

AVANCES Y EXPERIENCIAS EN LA MONITORIZACIÓN DEL SARS-COV-2 EN LAS AGUAS RESIDUALES URBANAS

Pedro Arroyo

11 de noviembre 2020

Contenidos

- Introducción
- Toma de muestras
- Trazabilidad
- Análisis de las muestras
- Conclusiones y aplicación



Introducción



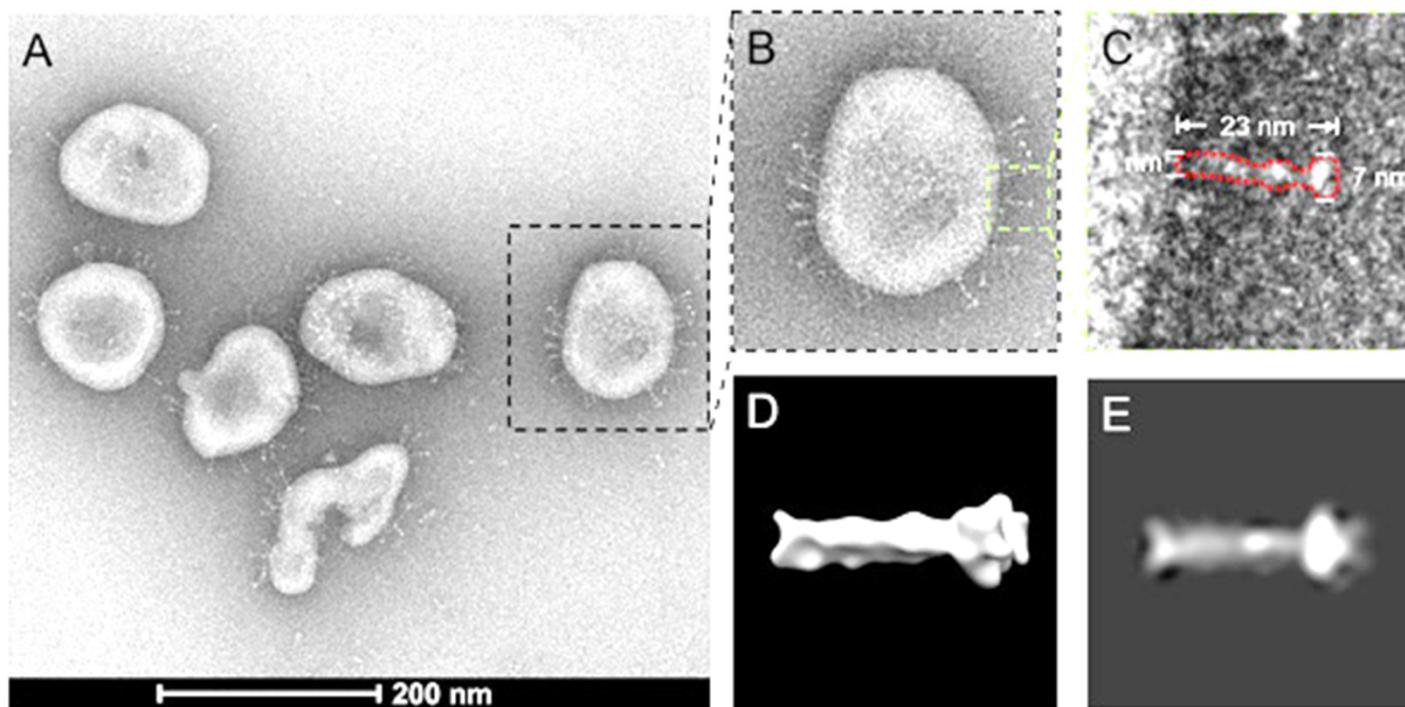
AQUAVALL: Indicadores generales	2019
Población abastecida	344.281
Vol. Distribuido diario para consumo m³	74.556
Dotación general de consumo (l/hd)	216,6
Vol. anual suministrado m³	27.213.017
Vol. anual agua residual generado m³	44.965.584
Importe de cifra de negocio €	27.041.664
Longitud red alcantarillado Km	776,74
Tanques de tormenta	14
Estaciones de bombeo	17
Habitantes equivalentes caudal depurado	751.600
EDARs	1
Municipios conectados	6

