

Vigilància epidemiològica del COVID-19 en aigües residuals

Investigador responsable: Rafael Sanjuán

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

Paterna, 16 de novembre de 2020

1. Resultats científic-tècnics

1.1. Introducció

La vigilància epidemiològica basada en aigües residuals ens permet fer un seguiment de la circulació de patògens o substàncies nocives en la població. Les proves individualitzades, bé per PCR o per proves ràpides d'antígens, són essencials per a controlar els brots com ha sigut demostrat en la COVID-19. Tanmateix, en un escenari de pandèmia com l'actual, l'ús generalitzat d'aquestes proves en la població té limitacions tècniques i econòmiques. El seguiment mitjançant les aigües residuals és un mètode alternatiu senzill, econòmic, ràpid i no invasiu, que ens permet monitoritzar les poblacions i portar a terme un control de les epidèmies des d'una aproximació complementària a les proves individualitzades. Estudis previs han demostrat que es pot detectar una persona infectada per SARS-CoV-2 per cada 1000 habitants a través de l'anàlisi d'aigües residuals, valor que és a prop dels valors d'incidència considerats com alarmants. No obstant això, ne són necessaris més estudis per definir millor els llindars de detecció d'aquesta tècnica.

Mitjançant l'anàlisi d'aigües residuals, es podria detectar nous brots, així com estudiar l'estacionalitat de les epidèmies i d'altres paràmetres poblacionals d'interés. A més a més, tant els pacients simptomàtics com els individus asimptomàtics poden contribuir a la presència de virus en les aigües, la qual cosa és d'especial rellevància en el cas de la COVID-19. El SARS-CoV-2 se sap que pot ser excretat per saliva, femta i orina, no sols d'individus asimptomàtics sinó també abans de començar els símptomes i fins a cinc setmanes després, per la qual cosa, l'anàlisi d'aigües residuals és un mètode a priori adequat per al seguiment d'aquest virus.

Un dels objectius a abastar és determinar la validesa de l'anàlisi d'aigües residuals com a sistema d'alerta primerenca, el qual ens permetria anticipar de forma senzilla i econòmica la presència de nivells preocupants de SARS-CoV-2 en la població. Per tal d'aconseguir aquest objectiu, n'és necessari monitoritzar les estacions depuradores de manera periòdica (al menys una vegada per setmana) seguint uns protocols consistents. No obstant això, caldria realitzar estudis metodològics per a determinar els sistemes de recollida més eficaços.

En concret, a l'hora de fer el seguiment en aigües residuals, és important realitzar un mostreig representatiu, valorant factors com la selecció del punt del mostreig, el volum d'aigua analitzat, l'horari i tipus de mostra, l'emmagatzematge fins el seu processament o fins i tot, factors ambientals que poden influir com la temperatura, la radiació solar, la pluja o la contribució d'aigües de regadiu.

N'és també important implementar una metodologia de detecció molecular adequada amb protocols estandarditzats, realitzant els controls de recuperació viral i inhibició adequats. Cal establir els límits de detecció de les tècniques utilitzades, la seua validació mitjançant corbes d'estandardització així com la presència de falsos positius i falsos negatius.

També és primordial remarcar que les aigües residuals són una matriu complexa, amb variacions entre plantes residuals i entre països i que pot dificultar en sí mateix la detecció del material genètic viral. Tanmateix, les dades publicades fins aleshores indiquen que la senyal observada per mètodes moleculars en aigües residuals es dèbil, prop del llindar de sensibilitat de les tècniques, però n'és detectable. També remarcar que per a poder utilitzar les dades moleculars en aigües residuals com a eina de vigilància epidemiològica, és important poder correlacionar-los amb altres dades epidemiològiques amb l'objectiu d'implementar models de predicció i seguiment de casos.

En el I2SysBio, centre mixt de la Universitat de València i el CSIC, estem analitzant les aigües residuals de les estacions depuradores de Pinedo 1, Pinedo 2 i Quart-Benàger des del inici de la pandèmia. En una primera aproximació, vam realitzar anàlisis retrospectius per PCR de mostres puntuals recollides des de febrer fins abril de 2020. Els nostres resultats van permetre determinar que el SARS-CoV-2 era detectable en aigües residuals dies abans del primer cas declarat a València, la qual cosa suggereix que el sistema de detecció podria alertar precoçment. (<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1438463920305678>).

1.2. Posada a punt de la metodologia

Des del passat mes de maig, gràcies al conveni entre la Generalitat Valenciana (a través de la Conselleria de Agricultura, Desenvolupament Rural, Emergència Climàtica i Transició Ecològica) i la Universitat de València, estem fent un seguiment temporal de tres mostres setmanals recollides en les estacions abans mencionades, les quals recullen aigües de més d'un milió d'habitants.

