

Vigilancia epidemiológica del COVID-19 en aguas residuales

Investigador responsable: Rafael Sanjuán

Instituto de Biología Integrativa de Sistemas (Universitat de València-CSIC)

Paterna, 16 de noviembre de 2020

1. Resultados científico-técnicos

1.1. Introducción

La vigilancia epidemiológica basada en aguas residuales nos permite hacer un seguimiento de la circulación de patógenos o sustancias nocivas en la población. Las pruebas individualizadas, ya sean por PCR o pruebas rápidas de antígenos, son esenciales para el control de brotes, tal como se ha demostrado en el caso de la COVID-19. Sin embargo, en un escenario de pandemia como la actual, su uso generalizado en la población se ve a menudo limitado desde los puntos de vista técnico y económico. El seguimiento a través de las aguas residuales es un método alternativo sencillo, económico, rápido y no invasivo, que permite monitorizar las poblaciones y llevar a cabo un control de las epidemias desde una aproximación complementaria a las pruebas individualizadas. Estudios previos han demostrado que se puede detectar una persona infectada por SARS-CoV-2 por cada 1000 habitantes a través del análisis de aguas residuales, valor que está cerca de los valores de incidencia considerados como alarmantes. Sin embargo, son necesarios más estudios para determinar mejor los umbrales de detección de esta técnica.

Mediante el análisis de aguas residuales, se espera poder detectar nuevos brotes, así como estudiar la estacionalidad de las epidemias y otros parámetros poblacionales de interés. Además, tanto los pacientes sintomáticos como los individuos asintomáticos pueden contribuir a la presencia de virus en aguas, lo cual es de especial relevancia en el caso de la COVID-19. Es sabido que el SARS-CoV-2 puede ser excretado, tanto por saliva como por heces y orina, no sólo por individuos asintomáticos, sino también antes del inicio de los síntomas y hasta cinco semanas después, siendo por tanto el análisis de aguas residuales un método en principio adecuado para el seguimiento de este virus.

Uno de los objetivos a alcanzar es determinar la validez del análisis de aguas residuales como sistema de alerta temprana, el cual permitiría anticipar de forma sencilla y económica la presencia de niveles preocupantes de SARS-CoV-2 en la población. Para conseguir este objetivo, es necesario monitorizar las estaciones depuradoras de manera periódica (al menos una vez por semana) y siguiendo protocolos consistentes. No obstante, es necesario realizar estudios metodológicos para determinar qué sistemas recogida son los más eficaces.

En concreto, a la hora de hacer el seguimiento en aguas residuales, es importante llevar a cabo un muestreo representativo, teniendo en cuenta factores como la selección del punto de muestreo, el volumen de agua analizado, el horario y tipo de muestra, su almacenamiento hasta

su procesado, o incluso factores ambientales que pueden tener efecto como la temperatura, la radiación solar, la lluvia, o la contribución de aguas de regadío. También es importante implementar una metodología de detección molecular adecuada, mediante protocolos estandarizados, llevando a cabo los controles de recuperación viral e inhibición adecuados. Se deben establecer los límites de detección de las técnicas utilizadas, su validación mediante curvas de estandarización, y la presencia de falsos positivos y falsos negativos. Es importante remarcar que las aguas residuales son una matriz compleja, que varía entre plantas residuales y entre países y que puede dificultar en sí misma la detección del material genético viral. Asimismo, los datos publicados hasta la fecha indican que la señal observada por métodos moleculares en aguas residuales es débil y está cerca del umbral de sensibilidad de las técnicas, aunque es detectable. Por último, para poder utilizar los datos moleculares en aguas residuales como herramienta de vigilancia epidemiológica, es importante poder correlacionarlos con otros datos epidemiológicos con el objetivo de implementar modelos de predicción y seguimiento de casos.

En el I2SysBio, centro mixto de la Universitat de València y el CSIC, llevamos analizando las aguas residuales de las estaciones depuradoras de Pinedo 1, Pinedo 2 y Quart-Benàger desde el inicio de la pandemia. En una primera aproximación, realizamos análisis retrospectivos por PCR de muestras puntuales recogidas desde febrero hasta abril de 2020. Nuestros resultados permitieron determinar que el SARS-CoV-2 era detectable en aguas residuales días antes del primer caso declarado en València, lo que sugiere que el sistema de detección podría alertar de forma temprana (<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1438463920305678>).