Municipios conectados a EDAR: Valladolid, Arroyo de la Encomienda, Laguna de Duero, Simancas, Zaratán, La Cistérniga

Toma de muestras

Fundamentos:

- El **SARS-CoV-2** está presente en heces, aunque con muy baja infectividad. Sus trazas aparecen en las aguas residuales.
- Las trazas excretadas persisten hasta **27,9 días** desde el primer síntoma, 11,2 días más que en muestras respiratorias.
- Estas trazas excretadas se encuentran **diluidas** en todo el caudal de agua entrante en la EDAR: resto de aguas domésticas e industriales, pluviales, freáticos.



<https://www.quo.es/ciencia/q2003299040/foto-imagen-estructura-coronavirus/>

Toma de muestras

Protocolo:



- Recomendaciones generales de **bioseguridad** de nivel BSL-2 (P2).
- Manipulación en laboratorio de nivel 2 de **contención biológica** (NCB2).
- Asegurar la **trazabilidad** de la muestra mediante el acta de toma de muestras.



Acta de toma de muestras con:

- Identificación de la **muestra**, del **tomador** y de la **forma de envío** a laboratorio.
- Identificación del **punto de toma**, **hora** y **proceso** de captación.
- Captación de al menos **500ml** para **muestras simples**, y, con un total mínimo **100ml** por submuestra en compuestas de 5 submuestras.
- **Valladolid** toma **muestras simples** los **domingos a las 12h**, punta de vertido doméstico a las 9:30h + 2,5h para transporte por la red.
- Consignar los **parámetros de caracterización físico química** que adicionalmente se deseen realizar, captando al menos **2l** más en este caso.
- **Conservación** a menos de 10°C. **Almacenamiento** a $3 \pm 2^\circ\text{C}$. **Transporte** a $5 \pm 3^\circ\text{C}$, según ISO 5667-3:2012.
- Realización de **medidas complementarias in situ**: conductividad, turbidez, temperatura, caudal instantáneo.



Trazabilidad

Cadena de custodia:

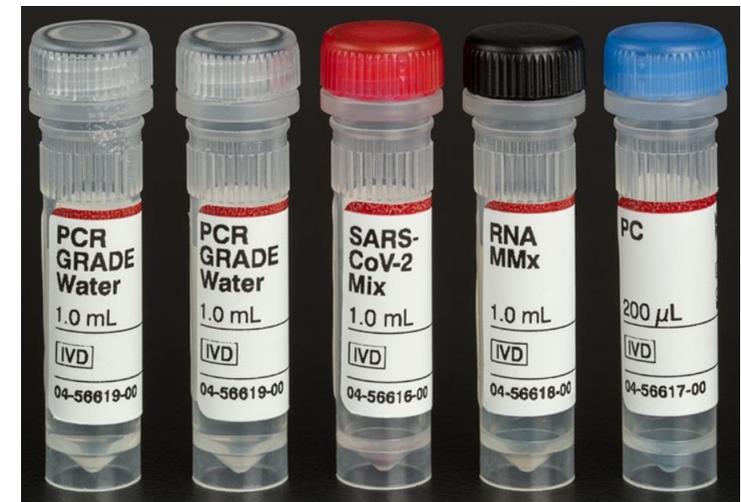
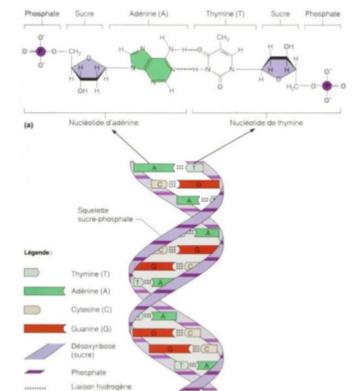
- Asegurar la llegada de la muestra y su análisis en laboratorio antes de **48h**.
- **Transporte refrigerado**. Si la demora supera las 48h la muestra debe **congelarse**.
- Etiquetas exteriores advirtiendo de **Riesgo Biológico**.
- **Desinfección del embalaje** a su recepción en laboratorio y antes de su apertura.
- **Preservación de alícuota** de la muestra en congeladores de laboratorio -20 a -80 °C.



