

LA HUELLA GENÉTICA DE LAS ESTACIONES DEPURADORAS DE AGUAS RESIDUALES COMO SISTEMA DE ALERTA PARA HACER FRENTE AL COVID-19

LA PRESENCIA DE TRAZAS DE ARN DE SARS-CoV-2 EN LAS HECE DE ENFERMOS POR COVID-19 HA ABIERTO DOS VÍAS DE INVESTIGACIÓN NOVEDOSAS PARA LUCHAR FRENTE A ESTA ENFERMEDAD. UNA DE LAS LÍNEAS DE INVESTIGACIÓN SE CENTRA EN DETERMINAR SI LA CONTAMINACIÓN FECAL-ORAL PUEDE SER UN VECTOR RELEVANTE EN LA TRANSMISIÓN POR COVID-19. Y, POR OTRO LADO, SE INTENTA ESTABLECER UN SISTEMA DE ALERTA TEMPRANA MEDIANTE LA VIGILANCIA DEL MATERIAL GENÉTICO PRESENTE EN LAS AGUAS RESIDUALES QUE SE RECOGEN DE LOS NÚCLEOS URBANOS COMO INDICADOR DE LA EXTENSIÓN DE LA ENFERMEDAD ENTRE LA POBLACIÓN. EN ESA VÍA DE INVESTIGACIÓN ES EN LA QUE EL IATA-CSIC Y EL CEBAS-CSIC ESTAMOS TRABAJANDO DESDE PRINCIPIOS DE MARZO, ANTES DE QUE SE DECLARARA EL ESTADO DE ALARMA.

Introducción

El 11 de marzo de 2020, la Organización Mundial de la Salud declara mundialmente la pandemia provocada por el SARS-CoV-2, el cual provoca la enfermedad conocida como COVID-19. Este virus perteneciente a la familia de los coronavirus se transmite entre humanos principalmente a través de secreciones respiratorias. Sin embargo, el SARS-CoV-2 también ha sido detectado en heces y orina de enfermos con COVID-19 y en portadores asintomáticos (He et al., 2020; Pan et al., 2020; Woelfel et al., 2020; Sun et al., 2020). A pesar de que la cantidad de material genético que se excreta puede variar de 10^2 a 10^8 copias de ARN por gramo (Pan et al., 2020; Woelfel et al., 2020), la ruta de transmisión fecal-oral aún no ha sido confirmada.

La presencia de este material genético en las heces ponía de manifiesto la posible presencia del ARN del SARS-CoV-2 en las aguas residuales. Previamente, otras enfermedades provocadas por virus entéricos como, el virus de la hepatitis E, norovirus y poliovirus ya habían sido estudiadas mediante la búsqueda de su material genéticos en las aguas residuales. Actualmente, son varias las investigaciones que alrededor del mundo ya han detectado ARN del SARS-CoV-2 en aguas residuales (Ahmed et al., 2020; Lodder, et al., 2020; Medema et al., 2020; Randazzo et al., 2020; Wu et al., 2020; Wurtzer et al., 2020). Estos estudios han sugerido que el monitoreo del material genético del SARS-CoV-2 en dichas aguas puede ser una herramienta no invasiva de alerta temprana para evaluar el estado y la tendencia de la infección por COVID-19 en una población y como un instrumento para ajustar la respuesta de salud pública.

Vigilancia epidemiológica en la Región de Murcia

La investigación que se desarrolla y que comenzó la primera semana de marzo, se centra en el análisis de las aguas de influente que llegan a seis depuradoras en la Región de Murcia y que representan aproximadamente la mitad de todos los efluentes que se generan en esta Región. Los análisis de las aguas residuales en Murcia comenzaron incluso antes de que se decretara el Estado de Alarma en Espa-



THE GENETIC FINGERPRINT OF WASTEWATER TREATMENT PLANTS AS A WARNING SYSTEM TO COMBAT COVID-19

THE PRESENCE OF SARS-CoV-2 RNA TRACES IN THE FAECES OF COVID-19 PATIENTS HAS OPENED UP TWO NEW AVENUES OF RESEARCH TO COMBAT THE DISEASE. ONE OF THESE RESEARCH LINES FOCUSES ON DETERMINING WHETHER THE FAECAL-ORAL ROUTE COULD BE A RELEVANT VECTOR IN THE TRANSMISSION OF COVID-19. THE OTHER RESEARCH LINE SEEKS TO ESTABLISH AN EARLY WARNING SYSTEM THROUGH THE SURVEILLANCE OF GENETIC MATERIAL PRESENT IN THE WASTEWATER COLLECTED FROM URBAN AREAS AND USING THIS AS AN INDICATOR OF THE DEGREE TO WHICH THE POPULATION IS INFECTED BY THE DISEASE. THE IATA-CSIC AND CEBAS-CSIC RESEARCH TEAMS HAVE BEEN WORKING ON THIS SECOND LINE OF RESEARCH SINCE EARLY MARCH, PRIOR TO THE DECLARATION OF THE STATE OF ALARM IN SPAIN.



