alíquotes que componen la mostra composta final hauria de realitzar-se cada poc temps, idealment cada 5 o 10 minuts, per a minimitzar les incerteses, però lògicament no sempre és possible en les EDAR, per la qual cosa finalment sol dependre de les possibilitats de cada planta, i en la pràctica solen realitzar-se cada 20 o 30 minuts, i fins i tot cada hora.

- 2) Relacionat amb el punt anterior es troba l'estabilitat en el temps del material analitzat, la conservació de la mostra i la possible degradació que poguera ocórrer fins al moment de les anàlisis. El processament de les mostres i anàlisi el mateix dia del mostreig és l'ideal, però no sempre és possible, per la qual cosa en aquests casos ha d'establir-se un protocol sobre la manera i condicions de conservació de les mostres.
- 3) El punt on es realitza la presa de mostres és també un aspecte rellevant. Encara que en la major part d'estudis es realitza en l'entrada de l'EDAR, també poden mostrejar-se punts intermedis de la xarxa, aprofitant els col·lectors que puguen haver-hi. La nostra experiència és que pot detectar-se un brot en una zona concreta de la ciutat mitjançant anàlisi de l'aigua residual presa en punts pròxims al focus d'infecció, mentre que anàlisis realitzades en paral·lel en mostres preses a l'entrada de l'EDAR poden no reflectir l'augment en el virus. La proximitat de la mostra al lloc on viuen les persones afectades fa que les possibilitats de degradació del virus al llarg de les conduccions siguin molt menors. La distància des dels focus d'infecció fins a l'entrada de l'EDAR i els (quilò)metres recorreguts per l'aigua residual afectaran els resultats i hauran de tindre's en compte a l'hora d'interpretar-los. Cal assenyalar que en punts intermedis de la xarxa sol ser més complicada la presa de mostres compostes, i que no sempre és possible instal·lar mostrejadors automàtics, per la qual cosa moltes vegades es recorre a la presa de diverses mostres puntuals que finalment es mesclen en una sola mostra composta.
- 4) El mesurament precís del cabal de l'aigua durant el període de mostreig és un altre aspecte que cal destacar. Aquesta dada és necessària per a poder calcular la càrrega diària, expressada en còpies gen/dia. És important que aquesta dada siga fiable i que estiga subjecta el menys possible a incerteses.

- 5) La normalització de dades en aigua residual requereix conèixer el nombre d'habitants que aboca les seues aigües a la xarxa, per a expressar els resultats finals com a còpies/dia/1.000 habitants. Aquesta dada és també causa d'incerteses, sobretot en poblacions en les quals hi ha molt de moviment de treballadors, que durant unes hores estan en una població, però tornen a les seues llars al final de la jornada laboral. Se solen usar les dades proporcionades pel cens, que reflectirien la població estàtica, però hi ha altres possibilitats com són els càlculs estimatius a partir de paràmetres com la DBO o la DQO, o també a partir del consum d'aigua potable. Aquests últims poden ser d'utilitat per a reflectir els moviments de població, és a dir la població dinàmica associada a una ciutat.
- 6) L'estimació del nombre d'infectats és francament complicada i està subjecta a una alta incertesa. No sembla haver-hi acord internacional sobre el valor mitjà del virus excretat en la femta, ni sobre el moment en què comença i finalitza l'excreció. Transformar la dada proporcionada per WBE, expressat en còpies/dia/1.000 habitants, en nombre estimat d'infectats és un dels majors reptes. Segurament, amb la realització de nous estudis i publicació de dades que puguen reportar-se en el futur pròxim, hi haurà major informació sobre aquest tema i es podrà millorar aquesta estimació.
- 7) Des del punt de vista de les anàlisis, hi ha alguns aspectes que han de ressaltar-se. Cal destacar que no hi ha consens sobre la metodologia que s'ha de seguir. En aquests moments, la literatura mostra l'existència d'una àmplia varietat d'opcions per a dur a terme passos claus com són la concentració de la mostra (ex., ultrafiltració, precipitació amb PEG, clorur d'alumini, etc.), l'extracció de l'RNA o sobre els gens diana que cal utilitzar per a la detecció del SARS-CoV-2 en aigües residuals. Cadascun d'aquests punts són claus en la detecció del virus i pot tindre un efecte important en el resultat final. Per això, hi ha la necessitat d'establir un protocol estandarditzat i globalment adoptat, que permeta comparar resultats entre diferents estudis i minimitzar així possibles interpretacions incorrectes.
- 8) La correlació de dades proporcionades per les anàlisis d'aigües residuals amb les dades epidemiològiques disponibles no és senzilla. Hi ha diversos tipus de dades epidemiològiques que poden ser utilitzades segons les fonts i la base sobre la qual s'ha construït la informació, i cadascun d'aquests té els seus avantatges i limitacions. Encara que la informació referent a la data de declaració dels casos és fàcilment accessible a través del web COVID de la Conselleria de Sanitat i d'estadístiques rutinàries del Sistema

