

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

Introducción

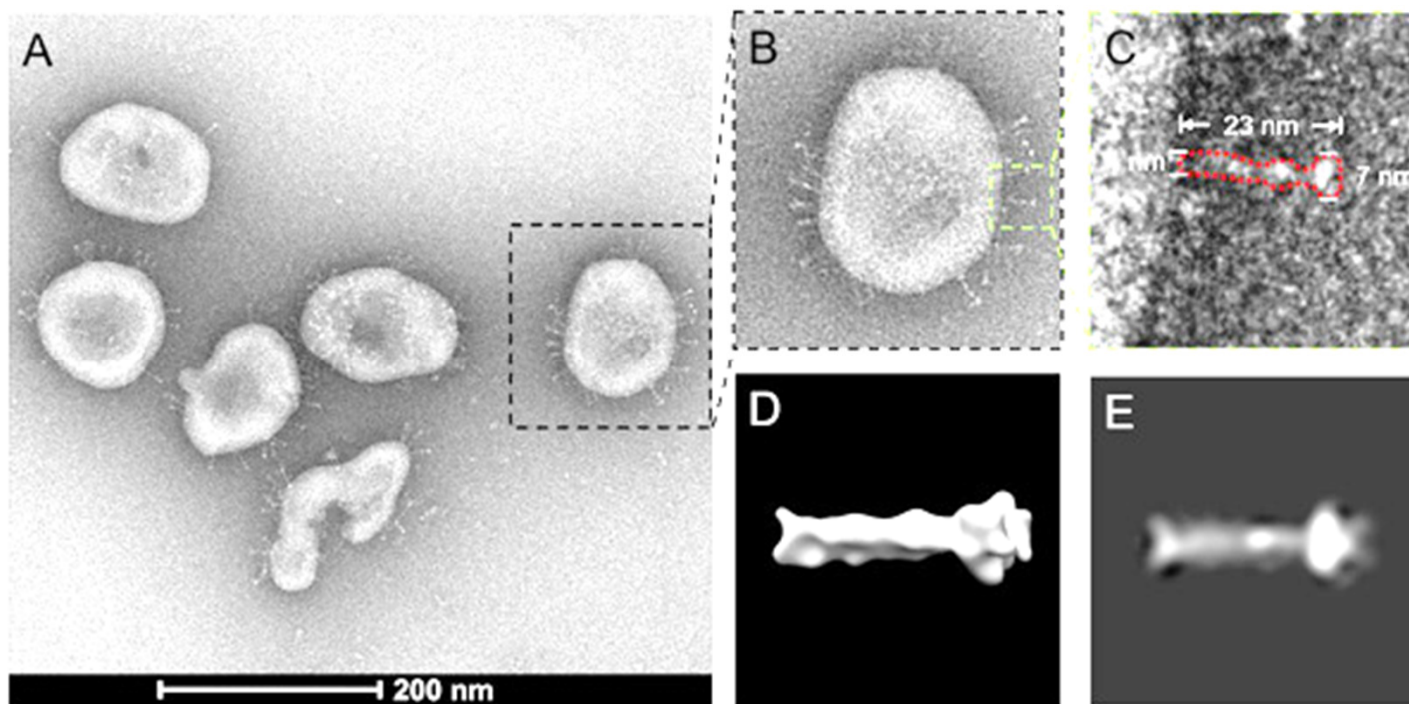
- Colaboración en proyecto **VATar COVID-19** “Vigilancia microbiológica en aguas residuales y aguas de baño como indicador epidemiológico para un sistema de alerta temprana para la detección precoz de SARS-CoV-2 en España”, de MITERD y CSIC
- Colaboración en proyecto **FIVI** “Desarrollo de una plataforma online de predicción epidemiológica del SARS-CoV2 e Influenza basada en datos de aguas residuales” con la Universidad de Valladolid



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:

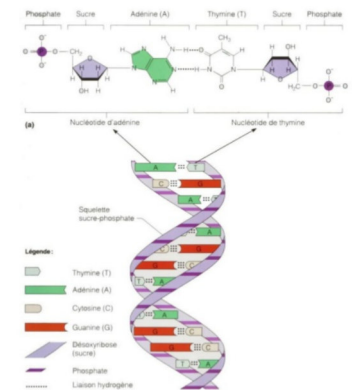
- Asegurar la llegada de la muestra y su análisis en laboratorio antes de **48h**.
- **Transporte refrigerado**. Si la demora supera las 48h la muestra debe **congelarse**.
- Etiquetas exteriores advirtiendo de **Riesgo Biológico**.
- **Desinfección del embalaje** a su recepción en laboratorio y antes 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”.

