

Vigilància epidemiològica de la COVID-19 en aigües residuals

Investigadors responsables: Rafael Sanjuán i Pilar Domingo-Calap

Institut de Biologia Integrativa de Sistemes (Universitat de València-CSIC)

Paterna, 23 de novembre de 2021

1. Resultats científic-tècnics

1.1. Introducció

La vigilància epidemiològica basada en aigües residuals ens permet fer un seguiment de la circulació de patògenes o substàncies nocives en la població. Les proves individualitzades, bé per PCR o proves ràpides d'antígens, són essencials per al control de brots, com ha sigut demostrat en el cas de la COVID-19. No obstant això, en un escenari de pandèmia com la que hi ha a hores d'ara, 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 permet monitoritzar les poblacions i dur a terme un control de les epidèmies des d'una aproximació complementària a les proves individualitzades. Estudis previs han demostrat que amb l'anàlisi d'aigües residuals, és possible detectar una persona infectada per SARS-CoV-2 d'entre 1000 habitants, valor que s'apropa als valors d'incidència considerats com alarmants. No obstant això, ne són necessaris més estudis per a determinar millor els llindars de detecció d'aquesta tècnica.

Mitjançant, l'anàlisi d'aigües residuals, s'espera poder detectar nous brots, així com estudiar l'estacionalitat de les epidèmies i d'altres paràmetres poblacionals d'interés. Cal ressaltar que no sols els pacients simptomàtics sinó també els individus asimptomàtics poden contribuir a la presència de virus en les aigües, observació d'especial rellevància en el cas de la COVID-19. Es sabut que el SARS-CoV-2 pot ser excretat per saliva, fenta i orina, tant per individus asimptomàtics com també abans de l'inici de les símptomes i fins a cinc setmanes després. Així doncs, l'anàlisi de les aigües residuals hauria de ser un mètode 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 precoç, el qual permetria anticipar de forma senzilla i econòmica la presència de nivells preocupants de SARS-CoV-2 en la població. Per aconseguir aquest objectiu, és necessari monitoritzar les estacions depuradores de manera periòdica (si més no, una vegada cada setmana) d'acord amb uns protocols consistents. No obstant això, és necessari realitzar estudis metodològics per a determinar què sistemes recollida són els més eficaços.

En concret, a l'hora de fer el seguiment en aigües residuals, és important fer un mostreig representatiu, considerant factors com ara, la selecció del punt de mostreig, el volum d'aigua analitzat, l'horari i el tipus de mostra, el seu emmagatzematge fins el procediment o fins i tot,

factors ambientals que poden influir com la temperatura, la radiació solar, la pluja o la contribució d'aigües de regadiu. També és important implementar una metodologia de detecció molecular adequada, mitjançant protocols estandarditzats, realitzant els controls de recuperació viral i inhibició adequats. Cal establir els límits de detecció de les tècniques utilitzades, la seua validació amb corbes d'estandardització i la existència de falsos positius i falsos negatius. N'és important remarcar que les aigües residuals són una matriu complexa, que varia entre plantes residuals i entre països, i que també pot dificultar per se, la detecció del material genètic viral. A més, les dades publicades fins ara, indiquen que el senyal observat per mètodes moleculars en aigües residuals és dèbil i a prop del llindar de sensibilitat de les tècniques, malgrat ser detectable. Per últim, per a poder utilitzar les dades moleculars en aigües residuals com a eina de vigilància epidemiològica, és important poder correlacionar-les 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 de l'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 en València, la qual cosa suggereix que el sistema de detecció podria alertar de forma precoç. (<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1438463920305678>).

1.2. Posada al punt de la metodologia

Des de maig 2020, mercé al conveni entre la Generalitat Valenciana a través de la Conselleria d'Agricultura, Desenvolupament Rural, Emergència Climàtica i Transició Ecològica, i la Universitat de València, estem realitzant un seguiment temporal de tres mostres setmanals en les estacions mencionades, les quals recullen aigües de més d'un milió d'habitants. Per aquesta tasca, hem posat al punt la metodologia de detecció per PCR del material genètic del coronavirus en aigües residuals. A més d'estimar la càrrega viral en les aigües residuals, des de gener 2021 estem fent seqüenciació d'aquestes mostres amb la finalitat de conèixer les variants d'interès del SARS-CoV-2 en la ciutat de València. Amb això, pretenem establir els protocols que ens permetrien obtenir una visió poblacional de l'avançament de la pandèmia en l'àrea metropolitana de València, mitjançant el sistema de vigilància en les aigües residuals, donat que, ens permet monitoritzar les poblacions al llarg del temps amb un mètode senzill, no invasiu i econòmic.