de Vigilància Epidemiològica, aquesta data presenta un major retard respecte a l'inici de l'excreció del virus per femta, la qual s'aproxima més a l'inici de símptomes. No obstant això, el nombre de casos segons aquesta última data és més difícil d'obtenir, ja que generalment ha d'extraure's de l'enquesta epidemiològica i requereix les autoritzacions pertinents, a més de no poder definir-se en el cas de pacients asimptomàtics. En les anàlisis realitzades fins al moment no hem trobat diferències importants entre la utilització d'un indicador o un altre.

- 9) Una qüestió pràctica de rellevància és fins a quin punt les anàlisis d'aigües residuals permeten anticipar una resposta i prendre accions preventives abans que comencen a aparèixer les dades clíniques/epidemiològiques sobre casos d'infecció. Segons les dades preliminars obtingudes en aquest estudi, sembla observar-se una detecció en aigües residuals coherent amb les dades epidemiològiques. No obstant això, resultaria adequat estudiar amb major profunditat les dades obtingudes per al desenvolupament i validació d'un model de predicció, tenint en compte l'ajust per variables relacionades amb l'efluent, així com uns altres possibles determinants ambientals i sociodemogràfics de les zones d'estudi.

Sobre la base de l'estudi realitzat, poden fer-se algunes **recomanacions** per a futurs treballs.

#### **Mostreig i informació de l'EDAR**

És fonamental la recollida de mostres compostes per diverses alíquotes, que haurien de prendre's, idealment, amb una freqüència d'entre 20 i 30 minuts. L'experiència adquirida en aquest projecte ens indica que la presa de mostres compostes de 4 hores, entre de 8 a 12 hores, pot ser suficient, i no s'han observat tendències o diferències significatives amb els resultats obtinguts en mostres compostes de 24 hores, recollides de 8 a. m. a 8 a. m. de l'endemà.

D'altra banda, és important disposar de dades de cabal, el més precisos possible, durant el període de mostreig amb la finalitat de poder estimar la càrrega diària en una població, expressada en còpia gen/dia.

La normalització de resultats, expressats en còpia gen/dia/1.000 habitants, permet una millor visualització del problema, en relacionar-los amb el nombre d'habitants connectats a la xarxa de sanejament. Disposar de dades de cens actualitzat és

primordial, per a conèixer la població estàtica, però així i tot es recomana usar altres paràmetres que permeten realitzar estimacions per a tindre una informació més completa de la situació, com poden ser la DBO, DQO i fins i tot el consum d'aigua potable. Aquests últims paràmetres permetrien estimar la població dinàmica i reflectirien els moviments de població durant el període d'estudi.

### **Conservació de la mostra fins a l'anàlisi**

Els resultats obtinguts indiquen que no és crítica la conservació de la mostra fins a 21 dies, i que pot conservar-se en frigorífic a 4 °C, o també en congelador a -18 °C, atés que no s'ha observat una degradació significativa en el material víric analitzat.

