



**Laboratory**  
of **Viruses** Contaminants  
of **Water** and **Food**



UNIVERSITAT DE  
BARCELONA



Institut de Recerca  
de l'Aigua | UNIVERSITAT DE  
BARCELONA

## Avances en el proceso de determinación del SARS-CoV-2 en las aguas residuales

Bofill-Mas S, Itarte M, Forés E, Martínez-Puchol S, Hundesa A, Girones R, Rusiñol M



**Sílvia Bofill-Mas**

@LabViruses 

[http://www.ub.edu/microbiologia\\_virology/en/](http://www.ub.edu/microbiologia_virology/en/)



**Laboratory**  
of **Viruses** Contaminants  
of **Water** and **Food**

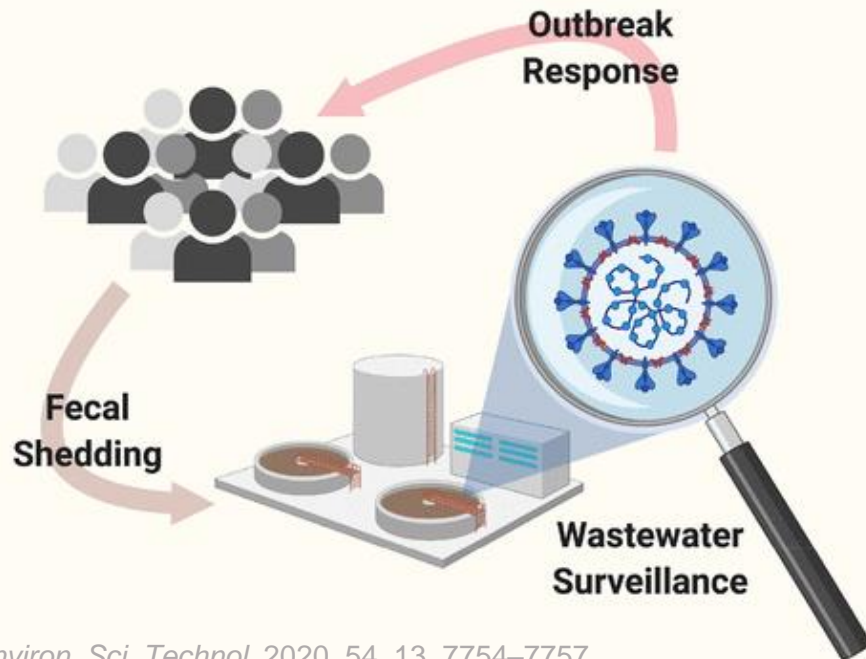


UNIVERSITAT DE  
BARCELONA



Institut de Recerca  
de l'Aigua | UNIVERSITAT DE  
BARCELONA

## Agua residual-epidemiología (Wastewater-based Epidemiology, WBE)



*Environ. Sci. Technol.* 2020, 54, 13, 7754–7757



**Laboratory**  
of **Viruses** Contaminants  
of **Water** and **Food**

## SARS-CoV-2 y WBE

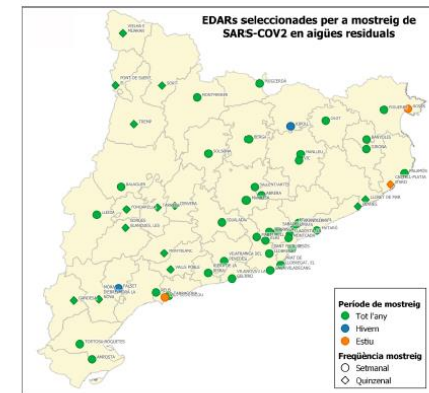


**Laboratory**  
of **Viruses** Contaminants  
of **Water** and **Food**

## Optimización de métodos

## Red de Vigilancia Catalunya

Localització de les 56 EDAR seleccionades. S'indica també període i freqüència de mostreig.



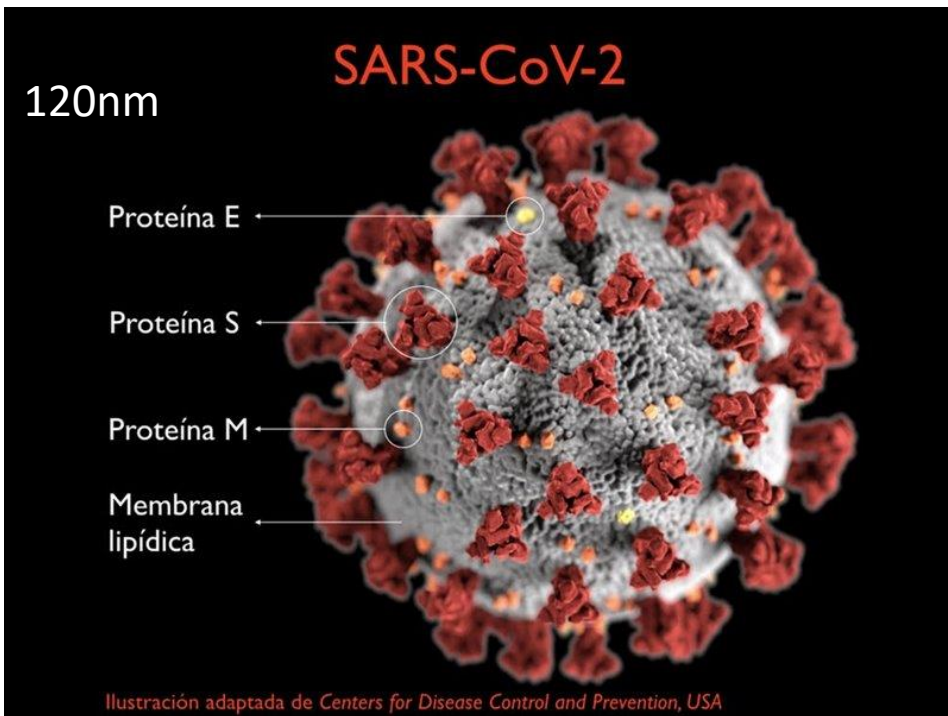
Generalitat de Catalunya  
**Agència de Salut Pública de Catalunya**