En una primera aproximació, s'han posat al punt les tècniques de concentració, extracció i detecció del material genètic. L'objectiu és determinar la càrrega viral del SARS-CoV-2 en aigües residuals, -una matriu complexa- de la forma més reproducible i eficaç possible. A més, es pretén utilitzar un mètode que permetia mantenir infectives les possibles partícules virals. Per aconseguir-ho, fem centrifugació a alta velocitat, atés que vam demostrar que era el millor mètode en la detecció, utilitzant indistintament mètodes moleculars o d'assaig en placa (detecció de partícules virals infectives, resultats 2020). La detecció per mètodes moleculars del SARS-CoV-2 es realitza fent servir la tècnica de RT-qPCR amb els cebadors recomanats pel CDC (N1 i N2). Respecte a la seqüenciació, en una primera instància, es va realitzar seqüenciació massiva de les mostres mitjançant la tècnica Illumina MiSeq. No obstant això, les mostres

d'aigües residuals de càrrega viral baixa són molt difícils de seqüenciar amb aquest mètode. A més a més, és complicat recuperar genomes complets atès que, en molts casos, el RNA viral es troba degradat i no amplifica correctament. Per a resoldre este problema, hem seqüenciat les mostres utilitzant seqüenciació Sanger. Amb aquest mètode, obtenim seqüències de qualitat de regions d'interés del SARS-CoV-2 que són informatives de la variant d'interés. En primer lloc, obtenim seqüències consens per a determinar la variant majoritària en las aigües residuals. Posteriorment, procedim amb clonació de les bandes de RT-PCR i seqüenciem un nombre elevat de clons per a poder conèixer les variants minoritàries que circulen per la ciutat de València.

1.3. Resultats

S'han realitzat mostres a un ritme de dos o tres mostres per setmana des de el mes de maig de 2020 en las tres EDARs principals de l'àrea metropolitana de València: Pinedo 1, Pinedo 2 i Quart-Benàger. En primer lloc, s'ha comparat l'amplificació per RT-qPCR de les dues regions diana, N1 i N2, observant-se una bona correlació, i s'ha determinat el límit de detecció de la tècnica implementada (**Figura 1**).

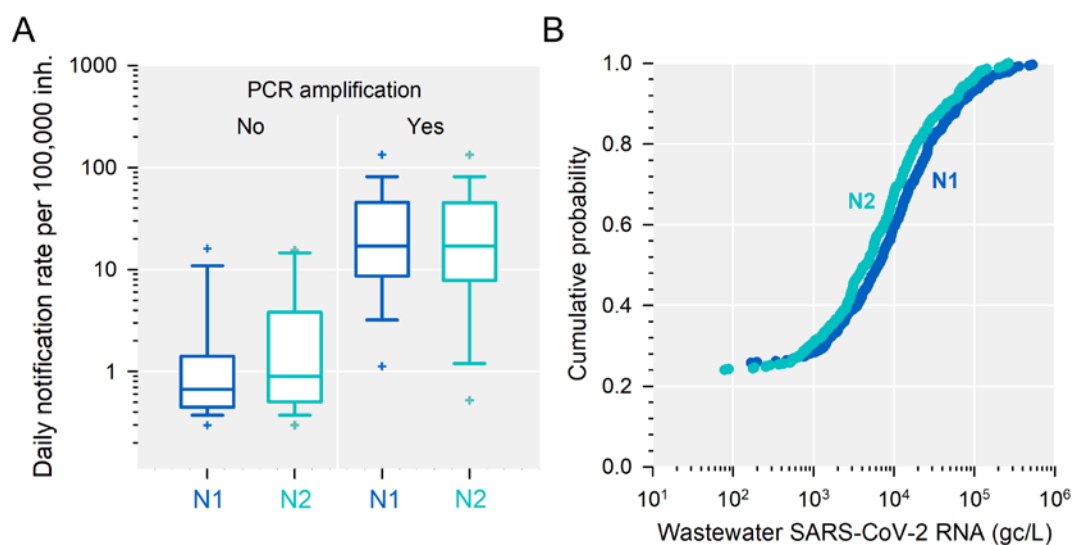


Figura 1. Límit de detecció del SARS-CoV-2 en aigües residuals. **A.** Diagrama de les taxes de notificació diària per 100.000 habitants de les mostres d'aigües residuals que van donar un producte de RT-qPCR comparat amb les que no es van amplificar. Les dades es mostren separatament per a es regions del genoma viral N1 i N2. Els requadres mostren els percentils 25, 50 (mitjana) i 75. Las barres d'error indiquen els percentils 10 i 90. Les creus mostren els percentils 5 i 95. **B.** Distribució de probabilitat acumulada de la concentració de ARN viral estimada per a les regions genòmiques N1 i N2. Segons esta distribució, el límit de detecció de la RT-qPCR va ser d'aproximadament 100 gc/L.