Kit RT-qPCR (quantitative reverse Polymerase Chain Reaction)

Contenido:

- **Polimerasa:** enzima capaz de replicar ácidos nucleicos (ADN/ARN).
- **Nucleótidos:** monómeros compuestos de base nitrogenada, pentosa y fosfato, que forman los ácidos nucleicos (ADN/ARN) y aportan energía a las reacciones.
- **“Primer’s”** (iniciador ó cebador) para regiones diana:
 - **IP4** (identificador de las secuencias de ARN).
 - **E** (proteína de la envoltura del virus)
 - **N1** (nucleoproteína del SARS-CoV-2).
- **Marcador de fluorescente** asociado a “primer’s”.



Análisis de las muestras

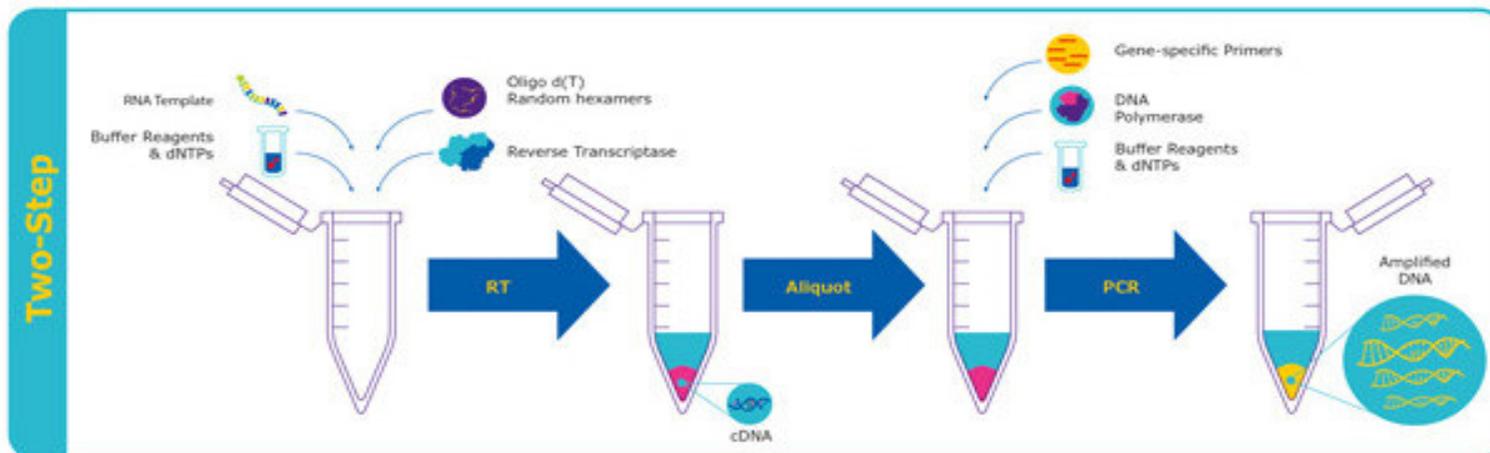
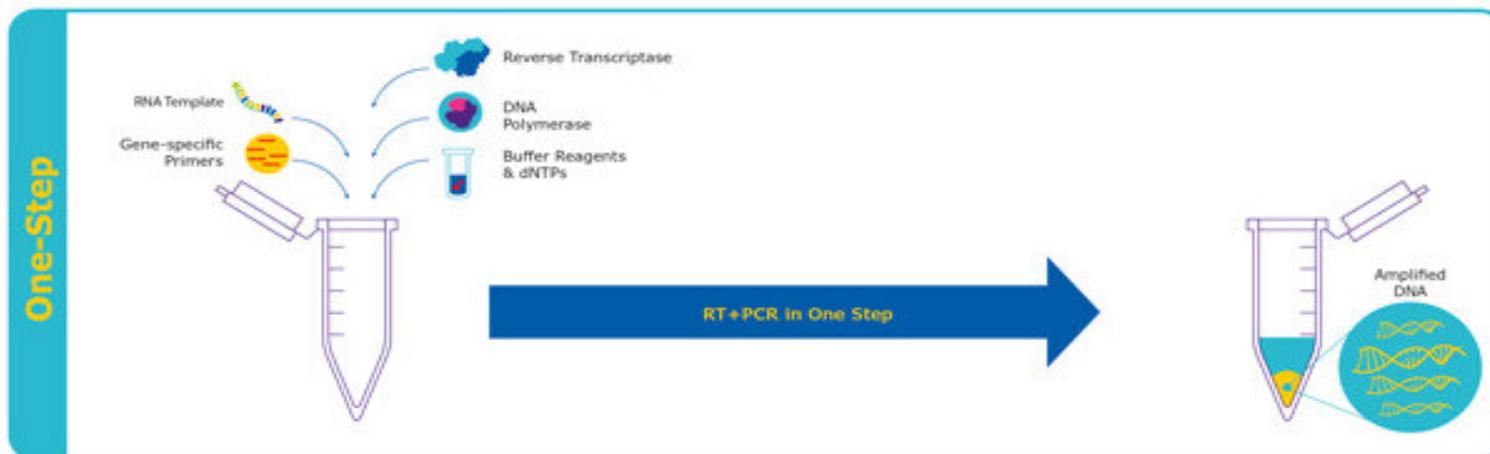
Análisis RT-qPCR (quantitative reverse Polymerase Chain Reaction)