Per a realitzar-lo, hem posat a punt la metodologia de detecció per PCR del material genètic del coronavirus en aigües residuals, metodologia que ha sigut validada per un laboratori independent. Així, tenim la pretensió d'establir protocols que ens permeten obtenir una visió poblacional de l'avançament de la pandèmia en l'àrea metropolitana de València mitjançant l'anàlisi d'aigües residuals. La vigilància d'aquestes aigües permet monitoritzar les poblacions al llarg del temps amb un mètode senzill, no invasiu i econòmic.

En una primera aproximació, s'han enllestit les tècniques de concentració, extracció i detecció del material genètic. L'objectiu és determinar la càrrega viral del SARS-CoV-2 en aigües residuals, de la forma més reproduïble i eficaç possible, malgrat ser una matriu complexa. A més a més, es vol aconseguir que aquest mètode permetia mantenir infectives les possibles partícules virals. Després de testar diverses metodologies de concentració de les mostres -floculació amb alumini, PEG, ultrafiltració i centrifugació a alta velocitat-, els resultats avalen la centrifugació com el millor mètode de detecció de partícules virals infectives tant amb tècniques moleculars com d'assaig en placa (Figures 1 i 2). Els assajos han sigut realitzats en primera instància amb el coronavirus subrogat TGEV amb tècniques moleculars i en placa, i per mètodes moleculars en el cas del SARS-CoV-2, fent servir la tècnica de RT-qPCR amb els cebadors recomanats pel CDC (N1 i N2).

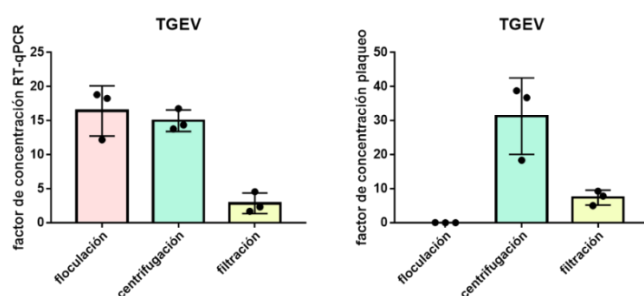


Figura 1. Comparació de metodologies de concentració de les mostres per a la detecció del coronavirus subrogat TGEV per assajos moleculars (RT-qPCR) i per assaig en placa. Es mostren els assajos realitzats mitjançant floculació amb alumini, centrifugació a alta velocitat i ultrafiltració.

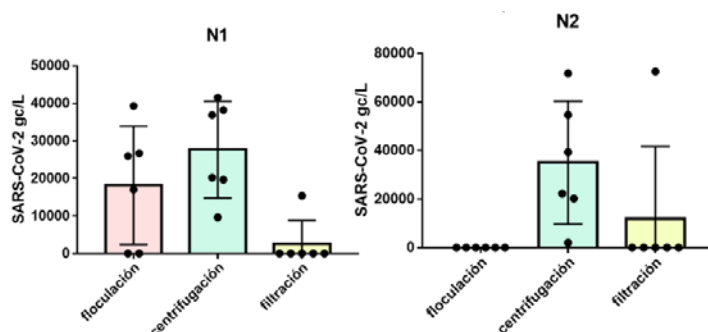


Figura 2. Validació de metodologies de concentració de les mostres per a la detecció del coronavirus SARS-CoV-2 per assajos moleculars (RT-qPCR). Es mostren els assajos realitzats mitjançant floculació amb alumini, centrifugació a alta velocitat i ultrafiltració. La detecció de l'ARN viral s'ha dut a terme d'acord amb els protocols recomanats per la CDC, utilitzant els cebadors per a las regions N1 i N2.

1.3. Resultats

S'han realitzat de dos o tres preses de mostres per setmana des del mes de maig en las tres EDARs principals de l'àrea metropolitana de València: Pinedo 1, Pinedo 2 i Quart-Benàger. S'està comparant la presa de mostres puntuals amb mostres compostes de 4h, totes elles de primera hora del matí. Aquestes s'analitzen el mateix dia o dins dels 3 dies següents, guardades a -20°C per a la seua correcta preservació. Els resultats d'unitats genòmiques per litre obtinguts per RT-qPCR es comparen amb les dades epidemiològiques obtingudes de la Direcció General de Salut Pública.