1.2. Puesta a punto de la metodología

Desde mayo, gracias al convenio entre la Generalitat Valenciana a través de la Conselleria de Agricultura, Desarrollo Rural, Emergencia Climática y Transición Ecológica y la Universitat de València, estamos realizando un seguimiento temporal a razón de tres muestras semanales en las estaciones mencionadas, las cuales recogen aguas de más de un millón de habitantes. Para ello, hemos puesto a punto la metodología de detección por PCR del material genético del coronavirus en aguas residuales, validando nuestros protocolos por un laboratorio independiente. Con ello, pretendemos establecer los protocolos que nos permitan obtener una visión poblacional del avance de la pandemia en el área metropolitana de Valencia, mediante el sistema de vigilancia en las aguas residuales, ya que permite monitorizar las poblaciones a lo largo del tiempo siendo un método sencillo, no invasivo, económico.

En una primera aproximación se han puesto a punto las técnicas de concentración, extracción y detección del material genético. El objetivo es determinar la carga viral del SARS-CoV-2 en aguas residuales, una matriz compleja, de la forma más reproducible y eficaz posible. Además, se pretende utilizar un método que permita mantener infectivas las posibles partículas virales. Tras testar diferentes metodologías de concentración de las muestras, incluyendo floculación con aluminio, PEG, ultrafiltración y centrifugación a alta velocidad, los resultados avalan la centrifugación como el mejor método tanto en detección por métodos moleculares como por ensayo en placa (detección de partículas virales infectivas; Figuras 1 y 2). Los ensayos se han realizado en primera instancia con el coronavirus subrogado TGEV para la detección molecular y en placa, y por métodos moleculares en el caso del SARS-CoV-2, utilizando la técnica de RT-qPCR con los cebadores recomendados por el CDC (N1 y N2).

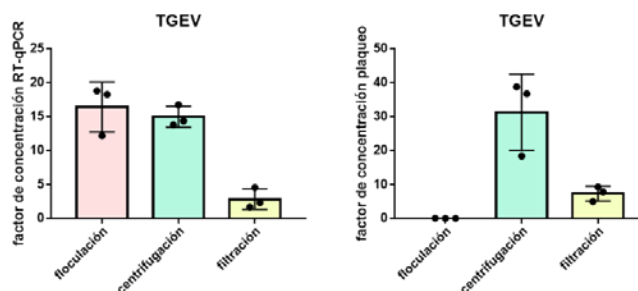


Figura 1. Comparación de metodologías de concentración de las muestras para la detección del coronavirus subrogado TGEV por ensayos moleculares (RT-qPCR) y por ensayo en placa. Se muestran los ensayos realizados mediante floculación con aluminio, centrifugación a alta velocidad, y ultrafiltración.

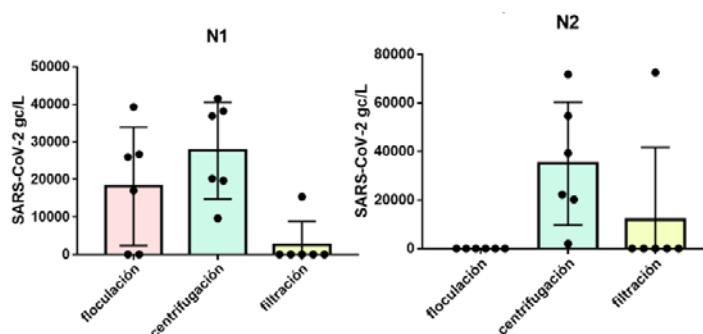


Figura 2. Validación de metodologías de concentración de las muestras para la detección del coronavirus SARS-CoV-2 por ensayos moleculares (RT-qPCR). Se muestran los ensayos realizados mediante floculación con aluminio, centrifugación a alta velocidad, y ultrafiltración. La detección del ARN viral se ha realizado siguiendo los protocolos recomendados por la CDC, utilizando los cebadores para las regiones N1 y N2.

1.3. Resultados

Se han realizado los muestreos a razón de dos o tres muestras por semana desde el mes de mayo en las tres EDARs principales del área metropolitana de Valencia: Pinedo 1, Pinedo 2 y Quart-Benàger. Se está comparando la toma de muestras puntuales con muestras compuestas de 4h, todas de primera hora de la mañana. Las muestras se analizan el mismo día o dentro de los 3 días siguientes a la toma de las muestras, guardadas a -20°C para su correcta preservación. Los resultados de unidades genómicas por litro obtenidos por RT-qPCR, se comparan con los datos epidemiológicos obtenidos a partir de la Dirección General de Salud Pública.

