

Monitoreo ambiental de SARS-CoV-2 en aguas cloacales de la ciudad de Córdoba, Argentina

El objetivo del presente documento es dar conocimiento público sobre los resultados preliminares de la evaluación de la circulación poblacional del virus SARS-CoV-2 y la participación de aguas residuales como potencial fuente de exposición al virus en aguas cloacales de la ciudad de Córdoba. La información en este documento forma parte de los resultados obtenidos por el trabajo conjunto entre el Instituto de Virología “Dr. JM. Vanella” (InViV) de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad Nacional de Córdoba, el Ministerio de Salud de la Provincia de Córdoba, el Laboratorio Central de la Provincia de Córdoba, la Universidad Nacional de la Defensa-Instituto de Medicina Aeronáutico Espacial (UNDEF) y la Planta Municipal de tratamientos de efluentes cloacales Bajo Grande. Estas instituciones se encuentran trabajando en forma conjunta y coordinada para tratar de entender el rol del SARS-CoV-2, causante de la pandemia actual, en las aguas residuales de la ciudad de Córdoba.

Grupo de trabajo

Facultad de Ciencias Médicas, UNC: Decano Dr. Rogelio Pizzi. **Instituto de Virología “Dr. JM. Vanella” Facultad de Ciencias Médicas, UNC:** Dra. Gisela Masachessi, Dra. Silvia Viviana Nates, Dra. Viviana Elisabeth Ré, Dra. María Belén Pisano, Bioq. Matías Liendo.

Ministerio de Salud de la Provincia Córdoba: Ministro de Salud Dr. Diego Cardozo; Secretaria de Prevención y Promoción de la Salud Bioq. Esp. Virol. María Gabriela Barbás. Mg. Laura López

Laboratorio Central Ministerio de Salud: Bioq. Esp. Virol. Gonzalo Castro, Bioq. Esp. Virol. Paola E Sicilia.

Universidad de la Defensa-Instituto de Medicina Aeronáutico Espacial: Dra. Ariana Mariela Cachi. Dra. María de los Ángeles Marinzalda

Planta de Tratamiento de efluente cloacales Bajo Grande-Laboratorio de análisis fisicoquímicos, bacteriológicos EDAR Bajo Grande, Córdoba Capital: Lic. Qca. Far. Gustavo Ibarra

Marco teórico

Trabajos de investigación llevados a cabo en diferentes países del mundo, reportan que del 2 al 10% de los pacientes con COVID-19 presentan síntomas gastrointestinales, incluida diarrea (Chen et al., 2020a, 2020b; Gao et al., 2020; Wang et al., 2020a, 2020b,

2020c). Además, estudios recientes muestran que el 35% de los pacientes infectados con SARS-Cov-2 excretan el virus por materia fecal independientemente de si presentan síntomas de diarrea (Tang et al., 2020a). Se ha demostrado que las células epiteliales glandulares gastrointestinales son el blanco para la infección por el SARS-CoV-2 (Xiao et al., 2020). La infección de estas células tiene lugar debido a que la Enzima Convertidora de Angiotensina 2 (ACE2) es el receptor celular del SARS-CoV-2 y se expresa abundantemente en el intestino delgado, así como en la mucosa oral y pulmonar (Hamming et al., 2004; Xu et al., 2020b). Esta evidencia sustenta la posibilidad de que el SARS-CoV-2 replique en el tracto gastrointestinal. Otra evidencia, se basa en estudios que detectan una excreción prolongada de hasta tres semanas de iniciados los síntomas (Jiehao et al., 2020; Y. Wu et al., 2020a; Xiao et al., 2020) con excreciones de hasta 10^7 copias genómicas/ml en pacientes con diarrea (Lescure et al., 2020; Pan et al., 2020; Wölfel et al., 2020) e incluso en individuos asintomáticos (Tang et al., 2020a). El conocimiento sobre la viabilidad del SARS-CoV-2 en materia fecal es aún muy limitado y controvertido. Algunos estudios sugieren que el SARS-CoV-2 se excreta de manera viable (Wang et al., 2020b; Zhang et al., 2020a), en contraposición con otros trabajos donde establecen que el virus no se excreta viable en las heces a pesar de las altas concentraciones de ARN viral (Wölfel et al., 2020). Estas evidencias ponen de manifiesto la importancia que tiene realizar estudios de SARS-CoV-2 en aguas residuales en busca de su presencia.

