

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

Actualización a Abril 2021.

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.

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) y la Planta Municipal de tratamientos de efluentes cloacales Bajo Grande

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

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 aproximadamente tres semanas de iniciados los síntomas), tomando como valor medio de excreción 17 días, independientemente a la presencia o no de diarrea (Tian y col., 2020; 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 su sensibilidad de la cobertura de red cloacal de la comunidad en estudio.

Metodología de estudio

Muestreo de aguas residuales

Desde el mes de mayo del año 2020 y al momento del presente informe se recolectaron semanalmente, aguas residuales crudas del conducto de la red central que ingresa a la planta depuradora de aguas cloacales “Bajo Grande” de la ciudad de Córdoba (50% de cobertura de red cloacal).

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 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 17 días y teniendo en cuenta la cobertura de red cloacal de la ciudad de Córdoba, 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 17 días hacia atrás en el tiempo (Tian y col., 2020), por los porcentajes previamente mencionados (Figura 1).

Estimación de excretores de SARS-CoV-2 en cloacas

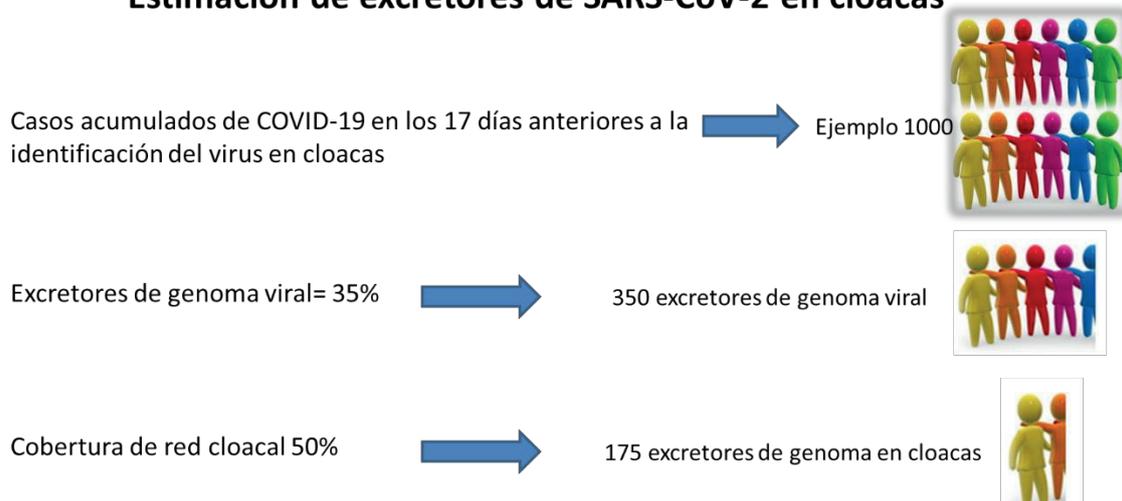


Figura 1. Estimación de excretores sintomáticos de SARS-CoV-2 en aguas cloacales. Ejemplo: 1000 casos acumulados de COVID-19 a 17 días, 35% de excretores del virus y 50% de cobertura de red cloacal.

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 cuando los casos clínicos en la ciudad de Córdoba empezaban a aumentar paulatinamente (Figura 2). La primera muestra de agua residual en la que se detectó el genoma del virus (Valor Ct: 28) correspondió al día 24 de agosto del 2020 (Figura 3). El número de casos acumulados a 17 días, en el período comprendido entre el 8 y el 24 de Agosto, era de 1331 casos de 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 24 de Agosto, resulta un total de 233 excretores en cloacas. 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 en la detección del genoma de SARS-CoV-2 medido a través del valor de Ct, conforme aumenta o disminuye la cantidad de excretores acumulados a 17 días (Figura 3). La detección de genoma viral en cloacas acompañó la curva epidémica definida por casos clínicos. En la Ciudad de Córdoba la curva epidémica se puede dividir en tres momentos: el primero de ellos comprende el período Agosto-Noviembre 2020. En este primer momento se detectó el genoma de SARS-CoV-2 en aguas residuales y como se observa en la figura 3 la detección

viral registró una tendencia a la disminución y aumento de valores de Ct conforme van aumentando o disminuyendo los casos de COVID-19 registrados. Esto define la primera ola epidémica en la ciudad de Córdoba. Un segundo momento es en el mes de Enero del 2021, en el que se evidencia un brote epidémico. El tercer momento se registra a partir del mes de Abril 2021, con detección viral en aguas residuales, acompañado de un aumento en el registro de casos clínicos, marcando el inicio de la segunda ola epidémica.

