

T-13

Proyecto COVIDBENS. Seguimiento de la pandemia de COVID-19 en aguas residuales del área metropolitana de A Coruña

Paloma Noelia Trigo-Tasende¹, Manuel Vaamonde², Kelly Conde-Pérez¹, Ángel López-Oriona², Elisa F. Álvarez³, Borja Freire³, Mohammed Nasser-Ali¹, Inés Barbeito², Soraya Rumbo-Feal¹, Rubén Reif⁴, Bruno K. Rodiño⁵, José Parama³, Laura Tomás⁶, Pili Gallego⁶, Germán Bou¹, Javier Tarrío-Saavedra², Iago I. Corras³, David Posada⁶, Ignacio López de Ulibarri², Juan A. Vallejo¹, Susana Ladra³, Ricardo Cao^{2,7} y Margarita Poza¹

¹ Grupo de Investigación en Microbiología, Centro de Investigación Biomédica (INIBIC), Centro de Investigaciones Científicas Avanzadas (CICA), Universidad de A Coruña (UDC), CIBER de Enfermedades Infecciosas, A Coruña.

² Grupo de Investigación MODES, Centro de Investigación de Tecnologías de la Información y Comunicación (CITIC), Universidad de A Coruña (UDC), A Coruña.

³ Laboratorio de Bases de Datos, Centro de Investigación de Tecnologías de la Información y Comunicación (CITIC), Universidad de A Coruña (UDC), A Coruña.

⁴ Centro Singular de Investigación en Química Biológica y Materiales Moleculares (CiQUS), Universidad de Santiago de Compostela (USC), Santiago de Compostela.

⁵ Bflow, Campus Vida, Santiago de Compostela, Spain.

⁶ Laboratorio de Filogenómica, Centro de Investigación Biomédica (CINBIO), Universidad de Vigo.

⁷ Instituto Tecnológico de Matemática Industrial (ITMATI), Universidades de A Coruña, (UDC), Santiago de Compostela (USC) y Vigo (UVIGO), Santiago de Compostela.

margarita.poza.dominguez@sergas.es

INTRODUCCIÓN

El virus SARS-CoV-2 está compuesto por una nucleocápside que engloba su material genético y la proteína N, rodeada por una membrana bilipídica, que contiene las proteínas M y E, y una corona de espigas, que contienen la proteína S. La proteína S se encarga de unirse a los receptores ACE2 presentes en gran variedad de células del cuerpo humano, sobre todo en el epitelio alveolar pulmonar y en el epitelio intestinal, en donde se aloja de forma persistente. Cuando el virus se une a estos receptores, se puede desencadenar una cascada inflamatoria que origina la enfermedad COVID-19, que incluso puede llegar a desencadenar la muerte del individuo. Un porcentaje importante de infectados no desarrollan la enfermedad y permanecen asintomáticos aunque su cuerpo esté invadido por el virus. De hecho, SARS-CoV-2 se excreta en las heces de las personas infectadas, tengan o no síntomas de COVID-19, desde el inicio de la infección hasta mucho tiempo después de dar negativo en muestras nasofaríngeas¹. Por eso, las estaciones depuradoras de aguas residuales (EDAR) sirven como sistemas de vigilancia epidemiológica y permiten conocer la verdadera magnitud de la pandemia de COVID-19 a partir del análisis de la cantidad de virus presente en sus aguas.

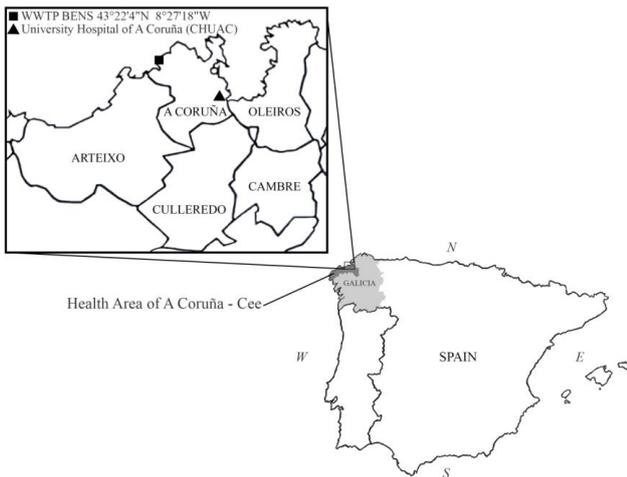
La estrategia epidemiológica basada en el rastreo del virus en aguas residuales no comete sesgos relacionados con el muestreo de individuos que a menudo genera datos incompletos o sesgados, por lo que constituye una herramienta complementaria al rastreo de los casos positivos que se lleva a cabo desde los sistemas de salud. La detección del virus en aguas residuales