Introduction

On March 11, 2020, the World Health Organisation declared the global SARS-CoV-2 pandemic, which causes the illness known as COVID-19. This virus, which belongs to the coronavirus family, is transmitted amongst humans mainly through respiratory secretions. However, SARS-CoV-2 has also been detected in the faeces and urine of COVID-19 patients and asymptomatic carriers (He et al., 2020; Pan et al., 2020; Woelfel et al., 2020; Sun et al., 2020). Despite the fact that the quantity of genetic material secreted can vary from 10^2 to 10^8 RNA copies per gram (Pan et al., 2020; Woelfel et al., 2020), the faecal-oral route of transmission has yet to be confirmed.

The presence of this genetic material in faeces brought attention to the possible presence of SARS-CoV-2 RNA in wastewater. Previously, other diseases caused by enteric viruses, such as the hepatitis E virus, norovirus and poliovirus, had been studied by searching for their genetic material in wastewater. A number of research studies worldwide have now detected SARS-CoV-2 RNA in wastewater (Ahmed et al., 2020; Lodder, et al., 2020; Medema et al., 2020; Randazzo et al., 2020; Wu et al., 2020; Wurtzer et al., 2020). These studies suggest that monitoring SARS-CoV-2 genetic material in wastewater could be a non-invasive early warning tool to evaluate COVID-19 infection status and trends in a population, as well as an instrument to adjust the response of public health services.



ña y algunas de las depuradoras analizadas corresponden a localidades que en ese momento aún no tenían registrado por parte de las autoridades sanitarias ningún caso positivo de COVID-19. Es más, en tres de las localidades muestreadas, se declararon los primeros casos de personas afectadas entre 12 y 16 días después de que se comenzasen los muestreos. Sin embargo, los análisis de las aguas residuales desvelaban que el ARN del SARS-CoV-2 ya estaba circulando semanas antes de que se confirmara el primer caso de COVID-19 en estas poblaciones.

En base a este estudio y a los datos que se han obtenido, son muchos los investigadores que ya consideran el análisis de las aguas residuales como un primer sistema de alerta temprana para detectar el aumento de casos entre la población incluso antes de que sean confirmados por los servicios sanitarios. Este sistema de alarma debe ser complementario a los análisis que se realizan a la población con el fin de determinar el número real de afectados.

En el momento actual de desescalada, y bajo el riesgo de que un repunte en el número de contagios pueda aparecer en distintas poblaciones que parecen tener el número de nuevos contagiados bajo control, creemos que el análisis de las aguas residuales puede ayudar a la toma de decisiones con respecto a qué medidas de prevención se deben implementar con el fin de reducir el riesgo de la población a un contagio masivo.

Esta línea de investigación sigue en constante evolución y el siguiente paso es poder desarrollar los modelos matemáticos que permitan, en base a las concentraciones de ARN presente en las aguas residuales, estimar el número real de afectados en una población, incluyendo los casos sintomáticos como los asintomáticos. Sin embargo, hay que tener en cuenta que es muy difícil establecer una correlación cuantitativa entre las concentraciones de SARS-COV-2 en aguas residuales y los casos confirmados de COVID-19. Los motivos son varios, pero entre ellos podemos mencionar que todavía no se realizan test a la población de forma masiva y que las características intrínsecas de los colectores y de las estaciones