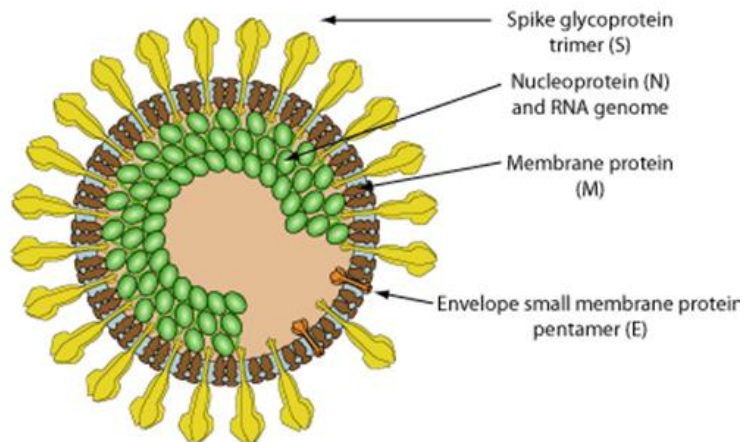
**Agència Catalana de l'Aigua**



## SARS-CoV-2 y WBE



SARS coronavirus



## Coronavirus humanos

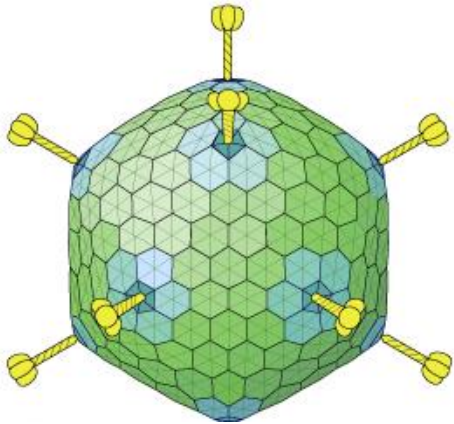
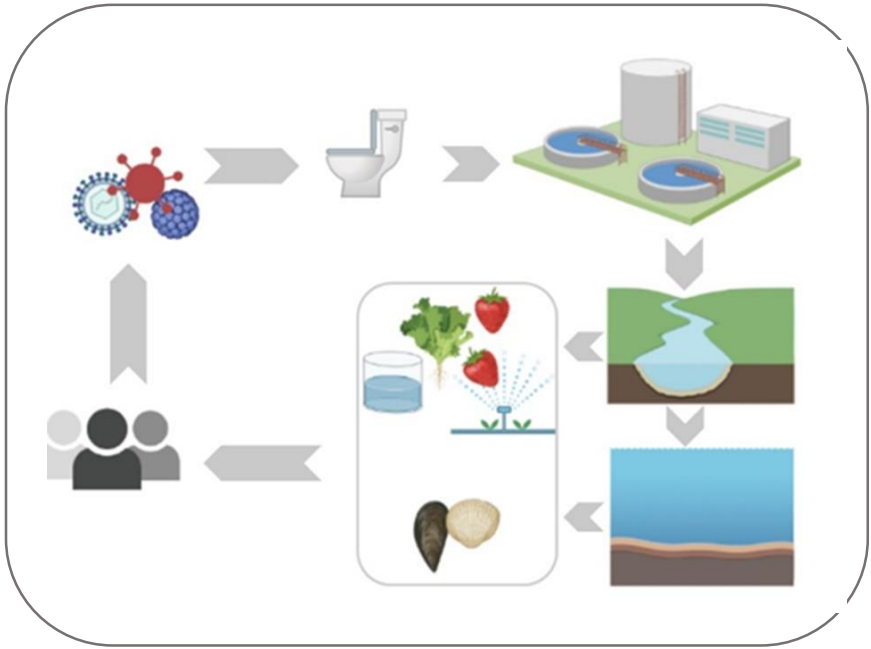
HCoV-229E, HCoV-OC43, HCoV-NL63 y  
HCoV-HKU1: **resfriado común**

SARSCoV1, MERS, SARSCoV2: **síndrome  
respiratorio agudo**

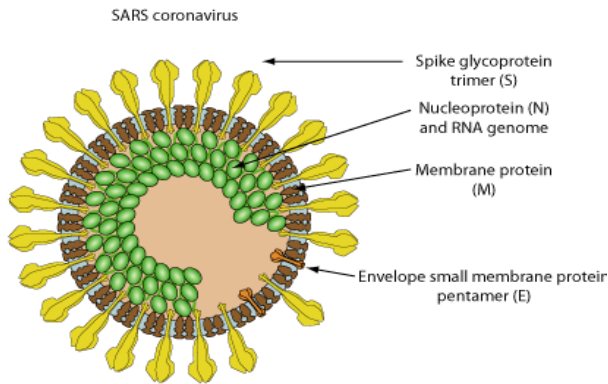


# SARS-CoV-2 y WBE

- Adenovirus
- Rotavirus
- Norovirus
- Enterovirus
- Hepatitis A Virus
- Hepatitis E Virus
- ...