permite poder cuantificar la cantidad de virus presente en todo el conjunto de la población de forma global. Imaginando a la población infectada como si fuera un iceberg, en la parte superior visible flotante estarían las personas sintomáticas que se detectan en los sistemas de salud, mientras que las personas asintomáticas, aquellos casos invisibles no detectados, que representan un gran porcentaje de las personas infectadas, se representan en la parte inferior sumergida del iceberg.

El día 3 de abril de 2020, *Nature news* informa sobre que las aguas residuales pueden revelar la verdadera magnitud de la epidemia de coronavirus y constituir una herramienta muy valiosa para establecer sistemas de alerta temprana que pudieran predecir nuevos brotes². Desde entonces, numerosos grupos de científicos de muchos países del mundo nos hemos puesto en marcha en el rastreo del coronavirus en aguas residuales³⁻²⁴. Además, desde final del 2020, la comunidad científica internacional se ha tenido que enfrentar a un nuevo reto; la emergencia de nuevas variantes del virus. Así, el 17 de marzo de 2021, la Comisión Europea publica varias recomendaciones sobre la vigilancia de SARS-CoV-2 y sus variantes en las aguas residuales (<https://eur-lex.europa.eu/eli/reco/2021/132/oj>). Consecuentemente, numerosos equipos de trabajo comenzamos a analizar el material genético de SARS-CoV-2 presente en las aguas residuales en busca de nuevas variantes de importancia epidemiológica²⁵⁻³⁵. El proyecto COVIDBENS surgió a principios de abril de 2020, en plena primera ola de COVID-19, cuando solo disponíamos de la referencia de Gertjan Medema², y alguna noticia que nos informaba de que en Murcia habían empezado a rastrear SARS-CoV-2 en aguas residuales. EDAR Bens S.A, empresa de depuración

de aguas residuales que da servicio a aproximadamente 400 000 habitantes de los ayuntamientos de A Coruña, Arteixo, Cambre, Culleredo y Oleiros (figura 1), nos encomendó el rastreo del virus en aguas residuales que llevamos haciendo ya dos años.

Figura 1. Área metropolitana de A Coruña que vierte sus aguas residuales a la EDAR de Bens (WTPP Bens)



OBJETIVOS DE COVIDBENS

1. Seguimiento de la epidemia a tiempo real mediante la monitorización de la carga viral de SARS-CoV-2 en las aguas residuales del área metropolitana de A Coruña.
2. Desarrollo de modelos estadísticos que permitan estimar el número de personas infectadas por SARS-CoV-2 en la población, incluyendo personas sintomáticas y asintomáticas.

3. Servir como sistema de alerta temprana que permita prever futuras olas epidémicas antes que el sistema sanitario.
4. Detección de mutaciones de SARS-CoV-2 en el agua residual mediante tecnologías de secuenciación de última generación.
5. Determinación de la frecuencia de las variantes en la población a tiempo real empleando modelos estadísticos.
6. Informar a las autoridades y al público en general de la evolución de la pandemia haciendo una labor de servicio público.

MUESTREO

Se emplearon muestreadores automáticos para recoger muestras compuestas integradas de 24 horas desde el 14 de abril del 2020 hasta la actualidad. La frecuencia del muestreo fue variable durante el transcurso de la epidemia.

LA CARGA VIRAL EN EL AGUA RESIDUAL SE CORRELACIONA CON LOS CASOS CLÍNICOS

En primer lugar, se analizó la correlación entre distintas variables: caudal, pluviometría, humedad, temperatura, número de casos reportados por el sistema sanitario, carga de virus en el agua residual, etc. Así, mediante una matriz de diagramas de dispersión, se encontró que la correlación más fuerte, de todas las observadas entre las diferentes variables, se establecía entre los casos de COVID-19 y el logaritmo de la carga viral detectada en el agua residual (figura 2).