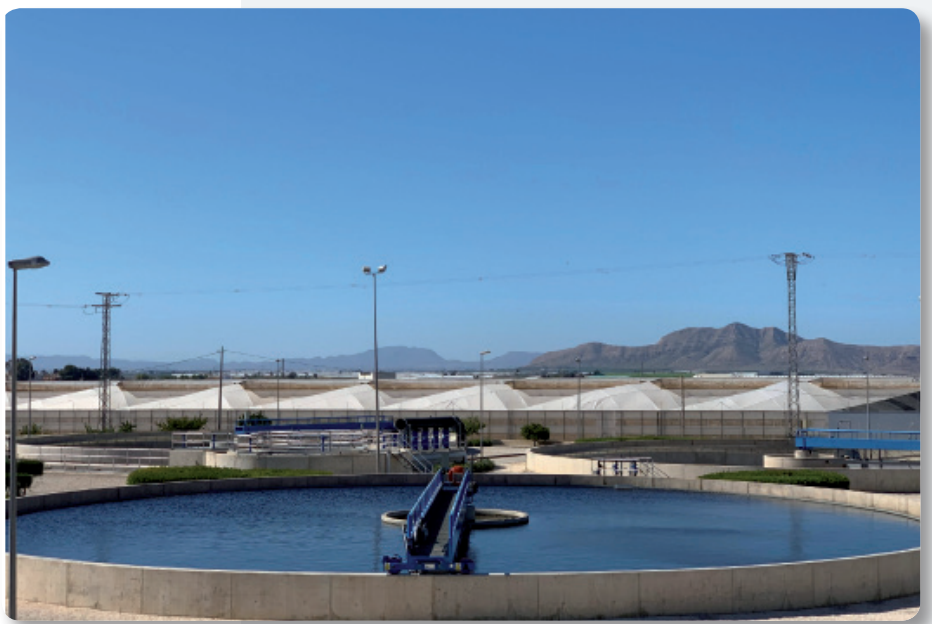
Epidemiological surveillance in the Region of Murcia

The research being carried out commenced in the first week of March and focuses on the analysis of the influent of six wastewater treatment plants in the Region of Murcia, which represents approximately half of all the wastewater generated in this region. Analysis of wastewater in Murcia began even before the declaration of the State of Alarm in Spain and some of the plants treat the wastewater from districts where no positive cases of COVID-19 had been registered by health authorities up to that time. Indeed, in three of the districts where samples were taken, the first cases of people affected by the disease were declared between 12 and 16 days after the sample-taking began. However, the wastewater analysis revealed that SARS-CoV-2 RNA was already in circulation weeks prior to the confirmation of the first case of COVID-19 in these districts.

Based on this study and the data obtained, many researchers now consider wastewater analysis to be a primary early warning system to detect an increase of cases amongst the population, even prior to the confirmation of cases by the health services. This alarm system should be complementary to the analyses carried out on the population to determine the real number of people affected.

In the current scenario of the gradual emergence from lockdown, and with the risk of a possible upturn in the numbers of cases in different districts which seemed to have the spread of the disease under control, we believe that wastewater analysis could help in decision-making related to the implementation of preventive measures designed to reduce the risk of mass infection amongst the population.

This line of research is in a state of constant evolution and the next step is to develop the mathematical models which, based on RNA concentrations in wastewater, would enable estimates of the real number of both symptomatic and asymptomatic cases in a population. However, it must be borne in mind that it is very difficult to establish a quantitative correlation between SARS-COV-2 concentrations in wastewater and confirmed COVID-19 cases. There are several reasons for this, but amongst those we



depuradoras de agua residuales hacen difícil poder extrapolar los datos de una zona a otra. Con el fin de afinar estos análisis, será necesario incluir en el modelo matemático los parámetros críticos capaces de estimar de forma precisa las variables que afectan tanto a los datos relacionados con la vigilancia epidemiológica, como por ejemplo cuales es el número real de casos positivos dentro de una Región, la concentración de SARS-COV-2 que es excretada por enfermos y asintomáticos, la variabilidad y la estacionalidad de las depuradoras, así como factores ambientales (lluvia y temperatura) que también afectan a los flujos de las aguas residuales.

Conclusión

En general, la vigilancia de aguas residuales representa un enfoque complementario para estimar la presencia e incluso la prevalencia de COVID-19 en una población. Sin embargo, su utilización como un sistema de alerta temprana, lo convierte en una herramienta eficaz que debe tenerse en cuenta por los gestores a la hora de tomar decisiones sobre las medidas preventivas que son necesarias para evitar un nuevo repunte de la enfermedad, principalmente cuando la capacidad para realizar pruebas masivas a la población es reducida.

can mention the fact that mass testing is not yet being carried out on the population and that the intrinsic characteristics of sewage pipes and wastewater treatment plants make it difficult to extrapolate data from one region to another. In order to optimise these analyses, the mathematical model will have to include the parameters needed to estimate precisely the variables that influence data associated with epidemiological surveillance. These variables include the real number of positive cases within a region, the concentration of SARS-COV-2 excreted by patients and asymptomatic carriers, the variability and seasonality of the wastewater treatment plants, and environmental factors (rainfall and temperature), which also affect wastewater streams.

Conclusion

In general, wastewater surveillance represents a complementary approach for estimating the presence and even the prevalence of COVID-19 in a population. Its implementation as an early warning system makes it a useful decision-making tool for those responsible for adopting the preventive measures necessary to prevent a new outbreak of the disease, mainly when the capacity to carry out mass testing of the population is limited.

