

“DETALLES DEL ESTUDIO DE LA RED DE ALCANTARILLADO EN CUANTO AL SARS-CoV-2 EN LA PROVINCIA DE BADAJOZ”



Pedro Tomás Martín de la Vega Manzano
Promedio, Diputación Provincial de Badajoz



ÍNDICE

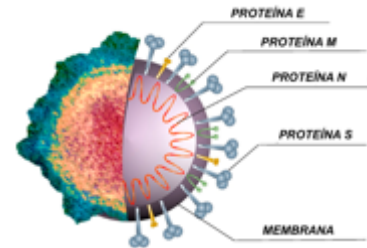
- 1.- ¿QUÉ SABEMOS DEL SARS-CoV-2 Y DE SU RELACIÓN CON EL AGUA RESIDUAL?.
- 2.- ¿POR QUÉ CENTRARNOS EN PEQUEÑAS POBLACIONES?.
- 3.- CRITERIOS DE TOMA DE MUESTRA. PUNTO CRÍTICO.
- 4.- CRITERIOS DE CALIDAD AL MÉTODO ANALÍTICO.
- 5.- NUESTROS RESULTADOS Y CRITERIOS PARA VIGILANCIA FUTURA.



1.- ¿QUÉ SABEMOS DEL SARS-CoV-2 Y DE SU RELACIÓN CON EL AGUA RESIDUAL?

ESTRUCUTRA

- VIRUS ENCAPSULADO EN UNA MEMBRANA LIPÍDICA.
- FORMA ESFÉRICA (60-160 nm)
- CAPACIDAD DE INFECCIÓN DE CÉLULAS INTESTINALES.



VÍA DE TRANSMISIÓN

1. PERSONA-PERSONA POR INHALACIÓN O RESPIRACIÓN
2. OBJETO INANIMADO-PERSONA
3. **HECES-PERSONA** ??? SE HAN LOCALIZADO VIRUS VIABLES EN HECES, PERO NO SE HA DEMOSTRADO LA CAPACIDAD DE INFECCIÓN.

CARGA EN HECES. [3]

NOTA: hay múltiples estudios que han detectado virus viables y ARN en heces, pero ninguno asegura un 100% de detección en los casos que se analizan varios individuos.

> $1 \cdot 10^8$ gc/gr. (100-400 gr heces/d/persona) → $1.25 \cdot 10^5$ gc/l en agua residual. SUPERIOR QUE OTROS VIRUS (SARS-CoV, MERS-CoV, etc).

SE HA VERIFICADO QUE LOS ASINTOMÁTICO EXCRETAN ARN VIRAL EN LAS HECES.

SE HA VERIFICADO QUE ENTRE EL 2-10 % DE LOS INFECTADOS PRESENTAN DIARREA ENTRE LOS SISTEMAS, LO QUE PODRÍA INCREMENTAR LA CARGA DE ARN EN EL AGUA

CARGA EN SALIVA [3]

$9,9 \cdot 10^2$ - $1,2 \cdot 10^8$ gc/ml. (50-100 ml/d/persona) → $3 \cdot 10^4$ gc/l en agua residual.



1.- ¿QUÉ SABEMOS DEL SARS-CoV-2 Y DE SU RELACIÓN CON EL AGUA RESIDUAL?

CAPACIDAD PARA SER DETECTADO EN EN AGUA RESIDUAL

SE HA DEMOSTRADO QUE UN PACIENTE INFECTADO PUEDE ESTAR ESCRETANDO ARN DURANTE 7 SEMANAS DESPUÉS DE HABER SUFRIDO LOS PRIMEROS SÍNTOMAS.

CONCENTRACIÓN MÍNIMA DE POBLACIÓN INFECTADA PARA DETECCIÓN DE MATERIAL GENÉTICO EN EL VIRUS.

0.00005% (1 INFECTADO EN 2 MILLONES DE HABITANTES)

RELACIÓN CON LA TEMPERATURA DEL AGUA [3]

UN PASO DE 25 A 10 GRADOS REDUCE EL T90 un 64 %, SI BIEN SE BASA EN DATOS DE OTROS VIRUS. UN ESTUDIO HA DETERMINADO QUE DE VERANO A INVIERNO LA CARGA VIRAL SE PUEDE REDUCIR HASTA UN 80% EN REGIONES CON CLIMAS EXTREMOS.

