

## **Epidemiología basada en aguas residuales en la ciudad de Córdoba:**

### **Monitoreo ambiental de SARS-CoV-2 y variantes de preocupación en aguas cloacales de la ciudad de Córdoba Capital.**

**Datos actualizados a Agosto 2021.**

El objetivo del presente documento es dar conocimiento público sobre resultados preliminares de la presencia de genoma del virus SARS-CoV-2 y variantes de preocupación (VOC) y de interés (VOI) 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 Nacional de Medicina Aeronáutica y Espacial 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 Nacional de la Defensa-Instituto Nacional de Medicina Aeronáutica y Espacial:** Dra. Ariana Mariela Cachi. Dra. María de los Ángeles Marinzalda

**Municipalidad de Córdoba, Secretaría 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

## Resumen

En el contexto de la vigilancia ambiental basada en aguas residuales se viene describiendo, desde el inicio de la pandemia, la dinámica de circulación de variantes virales en la ciudad de Córdoba. En el mes de Agosto 2021 se identificó la variante Delta en las aguas residuales en co-detección con las variantes Alpha, Gamma y no VOC, previamente identificadas, reflejando la co-circulación de estas variantes en la población de la Ciudad de Córdoba

## Marco teórico

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; Chen et al., 2020a, 2020b; Gao et al., 2020; Wang et al., 2020a, 2020b, 2020c), 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 síntomas gastrointestinales (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). De esta manera, el estudio de aguas residuales, es una matriz que resumiría la excreción poblacional de virus (suma de la excreción viral de personas sintomáticas y asintomáticas), dependiendo su sensibilidad de la cobertura de red cloacal de la comunidad en estudio y de la metodología utilizada para la detección del genoma viral (Sinclair et al., 2008; Xagorarakis y O'Brien, 2020; Carducci et al., 2006; La Rosa y Muscillo, 2013). Con este enfoque, también es posible monitorear la circulación de variantes virales en la población, con particular atención a las variantes de preocupación del virus SARS-CoV-2, dado su impacto en salud humana.

## Metodología de estudio

### Muestreo de aguas residuales

Desde el mes de mayo del año 2020 y al momento del presente informe se recolectaron, 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). Frecuencia de recolección: Dos muestras por semana.

### **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. Eficiencia de recuperación: 20%.

**Extracción del ARN genómico de los concentrados virales**

Extracción automatizada de ácidos nucleicos mediante GenePure Pro Nucleic Acid Purification System NPA-32P - BIOER o sistema MagNA Pure 96 - Roche.

**Detección del genoma de SARS-CoV-2**

Desde el inicio del estudio de SARS-CoV-2 en aguas residuales, la detección del genoma del virus se realiza a través del DisCoVery SARS-CoV-2RT-PCR Detection Kit que identifica los genes N (nucleocápside) y Orf1ab (fragmento de lectura abierto 1ab). En este estudio se analizaron solo los resultados derivados de la detección del gen N debido a que tiene mayor sensibilidad respecto al gen Orf1ab.

A partir del mes de Octubre del año 2020 se acopló a la detección del gen N, la detección del Gen E (envoltura), mediante la utilización del LightMix® Modular SARS and Wuhan CoV E-gene kit, para aumentar la sensibilidad de la detección.

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

**Detección de variantes de preocupación de SARS-CoV-2 mediante PCR en tiempo real**

A partir de las muestras de aguas residual concentradas, con resultado SARS-CoV-2 positivo, se realizó la técnica de RT-PCR en tiempo real utilizando el reactivo TaqMan™ SARS-CoV-2 Mutation Panel (Applied Biosystems), capaz de detectar mutaciones puntuales características de las variantes de preocupación (VOC) (Alpha-UK-Reino Unido; Beta-SA-Sud África; Gamma-MA- Manaos, Delta-IN-India) y las de interés (Lambda-AN-Andina; Zeta-RJ-Río de Janeiro; y Épsilon-CA-California)(Figura 1).