Figura 2. Inicio del muestreo en aguas residuales y número de casos diarios de COVID-19 en la ciudad de Córdoba

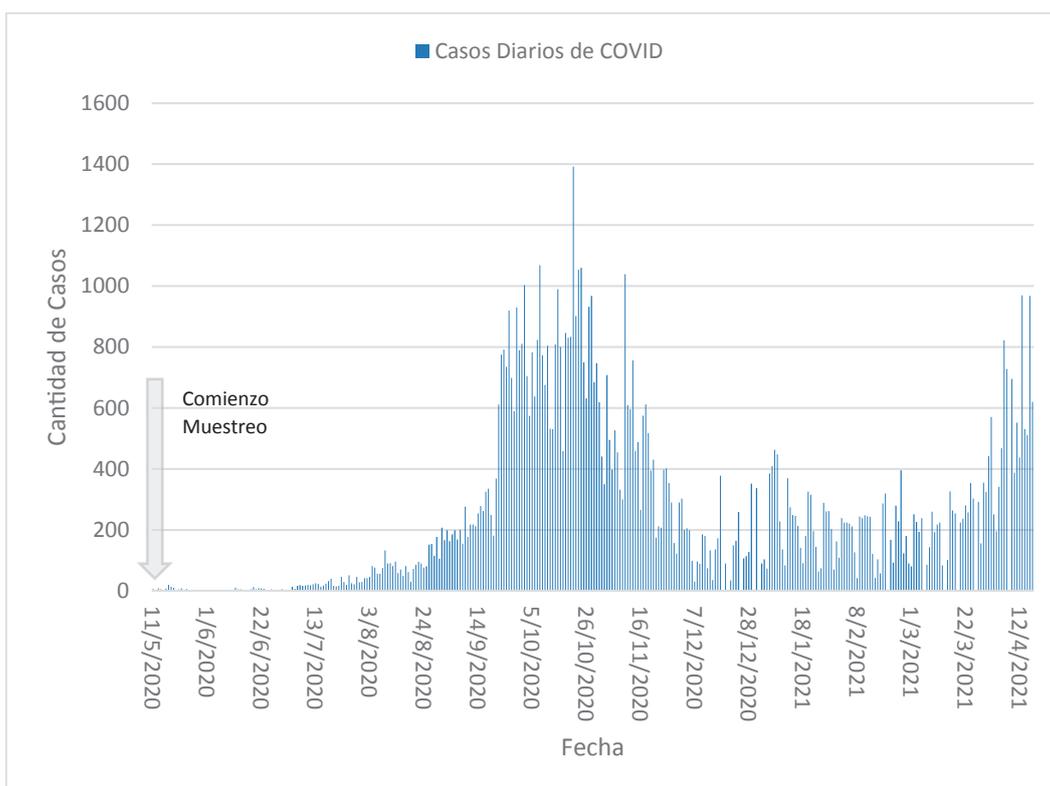
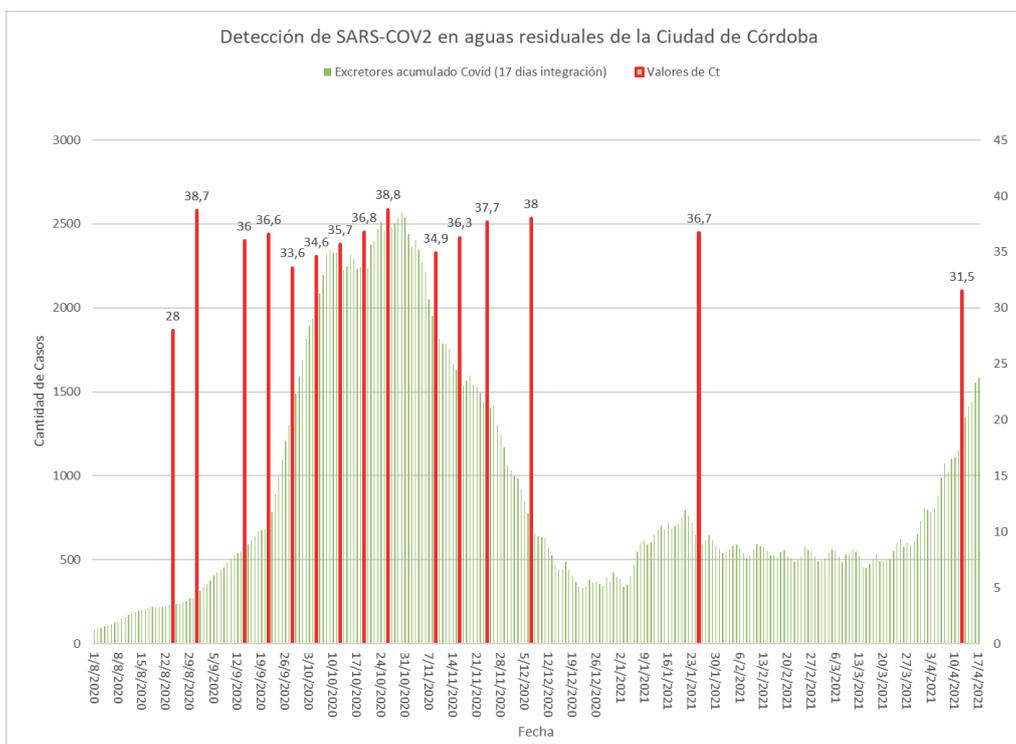