RELACIÓN DEL CONTENIDO DE SÓLIDOS DEL AGUA

UNA REDUCCIÓN DE SÓLIDOS Y MATERIA ORGÁNICA REDUCE EL T99% UN 33 %.

CONCLUSIÓN: EL SEGUIMIENTO DE ARN EN AGUA RESIDUAL CONSTITUYE UNA HERRAMEINTA PARA EVALUAR EL ESTADO DE LA INFECCIÓN EN UNA POBLACIÓN, SI BIEN, AÚN SE REQUIERE DEFINIR PROTOCOLOS E INVESTIGAR PARA HACER VIABLE Y FIABLE ESTA HERRAMIENTA.



PROMEDIO

2.- ¿POR QUÉ CENTRARNOS EN LAS PEQUEÑAS POBLACIONES PACENSES?

Badajoz	684.113 HAB. EN 21,766 km2	165 MUNICIPIOS
NUM. DE MUNICIPIOS	NIVEL DE POBLACIÓN	%
2	> 50.000	30,5%
3	50.000 > 20.000	14,3%
4	20.000 > 10.000	8,4%
16	10.000 > 2.000	14,8%
140	< 2.000	31,9%

EL NIVEL DE 2ª VIVIENDAS EN DICHAS POBLACIONES OSCILA ENTRE EL 10 Y EL 40 % DE LAS VIVIENDAS → MUCHAS POBLACIONES DUPLICAN SU POBLACIÓN EN PERIODOS ESTIVALES Y CIERTOS FESTIVOS.

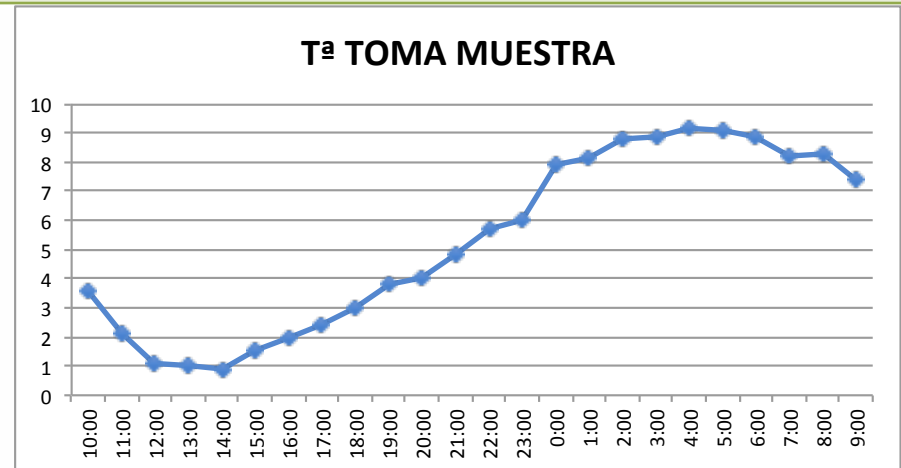
3.- CRITERIOS DE TOMA DE MUESTRAS. PUNTOS CRÍTICOS.

CRITERIOS DE PUNTO DE MUESTREO (ENTRADA EDAR O COLECTOR)

1. MAXIMA HOMOGENEIDAD. EVITAR ZONAS MUERTAS. MUESTREO A 2/3 DE LA ALTURA DE LA LÁMINA DE AGUA DESDE EL FONDO. EVITAR FLOTANTES.
2. EVITAR PUNTOS DE CONFLUENCIA DE CORRIENTES (RECIRCULACIONES, VACIADOS, RETORNOS, ETC)
3. PUNTOS DE BAJA INFLUENCIA DE VERTIDOS INDUSTRIALES E INFILTRACIONES.