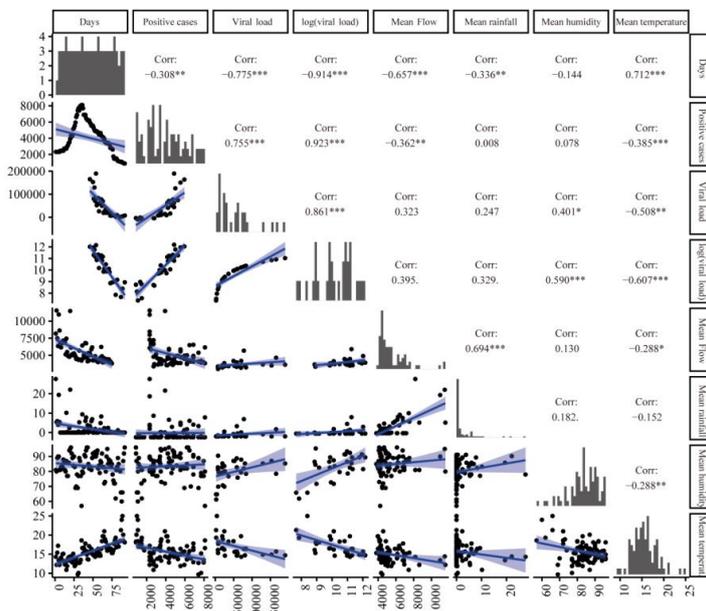


Figura 2. Análisis de correlación entre casos positivos estimados de COVID-19 y diferentes variables. La matriz de diagramas de dispersión muestra modelos lineales ajustados y coeficientes de correlación lineal de cada par de variables: tiempo, casos positivos de COVID-19, carga viral media, caudal medio, precipitación media, humedad media diaria y temperatura media diaria 25 %

ESTIMACIÓN DE PORTADORES EMPLEANDO LOS MODELOS ESTADÍSTICOS DE COVIDBENS

Se usaron modelos de regresión lineal y log-lineal simple y multivariantes, modelos no paramétricos y modelos semiparamétricos, como GAM y LOESS, para estimar el número de personas portadoras de COVID-19 (sintomáticas y asintomáticas) en la población a partir de los datos de carga viral en el agua³⁷. Para ello, se emplearon datos clínicos locales y del estudio de

seroprevalencia nacional ENE-COVID³⁶. Se encontraron cuatro modelos estadísticos capaces de estimar el número total de portadores con una fiabilidad de casi el 90 %. Uno de ellos consistió en un modelo muy simple de regresión lineal que emplea una sencilla fórmula a través de la cual es posible intercalar el valor de carga viral en el agua residual para extraer el número de portadores. Así, desde la segunda ola, en julio de 2020, los modelos han permitido mostrar la evolución del número de portadores de SARS-CoV-2 (figura 3).

Figura 3. Número estimado de portadores de SARS-CoV-2 (sintomáticos y asintomáticos) en el conjunto de los ayuntamientos de Cambre, Culleredo, Oleiros, Arteixo y A Coruña desde el 16 de julio hasta la actualidad, según el modelo log-lineal formulado por COVIDBENS

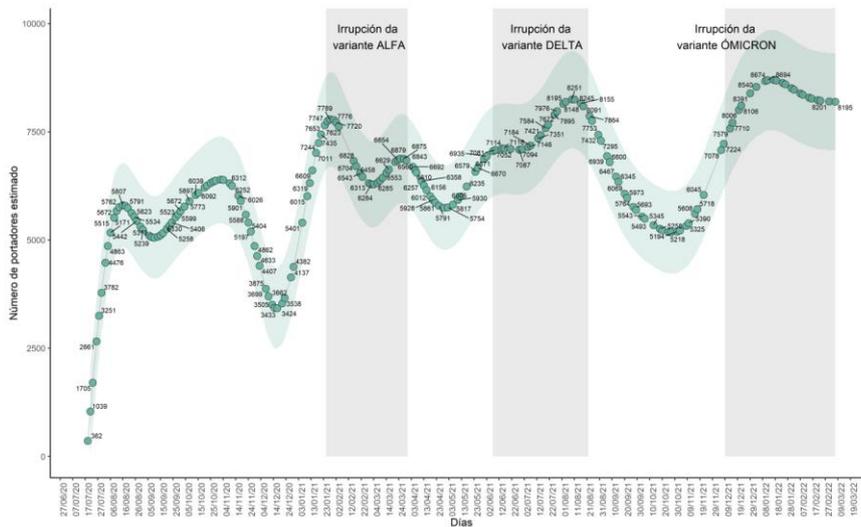
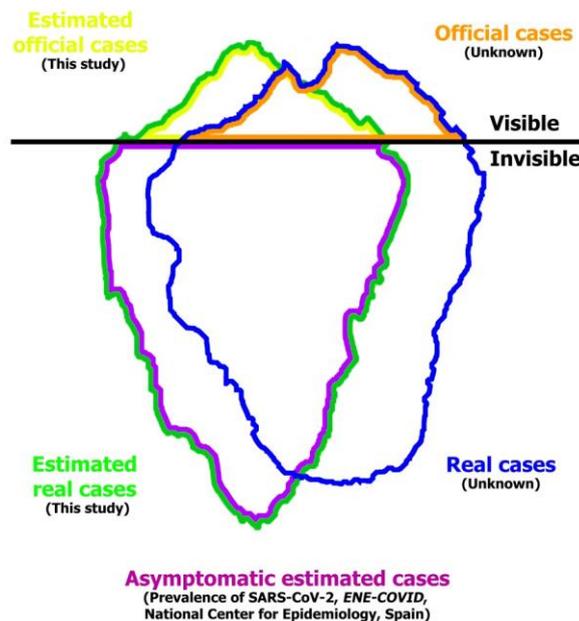