Metodología de estudio

Muestreo de aguas residuales

Desde el mes de mayo del corriente año al momento del presente informe se recolectaron semanalmente, aguas residuales crudas (n=50) del conducto de la red central que ingresa a la planta depuradora de aguas cloacales “Bajo Grande” de la ciudad de Córdoba. La misma tiene una cobertura aproximada del 45% de la población.

Concentración de SARS-CoV-2 en aguas residuales de la ciudad de Córdoba

Metodología estandarizada para la concentración de virus entéricos a partir de matrices acuosas, puesta a punto para la concentración de SARS-CoV-2. Brevemente, 0,5 litros de agua residual son sometidas a un proceso de centrifugación y precipitación con PEG6000 y NaCl logrando una concentración final de 100X.

Extracción del ARN genómico de los concentrados virales

Extracción automatizada de ácidos nucleicos mediante GenePure Pro Nucleic Acid Purification System NPA-32P - BIOER.

Detección del genoma de SARS-CoV-2

Detección del genoma de SARS-CoV-2 mediante DisCoVery SARS-CoV-2RT-PCR Detection Kit.

Estimación de excretores de SARS-CoV-2 en cloacas

Teniendo en cuenta que el 35% de los pacientes infectados con SARS-CoV-2 excretan el virus por materia fecal por 21 días y teniendo en cuenta que el 45% de la población de Córdoba está conectada a cloacas, se puede hacer una estimación de cuantos individuos están excretando el virus al momento de su detección en aguas residuales. La misma será una relación de la suma de los casos diarios de COVID-19 a 21 días hacia atrás en el tiempo por los porcentajes previamente mencionados (Figura 1).

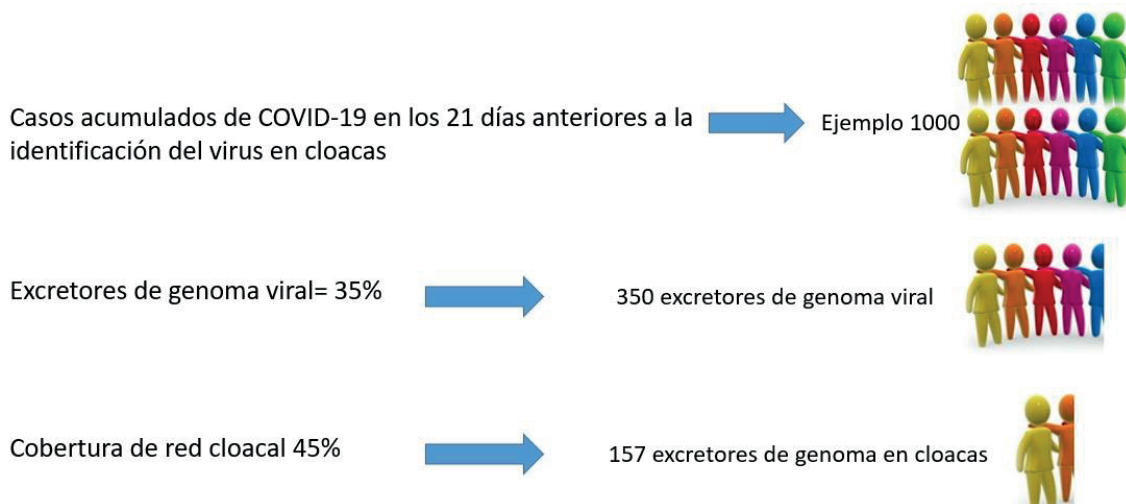


Figura 1. Estimación de excretores de SARS-CoV-2 en aguas cloacales. Ejemplo con 1000 casos acumulados de COVID-19 acumulado a 21 días.