*Virus desnudos*



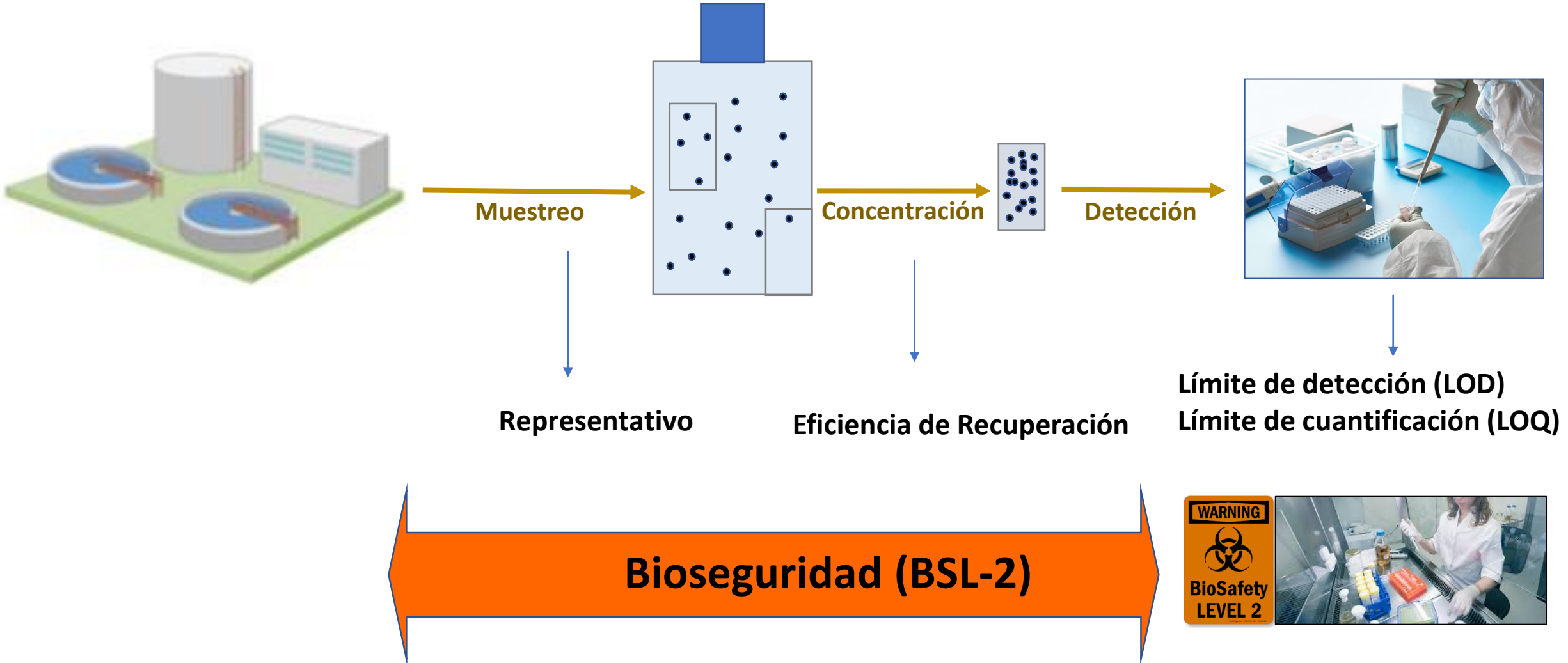
© ViralZone 2020

*Virus con envuelta*



**¿Qué método usar para concentrar virus con envuelta?**

# SARS-CoV-2 y WBE



## Optimización de métodos



**Centrifugal  
ultrafiltration**



**PEG/Al(OH)<sub>3</sub>  
flocculation-precipitation**



**Electronegative  
filtration**



**Ultracentrifugation**

# Optimización de métodos



Concentration methods for the quantification of coronavirus and other potentially pandemic enveloped virus from wastewater

Marta Rusiñol<sup>1,2,3</sup>, Sandra Martínez-Puchol<sup>1,3</sup>, Eva Forés<sup>1,3</sup>, Marta Itarte<sup>1,3</sup>, Rosina Girones<sup>1,3</sup>, Sílvia Bofill-Mas<sup>1,3</sup>

24h composite  
wastewater sample  
(150-200ml)



## VIRAL CONCENTRATION (SARS-CoV-2 and other enveloped viruses)



Centrifugal  
ultrafiltration

25.1-56.0%



PEG/Al(OH)<sub>3</sub>  
flocculation-precipitation

10.9-44.0%



Electronegative  
filtration

26.7-65.7%



Ultracentrifugation

1-33.5%

Viral recoveries  
calculated





## Optimización de métodos

¿Cómo evaluar métodos de concentración?



Comparar la eficiencia de dos o más métodos con muestras reales

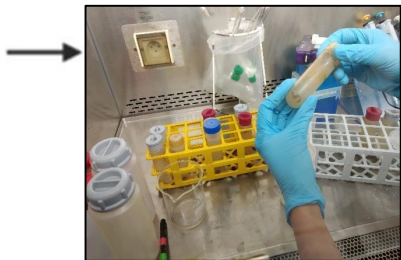


Añadiendo virus “**surrogate**” o substitutos: cálculo de % de recuperación

Murine hepatitis virus (MHV) / Murine Coronavirus	ATCC VR#-764, ATCC VR#-766, ATCC VR#-261	ss RNA, positive sense, enveloped	coronavirus, beta group	Mice	CEACAM1		1	TCID50. Takes ~ a week to grow. NCTC 1469 cell line (ATCC® CCL-9.1): ATCC VR 764; 1-2 days of incubation, VR 766; 1-2 day(s) of incubation; VR 261, 4-7 days of incubation, also note that this virus is genetically similar to COVID 19 (beta group).
Transmissible gastroenteritis virus (TGEV)	ATCC VR#-763	ss RNA, positive sense, enveloped	coronavirus, alpha group	Swine	Aminopeptidase N	BSL2/ \$593	1	
Canine coronavirus (CCV)	ATCC VR#-2068		coronavirus	Canine	Aminopeptidase N	\$593	1	\$593, ST cell line (ATCC CRL-1746) or CRFK cell (ATCC CCL): Naylor et. al. JCM 2001
Porcine respiratory coronavirus	ATCC VR#-2384	ss RNA, positive sense, enveloped	coronavirus, alpha group	Swine		BSL2/ \$593	1	ST cell line (ATCC CRL-1746): 2-3 days of incubation.

