

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

Instituto de Virología “Dr. JM. Vanella” Facultad de Ciencias Médicas, UNC

Ministerio de Salud de la Provincia Córdoba

Laboratorio Central Ministerio de Salud

Universidad de la Defensa-Instituto de Medicina Aeronáutico Espacial

Planta de Tratamiento de efluente cloacales Bajo Grande-Laboratorio de análisis fisicoquímicos, bacteriológicos EDAR Bajo Grande, Córdoba Capital

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

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 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).



Figura 1. Estimación de excretores 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 primer muestra de agua residual en la que se detectó el 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. A partir de ese momento se detectó genoma viral en todas 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 (Figura 4).

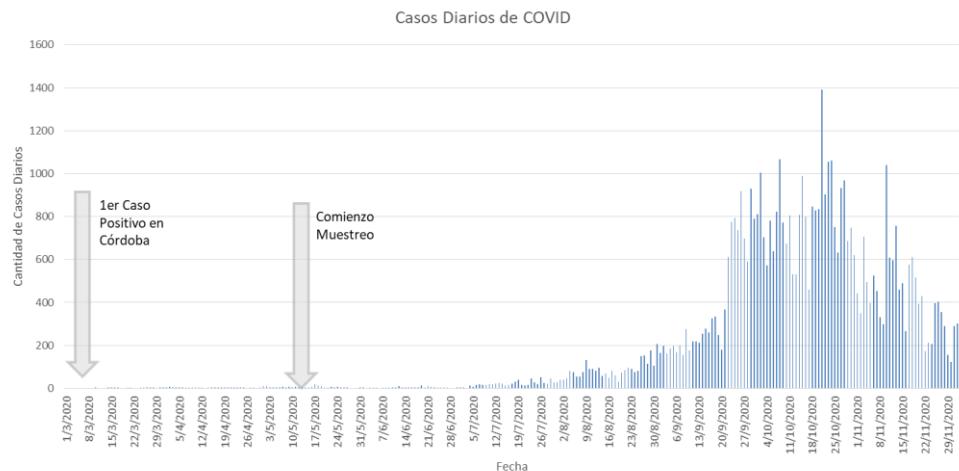


Figura 2. Primer caso de COVID-19 en la Ciudad de Córdoba/Inicio del muestreo en aguas residuales.

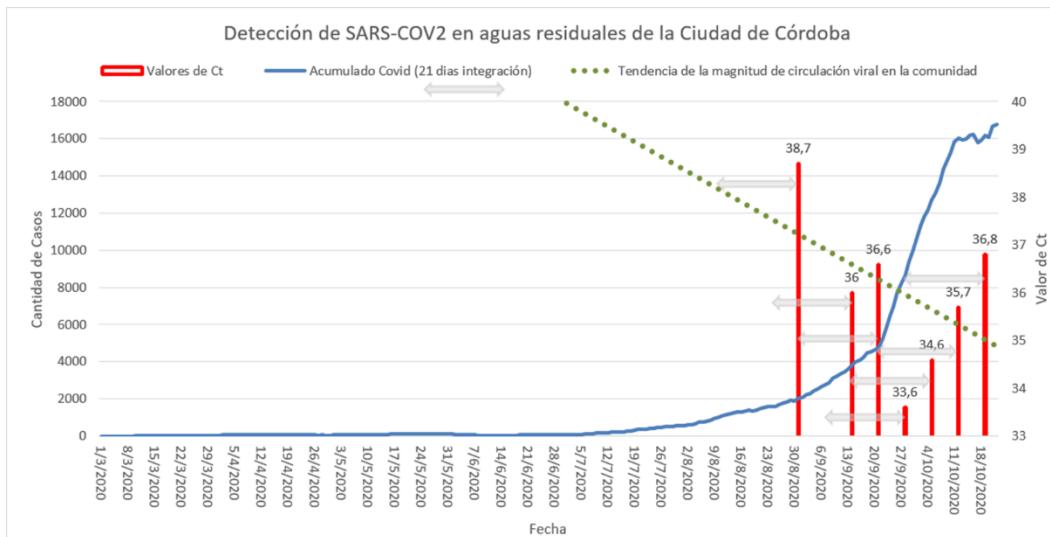


Figura 3. Curva epidémica de SARS-CoV-2, primer momento: Detección de SARS-CoV2 en aguas residuales y tendencia de la magnitud de circulación del virus en la ciudad de Córdoba hasta el 20 de Octubre del 2020