Por el momento, hemos centrado nuestro análisis estadístico de los datos en las muestras recogidas en Pinedo 1 y 2, puesto que abarcan gran parte de la ciudad de València y nos permiten una correlación con los casos declarados más fiable que en el caso de Quart-Benàger. De estos análisis, hemos extraído varias conclusiones

Las muestras compuestas presentan menor variación que las muestras puntuales y por tanto proporcionan una información más fiable acerca de la carga viral en aguas.

Existe cierta correlación entre la señal obtenida por PCR en aguas de Pinedo 1 y 2 y el número de casos COVID declarados en el mismo día (Figura 3). No obstante, existe fuerte variabilidad en los datos. Las razones de esa variabilidad pueden ser varias e incluyen factores como la baja señal obtenida en las PCRs de aguas, oscilaciones en el caudal del agua, la temperatura, etc., así como la variación diaria en el número declarado de casos (por ejemplo, con valores más bajos los fines de semana debido al menor número de pruebas realizadas). Para mejorar dicha correlación, extendemos el periodo de análisis a una semana, agregando los datos de ese periodo para Pinedo 1 y Pinedo 2. De ese modo, se alcanza una correlación de 0.95 entre la señal obtenida en aguas y el número de casos COVID activos declarados (Figura 3).

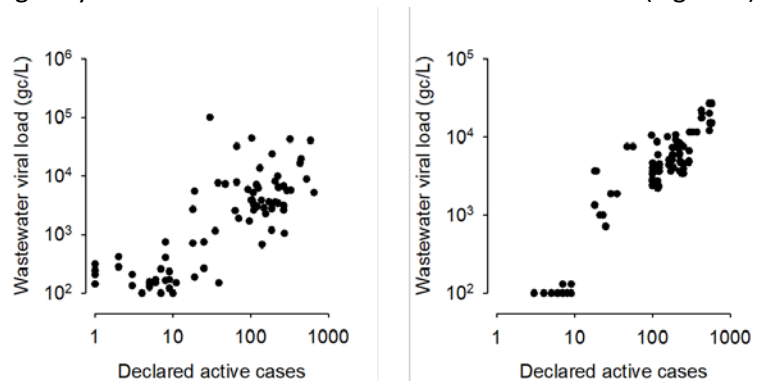


Figura 3. Correlación entre los casos activos declarados en Valencia y la señal obtenida por el análisis de aguas residuales de Pinedo 1 y 2. **Izq.** Análisis diario. Se obtuvo la media geométrica de las cargas virales para las regiones N1 y N2 del virus en las dos estaciones depuradoras (copias del genoma viral por litro, gc/L) y se correlacionó frente al número de casos declarados el mismo día. En escala log, la correlación de Pearson entre ambas variables fue de $r = 0.783$ ($P < 0.001$). **Der.** Análisis semanal. Cada punto corresponde a la agregación de los valores obtenidos a lo largo de una semana. Se usó una ventana deslizante para promediar diariamente los datos correspondientes a los últimos 7 días. En escala log, la correlación de Pearson entre ambas variables fue de $r = 0.952$ ($P < 0.001$).

Una vez establecido el método de obtención de la muestra, realización de la qPCR y análisis de datos, es posible establecer un paralelismo temporal entre el número de casos declarados y la señal obtenida en aguas residuales. Dicha relación se muestra en la Figura 4, donde puede observarse que el análisis de las aguas recapitula fielmente la curva epidémica del virus en la ciudad de València.

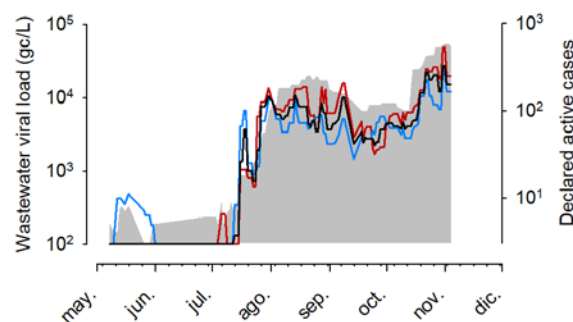


Figura 4. Validación del método de análisis de aguas residuales para el seguimiento epidemiológico del virus SARS-CoV-2. Se muestran la serie temporal de los casos activos declarados (área gris) y la señal obtenida en aguas residuales mediante el método de agregación semanal de datos descrito arriba. Se muestran los perfiles obtenidos para las regiones N1 (rojo) y N2 (azul) del genoma viral, así como agregando ambos tipos de datos. En el eje de las abscisas, las marcas pequeñas indican los lunes de cada semana y las marcas mayores delimitan los meses.

