

# Vigilancia epidemiológica del COVID-19 en aguas residuales

Investigadores responsables: Rafael Sanjuán y Pilar Domingo-Calap

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

Paterna, 30 de noviembre de 2022

## Introducción

La vigilancia epidemiológica basada en aguas residuales nos permite realizar un seguimiento de la circulación de patógenos 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 la COVID-19. Sin embargo, en un escenario de pandemia, su uso generalizado en la población se ve 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. Por ejemplo, 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 residual. Sin embargo, son necesarios más estudios para determinar la validez de esta técnica. Asimismo, sería de interés poder extender esta aproximación a otros virus de importancia reciente, tales como el virus de la viruela del mono.

En el I2SysBio, centro mixto de la Universitat de València y el CSIC, llevamos analizando las aguas residuales de estaciones depuradoras del área metropolitana de Valencia 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>).

Desde mayo 2020, 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, hemos desarrollado las técnicas necesarias para realizar un seguimiento temporal de la incidencia del SARS-CoV-2 en nuestro entorno. En una primera fase, se pusieron a punto las técnicas de concentración, extracción y detección del material genético. Para concentrar el virus presente en las aguas, inicialmente usamos la centrifugación a alta velocidad, el cual tiene la ventaja de conservar intacta la infectividad del virus (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8266481/> ). No obstante, se trata de un método relativamente lento y poco escalable. En cuanto a la detección por métodos moleculares del SARS-CoV-2, se realiza utilizando la técnica de RT-qPCR con los cebadores

recomendados por el CDC (N1 y N2). También pusimos a punto la secuenciación de regiones relevantes del genoma del SARS-CoV-2 que nos permiten adscribir el virus a diferentes variantes de interés.

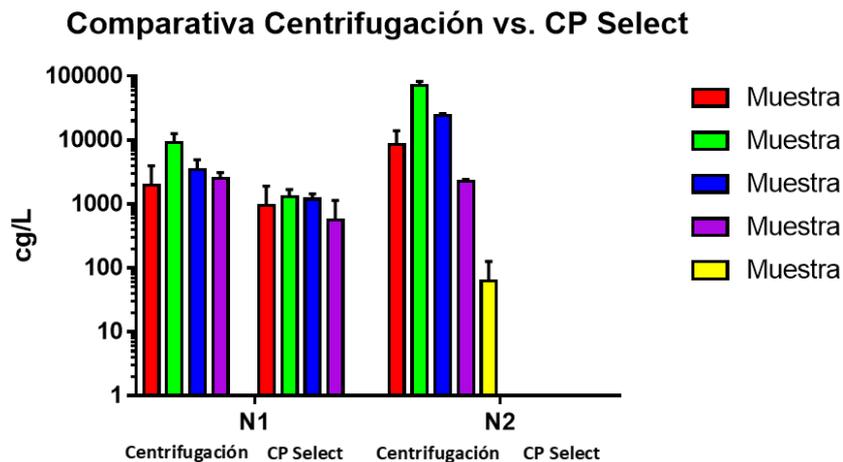
## **Objetivos**

Los objetivos que nos planteamos para la presente anualidad fueron los siguientes:

- Mejorar la técnica de concentración viral en aguas residuales para reducir el tiempo de obtención de resultados.
- Consolidar la calibración de la correlación entre la incidencia acumulada reportada por las autoridades y la carga viral detectada en las aguas residuales del área metropolitana de Valencia mediante un análisis que abarque un periodo de seguimiento de dos años.
- En ausencia de otros datos de incidencia global, investigar la viabilidad de un análisis de aguas residuales que alerte sobre la existencia de nuevas oleadas epidémicas en nuestra comunidad y que puedan ser tenidas en cuenta por las autoridades para la toma de decisiones.
- Realizar un seguimiento de la presencia de SARS-CoV-2 en las aguas residuales del área metropolitana de Valencia.
- Explorar la viabilidad de aplicar técnicas similares a otros virus circulantes en nuestra comunidad.