# Optimización de métodos

24h composite  
wastewater sample  
(150-200ml)



Debris elimination  
4800xg, 30 min

## Floculación Leche descremada



Spiking



Flocculation 10L  
water



Centrifugation  
and floc  
recovery

- ✗ Complicado para muchas muestras
- ✓ Barato, no precisa material fungible

## Centricon® Plus-70 30kDa



- ✓ Rápido
- ✗ Compatible con centrifugas con swinging bucket 250ml
- ✗ Difícil manipular en BSL-2
- ✗ Filtros de un solo uso
- ✗ Dificultades para adquirir filtros

Pipette  
Concentrator  
Innovaprep  
CP Select  
Ultrafiltration Tips  
150KDa



- ✓ Rápido
- ✓ Eución instantanea (Wet Foam Elution™ process)
- ✓ Permite trabajar en cabina BSL-2
- ✗ Precisa equipo
- ✗ Pipetas de un solo uso



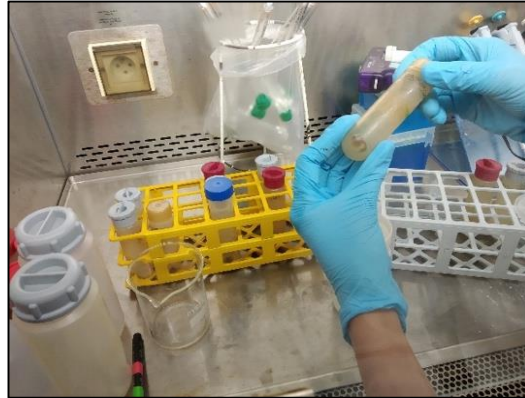
Resultados en 24  
horas

# Optimización de métodos

24h composite  
wastewater sample  
(150-200ml)



Eliminación material en suspensión  
4800xg, 30 min



Centricon® Plus-70 30kDa



Dopar muestras  
Bacteriofago MS2

Murine Hepatitis  
Virus (MHV)



Pipette Concentrator  
Innovaprep  
CP Select  
Ultrafiltration Tips  
150KDa

200-800µl  
concentrado  
viral

Extracción  
ARN

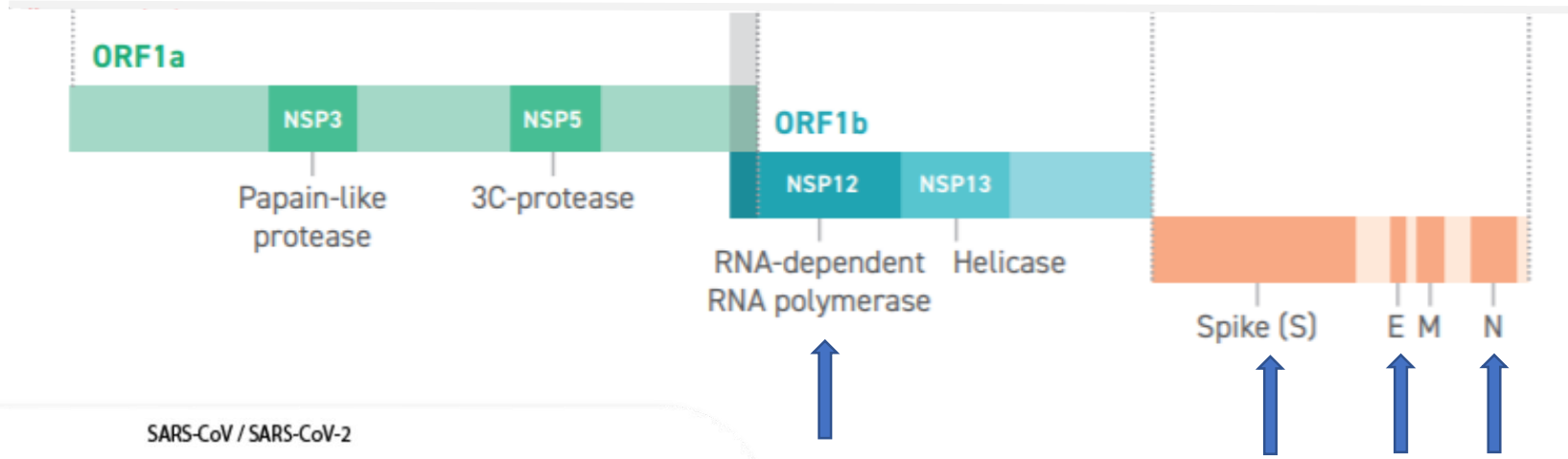
Detección  
qPCR

**DIANA: SARS-CoV-2**

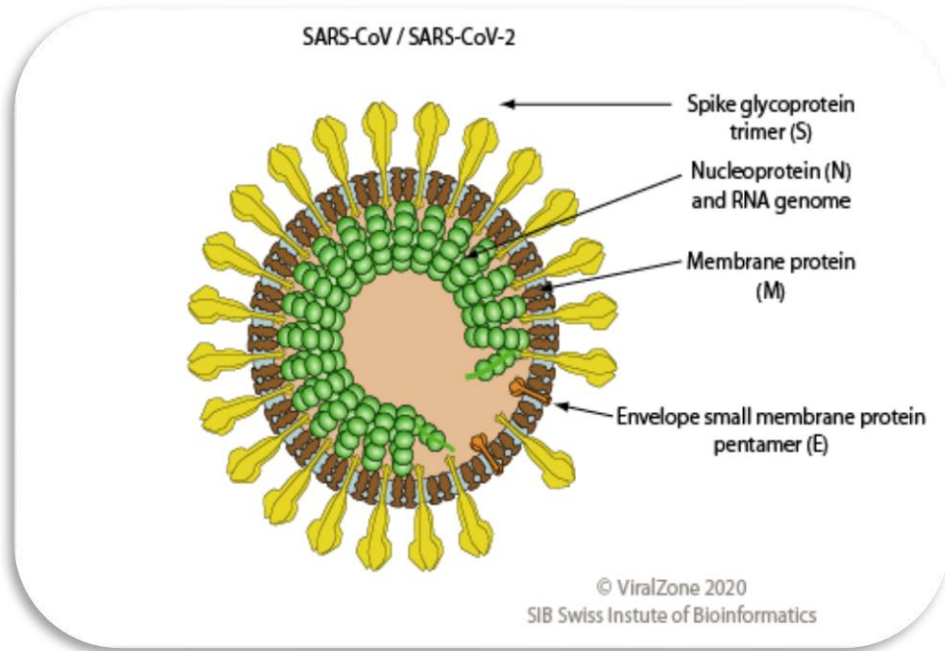
**CONTROL PROCESO/RECUPERACIÓN: MS2 y MHV**