Hem dut a terme anàlisis comparatives entre la càrrega viral en aigües compostes i puntuals, entre les regions diana N1 i N2, i entre diversos col·lectors. Els resultats es poden observar en la **Figura 2**. Cal destacar que les mostres compostes presenten menor variació que las mostres puntuals i conseqüentment, proporcionen una informació més fiable respecte a la càrrega viral en aigües. S'han comparat la recollida de mostres puntuals amb mostres compostes de 4h, totes elles de primera hora del matí. Les mostres són analitzades el mateix dia o fins a 3 dies després conservades a -20°C per a la seua correcta preservació. Els resultats d'unitats genòmiques per litre obtingudes per RT-qPCR, es comparen amb les dades epidemiològiques aportades per la Direcció General de Salut Pública. Hem centrat el nostre anàlisi estadístic de les dades de las mostres recollides en Pinedo 1 i 2, que abasten gran part de la ciutat de València, i ens permeten fer una correlació més fiable amb els casos declarats, que si ho correlacionem en les mostres de Quart-Benàger. A més, en esta última EDAR han tingut problemes en la recollida de mostres en períodes llargs la qual cosa dificulta el seu seguiment temporal.

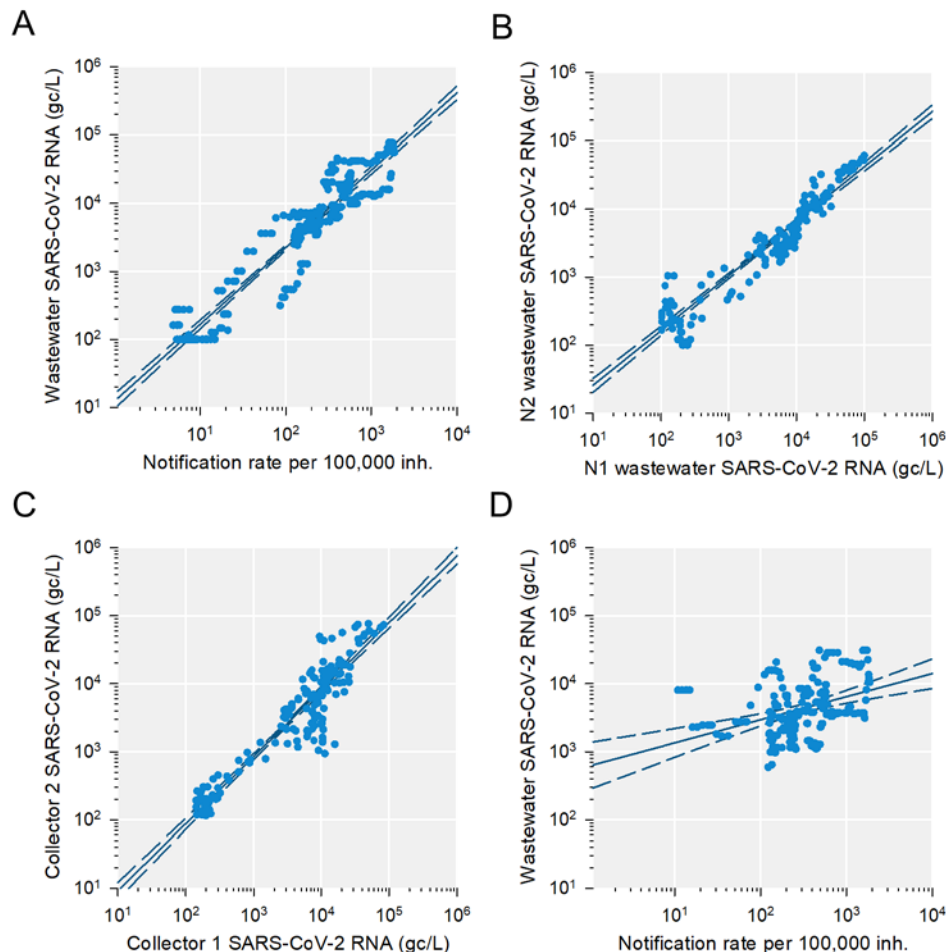


Figura 2. Influència de la estratègia de mostreig d'aigües residuals en la quantificació del SARS-CoV-2. Es van calcular les concentracions d'ARN viral en les aigües residuals i les taxes acumulades de notificació de casos per cada 100.000 habitants per a períodes de 14 dies, utilitzant finestres lliscants desplaçades de un dia. Es mostren les línies de regressió lineal log-log per mínims quadrats i els intervals de confiança del