CRITERIOS DE TEMPERATURA

1. PROCESO DE MUESTRA COMPUESTA AUTOMÁTICA (<10 °C DURANTE TODO EL MUESTREO)
2. ALMACENAMIENTO EN LAB., MENOS DE 48 HORAS A 2 +/- 3 °C. ISO 5667-3
3. TRANSPORTE A LABORATORIO 5 +/- 3 °C. ISO 5667-3



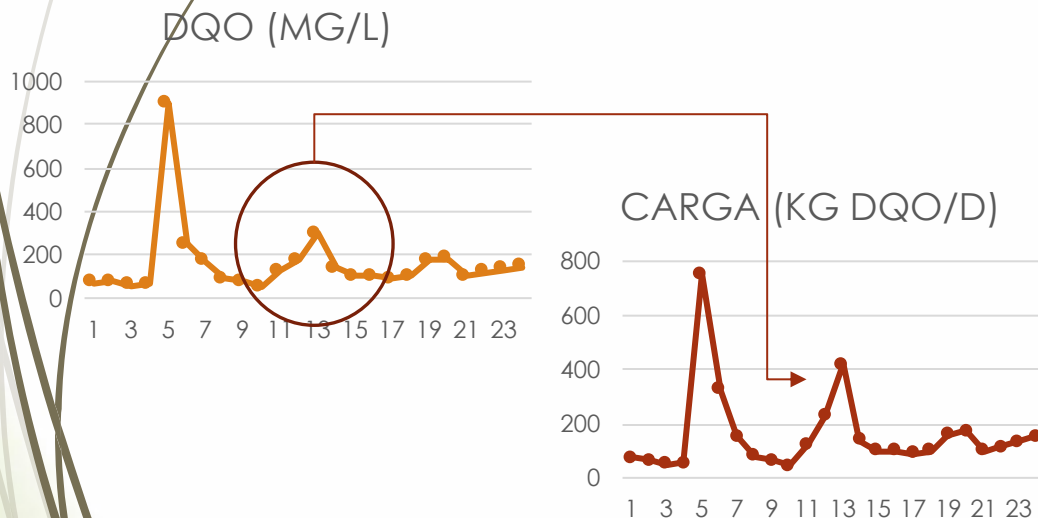
3.- CRITERIOS DE TOMA DE MUESTRAS. PUNTOS CRÍTICOS.

TIPO DE MUESTRA

1. SIMPLE, EN HORA DE MÁXIMA CONCENTRACIÓN DE DQO O SÓLIDOS EN SUSPENSIÓN O CARGA, SOBRE LAS 13:00.
2. COMPUESTAS, MANUAL O AUTOMÁTICA EN HORARIO DE MAÑANA (DE 8:00 A 15:00) O 24 H.

CRITERIOS DE SEGURIDAD

1. OPERARIO CON EPIS (MASCARILLA FFP2, GANTES, Y ROPA DE TRABAJO).
2. DESINFECCIÓN DE EQUIPOS TRAS SU USO CON UNA SOLUCIÓN DE AGUA Y LEJÍA.
3. ENGUAJE DEL EQUIPO CON AGUA A MUESTREAR ANTES DE TOMA DE MUESTRA.



4.- CRITERIOS DE CALIDAD AL MÉTODO ANALÍTICO.

CRITERIOS PARA LA RECTA DE CALIBRADO	$R^2 > 0,95-0,99$ SE PODRÍA IMPONER UN CRITERIO DE PENDIENTE ($-3,587 < m < -3,103$)
CRITERIOS DE DOPADO DE MUESTRAS PARA EVALUAR LA INHIBICIÓN DE PCR O PÉRDIDA DE ARN. SE PUEDE EMPLEAR MENGOVIRUS, NOROVIRUS, MURINE. [3]	<ol style="list-style-type: none">1. INOCULACIÓN PREVIO AL PASO DE CONCENTRACIÓN DEL ARN → CONTROL COMPLETO DEL PROCESO.2. INOCULACIÓN ANTES DEL PROCESO DE EXTRACCIÓN DEL ARN → CONTROL DE ESTE PROCESO.3. INOCULACIÓN PREVIO AL RT-qPCR → PARA CONTROLAR EL PROCESO EL PROCESO RT-qPCR. <p>UNO DE ESTOS CONTROLES SERÍA SUFICIENTE. CRITERIO DE ACEPTACIÓN DE EFICIENCIA DE EXTRACCIÓN SUPERIOR AL 1% (ISO 15216-1-2017).</p>
CRITERIOS DE REPETICIÓN DE MUESTRAS.	<ol style="list-style-type: none">1. SE REPETIRÁ, AL MENOS, EL 10% DE LAS MUESTRAS, DE TAL FORMA QUE SE IMPONGA UN CRITERIO DE PRECISIÓN DE ENTRE EL 10 Y EL 15 % PARA ACEPTAR QUE LA TANDA ANALÍTICA NO PRESENTA ALGÚN ERROR.
CONTROLES INTERLABORATORIO	<ol style="list-style-type: none">1. A NIVEL NACIONAL (IELAB)2. A NIVEL INTERNACIONAL (WRF) https://www.waterrf.org/news/wrl-releases-rfq-sars-cov-2-study



