

# Vigilància epidemiològica del COVID-19 en aigües residuals

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

Paterna, 30 de novembre de 2022

## Introducció

La vigilància epidemiològica basada en aigües residuals ens permet realitzar un seguiment de la circulació de patògens en la població. Les proves individualitzades, ja siguen per PCR o proves ràpides d'antígens, són essencials per al control de brots, tal com s'ha demostrat en la COVID-19. No obstant això, en un escenari de pandèmia, el seu ús generalitzat en la població es veu limitat des dels punts de vista tècnic i econòmic. El seguiment a través de les aigües residuals és un mètode alternatiu senzill, econòmic, ràpid i no invasiu, que permet monitorar les poblacions i dur a terme un control de les epidèmies des d'una aproximació complementària a les proves individualitzades. Per exemple, 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 residual. No obstant això, són necessaris més estudis per a determinar la validesa d'aquesta tècnica. Així mateix, seria d'interés poder estendre aquesta aproximació a altres virus d'importància recent, com ara el virus de la verola del mico.

En el I2SysBio, centre mixt de la Universitat de València i el CSIC, portem analitzant les aigües residuals d'estacions depuradores de l'àrea metropolitana de València des de l'inici de la pandèmia. En una primera aproximació, realitzem anàlisis retrospectives per PCR de mostres puntuals recollides des de febrer fins a 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 de manera primerenca (<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1438463920305678>).

Des de maig 2020, gràcies 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, hem desenvolupat les tècniques necessàries per a realitzar un seguiment temporal de la incidència del SARS-CoV-2 en el nostre entorn. En una primera fase, es van posar a punt les tècniques de concentració, extracció i detecció del material genètic. Per a concentrar el virus present en les aigües, inicialment usem la centrifugació a alta velocitat, el qual té l'avantatge de conservar intacta la infectivitat del virus (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/pmc8266481/>). No obstant això, es tracta d'un mètode relativament lent i poc escalable. Quant a la detecció per mètodes moleculars del SARS-CoV-2, es realitza utilitzant la tècnica de RT-qPCR amb els engreixadors recomanats pel CDC (N1 i N2). També vam posar a punt la seqüenciació de regions rellevants del genoma del SARS-CoV-2 que ens permeten adscriure el virus a diferents variants d'interés.

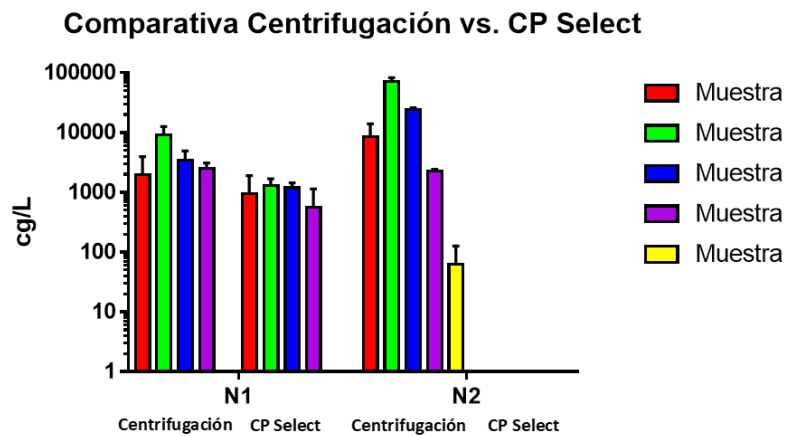
## 1.2. Objectius

Els objectius que ens plantejem per a la present anualitat van ser els següents:

- Millorar la tècnica de concentració viral en aigües residuals per a reduir el temps d'obtenció de resultats.
- Consolidar el calibratge de la correlació entre la incidència acumulada reportada per les autoritats i la càrrega viral detectada en les aigües residuals de l'àrea metropolitana de València mitjançant una anàlisi que abaste un període de seguiment de dos anys.
- En absència d'altres dades d'incidència global, investigar la viabilitat d'una anàlisi d'aigües residuals que alerte sobre l'existència de noves onades epidèmiques en la nostra comunitat i que puguen ser tingudes en compte per les autoritats per a la presa de decisions.
- Realitzar un seguiment de la presència de SARS-CoV-2 en les aigües residuals de l'àrea metropolitana de València.
- Explorar la viabilitat d'aplicar tècniques similars a altres virus circulants en la nostra comunitat.