Resultados

El muestreo de las aguas residuales del conducto principal que llega a la planta depuradora de Bajo Grande se inició el día 11 de mayo del 2020 (Figura 2) cuando los casos clínicos en la ciudad de Córdoba empezaban a aumentar paulatinamente. La primer muestra de agua residual en la cual se detectó el virus (Valor Ct: 38,7) correspondió al día 31 de agosto del 2020 (Figura 3). El número de casos acumulados a 21 días, en el período comprendido entre el 10 y el 31 de agosto, era de 2021 infectados por COVID-19. Teniendo en cuenta la estimación de excretores de SARS-CoV-2 por materia fecal, el porcentaje de individuos conectados a cloacas, la cantidad de excretores acumulados al día 31 de agosto sería de 332 individuos. A partir de ese momento se comenzó a detectar genoma viral en todas las semanas siguientes (Figura 3), observando una disminución de los Ct hallados conforme aumenta la cantidad de excretores acumulados a 21 días (Figura 4).

Teniendo en cuenta el valor del Ct se puede estimar la magnitud de circulación del SARS-CoV-2 en la comunidad. Se observa que el virus está circulando con mayor impacto en la clínica ya que los valores de Ct en las aguas cloacales van disminuyendo, reflejando mayores niveles de concentración de SARS-CoV-2 en las mismas. A partir de este dato

se puede estimar la tendencia de la magnitud de circulación del virus en la ciudad de Córdoba, como lo muestra figura 3.

Figura 2. Primer caso de COVID-19 en la Ciudad de Córdoba/Inicio del muestreo en aguas residuales.

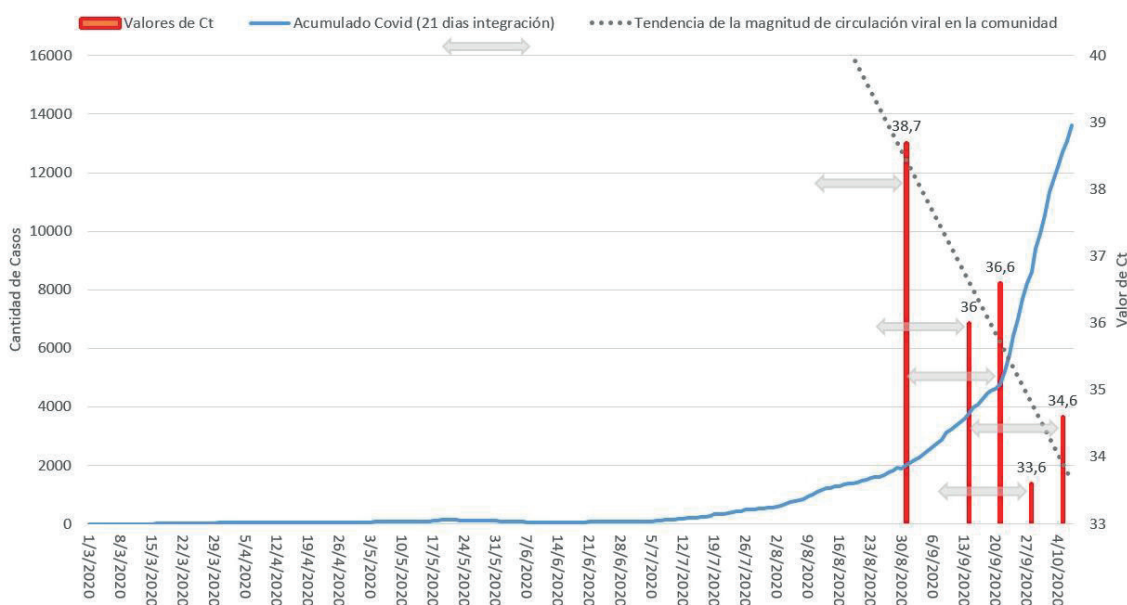
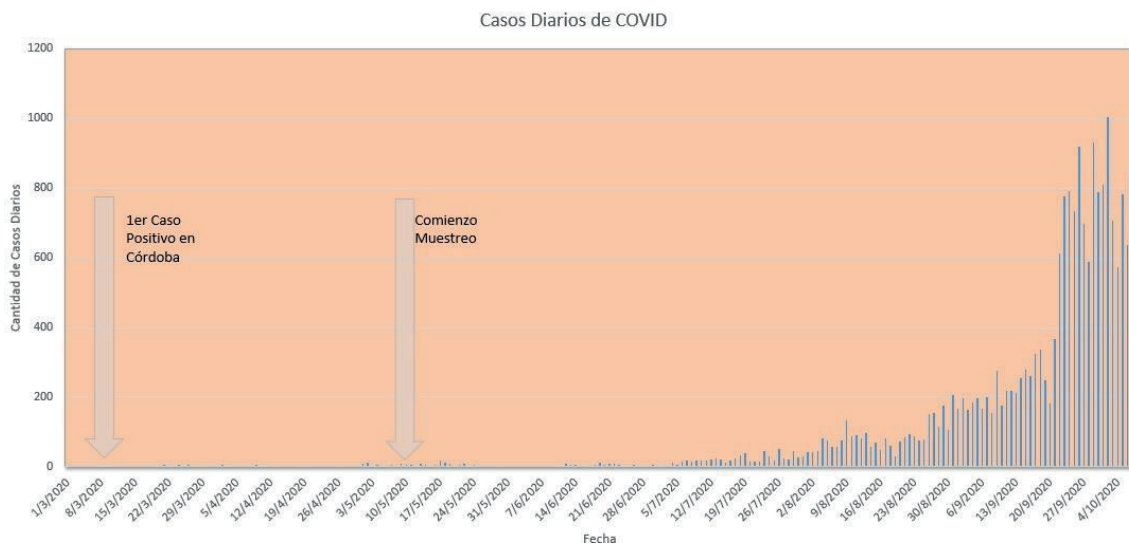