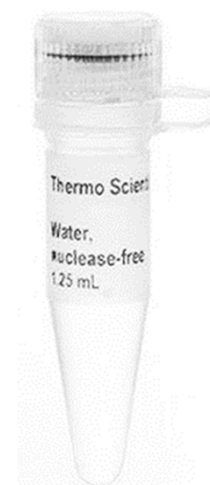


Análisis de las muestras

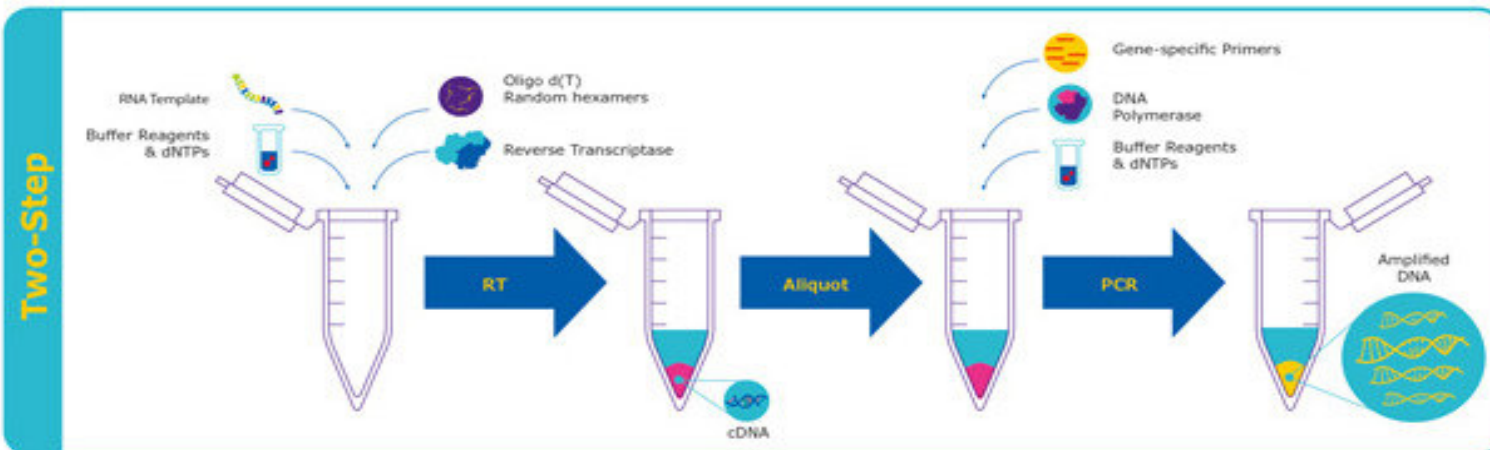
Análisis RT-qPCR (quantitative reverse Polymerase Chain Reaction)

Funcionamiento básico:

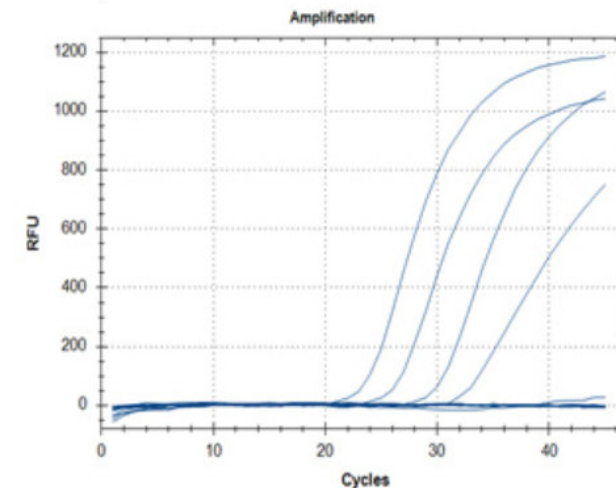
- **Concentración** de la muestra, p.e. por precipitación, centrifugado....
- **Extracción** de ARN, p.e. con separador magnético
- **Conversión del ARN en ADN** de doble cadena, p.e. con enzima transcriptasa inversa
- **Amplificación**: duplicación secuencial de cadenas de polimerasa hasta 40 veces...
 - 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.