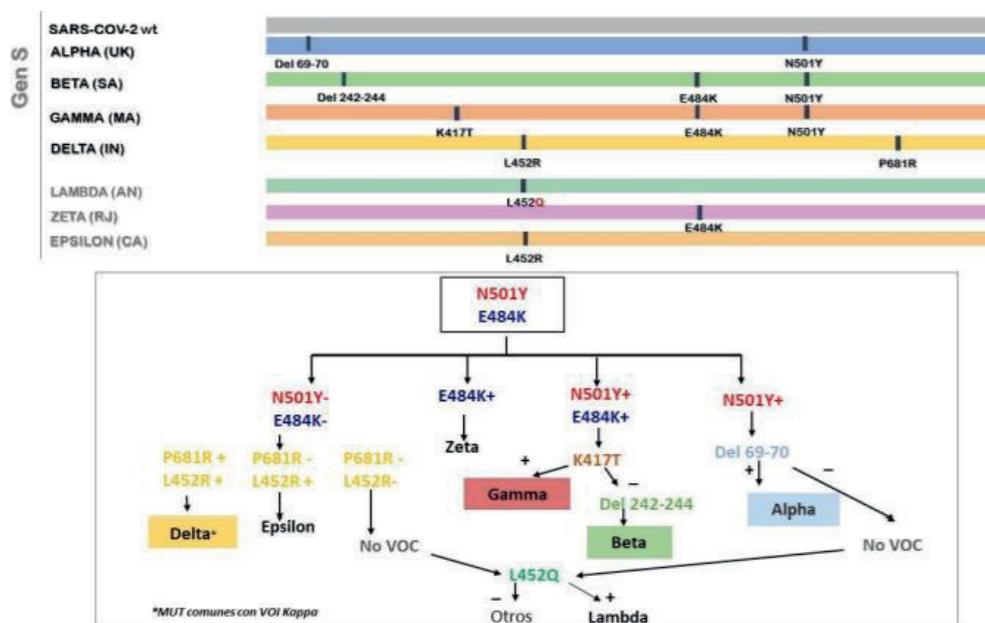


Figura 1. Ensayos para identificar mutaciones conservadas y específicas de SARS-CoV-2

## Estimación de excretores sintomáticos de SARS-CoV-2 en cloacas

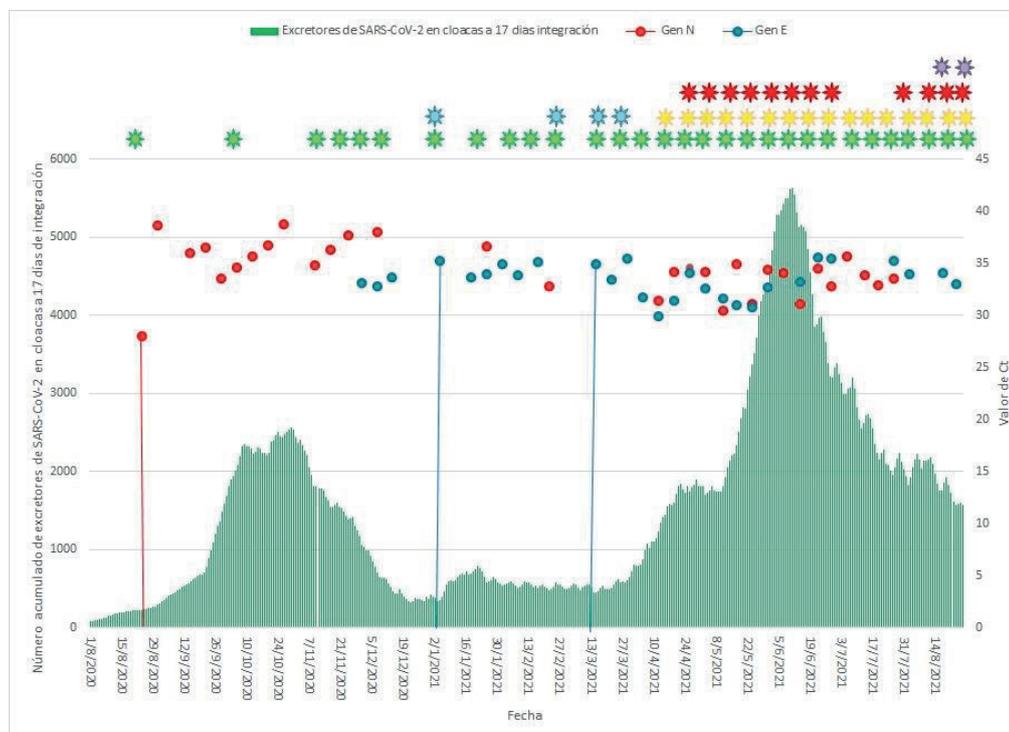
Estimando que el 35% de los individuos infectados con SARS-CoV-2 excretan el virus por materia fecal, en promedio, durante 17 días y teniendo en cuenta la cobertura de red cloacal de la ciudad de Córdoba, se realiza una estimación de individuos excretores del virus al momento de la toma de la muestra 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 (porcentaje de individuos conectados a la red cloacal en la comunidad estudiada y el 35% estimado de excretores).