Figura 3. Detección de SARS-COV2 en aguas residuales y tendencia de la magnitud de circulación del virus en la ciudad de Córdoba

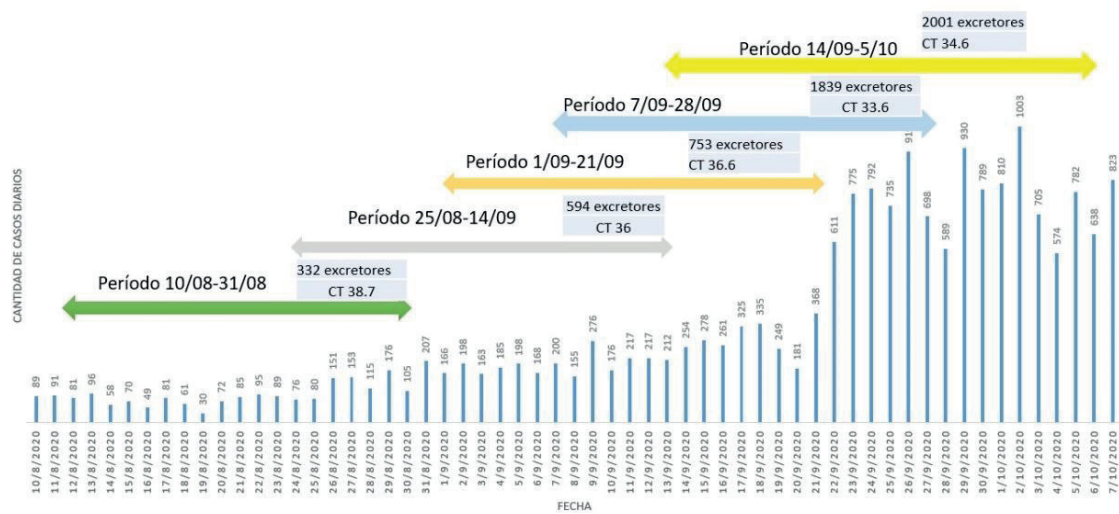


Figura 4. Detección de SARS-CoV-2 en aguas residuales vs la cantidad de casos notificados acumulados a 21 días de la fecha de detección de genoma viral en aguas cloacales.