**CONTROL CONTAMINACIÓN FECAL VIRAL:  
Adenovirus humanos, poliomavirus JC  
(crassphage, PMMV)**

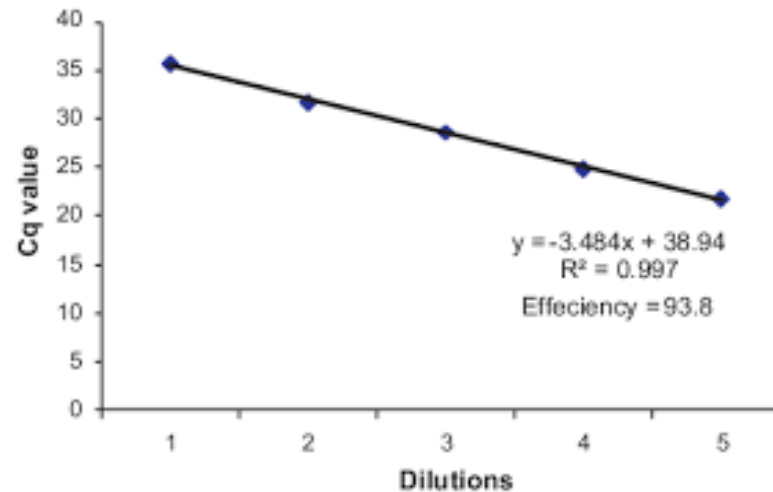
# Optimización de métodos



Kits qPCR

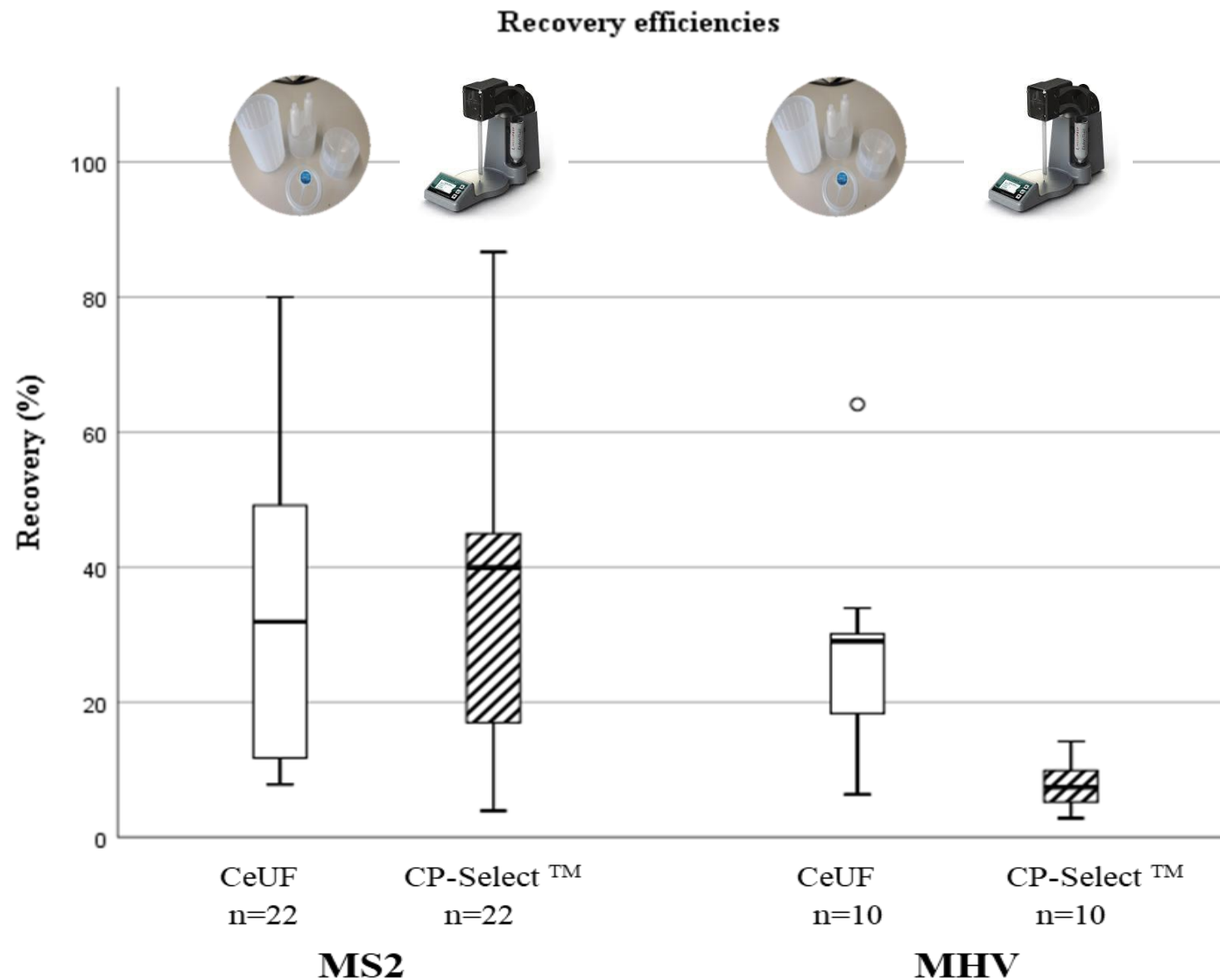
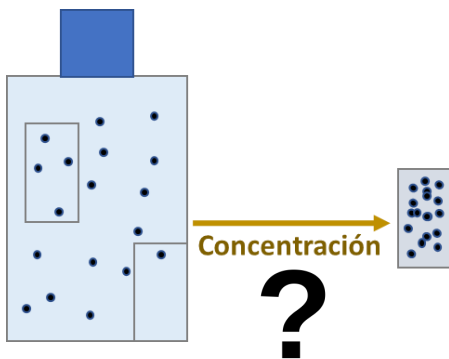