Figura 4. Iceberg que representa la salud global de la población del área metropolitana de A Coruña infectada por SARS-CoV-2. En azul se representa el número real de personas portadoras y en verde el número de personas portadoras estimadas empleando los modelos de COVIDBENS



En un iceberg que representa el número de personas infectadas en la población (figura 4), se puede observar el "iceberg verdadero" (en color azul), que constituye el conjunto de personas portadoras, sean o no visibles, y otro "iceberg estimado" (en color verde), que se corresponde con las personas estimadas empleando los modelos estadísticos de COVIDBENS y que muestra una forma y un tamaño ligeramente diferentes al anterior, ya que se tiene en cuenta el margen de error del 10 % que cometen las estimaciones.

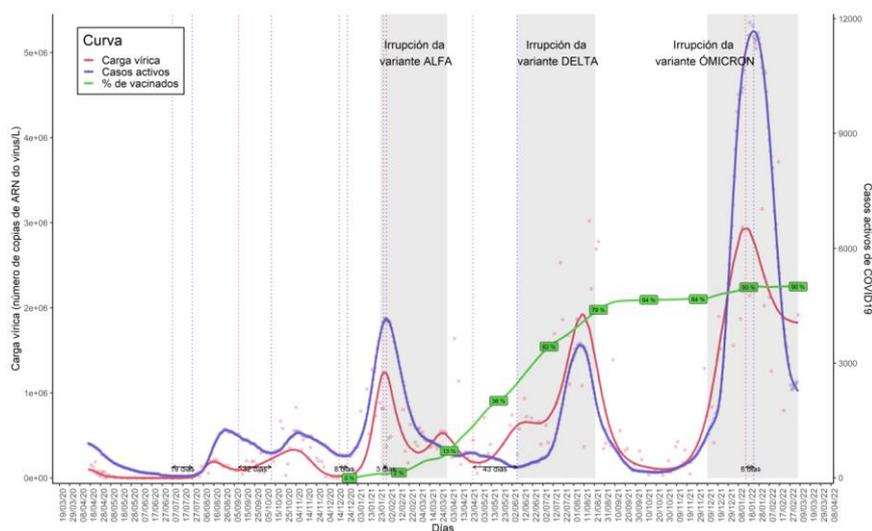
COVIDBENS COMO SISTEMA DE ALERTA TEMPRANA

La carga viral y el número de casos reportados a lo largo del tiempo (manuscrito en preparación) se puede observar en la figura 5. La curva azul representa los

casos activos de COVID-19 reportados por el sistema sanitario, datos cedidos semanalmente por la Dirección Xeral de Saúde Pública (DXSP), de la Xunta de Galicia (XUGA). En la curva roja se representa la carga vírica en el agua residual (número de copias de ARN del virus por litro de agua). Paralelamente, se ha representado (curva verde) el porcentaje de personas vacunadas en el área metropolitana, datos cedidos por la DXSP, XUGA.