5.- RESULTADOS

PAIS DE ESTUDIO	TAMAÑO MEDIO DE LA EDAR	PUNTO DE MUESTREO	CONDICIONES DE TOMA DE MUESTRAS	TIEMPO DE SEGUIMIENTO	FASE DE LA EPIDEMIA
ESPAÑA (BADAJOZ)	1. EDAR SALVALEON (BLANCO) 2. EDAR LA ALBUERA 3. EDAR PUEBLA-MONTIJO 4. EDAR VILLANUEVA-BENITO 5. EDAR VILLANUEVA DEL FRESNO	1. ENTRADA EDAR 2. COLECTOR 3. FANGO PRIMARIO	1. SIMPLES (12:00-13:00) 2.. COMPUESTAS (8:00-15:00) 3. COMPUESTAS 24 HORAS REFRIGERADAS Y CON CRITERIOS DE MUESTREO SEGÚN ISO 5667-3	DEL 14 DE MAYO A LA ACTUALIDAD	FASE DE DESESCALADA
JAPÓN [2]	1 EDAR (YAMANASHI PREFECTURE) 1 RIO	ENTRADA EDAR/SALIDA BIOLÓGICO	SIMPLES	DEL 14 DE ABRIL AL 7 DE MAYO	PICO DE LA CURVA
ITALIA [4]	4 EDAR ALREDEDOR DE 1000000 HE (MILAN Y ROMA)	ENTRADA EDAR	COMPUESTA 24 HORAS	DEL 2 DE FEBRERO AL 2 DE ABRIL	CURVA CRECIMIENTO
ESPAÑA (MURCIA) [8]	6 EDAR ENTRE 530000 Y 29000 HE (MURCIA, CARTAGENA, MOLINA DE SEGURA, LORCA, CIEZA Y TOTANA)	ENTRADA/ EFLEUNTE SECUNDARIO/EFLUENTE TERCIARIO (HIPOCLORITO/UV)	MUESTRAS SIMPLES ENTRE LA 7 Y LAS 12.	DEL 12 DE MARZO AL 14 DE ABRIL	CURVA CRECIMIENTO
ESPAÑA (VALENCIA) [7]	8 EDAR QUE TRATAN 22 MUNICIPIOS(PINEDO 1: 390.000 HE; PINEDO 2: 850.000 HE Y QUART BENÀGER: 150.000 HE)	ENTRADA/EFLUENTE TRAS TERCIARIO	MUESTRAS SIMPLES, NO QUEDA CLARO	12 DE FEBRERO-14 ABRIL	CURVA DE CRECIMIENTO
AUTRALIA [1]	2 EDAR CADA UNA EN TORNO A 350.000 HE	ESTACIÓN DE BOMBEO Y ENTRADA	COMPUESTAS 24 HORAS	20 DE MARZO-01 DE ABRIL	CURVA DE CRECIMIENTO
PAISES BAJOS [5]	6 EDAR URBANAS ENTRE 375000 Y 1400000 HE) Y UNA EDAR DE AEROPUERTO CON 54000 HE.	ENTRADA EDAR	MUESTRAS 24 HORAS REFRIGERADAS DURANTE EL MUESTREO	DEL 5 DE FEBRERO AL 16 DE MARZO	CURVA DE CRECIENTO
UU EE [9]	1 EDAR (MASSACHUSSET)	ENTRADA	COMPUESTA 24 HORAS	DEL 18 AL 25 DE MARZO	CURVA DE CRECIENTO
UU EE [6]	1 EDAR (BOZEMAN, MONTANA)	AGUA PRETRATADA	COMPUESTA 24 HORAS Y MUESTRAS SIMPLES	DEL 23 DE MARZO AL 3 DE ABRIL	CURVA DE CRECIENTO
FRANCIA (PARIS) [10]	3 EDAR DE MÁS DE 100.000 HE	ENTRADA EDAR	SIMPLES	DEL 5 DE MARZO AL 23 DE ABRIL	CURVA DE CRECIMIENTO, ESTABILIZACIÓN Y DECRECIMIENTO