## **Resultados**

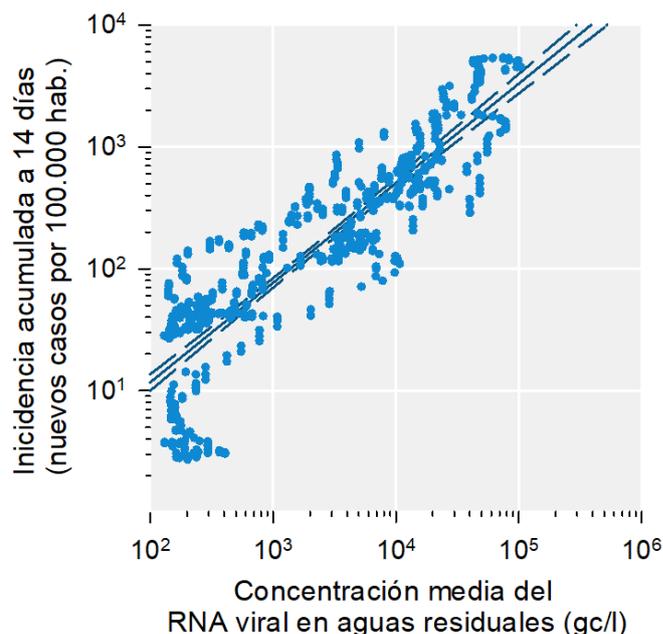
En primer lugar, se exploró el uso de técnicas alternativas a la centrifugación que nos permitiesen concentrar las aguas residuales de manera más rápida y eficaz. Hasta ahora, gracias a la puesta a punto del método basado en la centrifugación de alta velocidad, los resultados obtenidos eran reproducibles y representaban una buena metodología para determinar la carga viral del SARS-CoV-2 en las aguas residuales. Sin embargo, el proceso requiere horas de centrifugación que retrasan la obtención de resultados a tiempo real y se planteó implementar nuevas técnicas para reducir el tiempo de obtención de resultados. Para ello, se realizaron ensayos comparativos de concentración del virus en aguas residuales mediante la centrifugación de alta velocidad frente a la concentración con pipetas de ultrafiltración gracias a la Pipeta CP Select (Innovaprep). En una primera aproximación, se comparó el procedimiento rutinario con la concentración mediante la CP Select directamente, obteniéndose mejores resultados con la concentración mediante centrifugación de alta velocidad. Tal y como se observa en la Figura 1, los resultados muestran que la eficiencia es superior para la metodología de centrifugación, tanto para la región N1 como para la N2. Es llamativo cómo en la región N2, todos los resultados son negativos utilizando la CP Select, mientras que el número de copias obtenido mediante centrifugación es elevado.



**Figura 1.** Comparativa entre concentración de muestras de aguas residuales mediante centrifugación de alta velocidad y la pipeta CP Select. Se realizaron pruebas comparativas para 5 muestras diferentes, para las regiones N1 y N2 de SARS-CoV-2, para calcular las copias genómicas por litro (cg/L) para cada una de ellas.

Debido a los resultados obtenidos, se realizó una segunda aproximación modificando el protocolo y realizando un filtrado de las muestras por filtros de 0.45  $\mu\text{m}$  previo al uso de la CP Select para evitar el colapso de las pipetas ultrafiltrantes. Sin embargo, de nuevo, los resultados fueron mejores para la concentración mediante centrifugación de alta velocidad. Es por ello que los análisis fueron llevados a cabo mediante centrifugación, tal y como se había estado realizando.

En segundo lugar, se llevó a cabo un análisis de correlación entre la señal obtenida por qPCR y la incidencia acumulada de SARS-CoV-2 con el fin de consolidar la calibración que previamente habíamos llevado a cabo con datos de la primera anualidad (<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fviro.2021.776998/full>). Se tomaron un promedio de 3 muestras semanales de los caudales entrantes en las estaciones depuradoras de Pinedo 1 y Pinedo 2, se realizó por duplicado una qPCR sobre cada una de las regiones N1 y N2 del virus y se promedió el número de copias genómicas de SARS-CoV-2 por litro de agua (gc/L) a lo largo de 14 días. Cada uno de estos promedios se obtuvo pues a partir de 3 días \* 2 regiones virales \* 2 réplicas de qPCR = 12 datos, con ligeras variaciones en función de la disponibilidad de muestras. Estos datos se compararon con la incidencia acumulada del virus a lo largo de esos mismos 14 días. La figura 2 muestra la correlación entre ambos valores a lo largo del periodo que abarca desde abril de 2020 hasta septiembre de 2022. Puede observarse que existe una correlación significativa, validando así la metodología para el seguimiento de la incidencia virales haciendo uso de las aguas residuales.