En la figura 5 se muestra la superposición de la carga viral en el agua residual (curva roja), los casos activos de COVID-19 (curva azul), datos cedidos por la DXSP de la Xunta de Galicia, desde el 14 de abril de 2020 hasta la actualidad. En la curva verde se muestran los datos de vacunación desde el día 27 de diciembre hasta la actualidad (porcentaje de vacunados al menos con

Figura 5. Evolución de la epidemia de COVID-19 en el área metropolitana de A Coruña



una sola dosis), datos cedidos por la DXSP de la Xunta de Galicia. Las líneas verticales informan sobre la alerta temprana. Se señala con áreas de color gris el período de transición a las nuevas variantes dominantes que han ido apareciendo.

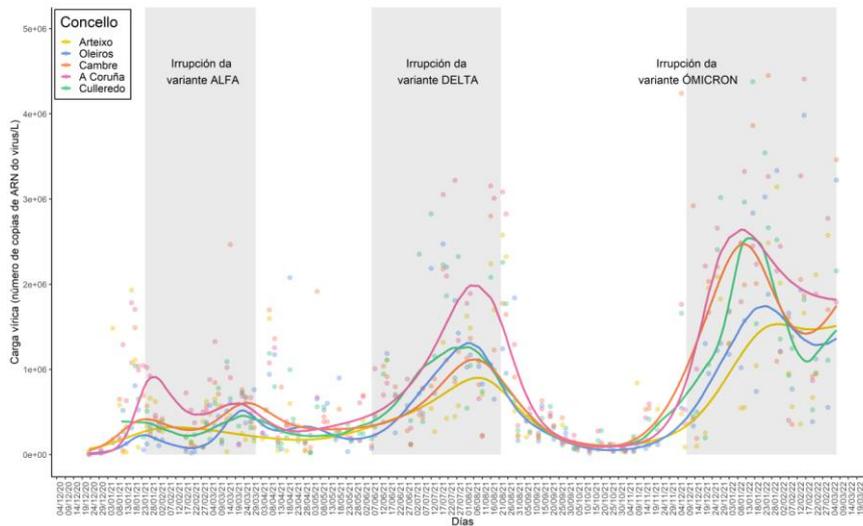
En esta figura se distinguen perfectamente las 6 olas de COVID-19 en el área metropolitana de A Coruña. En las líneas de puntos verticales se puede observar cómo las subidas en la carga viral (líneas de puntos en rojo) anticiparon el posterior incremento en los casos reportados por el sistema sanitario (líneas de puntos en azul) en las sucesivas olas epidémicas, demostrándose la eficacia de COVIDBENS como sistema de alerta temprana. Los periodos de transición de una variante a otra están señalados en la gráfica con zonas grises.

RASTREO DE SARS-CoV-2 AGUAS ARRIBA

Desde diciembre del 2020 el equipo comenzó a analizar las aguas residuales procedentes de los 5 ayuntamientos del área metropolitana por separado (figura 6), lo cual permitió determinar brotes con mayor precisión.

Además, a principios de 2021, COVIDBENS llevó a cabo el rastreo en residencias de mayores. Este sub-proyecto resultó muy útil para saber que las vacunas estaban funcionando, pues muchos residentes recién vacunados se habían infectado y excretaban gran cantidad de virus en sus heces sin llegar a desarrollar la enfermedad. Este hecho, abrió una gran puerta a la esperanza, pues nos informó por primera vez sobre que la eficacia de las vacunas.

Figura 6. Evolución de la carga viral de SARS-CoV-2 detectada en las aguas residuales de los 5 ayuntamientos del área metropolitana de A Coruña, desde el 19 de diciembre de 2020 hasta la actualidad. Se señalan en gris los períodos de transición a las variantes alfa, delta y ómicron



EMERGENCIA Y EVOLUCIÓN DE LAS VARIANTES DE SARS-CoV-2

A principios de 2021 el equipo de COVIDBENS comenzó a realizar la secuenciación del material genético del virus en aguas residuales de muestras del área metropolitana de A Coruña. Los primeros análisis arrojaron valiosa información que reveló que esta metodología permite detectar nuevas variantes emergentes antes de que estas sean detectadas en muestras nasofaríngeas. Esto implica que COVIDBENS puede servir también como sistema de alerta epidemiológica temprana de nuevas variantes preocupantes, ya que es capaz de anticiparse a la aparición de una nueva variante.