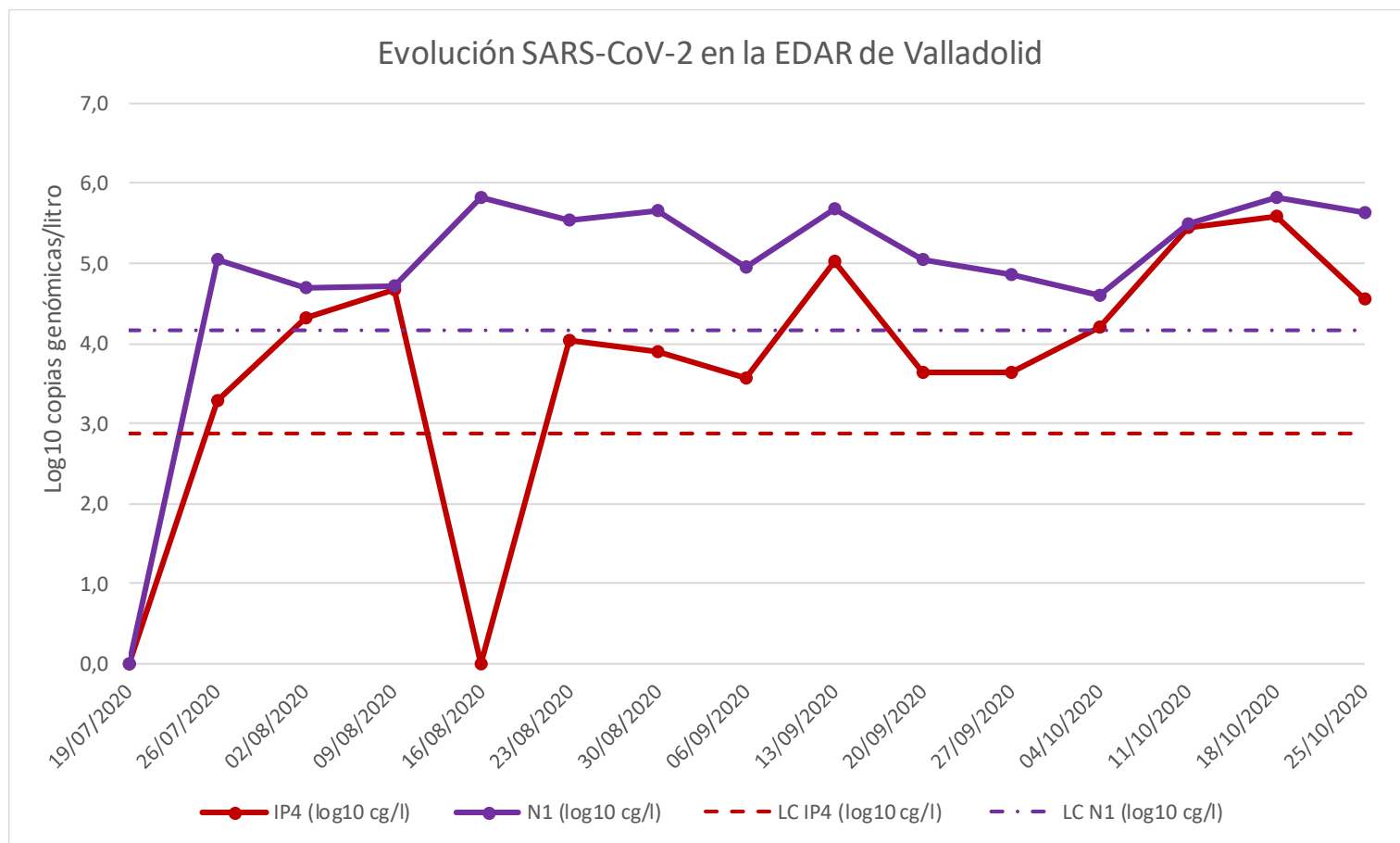
| FECHA TOMA MUESTRA | IP4 (log10 cg/l) | E (log10 cg/l) | N1 (log10 cg/l) | Resultado SARS-CoV-2 | Variación IP4 ¹ (Ulog) | Variación E ¹ (Ulog) | Variación N1 ¹ (Ulog) | Promedio variación (Ulog) ¹ | Variación |
|--------------------|------------------|----------------|-----------------|----------------------|-----------------------------------|---------------------------------|----------------------------------|--|---------------------------|
| 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