N1, N2



RNA referencia

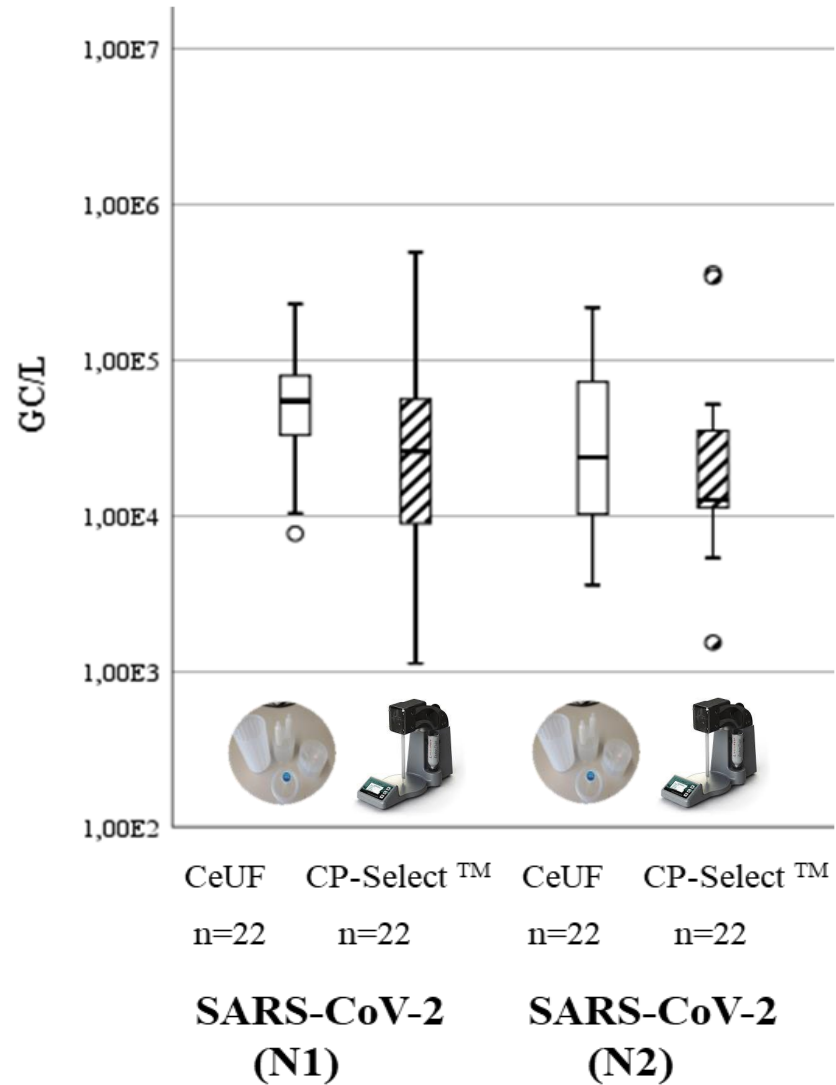
# Optimización de métodos



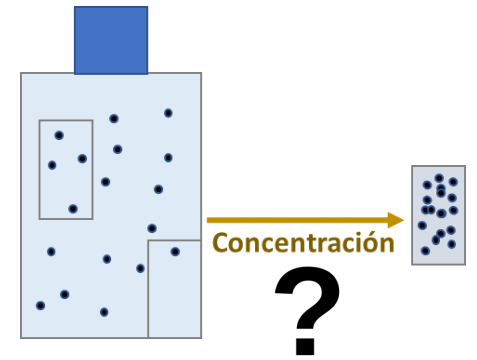
Viurs Surrogates (substitutos)