## **Resultats**

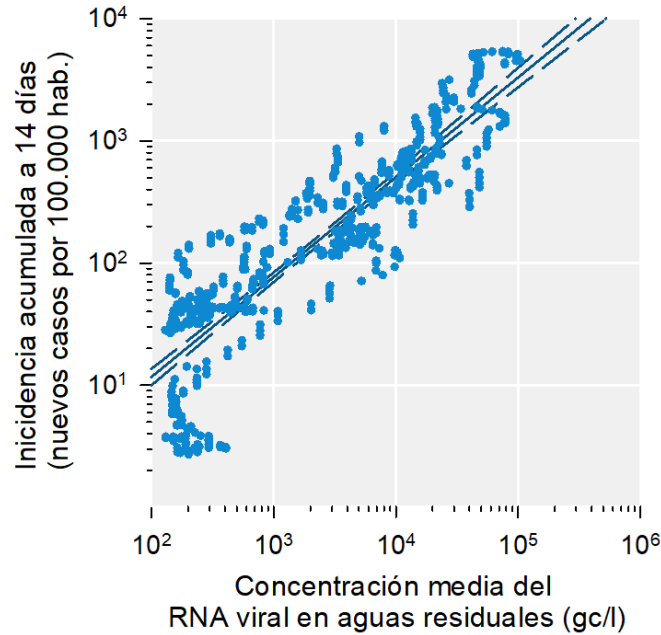
En primer lloc, es va explorar l'ús de tècniques alternatives a la centrifugació que ens permeteren concentrar les aigües residuals de manera més ràpida i eficaç. Fins ara, gràcies a la posada a punt del mètode basat en la centrifugació d'alta velocitat, els resultats obtinguts eren reproduïbles i representaven una bona metodologia per a determinar la càrrega viral del SARS-CoV-2 en les aigües residuals. No obstant això, el procés requereix hores de centrifugació que retarden l'obtenció de resultats a temps real i es va plantejar implementar noves tècniques per a reduir el temps d'obtenció de resultats. Per a això, es van realitzar assajos comparatius de concentració del virus en aigües residuals mitjançant la centrifugació d'alta velocitat front la concentració amb pipetes d'ultrafiltració gràcies a la Pipeta CP Select (Innovaprep). En una primera aproximació, es va comparar el procediment rutinari amb la concentració mitjançant la CP Select directament, obtenint-se millors resultats amb la concentració mitjançant centrifugació d'alta velocitat. Tal com s'observa en la Figura 1, els resultats mostren que l'eficiència és superior per a la metodologia de centrifugació, tant per a la regió N1 com per a la N2. És cridaner com a la regió N2, tots els resultats són negatius utilitzant la #CP Select, mentre que el nombre de còpies obtingut mitjançant centrifugació és elevat.



**Figura 1.** Comparativa entre concentració de mostres d'aigües residuals mitjançant centrifugació d'alta velocitat i la pipeta #CP Select. Es van realitzar proves comparatives per a 5 mostres diferents, per a les regions N1 i N2 de SARS-CoV-2, per a calcular les còpies genòmiques per litre (cg/L) per a cadascuna d'elles.

A causa dels resultats obtinguts, es va realitzar una segona aproximació modificant el protocol i realitzant un filtrat de les mostres per filtres de 0.45 µm previ a l'ús de la CP Select per a evitar el col·lapse de les pipetes ultrafiltrants. No obstant això, de nou, els resultats van ser millors per a la concentració mitjançant centrifugació d'alta velocitat. És per això que les anàlisis van ser dutes a terme mitjançant centrifugació, tal com s'havia estat realitzant.

En segon lloc, es va dur a terme una anàlisi de correlació entre el senyal obtingut per qPCR i la incidència acumulada de SARS-CoV-2 amb la finalitat de consolidar el calibratge que prèviament havíem dut a terme amb dades de la primera anualitat (<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fviro.2021.776998/full>). Es van prendre una mitjana de 3 mostres setmanals dels cabals entrants en les estacions depuradores de Pinedo 1 i Pinedo 2, es va realitzar per duplicat una qPCR sobre cadascuna de les regions N1 i N2 del virus i es va fer una mitjana de el nombre de còpies genòmiques de SARS-CoV-2 per litre d'aigua (gc/L) al llarg de 14 dies. Cadascun d'aquestes mitjanes es va obtenir doncs a partir de 3 dies \* 2 regions virals \* 2 rèpliques de qPCR = 12 dades, amb lleugeres variacions en funció de la disponibilitat de mostres. Aquestes dades es van comparar amb la incidència acumulada del virus al llarg d'aqueixos mateixos 14 dies. La figura 2 mostra la correlació entre tots dos valors al llarg del període que abasta des d'abril de 2020 fins a setembre de 2022. Pot observar que existeix una correlació significativa, validant així la metodologia per al seguiment de la incidència virals fent ús de les aigües residuals.



