

Epidemiología basada en aguas residuales: Monitoreo ambiental de SARS-CoV-2 en aguas cloacales de la ciudad de Córdoba y Valle de Punilla, Argentina.

El objetivo del presente documento es dar conocimiento público sobre resultados preliminares de la presencia del genoma del virus SARS-CoV-2 en aguas residuales, como reflejo de la tendencia de la circulación poblacional del virus en la Ciudad de Córdoba Capital y Valle de Punilla (Carlos Paz y La Falda, Villa Giardino y Huerta Grande).

La información de 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), la Planta Municipal de tratamientos de efluentes cloacales Bajo Grande y la Cooperativa Integral Regional de Provisión de Servicios Públicos, Vivienda y Consumo Limitada (COOPI).

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, Bioq. Matías Liendo, Dra. María Belén Pisano, Dra. Viviana Elisabeth Ré, Dra. Silvia Viviana Nates.

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

Municipalidad de Córdoba, Secretaria de Infraestructura: Arquitecto Daniel Rey

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

Cooperativa Integral Regional de Provisión de Servicios Públicos, Vivienda y Consumo Limitada (COOPI). Biol. Ricardo Manuel Rojas

Observatorio de salud: Proyecto de investigación SARS-CoV-2, Enterovirus y otros marcadores de contaminación fecal en aguas residuales y recreativas de la cuenca del lago San Roque de la Provincia de Córdoba, Argentina. Med. Sanitarista Emilio Iosa

Marco teórico

Trabajos de investigación llevados a cabo en diferentes países del mundo, reportan que entre el 2 y 10% de los pacientes con COVID-19 presentan síntomas gastrointestinales, entre los que se incluye la diarrea (Chen et al., 2020a, 2020b; Gao et al., 2020; Wang et al., 2020a, 2020b, 2020c). Estudios recientes han demostrado que las células epiteliales glandulares gastrointestinales son blanco para la infección por SARS-CoV-2, debido a que expresan abundantemente el receptor celular para el virus (ACE2) (Xiao et al., 2020, Hamming et al., 2004; Xu et al., 2020b), lo que permitiría la replicación viral en el tracto gastrointestinal. Así, diferentes estudios reportan que el 35% de los pacientes infectados con SARS-CoV-2 excretan el virus por materia fecal (estimado 10^7 copias genómicas/ml, hasta tres semanas de iniciados los síntomas), independientemente a la presencia o no de diarrea (Tang et al., 2020a). (Jiehao et al., 2020; Y. Wu et al., 2020a; Xiao et al., 2020, Lescure et al., 2020; Pan et al., 2020; Wölfel et al., 2020; Tang et al., 2020a). De esta manera, el estudio de aguas residuales, es una matriz que resumiría la excreción poblacional de virus, dependiendo la sensibilidad de esta herramienta de análisis, de la cobertura de red cloacal de la comunidad en estudio.

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 del conducto de la red central que ingresa a: 1) la planta depuradora de aguas cloacales “Bajo Grande” de la ciudad de Córdoba (45% de cobertura de red cloacal); 2) planta depuradora de aguas cloacales de Carlos Paz (Costa Azul) (37% de cobertura de red cloacal); y 3) Planta depuradora de aguas cloacales de la Falda que procesa aguas residuales de La Falda, Huerta Grande y Villa Giardino (50% de cobertura de red cloacal)

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

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 sintomáticos de SARS-CoV-2 en cloacas

Teniendo en cuenta que el 35% de los individuos infectados con SARS-CoV-2 excretan el virus por materia fecal por 21 días y teniendo en cuenta la cobertura de red cloacal por localidad estudiada, se realiza una estimación de individuos excretores del virus al momento de la toma de la muestra de agua residual. 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).