Funcionamiento básico:

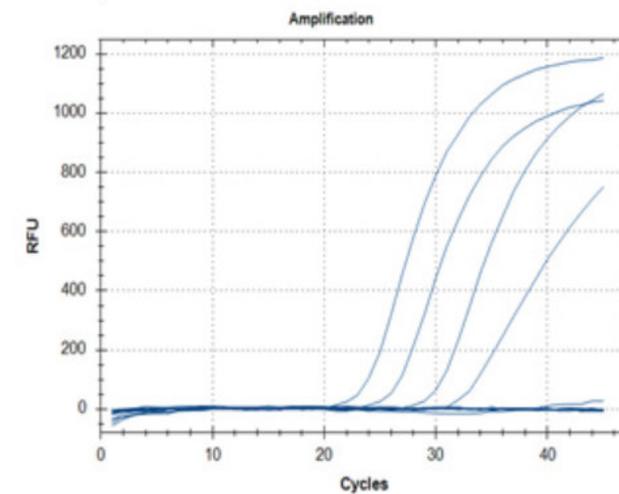
- **Concentración** de la muestra, p.e. por precipitación, centrifugado....
- **Extracción** de ARN, p.e. con separador magnético
- **Conversión del ARN en ADN** de doble cadena, p.e. con enzima transcriptasa inversa
- **Amplificación**: duplicación secuencial de cadenas de polimerasa hasta 40 veces...
 - Nº de cadenas creadas: hasta 2^{40} : 1.099.511.627.776
- **Identificación** con fluorescencia mediante combinación con “primer’s” representativos.
- **Ciclo de iteración de amplificaciones.**
- **Resultado del test**: conjunto de identificaciones tras el ciclo de amplificaciones
 - **Negativo**: 40 ciclos sin combinación de “primer’s”
 - **Positivo**: combinación en ciclo $n < 40$
 - Cálculo de concentración según dilución 2^n en cg/L (copias del genoma del virus por litro).