**Figura 2.** Correlación entre concentración de RNA viral en aguas residuales (obtenida mediante centrifugación de alta velocidad) y la incidencia acumulada del SARS-CoV-2 en el periodo abril 2020 – noviembre 2022. Se muestra la línea de regresión y su intervalo de confianza al 95%.

Mediante un análisis de regresión lineal por mínimos cuadrados es posible obtener la siguiente estimación de la incidencia a 14 días (I) a partir de la concentración de RNA viral en las aguas (C):

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

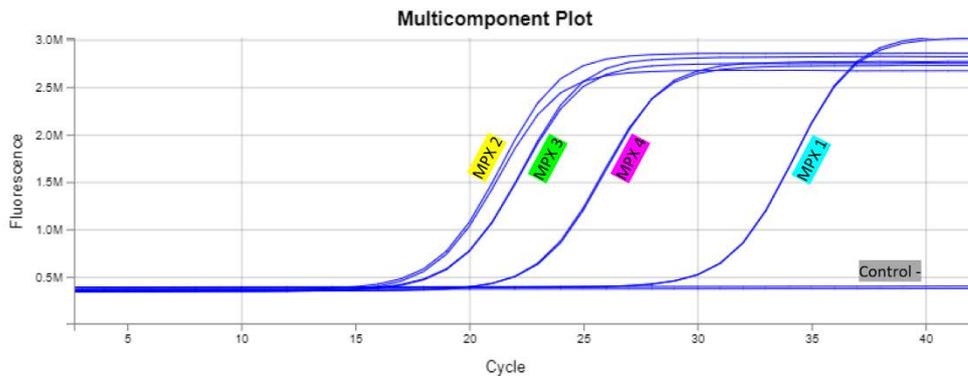
Es posible además establecer la siguiente clasificación:

gc/L	Incidencia	Número de observaciones
>1000	>100	376
>1000	<100	14
<1000	>100	32
<1000	<100	268

Esto significa que detectar una concentración media de RNA viral en aguas >1000 gc/L en un periodo de 14 días mediante la aproximación arriba descrita permite afirmar que la incidencia acumulada a 14 días es superior a 100 casos por cada 100.000 habitantes con una sensibilidad del 92% y una especificidad del 95% y, por tanto, una probabilidad global de acierto del 93%.

Puesto que el Sistema Nacional de Salud dejó de obtener datos de incidencia acumulada en la población general a principios de 2022, la metodología puesto a punto aquí ofrece una herramienta única para estimar dichos datos.

Por último, pusimos a punto la detección del virus de la viruela del mono mediante qPCR. Para ello, partimos de unas muestras positivas para poner a punto la técnica. La Figura 3 recoge los resultados de esta calibración inicial.



**Figura 3.** Detección por qPCR de muestras positivas para el virus de la viruela del mono (MPX). Se muestra la señal obtenida para diferentes concentraciones del virus, así como un control negativo que no contienen MPX.

### Conclusiones

Como era previsible, el esfuerzo diagnóstico del SARS-CoV-2 por PCR u otras técnicas basado en análisis individualizados ha decaído 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. En este contexto, disponer de un método de seguimiento basado en aguas residuales es de gran utilidad, tal y como recomienda la Comisión Europea. Los resultados aquí presentados avalan la posibilidad de implementar esta metodología en la ciudad de València. Gracias al presente convenio, ha sido posible no sólo poner a punto las técnicas necesarias, sino optimizarlas para poder llevar a cabo su aplicación práctica en Salud Pública. Sería interesante extender la metodología a otros virus cuyo seguimiento poblacional pueda resultar de interés.

**Rafael Sanjuán Verdeguer**

**Investigador responsable**

**Pilar Domingo Calap**

**Investigadora responsable**