Discusión

La epidemiología basada en aguas residuales sirve como una herramienta importante para rastrear la circulación de virus en una comunidad, brindando oportunidades para estimar su prevalencia, diversidad genética y distribución geográfica (Sinclair et al., 2008; Xagorarakí y O'Brien, 2020). Los sistemas de aguas residuales ofrecen un enfoque práctico para identificar virus excretados en las heces de toda una región (Carducci et al., 2006; La Rosa y Muscillo, 2013). Con este enfoque, es posible monitorear la epidemiología de las infecciones víricas incluso si no son evidentes mediante la vigilancia clínica, especialmente porque los enfoques epidemiológicos tradicionales pueden estar limitados por la naturaleza asintomática de muchas infecciones virales. Se sabe que el SARS-CoV-2 causa infecciones asintomáticas (Lai et al., 2020; Mizumoto et al., 2020; Nishiura et al., 2020; A. Tang et al., 2020a) lo que dificulta determinar el grado real de circulación viral en una comunidad.

En este trabajo se confirma que las aguas residuales de la ciudad de Córdoba constituyen una muestra de la excreción viral poblacional. La detección del genoma viral de SARS-CoV-2 en las aguas cloacales de la ciudad de Córdoba (suma de la excreción viral de personas sintomáticas y asintomáticas) está ligada a la magnitud de circulación del virus en la comunidad.

La experiencia con otras enfermedades virales ha demostrado que la vigilancia de las aguas residuales en busca de rastros de un patógeno permite una vigilancia eficaz de comunidades enteras, proporcionando un indicador sensible de si el patógeno está presente en la población y si la transmisión está aumentando o disminuyendo. En nuestro estudio se estimó, en base al valor del Ct, que el virus en la ciudad de Córdoba aumentó su dinámica de circulación y esto se evidencia por el mayor número de casos notificados.

La presencia de virus en aguas residuales puede tener un impacto potencial sobre otras matrices ambientales. Así, debido a la fragilidad del sistema de eliminación de excretas en nuestro medio, con frecuencia, las aguas crudas o mal tratadas alcanzan cursos de aguas superficiales, que son utilizados como fuente de abastecimiento de agua, con fines recreacionales y/o para riego en sistemas productivos de alimentos. De esta manera se abren nuevos escenarios ambientales con potencialidad de transmisión viral a la población expuesta.

Referencias

Carducci, A., Verani, M., Battistini, R., Pizzi, F., Rovini, E., Andreoli, E., Casini, B., 2006. Epidemiological Surveillance of Human Enteric Viruses by Monitoring of Different Environmental Matrices, pp. 239–244. <https://doi.org/10.2166/wst.2006.475>.

Chen, C., Gao, G., Xu, Y., Pu, L., Wang, Q., Liming, Wang, Wang, W., Song, Y., Chen, M., Linghang, Wang, Yu, F., Yang, S., Tang, Y., Zhao, L., Wang, H., Wang, Y., Zeng, H., Zhang, F., 2020c. SARS-CoV-2–positive sputum and feces after conversion of pharyngeal samples in patients with COVID-19. *Ann. Intern. Med.* 170, 1–3. <https://doi.org/10.7326/AITC201903050>

Chen, N., Zhou, M., Dong, X., Qu, J., Gong, F., Han, Y., Qiu, Y., Wang, J., Liu, Y., Wei, Y., Xia, J., Yu, T., Zhang, X., Zhang, L., 2020b. Epidemiological and clinical characteristics of 99 cases of 2019 novel coronavirus pneumonia in Wuhan, China: a descriptive study. *Lancet* 395, 507–513. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30211-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30211-7).