Análisis de las muestras



A: ensayo N1



Análisis de las muestras

Resultados de los análisis RT-qPCR

RESULTADOS MUESTRAS EDAR

Fecha: 05/11/2020

Nº informe: 14

Nd: No detectado

En rojo: <LC

NT: No testeado

	LABORATORIO	IP4 (log10 cg/L)	E (log10 cg/L)	N1 (log10 cg/L)
Limite de cuantificación (LC)	IATA	2,82	3,82	3,82
	CEBAS	2,87	4,17	4,18
	USC	3,20	4,08	3,82
	UB	3,52	3,52	3,52

LC: cantidad más pequeña del analito (ARN del virus) que se puede cuantificar por la técnica utilizada (RT-qPCR) de forma reproducible y confiable

Resultado SARS-CoV-2

- **NEGATIVO**→ Las dianas determinadas (IP4, E y N1) son negativas
- **POSITIVO**→ Hay detección robusta para una de las dianas (IP4, E o N1), o detección para dos de las dianas, aunque la determinación sea por debajo del límite de cuantificación.
- **PRESUNTO POSITIVO**→ Solo hay detección para una de las dianas, y esta no es muy robusta, siendo una diana positiva, y las otras dos negativas

CÓDIGO MUESTRA	LUGAR DEL MUESTREO	ID EDAR	LABORATORIO DE ANÁLISIS	FECHA TOMA MUESTRA	PUNTO MUESTREO	Diana IP4		Diana E		Diana N1		Resultado SARS-CoV-2
						IP4 (log10 cg/l)	Error Est IP42	E (log10 cg/l)	Error Est E2	N1 (log10 cg/l)	Error Est N12	
200719-EDAR_23-E	Valladolid	EDAR_23	CEBAS	19/07/2020	ENTRADA	Nd		Nd		Nd		Negativo
200726-EDAR_23-S	Valladolid	EDAR_23	CEBAS	26/07/2020	SALIDA	Nd		Nd		Nd		Negativo
200726-EDAR_23-E	Valladolid	EDAR_23	CEBAS	26/07/2020	ENTRADA	3,29	3,45	Nd	Nd	5,06	4,34	Positivo
200802-EDAR_23-E	Valladolid	EDAR_23	CEBAS	02/08/2020	ENTRADA	4,31	4,47	Nd		4,69	4,34	Positivo
200809-EDAR_23-S	Valladolid	EDAR_23	CEBAS	09/08/2020	SALIDA	Nd		Nd		Nd		Negativo
200809-EDAR_23-E	Valladolid	EDAR_23	CEBAS	09/08/2020	ENTRADA	4,66	4,56	3,06	3,08	4,71	4,06	Positivo
200816-EDAR_23-E	Valladolid	EDAR_23	CEBAS	16/08/2020	ENTRADA	Nd		Nd		5,83	5,80	Positivo
200823-EDAR_23-S	Valladolid	EDAR_23	CEBAS	23/08/2020	SALIDA	Nd		Nd		Nd		Negativo
200823-EDAR_23-E	Valladolid	EDAR_23	CEBAS	23/08/2020	ENTRADA	4,04	3,66	Nd		5,55	4,94	Positivo
200830-EDAR_23-E	Valladolid	EDAR_23	CEBAS	30/08/2020	ENTRADA	3,91	3,52			5,65	5,31	Positivo
200906-EDAR_23-S	Valladolid	EDAR_23	CEBAS	06/09/2020	SALIDA	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT
200906-EDAR_23-E	Valladolid	EDAR_23	CEBAS	06/09/2020	ENTRADA	3,57	2,64			4,95	4,97	Positivo
200913-EDAR_23-E	Valladolid	EDAR_23	CEBAS	13/09/2020	ENTRADA	5,02	3,93	5,59	4,22	5,68	5,65	Positivo
200920-EDAR_23-E	Valladolid	EDAR_23	CEBAS	20/09/2020	ENTRADA	3,64	3,42			5,06	4,75	Positivo
200927-EDAR_23-E	Valladolid	EDAR_23	CEBAS	27/09/2020	ENTRADA	3,64	3,43			4,85	4,65	Positivo
201004-EDAR_23-E	Valladolid	EDAR_23	CEBAS	04/10/2020	ENTRADA	4,20	4,27			4,61	4,56	Positivo
201011-EDAR_23-E	Valladolid	EDAR_23	CEBAS	11/10/2020	ENTRADA	5,45	5,57			5,50	5,01	Positivo
201018-EDAR_23-E	Valladolid	EDAR_23	CEBAS	18/10/2020	ENTRADA	5,59	5,71			5,82	5,13	Positivo
201025-EDAR_23-E	Valladolid	EDAR_23	CEBAS	25/10/2020	ENTRADA	4,56	4,14			5,64	5,64	Positivo