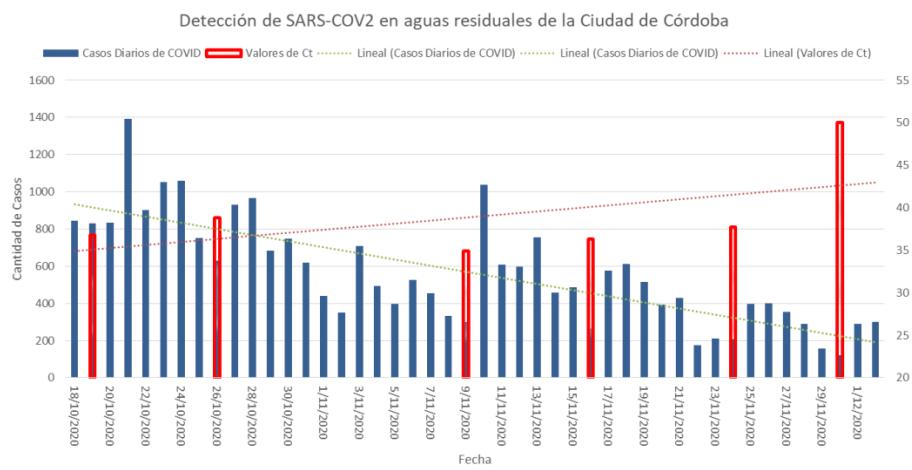


Figura 4. Curva epidémica de SARS-CoV-2, segundo momento: Detección de SARS-CoV2 en aguas residuales y tendencia de la magnitud de circulación del virus en la ciudad de Córdoba hasta el 3 de Diciembre del 2020

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. 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 (Figura 5)



Figura 5. Primera detección de SARS-CoV-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. En las semanas siguientes el número de casos de COVID-19 fue en tendencia descendente (número de excretores menor a 20 acumulados a 21 días) y la detección viral en aguas residuales resultó negativa (Figura 6)

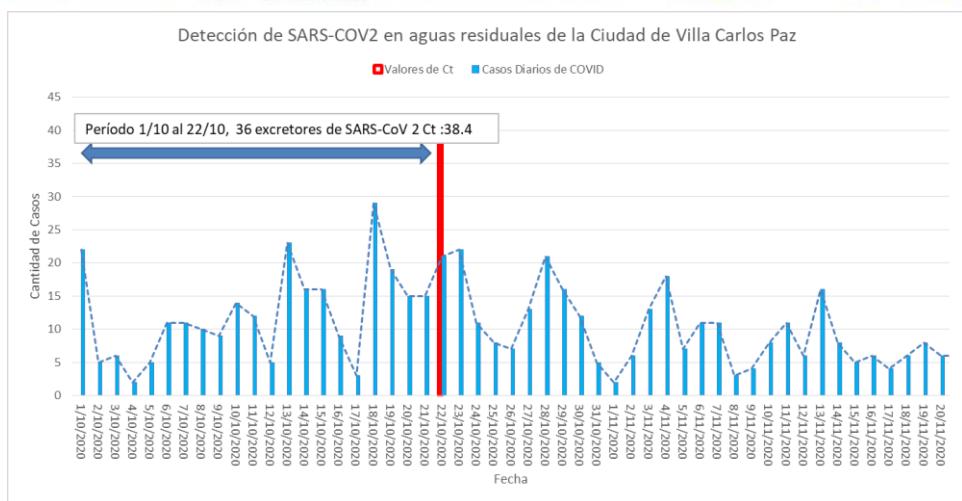


Figura 6. Primera detección de SARS-CoV-2 en aguas residuales de Costa Azul, Carlos Paz.

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; Xagoraraki y O'Brien, 2020), ya que las aguas residuales ofrecen un resumen de la excreción poblacional de 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 evidentes mediante la vigilancia clínica, especialmente porque los enfoques epidemiológicos tradicionales pueden estar limitados por la naturaleza asintomática de muchas infecciones virales. 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.

En este trabajo 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 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 transmisión está aumentando o disminuyendo (La Rosa y col., 2020; Sinclair y col., 2008). En nuestro estudio se estimó, en base al valor del Ct, que el virus en la ciudad de Córdoba tuvo una tendencia al aumento y posterior disminución en su dinámica de circulación a lo largo del período pandémico (6 de Marzo a la fecha).

Los resultados obtenidos en Valle de Punilla destacan la importancia de la vigilancia basada en aguas residuales para identificar la tendencia de la dinámica de circulación del virus en comunidades de bajo número de habitantes

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., Chunling, 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>

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., Seilmäier, M., Zange, S., Mueller, M.A., Niemeyer, D., Vollmar, P., Rothe, C., Hoelscher, M., Bleicker, T., Bruenink, S., Schneider, J., Ehmann, R., Zwirglmaier, 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.*

Xagoraraki, 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