Estimación de excretores de SARS-CoV-2 en cloacas

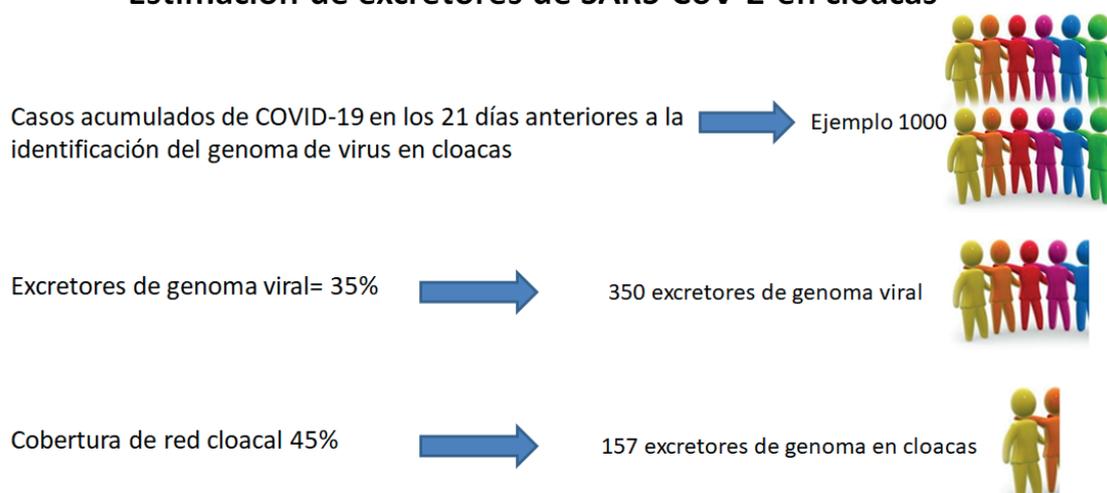


Figura 1. Estimación de excretores sintomáticos de SARS-CoV-2 en aguas cloacales. Ejemplo: 1000 casos acumulados de COVID-19 a 21 días, 35% de excretores del virus y 45% de cobertura de red cloacal.

Resultados

Córdoba Capital

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 primera muestra de agua residual en la que se detectó el genoma del virus (Valor Ct: 38,7) correspondió al día 31 de agosto del 2020. 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 y la cantidad de excretores acumulados al día 31 de agosto resulta un acumulado de excretores virales en cloacas de 332 individuos. El número de excretores teóricos estimados, coincide con

la sensibilidad de la metodología empleada, que según parámetros analíticos y de cobertura de red cloacal en Córdoba, es necesario un número no inferior a 315 excretores para la detección de genoma viral en aguas residuales de la ciudad de Córdoba (WHO, 2003). A partir de ese momento se detectó genoma viral en las muestras colectadas en las semanas siguientes, observando una tendencia a la disminución o aumento del valor de Ct conforme aumenta o disminuye la cantidad de excretores acumulados a 21 días. En la Ciudad de Córdoba la curva epidémica se puede dividir en dos momentos: el primero de ellos es desde la aparición del primer caso de COVID-19 (6 de Marzo) hasta el pico de casos registrados en la ciudad de Córdoba (20 de Octubre). En este primer momento se observa en la figura 3 una tendencia a la disminución de valores de Ct conforme van aumentando los casos de COVID-19 registrados. Un segundo momento es a partir del 20 de Octubre (pico de casos) tiempo en que se empieza a registrar una tendencia a la disminución de casos COVID-19 en la Ciudad con el consecuente aumento de valores de Ct detectados en las muestras cloacales y posterior (a partir del 7 de diciembre) negativización de las muestras cloacales en concordancia con una marcada disminución de casos clínicos en la ciudad e Córdoba (Figura 4).