Referencias | References

- Ahmed, W., Angel, N., Edson, J., Bibby, K., Bivins, A., O'Brien, J.W., Choi, P.M., Kitajima, M., Simpson, S.L., Li, J., Tschärke, B., Verhagen, R., Smith, W.J.M., Zaugg, J., Dierens, L., Hugenholtz, P., Thomas, K.V., Mueller, J.F., 2020. First confirmed detection of SARS-CoV-2 in untreated wastewater in Australia: A proof of concept for the wastewater surveillance of COVID-19 in the community. *Sci. Total Environ.* 138764. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.138764>
- He, X., Lau, E.H.Y., Wu, P., Deng, X., Wang, J., Hao, X., Lau, Y.C., Wong, J.Y., Guan, Y., Tan, X., Mo, X., Chen, Y., Liao, B., Chen, W., Hu, F., Zhang, Q., Zhong, M., Wu, Y., Zhao, L., Zhang, F., Cowling, B.J., Li, F., Leung, G.M., 2020. Temporal dynamics in viral shedding and transmissibility of COVID-19. *Nat. Med.* <https://doi.org/10.1038/s41591-020-0869-5>
- Lodder, W., de Roda Husman, A.M., 2020. SARS-CoV-2 in wastewater: potential health risk, but also data source. *Lancet Gastroenterol. Hepatol.* [https://doi.org/10.1016/S2468-1253\(20\)30087-X](https://doi.org/10.1016/S2468-1253(20)30087-X)
- Medema, G., Heijnen, L., Elsinga, G., Italiaander, R., Brouwer, A., 2020. Presence of SARS-Coronavirus-2 in sewage. *medRxiv 2020.03.29.20045880*. 5880
- 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)
- Randazzo, W., Truchado, P., Cuevas Ferrando, E., Simon Andreu, P., Allende, A., Sanchez, G., 2020. SARS-CoV-2 RNA titers in wastewater anticipated COVID-19 occurrence in a low prevalence area. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2020.115942>
- Sun, J., Zhu, A., Li, H., Zheng, K., Zhuang, Z., Chen, Z., Shi, Y., Zhang, Z., Chen, S-b., Liu, X., Dai, J., Li, X., Huang, S., Huang, X., Luo, L., Wen, L., Zhuo, J., Li, Y., Wang, Y., Zhang, Lu., Zhang, Y., Li, F., Feng, L., Chen, X., Zhong, N., Yang, Z., Huang, J., Zhao, J., Li, Y-m, 2020. Isolation of infectious SARS-CoV-2 from urine of a COVID-19 Patient. *Emerging Microbes & Infections*, DOI: 10.1080/22221751.2020.1760144.
- Woelfel, 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. Clinical presentation and virological assessment of hospitalized cases of coronavirus disease 2019 in a travel-associated transmission cluster. *medRxiv 2020.03.05.20030502*. <https://doi.org/10.1101/2020.03.05.20030502>
- Wu, F., Xiao, A., Zhang, J., Gu, X., Lee, W.L., Kauffman, K., Hanage, W., Matus, M., Ghaeli, N., Endo, N., Duvallet, C., Moniz, K., Erickson, T., Chai, P., Thompson, J., Alm, E., 2020. SARS-CoV-2 titers in wastewater are higher than expected from clinically confirmed cases. *medRxiv 2020.04.05.20051540*. <https://doi.org/10.1101/2020.04.05.20051540>
- 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., 2020. Prolonged presence of SARS-CoV-2 viral RNA in faecal samples. *Lancet Gastroenterol. Hepatol.* 5, 434–435. [https://doi.org/10.1016/S2468-1253\(20\)30083-2](https://doi.org/10.1016/S2468-1253(20)30083-2)
- Wurtzer, S., Marechal, V., Mouchel, J.-M., Moulin, L., 2020. Time course quantitative detection of SARS-CoV-2 in Parisian wastewaters correlates with COVID-19 confirmed cases. *medRxiv 2020.04.12.20062679*. <https://doi.org/10.1101/2020.04.12.20062679>



Walter Randazzo^{1,2}, Pilar Truchado³, Enric Cuevas-Ferrando³, Pedro Simón Andreu⁴, Ana Allende³, Gloria Sánchez^{2*}

¹Department of Microbiology and Ecology, University of Valencia

²Department of Preservation and Food Safety Technologies, Institute of Agrochemistry and Food Technology, IATA-CSIC

³Research Group on Quality, Safety and Bioactivity of Plant Foods, Department of Food Science and Technology, CEBAS-CSIC

⁵ESAMUR