Chen, Y., Qin, C., Wei, Q., Li, R., Gao, H., Zhu, H., Deng, W., Bao, L., Wei, T., 2020a. Protection of Rhesus Macaque from SARS-Coronavirus Challenge by Recombinant Adenovirus Vaccine. *bioRxiv* 2020.02.17.951939. <https://doi.org/10.1101/2020.02.17.951939>.

Gao, Q.Y., Chen, Y.X., Fang, J.Y., 2020. 2019 novel coronavirus infection and gastrointestinal tract. *J. Dig. Dis.* 1 (2). <https://doi.org/10.1111/1751-2980.12851>. Gralinski, L.E., Menachery, V.D., 2020. Return of the coronavirus: 2019-nCoV. *Viruses* 12, 1–8. <https://doi.org/10.3390/v12020135>

Hamming, I., Timens, W., Bulthuis, M., Lely, A., Navis, G., van Goor, H., 2004. Tissue distribution of ACE2 protein, the functional receptor for SARS coronavirus. A first step in understanding SARS pathogenesis. *J. Pathol.* 203, 631–637

Jiehao, C., Jing, X., Daojiong, L., Lei, X., Zhenghai, Q., Yuehua, Z., Hua, Z., Xiangshi, W., Yanling, G., Aimei, X., He, T., Hailing, C., Chuning, W., Jingjing, L., Jianshe, W., Mei, Z., Children, N., Women, H., Central, S., Zeng, M., 2020. A case series of children with 2019 novel coronavirus infection: clinical and epidemiological features. *Clin. Infect. Dis.* <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa198>

La Rosa, G., Muscillo, M., 2013. Molecular detection of viruses in water and sewage. In: Cook, N. (Ed.), *Viruses in Food and Water: Risks, Surveillance and Control*. Woodhead Publishing Limited, Cambridge, UK, pp. 97–125. <https://doi.org/10.1533/9780857098870.2.97>

Lai, C.-C., Liu, Y.H., Wang, C.-Y., Wang, Y.-H., Hsueh, S.-C., Yen, M.-Y., Ko, W.-C., Hsueh, P.-R., 2020. Asymptomatic carrier state, acute respiratory disease, and pneumonia due to severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2): facts and myths. *J. Microbiol. Immunol. Infect.* 2. <https://doi.org/10.1016/j.imii.2020.02.012>

Lescure, F.-X., Bouadma, L., Nguyen, D., Parisey, M., Wicky, P.-H., Behillil, S., Gaymard, A., Bouscambert-Duchamp, M., Donati, F., Le Hingrat, Q., Enouf, V., Houhou-Fidouh, N., Valette, M., Mailles, A., Lucet, J.-C., Mentre, F., Duval, X., Descamps, D., Malvy, D., Timsit, J.-F., Lina, B., van-der-Werf, S., Yazdanpanah, Y., 2020. Clinical and virological data of the first cases of COVID-19 in Europe: a case series. *Lancet Infect. Dis.* 2, 1–10. [https://doi.org/10.1016/s1473-3099\(20\)30200-0](https://doi.org/10.1016/s1473-3099(20)30200-0).

Mizumoto, K., Kagaya, K., Zarebski, A., Chowell, G., 2020. Estimating the asymptomatic proportion of coronavirus disease 2019 (COVID-19) cases on board the Diamond Princess cruise ship, Yokohama, Japan, 2020. *Eurosurveillance* 25, 1–5. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.es.2020.25.10.2000180>

Nishiura, H., Kobayashi, T., Suzuki, A., Jung, S.-M., Hayashi, K., Kinoshita, R., Yang, Y., Yuan, B., Akhmetzhanov, A.R., Linton, N.M., Miyama, T., 2020. Estimation of the asymptomatic ratio of novel coronavirus infections (COVID-19). *Int. J. Infect. Dis.* <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2020.03.020>