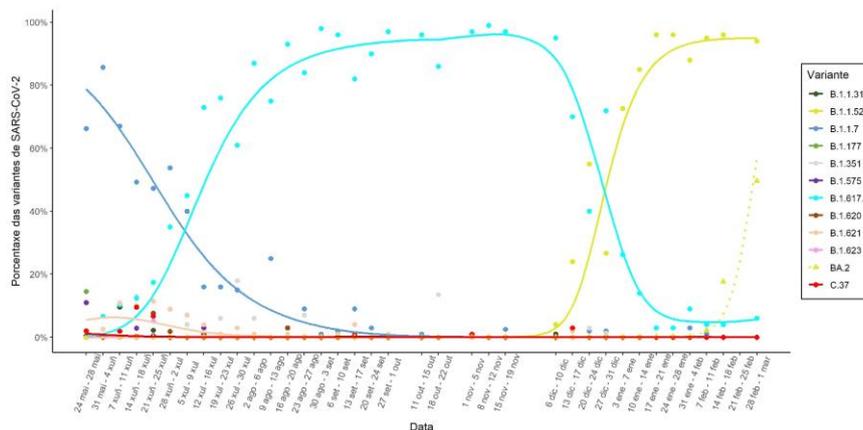
Paralelamente a la detección de mutaciones, se desarrolló un método estadístico de máxima verosimilitud

que permite estimar las proporciones de las variantes de SARS-CoV-2 en la población del área metropolitana de A Coruña a tiempo real en base a lecturas genómicas obtenidas mediante secuenciación del material genético del virus presente en las muestras de agua residual (manuscrito en preparación). Así, desde principios de mayo de 2021, COVIDBENS reporta semanalmente la evolución de las variantes mediante la representación de su porcentaje a lo largo del tiempo (figura 7).

COVIDBENS Y SU LABOR DE SERVICIO PÚBLICO

COVIDBENS ha estado reportando informes semanalmente a los gobiernos locales, autonómicos y nacionales desde la segunda ola, así como a autoridades del ámbito sanitario. Los datos reportados se actualizan semanalmente en su página web

Figura 7. Evolución en el porcentaje de las variantes de SARS-CoV-2 encontradas en las muestras de agua residual del área metropolitana de A Coruña desde el mes de mayo de 2021 hasta la actualidad a lo largo del tiempo



(<https://edarbens.es/covid19/>) de libre acceso al público en general. COVIDBENS ha estado realizando una importante labor de difusión de los datos a través de redes sociales, medios de comunicación y actividades de divulgación científica, en el ámbito nacional e internacional.

CONCLUSIONES

1. El análisis de la carga viral en el agua residual constituye una valiosa herramienta para comprender la verdadera magnitud de la epidemia, ya que incluye a todas las personas infectadas, tengan o no síntomas.
2. El análisis de la carga viral en el agua residual funciona como sistema de alerta epidemiológica temprana anticipándose a los brotes con una antelación considerable con respecto al sistema sanitario.
3. Los modelos estadísticos desarrollados en COVIDBENS permiten estimar el número de personas portadoras de SARS-CoV-2 en la población.
4. La secuenciación del material genético de SARS-CoV-2 en el agua residual permite determinar las mutaciones y variantes presentes en la población y anticiparse a la aparición de una variante preocupante promoviendo la vigilancia epidemiológica de mutaciones a tiempo real.
5. Los modelos estadísticos de COVIDBENS permiten estimar el porcentaje de las variantes en la población a tiempo real a partir de los datos de mutaciones.
6. COVIDBENS funciona de forma exitosa como herramienta epidemiológica basada en aguas residuales.

AGRADECIMIENTOS

COVIDBENS ha recibido financiación de EDAR Bens S.A. desde abril de 2020 hasta la actualidad (marzo 2022). Además, la Consellería de Política Social, de la Xunta de Galicia (XUGA) ha financiado el rastreo en residencias de ancianos y Aguas de Galicia ha financiado parcialmente una parte de la secuenciación de material genético del virus. El equipo quiere agradecer especialmente a Carlos Lamora, director de EDAR Bens SA, su labor como promotor y su apoyo al proyecto. Además, queremos agradecer la colaboración al personal del Servicio de Microbiología del Hospital Universitario de A Coruña (CHUAC), a Fernando Lamelo (HADO-CHUAC),