Codificación:
Fecha **AAMMDD**-EDAR_**ID**- **E**(entrada)/**S**(salida)

DIANAS:

- **IP4:** identificador de las secuencias de ARN.
- **E:** proteína de la envoltura del virus.
- **N1:** nucleoproteína del SARS-CoV-2.

Error Est: Desviación estándar de las repeticiones respecto al promedio de cada diana.

Análisis de las muestras

Interpretación de RT-qPCR

- Se analiza la **evolución** de los resultados puntuales, referidos al límite de cuantificación (muestra simple de frecuencia semanal expresado en log10 cg/L)
- Se interpretan las **tendencias** de la concentración logarítmica.

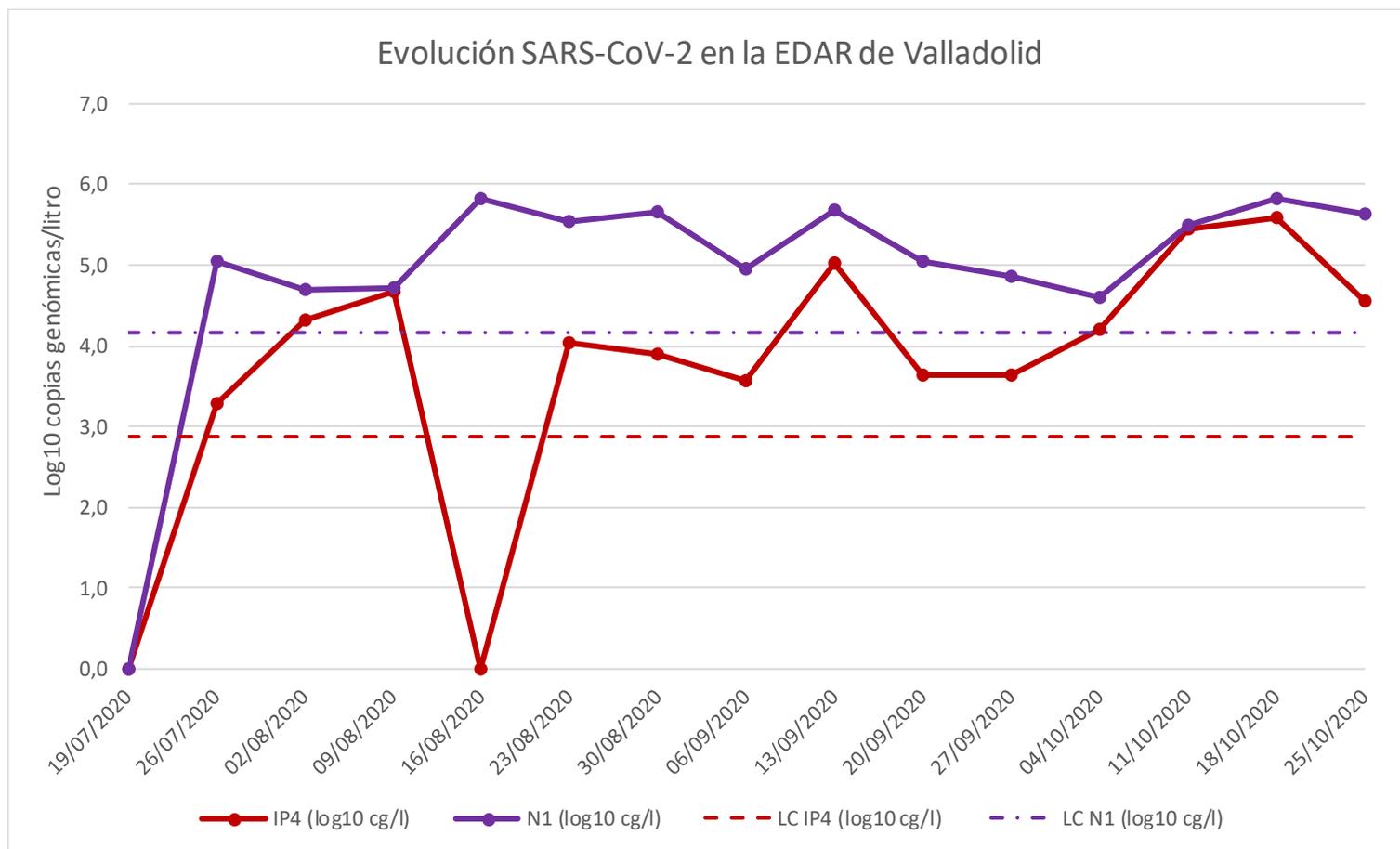
FECHA TOMA MUESTRA	IP4 (log10 cg/l)	E (log10 cg/l)	N1 (log10 cg/l)	Resultado SARS-CoV-2	Variación IP4 ¹ (Ulog)	Variación E ¹ (Ulog)	Variación N1 ¹ (Ulog)	Promedio variación (Ulog) ¹	Variación
19/07/2020	Nd	Nd	Nd	Negativo					S/D
26/07/2020	3,29	Nd	5,06	Positivo					Aumento
02/08/2020	4,31	Nd	4,69	Positivo	1,02		-0,37	0,33	Estable
09/08/2020	4,66	3,06	4,71	Positivo	0,35		0,02	0,18	Estable