# Optimización de métodos

## Method comparison with naturally occurring viruses



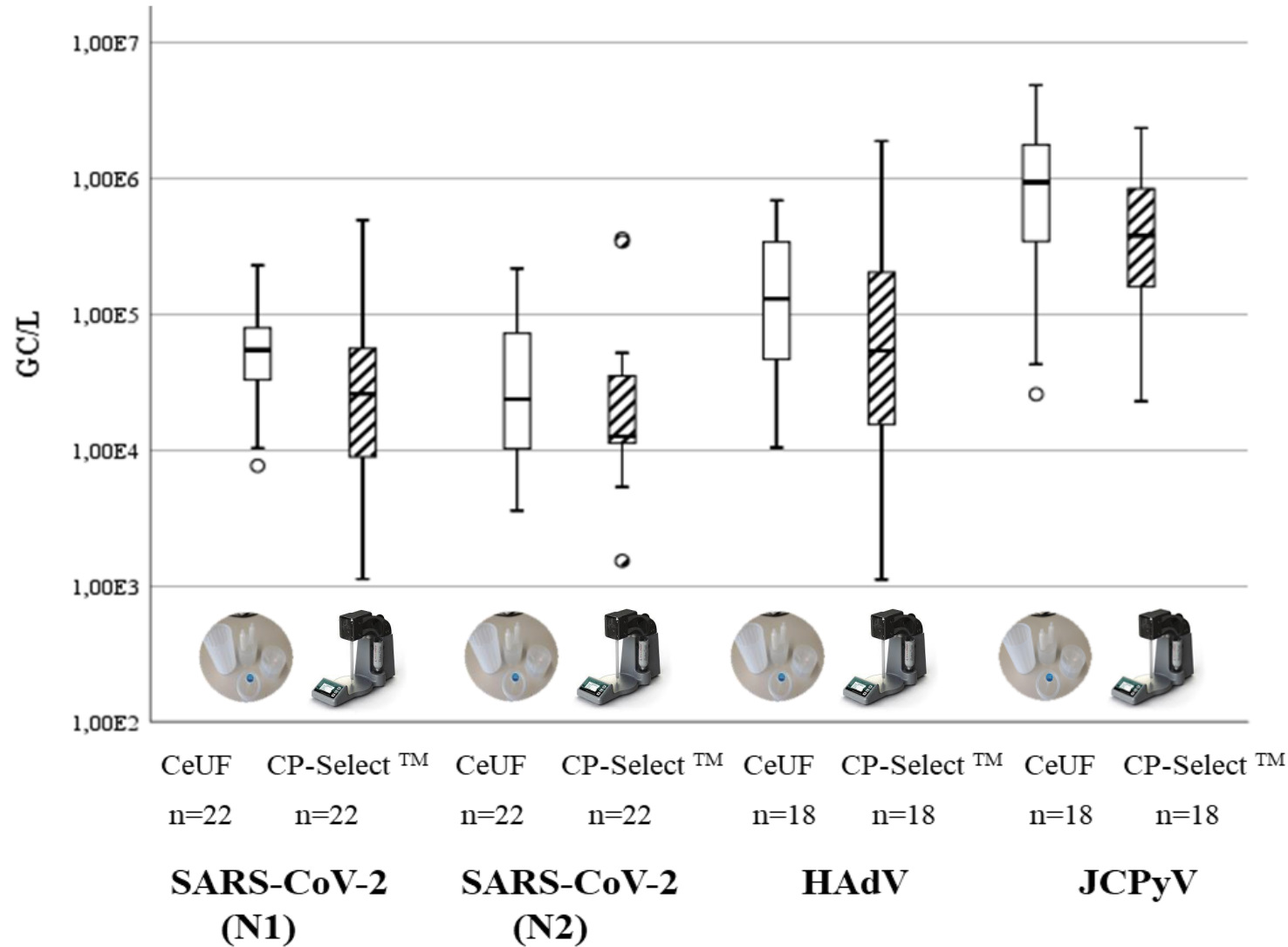
Virus presentes en aguas residuales



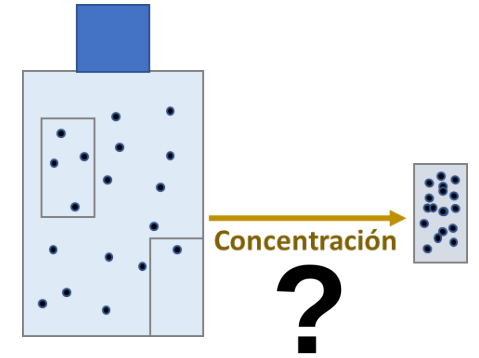
No statistically significant differences were observed between both concentration methods for naturally occurring viruses in wastewater (p-value 0.783).

# Optimización de métodos

Method comparison with naturally occurring viruses



Virus presentes en aguas residuales

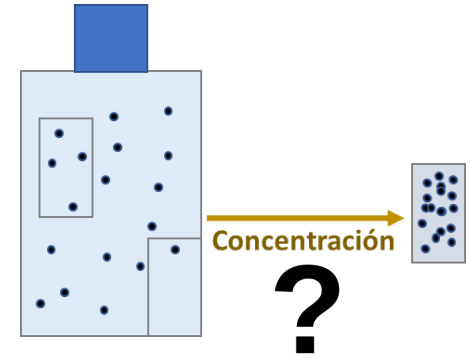


No statistically significant differences were observed between both concentration methods for naturally occurring viruses in wastewater (p-value 0.783).

## Optimización de métodos



**Caracterizar y validar el método empleado!**

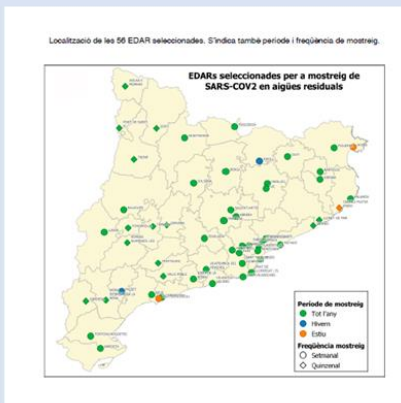


	CP-Select™	CeUF
<b>Sample volume analyzed</b>	1,56-2,92 ml	0,91-2,19 ml
<b>Concentration factor</b>	133-333x	77-250x
<b>LoD<sub>95%</sub> (CI)*</b>	MS2: $5,14 \times 10^3$ ( $3,02 \times 10^3 - 9,40 \times 10^3$ ) MHV: $6,19 \times 10^3$ ( $2,43 \times 10^3 - 1,58 \times 10^4$ )	MS2: $5,67 \times 10^3$ ( $3,22 \times 10^3 - 1,03 \times 10^4$ ) MHV: $6,61 \times 10^3$ ( $2,59 \times 10^3 - 1,68 \times 10^4$ )
<b>LoQ*</b>	MS2: $2,32 \times 10^3$ MHV: $2,35 \times 10^4$	MS2: $3,56 \times 10^3$ MHV: $2,51 \times 10^4$
<b>Mean recovery ± SD (CV)</b>	MS2: $27,72 \pm 24,46\%$ (0,65) MHV: $7,51 \pm 6,14\%$ (0,68)	MS2: $26,34 \pm 22,71\%$ (0,66) MHV: $24,07 \pm 14,48\%$ (0,58)

\*LoD<sub>95%</sub> and LoQ values are given in genome copies detected per liter of the original wastewater sample. CI: confidence interval; SD: Standard deviation; CV: coefficient of variation.