Fins aleshores, hem centrat el nostre anàlisi estadístic en les dades de les mostres recollides només en Pinedo 1 i 2, perquè pertanyen a gran part de la ciutat de València i ens permeten una més fiable correlació amb els casos declarats. Així les dades de les mostres de Quart-Benàger han quedat excloses.

D'aquests anàlisis, hem tret diverses conclusions.

Les mostres compostes presenten menor variació que las mostres puntuals, per la qual cosa en proporcionen una informació més fiable sobre la càrrega viral en aigües.

Hi ha certa correlació entre la senyal obtinguda per PCR en aigües de Pinedo 1 i 2 i el nombre de casos COVID declarats en el mateix dia (Figura 3). No obstant això, existeix una forta variabilitat en les dades. Les raons d'aquesta variabilitat poden ser diverses i enclouen factors com la baixa senyal obtinguda en les PCRs d'aigües, oscil·lacions del caudal d'aigua, temperatura, etc., així també com la variació diària en el nombre de casos declarats (per exemple, valors més baixos els caps de setmana conseqüència del menor nombre de proves realitzades). Per tal de millorar aquesta correlació, ampliem el període d'anàlisi a una setmana, afegint les dades d'eixe període per a Pinedo 1 i Pinedo 2. D'aquesta manera, s'obté una correlació de 0.95 entre la senyal obtinguda en aigües i el nombre de casos COVID actius declarats (Figura 3).

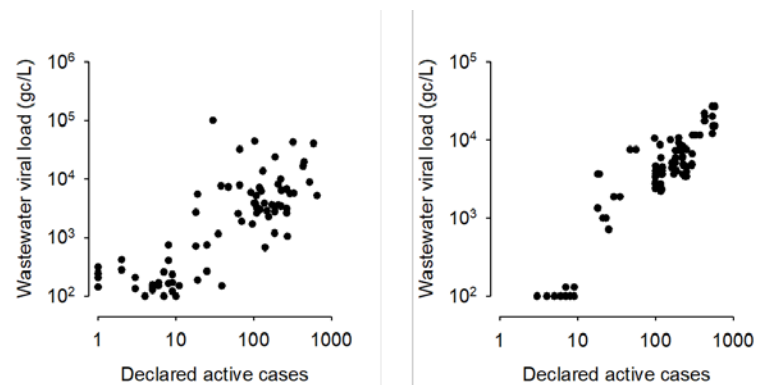


Figura 3. Correlació entre els casos actius declarats en València i la senyal obtinguda pel anàlisi d'aigües residuals de Pinedo 1 i 2. **Esquerra:** Anàlisi diari. Es va obtenir la mitjana geomètrica de les càrregues virals per a les regions N1 i N2 del virus en les dues estacions depuradores (còpies del genoma viral per litre, gc/L) i es va correlacionar amb el nombre de casos declarats el mateix dia. En escala log, la correlació de Pearson entre ambdues variables va ser de $r = 0.783$ ($P < 0.001$). **Dreta:** Anàlisi setmanal. Cada punt correspon a l'agregació dels valors obtinguts al llarg d'una setmana. Es va utilitzar una finestra llisquent per a amitar diàriament les dades corresponents als últims 7 dies. En escala log, la correlació de Pearson entre dues variables va ser de $r = 0.952$ ($P < 0.001$).

Una vegada establert el mètode d'obtenció de la mostra, realització de la qPCR i anàlisi de dades, és possible fer un paral·lelisme temporal entre el nombre de casos declarats i la senyal obtinguda en aigües residuals. Aquesta relació es pot veure en la Figura 4, on s'observa que l'anàlisi de les aigües recapitula fidelment la corba epidèmica del virus en la ciutat de València.

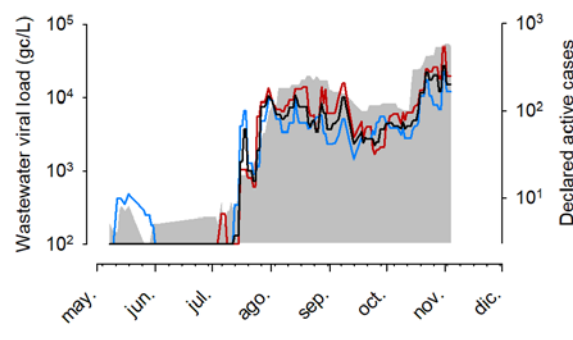


Figura 4. Validació del mètode d'anàlisi d'aigües residuals per al seguiment epidemiològic del virus SARS-CoV-2. Es mostra la sèrie temporal dels casos actius declarats (àrea gris) i la senyal obtinguda en aigües residuals mitjançant el mètode d'agregació setmanal de dades prèviament descrit. Es mostren els perfils obtinguts per a les regions N1 (roig) i N2 (blau) del genoma viral, així com la suma dels dos tipus de dades. En l'eix d'abscisses, les marques petites indiquen el dilluns de cada setmana i les marques majors delimiten els mesos.