16/08/2020	Nd	Nd	5,83	Positivo			1,12	1,12	Aumento significativo
23/08/2020	4,04	Nd	5,55	Positivo			-0,28	-0,28	Estable
30/08/2020	3,91		5,65	Positivo	-0,13		0,10	-0,02	Estable
06/09/2020	3,57		4,95	Positivo	-0,34		-0,70	-0,52	Disminución
13/09/2020	5,02	5,59	5,68	Positivo	1,45		0,73	1,09	Aumento significativo
20/09/2020	3,64		5,06	Positivo	-1,39		-0,62	-1,01	Disminución significativa
27/09/2020	3,64		4,85	Positivo	0,00		-0,21	-0,10	Estable
04/10/2020	4,20		4,61	Positivo	0,56		-0,24	0,16	Estable
11/10/2020	5,45		5,50	Positivo	1,26		0,89	1,07	Aumento significativo
18/10/2020	5,59		5,82	Positivo	0,13		0,33	0,23	Estable
25/10/2020	4,56		5,64	Positivo	-1,02		-0,18	-0,60	Disminución

1. Se calcula cuando hay detección para la diana ambas semanas. En caso de ser inferior al LC, se toma el valor de este para obtener las variaciones. La variación cualitativa se obtiene en base a los siguientes intervalos: <-1 unidades logarítmicas de diferencia "Disminución significativa"; -1 a -0,4 "Disminución"; -0,4 a 0,4 "Estable"; 0,4 a 1 "Aumento"; >1 "Aumento significativo".