**Figura 2.** Correlació entre concentració d'RNA viral en aigües residuals (obtinguda mitjançant centrifugació d'alta velocitat) i la incidència acumulada del SARS-CoV-2 en el període abril 2020 – novembre 2022. Es mostra la línia de regressió i el seu interval de confiança al 95%.

Mitjançant una anàlisi de regressió lineal per mínims quadrats és possible obtenir la següent estimació de la incidència a 14 dies (I) a partir de la concentració d'RNA viral en les aigües (C):

$$\log_{10} I = (0.817 \pm 0.016) \log_{10} C - (0.567 \pm 0.057)$$

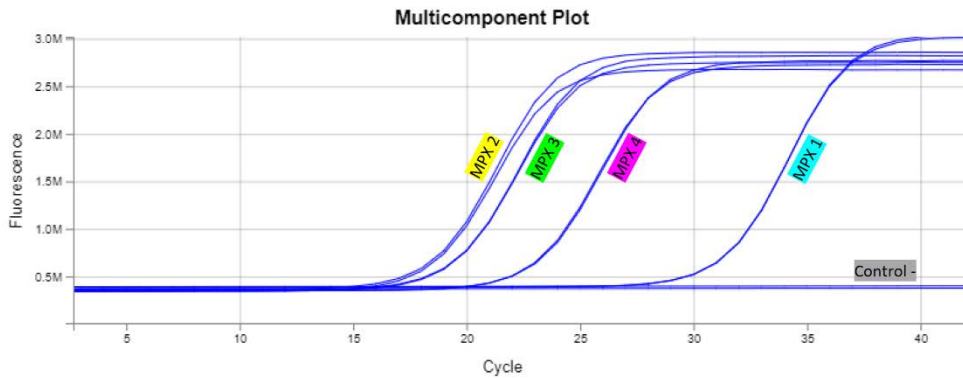
És possible a més establir la següent classificació:

gc/L	Incidència	Número d'observacions
>1000	>100	376
>1000	<100	14
<1000	>100	32
<1000	<100	268

Això significa que detectar una concentració mitjana d'RNA viral en aigües >1000 gc/L en un període de 14 dies mitjançant l'aproximació a dalt descrita permet afirmar que la incidència acumulada a 14 dies és superior a 100 casos per cada 100.000 habitants amb una sensibilitat del 92% i una especificitat del 95% i, per tant, una probabilitat global d'encert del 93%.

Com que el Sistema Nacional de Salut va deixar d'obtenir dades d'incidència acumulada en la població general a principis de 2022, la metodologia posat a punt ací ofereix una eina única per a estimar aquestes dades.

Finalment, vam posar a punt la detecció del virus de la verola del mico mitjançant qPCR. Per a això, partim d'unes mostres positives per a posar a punt la tècnica. La Figura 3 recull els resultats d'aquest calibratge inicial.



**Figura 3.** Detecció per qPCR de mostres positives per al virus de la verola del mico (MPX). Es mostra el senyal obtingut per a diferents concentracions del virus, així com un control negatiu que no contenen MPX.

### Conclusions

Com era previsible, l'esforç diagnòstic del SARS-CoV-2 per PCR o altres tècniques basat en anàlisis individualitzades ha decaïgut amb el temps, a causa del seu elevat cost material i logístic i a la disminució de l'alarma social. No obstant això, és important mantindre mitjans de seguiment epidemiològic de COVID a mig-llarg termini que siguin cost-efectius. 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 ací presentats avalen la possibilitat d'implementar aquesta metodologia a la ciutat de València. Gràcies al present conveni, ha sigut possible no sols posar a punt les tècniques necessàries, sinó optimitzar-les per a poder dur a terme la seua aplicació pràctica en Salut Pública. Seria interessant estendre la metodologia a altres virus el seguiment poblacional dels quals puga resultar d'interés.

Rafael Sanjuán Verdeguer  
Investigador responsable

Pilar Domingo Calap  
Investigadora responsable