Figura 3. Detección de Sars-CoV-2 en las aguas residuales de la ciudad de Córdoba



La detección del genoma de SARS-CoV-2 se expresa en valores de Ct. A mayor valor de Ct indica una menor carga viral.

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 (suma de la excreción viral de personas sintomáticas y asintomáticas) (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.

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 se constituyen en centinelas silenciosos de la tendencia de circulación viral en la población. Así, el estudio de la epidemiología basada en aguas residuales en la ciudad de Córdoba refleja la curva epidémica basada en casos clínicos señalando una primera etapa de incremento de casos (primera ola epidémica, período Agosto-Noviembre 2020); un brote epidémico (Enero 2021) y el inicio de una segunda etapa de incremento de casos (inicio de la segunda ola epidémica, Abril 2021). La detección de genoma viral en las aguas residuales tuvo valor predictivo de aumento de casos en el inicio de la primera ola epidémica. Esto podría responder a una sub-notificación y la subestimación de la carga de enfermedad de covid-19 debido a que excretores asintomáticos y pre-sintomáticos todavía no habían sido diagnosticados y registrados como casos clínicos.

Sin embargo, cuando la vigilancia clínica acoplada a la de laboratorio cubre acabadamente la demanda de la población, y se genera el registro de casos clínicos diariamente, como ocurre en la provincia de Córdoba, la detección de SARS-CoV-2 en aguas residuales acompaña la curva de casos. Por lo tanto, la epidemiología basada en aguas residuales tendría valor predictivo de aumento de nuevos casos cuando hay retraso de notificación de casos, bajo número de testeos o una alta tasa de individuos infectados asintomáticos o pre-sintomáticos.

Los resultados obtenidos sugieren que la epidemiología basada en aguas residuales de SARS-CoV-2 es una herramienta valiosa y complementaria para la vigilancia de COVID-19, que agrega información sobre la circulación viral a lo largo de las distintas fases de la curva epidémica pudiendo tener valor predictivo.

En Córdoba capital al igual que en algunos países como Australia, Nueva Zelanda, Países Bajos y partes de Brasil, se adoptó la vigilancia ambiental como una herramienta para rastrear la dinámica de circulación de SARS-CoV-2 en la comunidad.

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.jmii.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>

Tian Y, Rong L, Nian W, He Y. 2020. Review article: gastrointestinal features in COVID-19 and the possibility of faecal transmission. *Aliment Pharmacol Ther.* 51(9):843-851. doi:10.1111/apt.15731

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