99%. **A.** Taxa de notificació front a la mitjana de la concentració d'ARN viral en las aigües residuals compostes. **B.** Concentracions mitges d' ARN viral logarítmic estimades utilitzant la regió del genoma del SARS-CoV-2 N1 versus la N2. **C.** Concentracions mitges de log ARN viral estimades a partir del col·lector 1 de la EDAR de Pinedo en comparació al col·lector 2. **D.** Taxa de notificació versus la concentració mitja de log ARN viral en las aigües residuals utilitzant mostres individuals en compte de mostres compostes.

Existeix correlació entre el senyal obtingut per PCR en aigües de Pinedo 1 i 2 i el nombre de casos COVID declarats en el mateix dia. No obstant això, existeix forta variabilitat en les dades. Les raons d'aquesta variabilitat poden ser diverses i inclouen factors com el baix senyal obtingut en les PCRs d' aigües, oscil·lacions en el cabdal de l'aigua, la temperatura, etc., així com la variació diària en el nombre declarat de casos; (per exemple, amb valors més baixos els caps de setmana a causa del menor nombre de proves realitzades). Per tal de millorar la correlació, hem realitzat anàlisis per períodes d'una i de dues setmanes, agregant les dades d'eixe període per a Pinedo 1 i Pinedo 2. D'aquesta manera, s'abasta una molt bona correlació entre el senyal obtingut en aigües i el nombre de casos COVID actius declarats (**Figures 3 i 4**). Una vegada establert el mètode d'obtenció de la mostra, realització de la qPCR i anàlisi de dades, és possible establir un paral·lelisme temporal entre el nombre de casos declarats i el senyal obtingut en aigües residuals. Esta correlació es representa en la Figura 4, on pot observar-se que l'anàlisi de las aigües recapitula fidelment la corba epidèmica del virus en la ciutat de València.

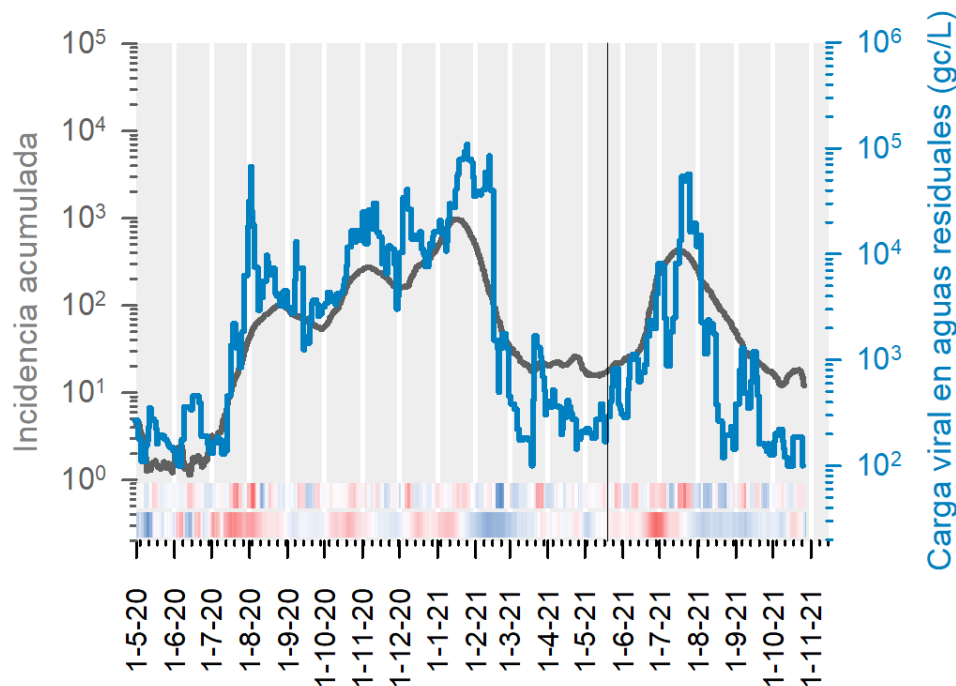


Figura 3. Correlació entre els casos actius declarats en València i el senyal obtingut per l'anàlisi d' aigües residuals de Pinedo 1 i 2 en intervals de 7 dies, des de maig 2020 fins novembre 2021.