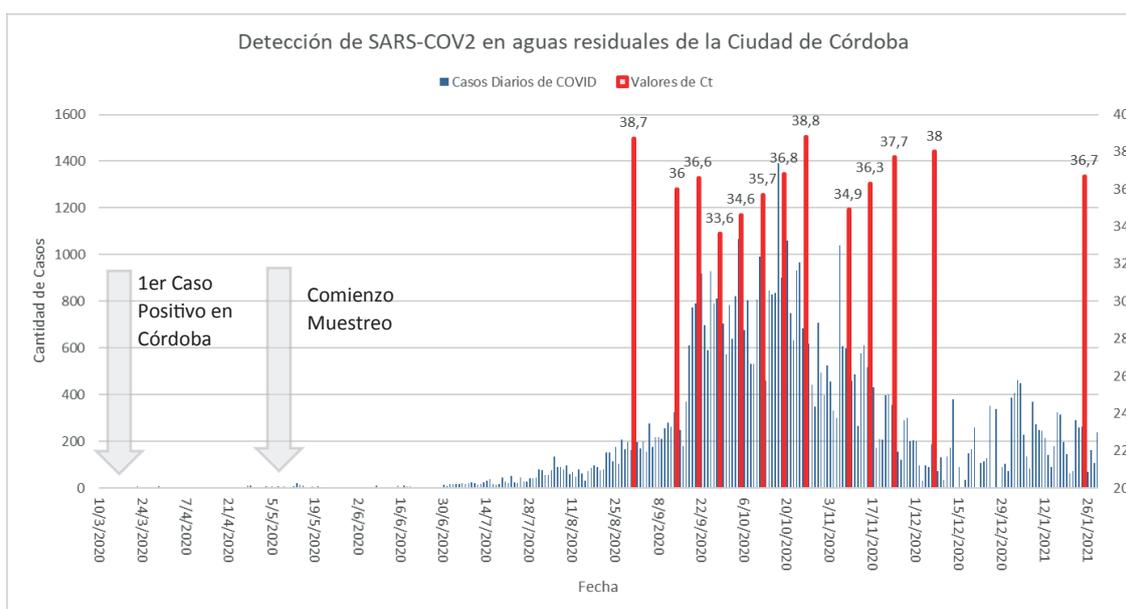


Figura 2. Primer caso de COVID-19 en la Ciudad de Córdoba, inicio del muestreo en aguas residuales, casos COVID-19 y detección de genoma viral en aguas residuales expresados en Ct

Resultados La Falda

Con el mismo criterio de análisis, se evaluaron los resultados obtenidos de la planta depuradora que recolecta aguas cloacales de La Falda, Huerta Grande y Villa Giardino. Se identificó genoma de SARS-CoV-2 en aguas crudas cuando el número de excretores alcanzó a 19 individuos, acumulados a 21 días atrás, con un valor de Ct 38,1. El número de excretores teóricos estimados, coincide con la sensibilidad de la metodología empleada, que según parámetros analíticos y de cobertura de red cloacal en las localidades analizadas, es necesario un número no inferior a 10 excretores para la detección de genoma viral en aguas residuales (WHO, 2003) En las semanas siguientes el número de casos de COVID-19 fue en tendencia descendente en estas tres localidades (número de excretores menor o igual a 9 acumulado a 21 días) y la detección viral en aguas residuales resultó negativa; hasta fines de diciembre fecha a partir de la cual comenzó a incrementarse los casos COVID-19 y acompañando esto la detección de genoma viral del SARS-CoV-2 en aguas residuales a la fecha (2 de febrero) (Figura 3).

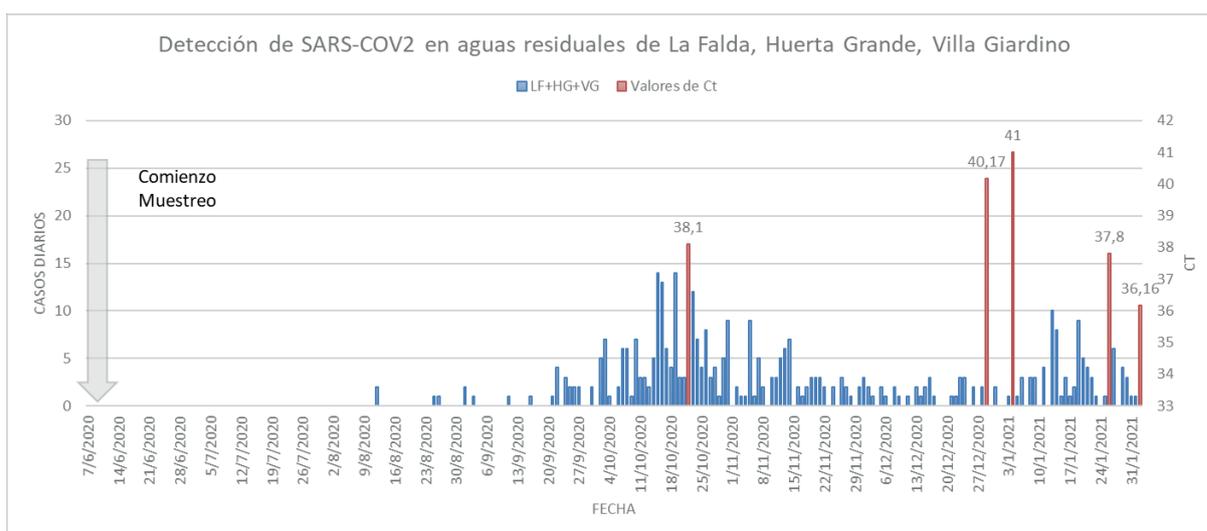


Figura 3. Primera detección de SARS-CoC-2 en la planta de tratamiento de aguas residuales que reúne a la localidad de La Falda, Villa Giardino y Huerta Grande.