Conclusiones y aplicación

Conclusiones

- Si hay disparidad entre las dianas, la tendencia deberá confirmarse en las siguientes muestras.
- La detección de trazas genómicas no siempre está correlacionada con unidades infecciosas.
- Los resultados deben verificarse con otros indicadores de vigilancia epidemiológica.



Conclusiones y aplicación

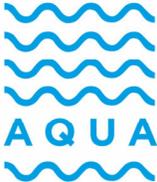
Aplicaciones:

- Dato para una **monitorización temprana** de un incremento en la carga vírica de la población.
- Comparación de la **evolución de concentración genómica** en el tiempo y entre diferentes municipios.

Otros usos:

- Complemento para la **localización de focos** (con muestreo en municipios del alfoz, cuencas vertientes, colectores ó acometidas).
- Experiencia para monitorización de **otros patógenos emergentes** con procedimientos sencillos y baratos.
- Probar el **potencial de información** de las aguas residuales para monitorizar drogas, medicamentos y otros contaminantes.

Código EDAR	EDAR	Municipio	Resultado SARS-CoV-2	Evolución desde la semana anterior ¹
EDAR_01	PINEDO 1	VALENCIA	Positivo	Estable
EDAR_02	DON BENITO	DON BENITO	Positivo	Disminución significativa
EDAR_03	LA GOLONDRINA	CÓRDOBA	Positivo	Estable
EDAR_04	GRANADA SUR	GRANADA	Positivo	Aumento significativo
EDAR_05	REZA	ORENSE	Positivo	Aumento
EDAR_06	GUADALHORCE	MÁLAGA	Positivo	Estable
EDAR_07	LA CHINA	MADRID	Positivo	Disminución
EDAR_08	LA GAVIA	MADRID	Positivo	Disminución
EDAR_09	TORREJÓN	TORREJON DE ARDOZ	Positivo	Estable
EDAR_10	SAN JERÓNIMO	SEVILLA	Positivo	Estable
EDAR_11	TUDELA	TUDELA	Positivo	Estable ²
EDAR_12	CRISPIJANA	VITORIA	Positivo	Disminución
EDAR_13	GALINDO	BILBAO	Positivo	Estable
EDAR_14	LOGROÑO	LOGROÑO	Positivo	Estable
EDAR_15	LA CARTUJA	ZARAGOZA	Positivo	Aumento
EDAR_16	VILLAPEREZ	OVIEDO	Positivo	Disminución significativa
EDAR_17	PALMA II	PALMA DE MALLORCA	Positivo	Aumento
EDAR_18	BARRANCO SECO II	LAS PALMAS DE GRAN CANARIA	Positivo	Disminución
EDAR_19	ADEJE - ARONA	ADEJE	Positivo	Estable ²
EDAR_20	SAN ROMAN	SANTANDER	Positivo	Estable
EDAR_21	SEGOVIA	SEGOVIA	Positivo	Estable
EDAR_22	SORIA	SORIA	Positivo	Aumento
EDAR_23	VALLADOLID	VALLADOLID	Positivo	Estable
EDAR_24	ALBACETE	ALBACETE	Positivo	Aumento
EDAR_25	GUADALAJARA	GUADALAJARA	Positivo	Disminución
EDAR_26	BESOS	BARCELONA	Positivo	Estable ²
EDAR_27	IGUALADA	IGUALADA	Positivo	Aumento
EDAR_28	LLEIDA	LLEIDA	Positivo	Estable
EDAR_29	CUENCA	CUENCA	Positivo	Aumento
EDAR_30	ARROYO DE EL SOTO	MÓSTOLES	Positivo	Disminución



AQUAVALL

AYUNTAMIENTO DE VALLADOLID