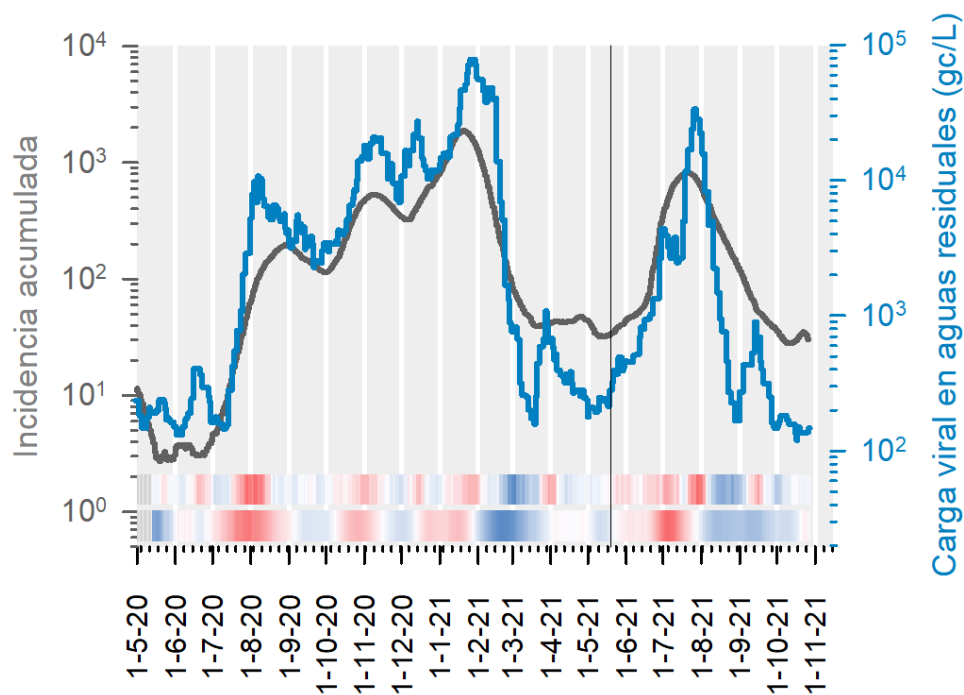


Figura 4. Correlació entre els casos actius declarats en València i el senyal obtingut per l'anàlisi d'aigües residuals de Pinedo 1 i 2 en períodes de 14 dies, des de maig 2020 fins novembre 2021.

A més a més, hem analitzat també la correlació entre la càrrega viral en aigües residuals d'una EDAR petita, Quart-Benàger, amb el nombre de casos. Els resultats poden observar-se en la **Figura 5**, on se detecta una major variabilitat i dispersió de les dades, així com períodes amb absència de mostreig.

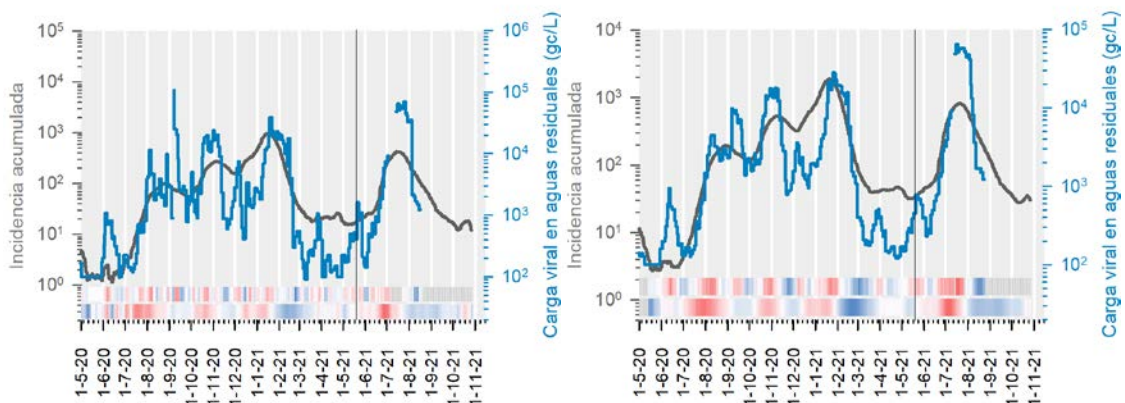


Figura 5. Correlació entre els casos actius declarats i el senyal obtingut per l'anàlisi d'aigües residuals de Quart-Benàger en períodes finestra de 7 dies (esquerra) i 14 dies (dreta), des de maig 2020 fins novembre 2021.