1.4. Conclusions

Malgrat el previsible control de la epidèmia COVID després de la implementació de campanyes de vacunació massiva, es molt possible que el virus no siga eradicat a curt termini i experimente onades epidèmiques en la població no immunitzada, de la mateixa manera que ocorre amb la grip i altres virus. N'és també altament probable que l'esforç diagnòstic per PCR o d'altres mètodes es reduisca amb el temps a causa del seu alt cost material i logístic, així com la disminució de l'alarma social. No obstant això, és important mantindre mitjans de seguiment epidemiològic de COVID a mig i llarg termini que siguen cost-efectius. Cal considerar que la simptomatologia d'aquest virus és diversa i sovint molt poc específica, la qual cosa dificulta la diferenciació amb altres malalties respiratòries comuns. Així doncs, dispondre d'un mètode de seguiment basat en aigües residuals podria ser de gran utilitat. Els resultats ací presentats avalen la possibilitat d'implementar esta metodologia.

Hi ha doncs diverses raons per a donar continuïtat a estos estudis. En primer lloc, és necessari seguir millorant la tècnica. En aquest sentit, seria d'interés disposar de mètodes més eficaços de concentració de les mostres per tal d'obtenir una senyal de PCR més forta i conseqüentment, més allunyada del llindar de detecció. En segon lloc, caldria mantenir al llarg del temps l'estudi de correlació entre els casos declarats i la senyal en aigües, especialment en el moment que els casos comencen a disminuir significativament, perquè no hem pogut estudiar com és la senyal mesurada en aigües en este escenari. En tercer lloc, seria interessant estendre la metodologia a altres virus respiratoris, el seguiment poblacional dels quals puga resultar d'interés. Per finalitzar, tal i com ha sigut assenyalat, resultaria de gran utilitat mantenir al llarg del temps una plataforma de seguiment epidemiològic del COVID (i potencialment d'altres virus) basat en els mètodes descrits, quan hagen quedat establerts.

2. Justificació econòmica

Despeses de personal

- Despeses de contractació de María Dolores Arocas Castillo (Tècnic Especialista de Laboratori): 14 259.33 €

Justificació: recollida de mostres en estacions depuradores, posada a punt de la metodologia i realització de totes les PCR.

- Dedicació horària de Rafael Sanjuán Verdeguer (Professor Titular, Departament de Genètica de la Universitat de València): 5 419.20 €

Justificació: investigador principal, supervisió dels assajos, anàlisi i interpretació de resultats, redacció d'informes i activitats de seguiment del Conveni i difusió. Aquestes tasques han requerit una dedicació de 160 hores, amb un càlcul cost/hora de 33.87 €.

Despeses d'equipament:

- Adquisició d'un congelador (Freezer Comfort GP34339): 715.00 €

Justificació: emmagatzematge de les mostres de EDARs abans del seu processament, així com per a disposar d'un registre que permeti el reanàlisi d'aigües si fora necessari.

- Adquisició d'equip de qPCR QuantStudio 3: 11 913.96 €

Justificació: Es finança este equip parcialment amb càrrec a aquest conveni (el cost total apuja a 17 900 €). En les primeres fases dels experiments, es va fer ús d'equips de PCR comuns disponibles en el centre d'investigació I2SysBio, però a causa del volum de treball i amb la finalitat de garantir la reproductibilitat de les dades, es va adquirir este equip, el qual es destina de manera significativa (però no exclusiva) al actual Conveni. Malgrat que la data de facturació és el 10/11/2020, l'equip va ser lliurat de manera urgent el 30/09/2020 per tal de poder ser utilitzat en els objectius del Conveni. Una part substancial de les dades mostrades en l'informe científic van ser obtingudes amb aquest equip.

Material fungible:

- Kits per a l'extracció de RNA viral i la realització de qPCRs: 1986.00 €

Justificació: material necessari per fer les qPCR.

Altres despeses:

- Despeses de desplaçament i enviament de mostres: 506.51 €

Justificació: Despeses de combustible necessari per als desplaçaments fets per María Dolores Arocas Castillo amb el seu vehicle particular per a recollir les aigües residuals de les estacions de Pinedo i Quart-Benàger, així com altres despeses d'enviaments.

Costes indirectes:

- Despeses associades al manteniment dels laboratoris i les infraestructures necessàries per a l'execució del Conveni (13% del total): 5200.00 €.

TOTAL: 40 000 €