### **Anàlisi de les mostres**

Les anàlisis realitzades per a la detecció del material víric en les mostres d'aigües residuals evidencien la importància d'implementar un protocol adequat i estandarditzat per a la concentració de la mostra i l'anàlisi posterior d'aquesta per RT-qPCR. En el nostre cas, s'ha seguit el protocol definit pel Ministeri de Ciència i Innovació, desenvolupat per l'equip de la Dra. Gloria Sánchez (CSIC), la qual cosa ha permès comparar resultats entre diferents EDARs i laboratoris. És important ressaltar la necessitat d'utilitzar almenys tres gens dianes per a confirmar la presència del virus en aigua. En aquest treball, els gens diana N1, N2 i E han mostrat gran sensibilitat, tenint en compte el protocol de concentració de mostra utilitzat i el kit d'extracció d'RNA emprat, per la qual cosa pot recomanar-se'n l'ús.

### **Dades epidemiològiques**

Per a validar els resultats obtinguts mitjançant l'anàlisi de les aigües residuals d'una població amb finalitats epidemiològics es requereix un estudi comparat detallat amb les dades epidemiològiques corresponents a aquesta població, tal com s'ha realitzat en aquest treball. La data de declaració dels casos és generalment més fàcilment accessible, encara que presenta un major retard respecte a l'inici de l'excreció del virus per femta, la qual s'aproxima més a l'inici de símptomes. Es recomana, no obstant això, aprofundir en l'establiment dels indicadors epidemiològics que guarden una millor correlació amb els nivells de SARS-CoV-2 en aigües residuals, així com en l'avaluació de les diferents finestres temporals que permeten considerar l'excreció mantinguda a través de la femta.

Una vegada realitzada aquesta validació, si se segueixen escrupolosament les recomanacions i protocols de treball de l'aproximació WBE, amb les dades obtingudes en les aigües residuals es pot obtenir informació rellevant sobre la incidència del virus i la seua evolució. Amb dissenys de mostreig adequats, seria possible fitar zones afectades, i usar WBE com a eina complementària per a la gestió de certs brots, al mateix temps que permetria donar un brot per conclòs amb majors garanties davant l'absència repetida del material gènic del virus en les aigües residuals.

Atesa la coherència entre dades sobre virus en aigües residuals i les dades epidemiològiques disponibles, es recomana elaborar un model de predicció, tenint en compte les variables relacionades amb l'aigua residual i els factors sociodemogràfics de les zones d'estudi. Aquest model podria ser de gran utilitat per a anticipar una resposta i prendre accions preventives abans que comencen a aparéixer casos d'infecció a gran escala en una determinada població.

## 10. REFERÈNCIES

- 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. Vasani, 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 Guroi, 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. Quintana<sup>1</sup>, 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>.



## **AGRAÏMENTS**

Aquest treball ha sigut possible gràcies a l'ajuda rebuda de la Direcció General d'Aigua, de la Conselleria de Medi Ambient, Desenvolupament Rural, Emergència Climàtica i Transició Ecològica de la Generalitat Valenciana, per a l'execució en 2020 de projectes d'investigació aplicats als recursos hídrics en el Comunitat Valenciana. L'equip de treball vol agrair a aquesta Conselleria, i en particular al director general de l'Aigua, el fet d'haver apostat per un projecte com aquest quan encara no se sabia amb certesa les possibilitats que oferien les aigües residuals en el control de la pandèmia. La confiança en el nostre equip de treball per a dur a terme una investigació complexa i difícil, amb fortes implicacions socials i en el camp de la salut, ha sigut un estímul per a portar a bon terme la investigació.

Menció especial mereix el grup FACSA, i els integrants d'aquesta empresa que han participat en el desenvolupament del treball, per la seua dedicació i implicació i per les idees i dades que ens han subministrat, de gran rellevància en aquesta investigació. Igualment important, ha sigut la desinteressada col·laboració dels responsables i tècnics de les EDAR, que no sols han facilitat els mostrejos, sinó que també han aportat nombroses dades sobre paràmetres químics i dades relatives a la mateixa EDAR, necessàries per a la interpretació dels resultats obtinguts.

També volem agrair als ajuntaments de Castelló de la Plana, Borriana, Benicàssim, Vila-real i la Vall d'Alba l'autorització per a realitzar les preses de mostra de les EDAR d'aquestes poblacions, i a l'EPSAR l'autorització per a mostrejar les aigües residuals de la població d'Almassora.