5.- RESULTADOS

PAIS DE ESTUDIO	VOLUMEN TRATADO	MÉTODO DE CONCENTRACIÓN	CUANTIFICACIÓN	DETECCIÓN POSITIVA	CUANTIFICACIÓN MÁXIMA (GC/L)
ESPAÑA (BADAJOZ)	200-400 mL	ALUMINUM HYDROXIDE ADSORPTION-PRECIPITATION	COVID-19 dtcc-RT-qPCR GPS	0/30	NO DETECTADO
JAPÓN [2]	200 ML ENTRADA-5000 ML SALIDA	1. ELECTRONEGATIVE MEMBRANE-VORTEX 2. ELECTRONEGATIVE MEMBRANE-DIRECT RNA EXTRACTION	1. N_SARBECO RT-qPCR (+) 2. NIID_2019_nCOV_N RT-qPCR 3. CDC 2019_nCOV RT-qPCR 4. ORF1a nested PCR 5. S-protein nested PCR	0/5 ENTRADA EDAR 1/5 (20 %) SALIDA 2ª 0/3 RÍO	2.4 10 ³
ITALIA [4]	250 ml	PEG PRECIPITATION	1. ORF1ab nested PCR (+) 2. Ensayo propio nested PCR (+) 3. S-protein nested PCR (+) 4. N_sarberco RT-qPCR	6/12 (50%)	NO SE INDICA
ESPAÑA (MURCIA) [8]	200 ml	ALUMINUM HYDROXIDE ADSORPTION-PRECIPITATION	CDC 2019_nCOV	35/42 (83 %) ENTRADA EDAR 2/18 SECUNDARIO 0/18 TERCIARIO	> 1 10 ^{6,5}
ESPAÑA (VALENCIA) [7]	200 ml	ALUMINUM HYDROXIDE ADSORPTION-PRECIPITATION	CDC 2019_nCOV	13/15 (87 % EN AFLUENTE)	> 1 10 ⁶
AUSTRALIA [1]	100-200 ml	1. ELECTRONEGATIVE MEMBRANE-DIRECT RNA EXTRACTION 2. ULTRAFILTRATION	1. N_SARBECO 2. NIID_2019_nCOV	2/9 (22%)	1.2 10 ²
PAISES BAJOS [5]	100-200 ml	ULTRAFILTRATION	1. CDC 2019_nCOV; 2. E_SARBECO	14/24 (58%)	NO LO INDICA
UU EE [9]	40 ml	PEG PRECIPITATION	CDC 2019_nCOV	10/14 (71 %)	> 2 10 ⁵
UU EE [6]	500 ml	ULTRAFILTRATION	E_SARBECO	7/7 (100 %)	COMPUESTA (>2 10 ³), SIMPLE (> 2 10 ⁵)
FRANCIA (PARIS) [10]	11 ML	ULTRACENTRIFUGATION	E_SARBECO	23/23 (100 %)	> 1 10 ^{6,5}

5.- CONCLUSIONES Y CRITERIOS PARA ESTABLECIMIENTO DE LA HERRAMIENTA DE SEGUIMIENTO

CONCLUSIONES

- **ESTUDIOS EN PERÍODOS CORTOS, EN DIFERENTES ESTADOS DE LA CURVA DE CONTAGIOS Y CON CRITERIOS DE MUESTREO MUY VARIABLES.**
- (MUESTRAS SIMPLES, MAYOR NIVEL DE CUANTIFICACIÓN, ESPAÑA (MURCIA, UUEE, FRANCIA (PARÍS))
- **DIFICULTAD PARA COMPARAR ESTUDIOS, CADA INVESTIGACIÓN APLICA CRITERIOS DIFERENTES QUE SE LLEGAN A CONTRADECIR.**
- JAPON N_SARBECO (+) NESTED PCR (-), ITALIA POR EL CONTRARIO N_SARBECO (-) Y NESTED CPR (+). DIFERENTES VOLÚMENES TRATADOS, AHORA AUSTRALIA N_SARBECO (+) CON LC SIMILARES A JAPÓN.
- FRANCIA Y EEUU (MONTANA) E_SABERCO (+) EN MUESTRAS SIMPLES CON LC ALTOS.
- **LOS ESTUDIOS CONTRADICEN CIERTOS PRECEPTOS.**
- ESPAÑA (BADAJOZ) INFECTADOS EXCRETANDO HASTA 7 SEMANAS, NO SE HA VERIFICADO.
- ESPAÑA (MURCIA) y JAPÓN DETECCIÓN DE ARN TRAS EL TRATAMIENTO SECUNDARIO.