Resultados Carlos Paz

Siguiendo el mismo criterio de análisis, se evaluaron los resultados obtenidos de la planta depuradora de Carlos Paz, Costa Azul. Se identificó genoma de SARS-CoV-2 en aguas crudas cuando el número de excretores alcanzó a 36 individuos acumulados a 21 días atrás, con un valor de Ct 38,4. El número de excretores teóricos estimados, coincide con la sensibilidad de la metodología empleada, que según parámetros analíticos y de cobertura de red cloacal en ciudad de Carlos Paz, es necesario un número no inferior a 15 excretores para la detección de genoma viral en aguas residuales (WHO, 2003). En

las semanas siguientes el número de casos de COVID-19 fue en tendencia descendente (Figura 4). A partir del mes de diciembre del año 2020, comenzó la afluencia turística, con el consecuente aumento de población y aumento del número de casos de CoVid-19. Si se considera un aumento medio de población en Carlos Paz entre el 50 y 100%, respecto a la población estable de la ciudad, el número de excretores mínimo necesario para la detección de virus en aguas residuales se estimó entre 25 y 30 excretores, valor que no alcanzó el acumulado de casos a 21 días, motivo que explicaría la detección viral negativa en aguas residuales (Figura 4). Sumado a estos, hay otras variables a considerar como el recambio turístico, el aumento de precipitaciones a partir del mes de Enero y la distribución de la red cloacal en la ciudad de Carlos Paz.

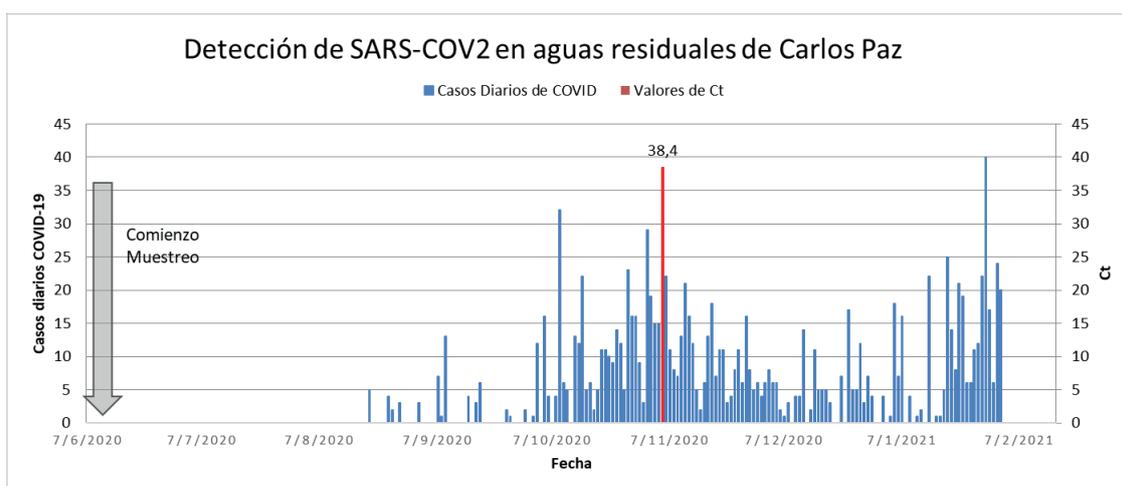


Figura 4. Primera detección de SARS-CoC-2 en aguas residuales de Costa Azul, Carlos Paz.

Discusión

La epidemiología basada en aguas residuales es una herramienta importante para estudiar la tendencia de circulación de virus en una comunidad (Sinclair et al., 2008; Xagorarakí y O'Brien, 2020), ya que las aguas residuales ofrecen un resumen de la excreción poblacional del virus en heces. (Carducci et al., 2006; La Rosa y Muscillo, 2013). Con este enfoque, es posible monitorear la epidemiología de las infecciones virales incluso si no son evidenciadas por vigilancia clínica, especialmente porque los enfoques epidemiológicos tradicionales pueden estar limitados por la naturaleza asintomática de la infección viral. Este es el caso del SARS-CoV-2, cuya infección se traduce en altas tasas de 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.

La experiencia con otras enfermedades virales ha demostrado que la vigilancia basada en aguas residuales es un indicador sensible, reportando si el patógeno está presente en la población y si la circulación viral está aumentando o disminuyendo (La Rosa y col., 2020; Sinclair y col., 2008).

En el presente informe se aportan evidencias que las aguas residuales de la ciudad de Córdoba y Valle de Punilla, se constituyen en centinelas silenciosos de la tendencia de circulación viral en la población. La detección del genoma viral de SARS-CoV-2 en las aguas cloacales (suma de la excreción viral de personas sintomáticas y asintomáticas) está ligada a la magnitud de circulación del virus en la comunidad.

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. Desde el mes de Octubre del año 2020 se llevan adelante muestreos mensuales para la detección de genoma de SARS CoV-2, en las aguas del embalse San Roque. A la fecha, la totalidad de las muestras ensayadas (n= 32) son negativas. Se prevé dar continuidad a este estudio durante el año 2021.

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).

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).