Pan, Y., Zhang, D., Yang, P., Poon, L.L.M., Wang, Q., 2020. Viral load of SARS-CoV-2 in clinical samples. *Lancet Infect. Dis.* 20, 411–412. [https://doi.org/10.1016/s1473-3099\(20\)30113-4](https://doi.org/10.1016/s1473-3099(20)30113-4)

Sinclair, R.G., Choi, C.Y., Riley, M.R., Gerba, C.P., 2008. Pathogen surveillance through monitoring of sewer systems. *Adv. Appl. Microbiol.* 65, 249–269. [https://doi.org/10.1016/S0065-2164\(08\)00609-6](https://doi.org/10.1016/S0065-2164(08)00609-6)

Tang, B., Wang, X., Li, Q., Bragazzi, N., Tang, S., Xiao, Y., Wu, J., 2020. Estimation of the transmission risk of the 2019-nCoV and its implication for public health interventions. *J. Clin. Med.* 9, 462. <https://doi.org/10.3390/jcm9020462>

Wang, C., Horby, P.W., Hayden, F.G., Gao, G.F., 2020a. A novel coronavirus outbreak of global health concern. *Lancet* 395, 470–473. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30185-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30185-9).

Wang, D., Hu, B., Hu, C., Zhu, F., Liu, X., Zhang, J., Wang, B., Xiang, H., Cheng, Z., Xiong, Y., Zhao, Y., Li, Y., Wang, X., Peng, Z., 2020b. Clinical characteristics of 138 hospitalized patients with 2019 novel coronavirus-infected pneumonia in Wuhan, China. *J. Am. Med. Assoc.* 323, 1061–1069. <https://doi.org/10.1001/jama.2020.1585>.

Wang, W., Xu, Y., Gao, R., Lu, R., Han, K., Wu, G., Tan, W., 2020c. Detection of SARS-CoV-2 in different types of clinical specimens. *J. Am. Med. Assoc.*, 3–4 <https://doi.org/10.1001/jama.2020.3786>

Wölfel, R., Corman, V.M., Guggemos, W., Seilmaier, M., Zange, S., Mueller, M.A., Niemeyer, D., Vollmar, P., Rothe, C., Hoelscher, M., Bleicker, T., Bruenink, S., Schneider, J., Ehmann, R., Zwirgmaier, K., Drosten, C., Wendtner, C., 2020. Virological assessment of hospitalized cases of coronavirus disease 2019. *Nature* <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2196-x>

Wu, Y., Guo, C., Tang, L., Hong, Z., Zhou, J., Dong, X., Yin, H., Xiao, Q., Tang, Y., Qu, X., Kuang, L., Fang, X., Mishra, N., Lu, J., Shan, H., Jiang, G., Huang, X., 2020a. Prolonged presence of SARS-CoV-2 viral ARN in faecal samples. *Lancet Gast.*

Xagorarakis, I., O'Brien, E., 2020. Wastewater-based epidemiology for early detection of viral outbreaks. In: O'Bannon, D. (Ed.), *Women in Water Quality*. Springer Nature Switzerland, pp. 75–97. <https://doi.org/10.1007/978-3-030-17819-2>

Xiao, F., Tang, M., Zheng, X., Li, C., He, J., 2020. Evidence for Gastrointestinal Infection of SARS-CoV-2. *medRxiv*. <https://doi.org/10.1101/2020.02.17.20023721>

Xu, H., Zhong, L., Deng, J., Peng, J., Dan, H., Zeng, X., Li, T., Chen, Q., 2020b. High expression of ACE2 receptor of 2019-nCoV on the epithelial cells of oral mucosa. *Int. J. Oral Sci.* 12, 1–5. <https://doi.org/10.1038/s41368-020-0074-x>

Zhang, Y., Chen, C., Zhu, S., Shu, C., Wang, D., Song, J., Song, Y., Zhen, W., Feng, Z., Wu, G., Xu, J., Xu, W., 2020a. Isolation of 2019-nCoV from a stool specimen of a laboratory confirmed case of the coronavirus disease 2019 (COVID-19). *China CDC Wkly* 2,123–124