CRITERIOS

- **SE REQUIERE AMPLIAR EL CONOCIMIENTO DEL SARS-CoV-2 EN AGUAS Y UNA REVISIÓN PERIÓDICA DE LA BIBLIOGRAFÍA.**
- **SE REQUIERE COLABORACIÓN ENTRE OPERADORES PÚBLICOS Y CENTROS DE INVESTIGACIÓN.**
- **ES PRECISO INCLUIR CONTROLES DE CALIDAD AL MÉTODO Y AL MUESTREO PARA ESTABLECER COMPARABILIDAD.**

BIBLIOGRAFÍA

1. Ahmed, W., Angel, N., Edson, J., Bibby, K., Bivins, A., Brien, J.W.O., Choi, P.M., Kitajima, M., Simpson, S.L., Li, J., Tscharke, B., Verhagen, R., Smith, W.J.M., Zaugg, J., Dierens, L., Hugenholtz, P., Thomas, K.V., Mueller, J.F., 2020. **First confirmed detection of SARS-CoV-2 in untreated wastewater in Australia: a proof of concept for the wastewater surveillance of COVID-19 in the community.** Sci. Total Environ.
2. Haramoto, E., Malla, B., Thakali, O., Kitajima, M., 2020. **First environmental surveillance for the presence of SARS-CoV-2 RNA in wastewater and river water in Japan.** Sci. Total Environ.
3. Kitajima, M., Ahmed, W., Bibby, K., Carducci, A., Gerba, C. P., Hamilton K. A., Haramoto, E., Rose, J. B., 2020. **SARS-CoV-2 in wastewater: State of knowledge and research needs.** Science of the Total Environment.
4. La Rosa, G., Iaconelli, M., Mancini, P., Ferraro, G. B., Veneri, C., Bonadonna, L., Lucentini, L., Suffredini, E., 2020. **First detection of SARS-CoV-2 in untreated wastewater in Italy.** Sci. Total Environ.
5. Medema, G., Heijnen, L., Elsinga, G., Italiaander, R., 2020. **Presence of SARS-Coronavirus-2 in Sewage.** medRxiv.
6. Nemudryi, A., Nemudraia, A., Surya, K., Wiegand, T., Buyukyoruk, M., Wilkinson, R., Wiedenheft, B., 2020. **Temporal detection and phylogenetic assessment of SARS-CoV-2 in municipal wastewater.** medRxiv.
7. Randazzo, W., Cuevas-Fernando, E., Sanjuán, R., Domingo-Calap, P., Sánchez, G., 2020, **Metropolitan wastewater analysis for COVID-19 Epidemiological Surveillance.** medRxiv.
8. Randazzo, W., Truchado, P., Cuevas-Ferrando, E., Simón, P., Allende, A., Sánchez, G., 2020, **SARS-CoV-2 RNA in wastewater anticipated COVID-19 occurrence in a low prevalence area.** Wat. Research.
9. Wu, F., Xiao, A., Zhang, J., Gu, X., Lee, W., Kauffman, K., Hanage, W., Matus, M., Ghaeli, N., Endo, N., Duvall, C., Moniz, K., Erickson, T., Chai, P., Thompson, J., Alm, E., 2020. **SARS-CoV-2 titers in wastewater are higher than expected from clinically confirmed cases.** medRxiv.
10. Wurtzer, S., Marechal, V., Mouchel, J., Moulin, L., 2020. **Time Course Quantitative Detection of SARS-CoV-2 in Parisian Wastewaters Correlates with COVID-19 Confirmed Cases.** medRxiv.



GRACIAS POR SU ATENCIÓN



PROMEDIO



pmartin@dip-badajoz.es

#SINCIENCIA NO HAY FUTURO