1.4. Conclusiones

Pese al previsible control de la epidemia COVID tras la implementación de campañas de vacunación masiva, es muy posible que el virus no sea erradicado a corto plazo y experimente oleadas epidémicas en la población no inmunizada, al igual que ocurre con la gripe y otros virus. Es también altamente probable que el esfuerzo diagnóstico por PCR u otros métodos decaiga con el tiempo, debido a su elevado coste material y logístico y a la disminución de la alarma social. No obstante, es importante mantener medios de seguimiento epidemiológico de COVID a medio-largo plazo que sean coste-efectivos. Hay que tener en cuenta que la sintomatología de este virus es variable y a menudo muy poco específica, haciendo difícil su diferenciación de otras enfermedades respiratorias comunes. En este contexto, disponer de un método de seguimiento basado en aguas residuales sería de gran utilidad. Los resultados aquí presentados avalan la posibilidad de implementar esta metodología.

Existen diversas razones pues para dar continuidad a estos estudios. En primer lugar, es necesario seguir mejorando la técnica. En esta dirección, sería beneficioso disponer de métodos más eficaces de concentración de las muestras que nos permitan obtener una señal de PCR más fuerte y por tanto más alejada el umbral de detección. En segundo lugar, sería conveniente mantener en el tiempo el estudio de correlación entre los casos declarados y la señal en aguas, especialmente en el momento en el que los casos empiecen a disminuir significativamente, pues no hemos podido estudiar qué sucede con la señal medida en aguas en este escenario. En tercer lugar, sería interesante extender la metodología a otros virus respiratorios cuyo seguimiento poblacional pueda resultar de interés. Por último, como se ha señalado, resultaría muy útil mantener en el tiempo una plataforma de seguimiento epidemiológico del COVID (y potencialmente de otros virus) basado en los métodos descritos, una vez éstos hayan quedado establecidos.

2. Justificación económica

Gastos de personal

- Gastos de contratación de María Dolores Arocas Castillo (Técnico Especialista de Laboratorio): 14 259.33 €

Justificación: recolección de muestras en estaciones depuradoras, puesta a punto de la metodología y realización de todas las PCR.

- Dedicación horaria de Rafael Sanjuán Verdeguer (Profesor Titular, Departamento de Genética de la Universidad de València): 5 419.20 €

Justificación: investigador principal, supervisión de los ensayos, análisis e interpretación de resultados, redacción de informes y actividades de seguimiento del Convenio y difusión. Estas tareas han supuesto una dedicación horaria de 160 h, con un coste/hora calculado en 33.87 €.

Gastos de equipamiento:

- Adquisición de un congelador (Freezer Comfort GP34339): 715.00 €

Justificación: almacenaje de las muestras de as EDARs previo a su procesamiento, así como para disponer de un registro que permita el reanálisis de aguas si fuera necesario.

- Adquisición de equipo de qPCR QuantStudio 3: 11 913.96 €

Justificación: se financia este equipo parcialmente con cargo a este convenio (el coste total del mismo asciende a 17 900 €). En las primeras fases de los experimentos, se hizo uso de equipos de PCR comunes disponibles en el centro de investigación I2SysBio, pero debido al volumen de trabajo y con el fin de garantizar la reproducibilidad de los datos, se adquirió este equipo, el cual se destina de manera significativa (aunque no exclusiva) al presente Convenio. Pese a que la fecha de facturación es el 10/11/2020, el equipo fue servido de urgencia el 30/09/2020 para que este pudiera ser utilizado en los objetivos de Convenio. Una parte sustancial de los datos mostrados en el informe científico fueron obtenidas con este equipo.

Material fungible:

- Kits para la extracción de RNA viral y la realización de qPCRs: 1986.00 €

Justificación: material necesario para la realización de las qPCR.

Otros gastos:

- Gastos de desplazamiento y envío de muestras: 506.51 €

Justificación: gastos de combustible fruto de desplazamientos efectuados por María Dolores Arocas Castillo con su vehículo particular para la recogida de aguas residuales en las estaciones de Pinedo y Quart-Benàger, así como otros gastos de envíos.

Costes indirectos:

- Gastos asociados al mantenimiento de los laboratorios y las infraestructuras necesarias para la ejecución del Convenio (13% del total): 5200.00 €.

TOTAL: 40 000 €