1.4. Conclusions

Malgrat el previsible control de la epidèmia COVID després de la implementació de campanyes de vacunació massiva, a hores d'ara, el virus encara no s'ha eradicat. Noves onades epidèmiques en la població no immunitzada o la emergència de noves variants podrien provocar nous pics que sobrecarregarien el sistema de salut, de la mateixa manera ocorre amb la grip i altres virus. Es també altament probable que l'esforç diagnòstic per PCR o per altres mètodes, decaïga amb el temps, a causa del seu alt cost material i logístic i a la disminució de l'alarma social. No obstant això, és important mantenir mitjans de seguiment epidemiològic de COVID a mig-llarg termini que siguin cost-efectius. Cal considerar que la simptomatologia d'aquest virus és variable i sovint molt poc específica, la qual cosa fa difícil la seua diferenciació amb altres malalties respiratòries comunes. En aquest context, disposar d'un mètode de seguiment basat en aigües residuals és de gran utilitat, tal com recomana la Comissió Europea. Els resultats aquí presentats avalen la possibilitat d'implementar aquesta metodologia en la ciutat de València.

Existeixen diverses raons doncs per a donar continuïtat a estos estudis. En primer lloc, és necessari seguir millorant la tècnica. En aquest sentit, seria beneficiós dispondre de mètodes més eficaços de concentració de les mostres que ens permetan obtenir un senyal de PCR més fort i conseqüentment més allunyada del llindar de detecció. En segon lloc, seria convenient mantenir en el temps l'estudi de correlació entre els casos declarats i el senyal en aigües, especialment en els moments que hi ha poc casos, perquè no hem pogut estudiar què succeeix en el senyal en aquest escenari. En tercer lloc, seria interessant estendre la metodologia a altres virus respiratoris el seguiment poblacional dels quals puga resultar d'interés. Per últim, tal com ha sigut senyalat, resultaria de molta utilitat mantenir en el temps una plataforma de seguiment epidemiològic de la COVID (i potencialment d'altres virus) basada en els mètodes descrits, una vegada hagen estat establerts.

2. Justificació econòmica

Despeses de personal

- Despeses de contractació de María Dolores Arocas Castillo (Tècnic Especialista de Laboratori): 31 392.65 €

Justificació: recollida de mostres en estacions depuradores, posada al 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): 2976.70 €

Justificació: investigador principal, supervisió dels assajos, anàlisis i interpretació de resultats, i activitats de seguiment del Conveni i difusió. Aquestes tasques han requerit una dedicació horària de 85 h, amb un cost/hora calculat en 35.02 €.

- Dedicació horària de Pilar Domingo Calap (Investigadora del Programa Ramón y Cajal, Institut de Biologia Integrativa de Sistemes de la Universitat de València): 5274.34 €

Justificació: co-investigadora principal, supervisió dels assajos, anàlisis i interpretació de resultats, i activitats de seguiment del Conveni i difusió. Aquestes tasques han suposat una dedicació horària de 181 h, amb un cost/hora calculat en 29.14 €.

Despeses d'equipament:

Material fungible:

- Reactius de biologia molecular: 20 400.68 €

Justificació: material necessari per a la realització de les qPCR.

Altres despeses:

- Despeses de desplaçament i enviament de mostres 678.30 €
- Despeses de formació i adquisició de reactius per a la posada en funcionament d'un equip de qPCR: 220.00 €.

Justificació: Despeses de combustible fruit del desplaçaments efectuats per María Dolores Arocas Castillo amb el seu vehicle particular per a la recollida d'aigües residuals de les estacions de Pinedo i Quart-Benàger, així com altres despeses d'enviament. Posada en marxa d'un equip de qPCR dedicat principalment al present conveni.

Despeses indirectes:

- Despeses associades al manteniment dels laboratoris i les infraestructures necessàries per a l'execució del Conveni (13% del total): 9100 €.

TOTAL: 70 042.67 €

Rafael Sanjuán Verdeguer

Investigador responsable

Pilar Domingo Calap

Investigadora responsable