# Red de Vigilancia Catalunya



Generalitat de Catalunya  
**Agència de Salut Pública de Catalunya**

**Agència Catalana de l'Aigua**

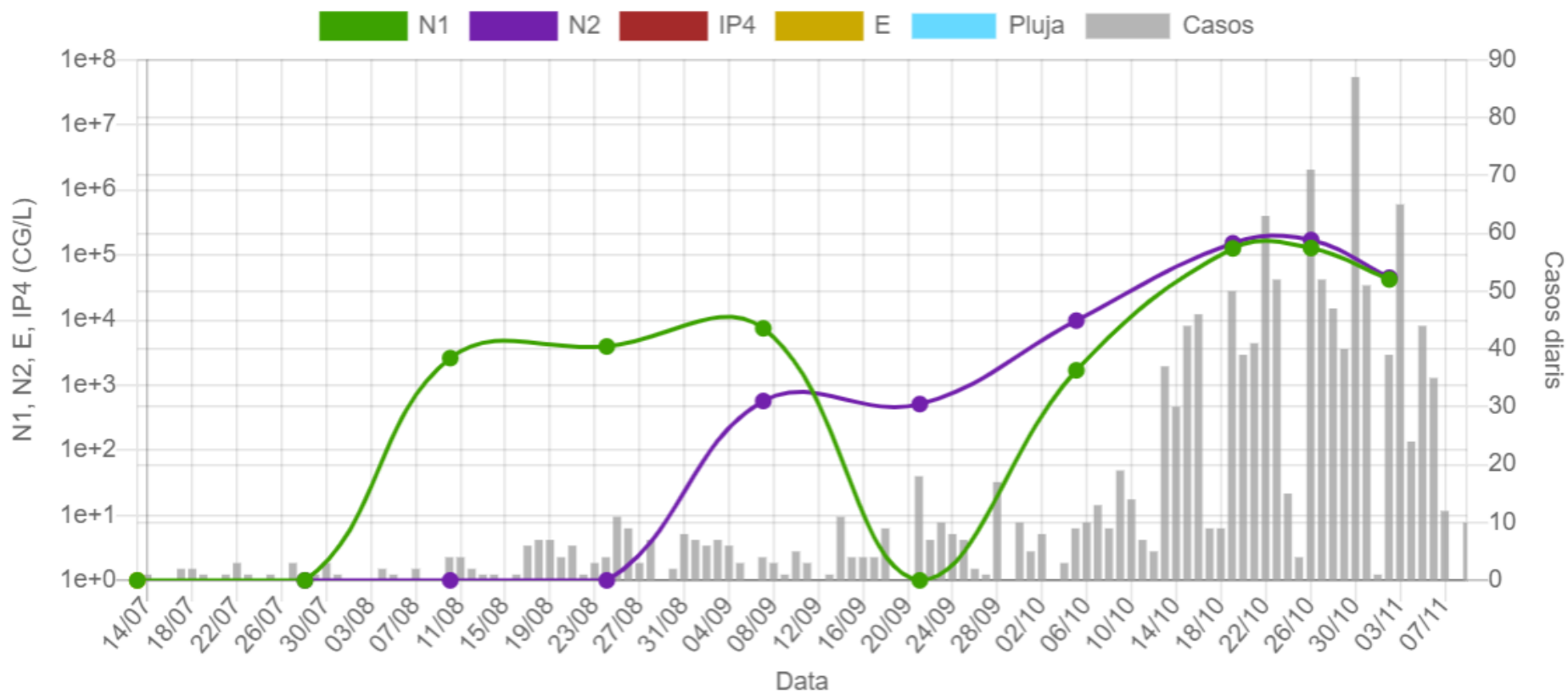
VIRUS ENTERICS  
 UNIVERSITAT DE BARCELONA  
 www.ub.edu/virusenterics

Laboratory of Viruses Contaminants of Water and Food

eurecat  
 Centre Tecnològic de Catalunya

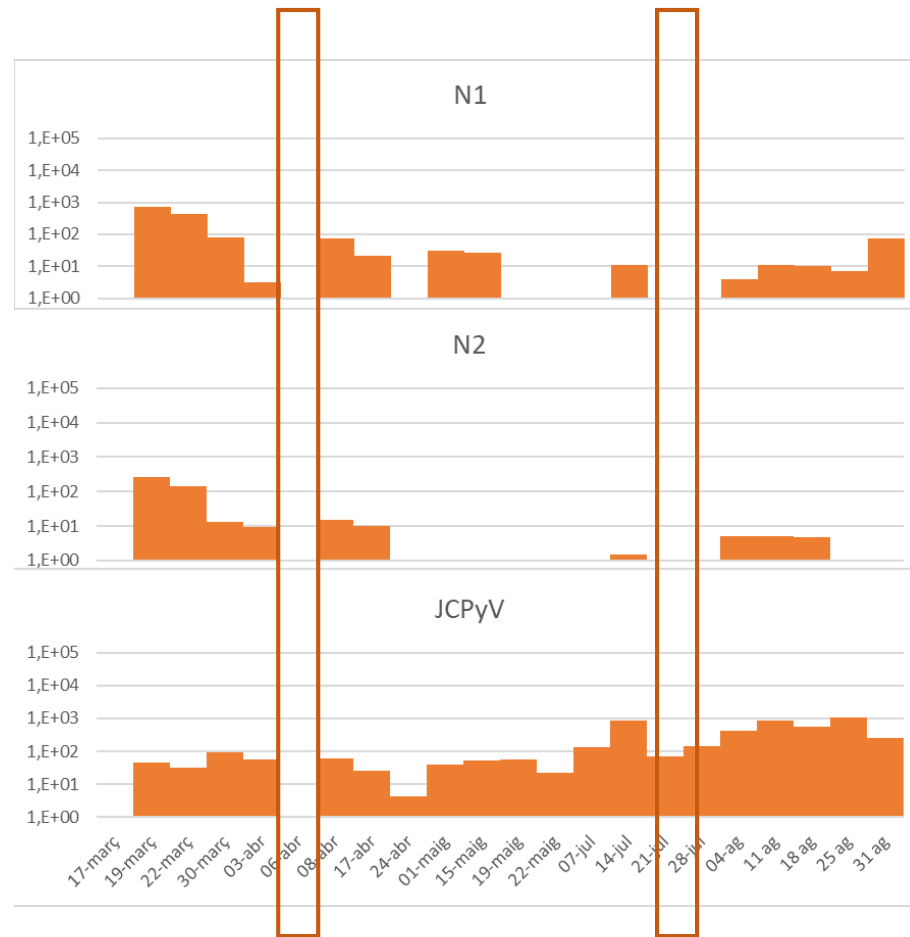
ICRA  
 Catalan Institute for Water Research

**Evolució del número de còpies genòmiques detectades i nombre de casos Covid-19**



# Red de Vigilancia Catalunya

Parámetros normalizadores





A falta de métodos estandarizados es aconsejable usar métodos **caracterizados** (límites detección) y **validados**, utilizar **material de referencia**, incluir **controles de proceso** y virus indicadores u otros **parámetros normalizadores**


En un futuro será importante disponer de los **métodos más sensibles posibles**, que analicen un V de agua residual lo más **representativo** posible con el fin de detectar posibles reemergencias del virus



**Laboratory**  
of **Viruses** Contaminants  
of **Water** and **Food**



Rosina Girones, Sílvia Bofill, Marta Rusiñol, Eva Forés,  
Sandra Martínez-Puchol, Marta Itarte, Ayalkibet Hundesa

@LabViruses @MasBofill 

[http://www.ub.edu/microbiologia\\_virology/en/](http://www.ub.edu/microbiologia_virology/en/)

# Gracias!