## 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 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: 28) correspondió al día 24 de agosto del 2020 (Figura 2). 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 sintomáticos en cloacas. A partir de este momento, la detección de SARS-CoV-2 en aguas residuales acompañó la curva epidémica definida por casos clínicos de COVID-19. Así, la detección de genoma viral en aguas residuales se puede dividir en tres momentos: el primero de ellos comprende el período 24 de Agosto-12 de Diciembre 2020 y reflejó la primera ola epidémica en la ciudad de Córdoba. La primera detección de genoma viral en cloacas fue predictiva del aumento posterior de casos clínicos de COVID-19 en la Ciudad de Córdoba (Figura 2). Un segundo momento es en el mes de Enero del 2021, en el que se evidencia un brote epidémico. La detección del genoma al inicio del mes de Enero fue predictivo del brote de verano (Figura 2). El tercer momento se registra a partir de mediados del mes de Marzo 2021 (15 de Marzo del 2021), teniendo valor predictivo, dos semanas antes, del inicio de la segunda ola epidémica en la ciudad de Córdoba (Figura 2). En esta segunda ola epidémica el genoma del virus se detectó ininterrumpidamente en las semanas siguientes, acompañado de un aumento en el registro de casos clínicos.

Del análisis de mutaciones, se desprende que en la primera ola epidémica en la ciudad de Córdoba circuló la cepa wild type, confirmada por análisis de genoma completo. El brote de verano se inicia con la introducción de la variante de interés Zeta-RJ-Rio de Janeiro en co-circulación con variantes no VOC. La segunda ola, mediados de mes de Marzo, inicia con la co-circulación de Zeta-RJ-Rio de Janeiro y no VOC. A partir del inicio del mes de Abril (5 de Abril), se identifica, además, la introducción de las variantes Gamma-MA-Manaos y Alpha-UK-Reino Unido. En el mes de Agosto 2021, se detecta en

las aguas residuales la Variante Delta-IN-India, en co-circulación con las variante Gamma, Alpha y no VOC, en ausencia la variante Zeta (Figura 2).



**Figura 2. Detección de Sars-CoV-2 en las aguas residuales de la ciudad de Córdoba y dinámica de circulación de variantes de preocupación.**

Genes estudiados: ● Gen E; ● Gen N

Variantes estudiadas: ● Wild Type-No VOC; ● Zeta-RJ-Río de Janeiro; ● Alpha-UK-Reino Unido; ● Gamma-MA-Manaos; ● Delta-IN-India

**Puntos a destacar de los resultados informados**

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 de SARS-CoV-2 en la población y de la dinámica de circulación de variantes virales. Así, el estudio de la epidemiología basada en aguas residuales de la ciudad de Córdoba refleja la curva epidémica basada en casos clínicos, siendo la detección del genoma viral en cloacas predictivo de olas epidémicas y brotes aislados. El valor predictivo de la presencia de genoma de SARS-CoV-2 en

las aguas residuales podría explicarse por un número significativo de excretores asintomáticos y pre-sintomáticos.

- Se describió la dinámica de circulación de variantes virales en la ciudad de Córdoba durante todo el período estudiado. En el mes de Agosto 2021 se identificó la variante Delta en las aguas residuales en co-detección con las variantes Alpha, Gamma y no VOC, reflejando la co-circulación de estas variantes en la población de la Ciudad de Córdoba.

El informe recientemente publicado por la Unión Europea (Diario Oficial de la Unión Europea 2021) destaca que las nuevas variantes del virus están evolucionando y propagándose por todo el mundo. La experiencia de los Estados miembros en este ámbito ha demostrado que la vigilancia del SARS-CoV-2 y sus variantes en las aguas residuales puede ser una fuente de información rápida y fiable sobre la propagación del SARS-CoV-2 entre la población y que puede constituir una parte valiosa de una vigilancia genómica y epidemiológica reforzada. La vigilancia del SARS-CoV-2 en las aguas residuales puede proporcionar información complementaria e independiente importante para el proceso de toma de decisiones en materia de salud pública en el contexto de la actual pandemia de COVID-19. En consecuencia, el seguimiento de las aguas residuales debería incluirse en las estrategias nacionales de detección del virus SARS-CoV-2.

- En la provincia de Córdoba al igual que en algunos países del mundo 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 y variantes de preocupación (VOC) en la comunidad.

### Agradecimientos

Este trabajo de investigación recibe aportes financieros del Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación de la Nación Argentina a través del Programa de Articulación y Fortalecimiento Federal de las Capacidades en Ciencia y Tecnología COVID-19 (CORD 29), de la Agencia Nacional de Promoción de la Investigación, el Desarrollo Tecnológico y la Innovación - IP-COVID (IP 558), del Programa de Acreditación y Financiamiento de Proyectos de Investigación y Desarrollo de la Universidad de la Defensa Nacional, del Ministerio de Salud de Córdoba y de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad Nacional de Córdoba.

### 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>.

Diario Oficial de la Unión Europea: ECOMENDACIÓN (UE) 2021/472 DE LA COMISIÓN de 17 de marzo de 2021 sobre un enfoque común para establecer una vigilancia sistemática del SARS-CoV-2 y sus variantes en las aguas residuales de la UE. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/ES/TXT/HTML/?uri=CELEX:32021H0472&from=EN>

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>

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., Ehmman, 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