a Francisco Pérez, Javier Martínez, Javier Fernández, Cristina Rodríguez y José M Lobelos (DIAGNÓSTICA y CADAGUA), a Joaquín Suárez, Alfredo Jácome y José Pajarrón-Puga (GEAMA-CITEEC, UDC), a la empresa Allgenetics & Biology S.L., a Ángeles Cid (MICROALGAE, UDC), a Antonio Acevedo (XUGA), a Andrés Paz-Ares, Xurxo Hervada, María Isolina Santiago, Gael Naveira y Alberto Malvar (DXSP, XUGA), a Amalia Jácome, Ana López-Cheda, Rebeca Peláez y Wende Safari (MODES-CITIC, UDC), a Miguel R. Luaces y Alejandro Cortiñas (LBD-CITIC, UDC), a Fernanda Rodríguez (SAI, UDC), a Laura Larriba (CHUAC), a Fiona Veira McTiernan (FEBS) y a NORMAN European Network for 'Collaboration in the time of Covid19' European Virus Archive Global (EVA-GLOBAL).

BIBLIOGRAFÍA

1. Wu Y, et al. Prolonged presence of SARS-CoV-2 viral RNA in faecal samples. *Lancet Gastroenterol Hepatol.* 2020; 5:434-435.
2. How sewage could reveal true scale of coronavirus outbreak. *Nature news*, 3 April 2020. Disponible en: <https://www.nature.com/articles/d41586-020-00973-x/>.
3. Fongaro G, et al. The presence of SARS-CoV-2 RNA in human sewage in Santa Catarina, Brazil, November 2019. *Sci Total Environ.* 2021; 778:146198.
4. Chavarria-Miró G, et al. Time Evolution of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) in Wastewater during the First Pandemic Wave of COVID-19 in the Metropolitan Area of Barcelona, Spain. *Appl Environ Microbiol.* 2021; 87:e02750-20.
5. Lodder W, de Roda AM. SARS-CoV-2 in wastewater: potential health risk, but also data source. *Lancet Gastroenterol. Hepatol.* 2020; 5:533-534.
6. Randazzo W, Cuevas-Ferrando E, Sanjuán R, Domingo-Calap P, Sánchez G. Metropolitan wastewater analysis for COVID-19 epidemiological surveillance. *Int J Hyg Environ Health.* 2020; 230:113621.
7. Randazzo W, Truchado P, Cuevas-Ferrando E, Simón P, Allende A, Sánchez G. SARS-CoV-2 RNA in wastewater anticipated COVID-19 occurrence in a low prevalence area. *Water Res.* 2020; 181:115942.
8. Roka E, et al. Ahead of the second wave: Early warning for COVID-19 by wastewater surveillance in Hungary. *Sci Total Environ.* 2021; 786:147398.
9. Saguti F, et al. Surveillance of wastewater revealed peaks of SARS-CoV-2 preceding those of hospitalized patients with COVID-19. *Water Res.* 2021; 189:116620.
10. Wannigama D.L, et al. Tracking COVID-19 with wastewater to understand asymptomatic transmission. *Int J Infect Dis.* 2021; 108:296-299.
11. Agrawal S, Orschler L, Lackner S. Long-term monitoring of SARS-CoV-2 RNA in wastewater of the Frankfurt metropolitan area in Southern Germany. *Sci Rep.* 2021; 11:5372.
12. Rubio-Acero R, et al. Spatially resolved qualified sewage spot sampling to track SARS-CoV-2 dynamics in Munich - One year of experience. *Sci Total Environ.* 2021; 797:149031.

13. Wurtzer S, Marechal, V, Mouchel JM, Moulin L. Time course quantitative detection of SARS-CoV-2 in Parisian wastewaters correlates with COVID-19 confirmed cases. medRxiv. 2020. Disponible en: <https://www.medrxiv.org/content/10.1101/2020.04.12.20062679v1>.
14. Wu Y, et al. Prolonged presence of SARS-CoV-2 viral RNA in faecal samples. *Lancet Gastroenterol Hepatol.* 2020; 5: 434-435.
15. Nemudryi A, et al. Temporal detection and phylogenetic assessment of SARS-CoV-2 in municipal wastewater. *Cell Rep Med;* 2020; 1:100098.
16. La Rosa, G. et al. First detection of SARS-CoV-2 in untreated wastewaters in Italy. *Sci Total Environ.* 2020; 736:139652.
17. Haramoto E, Malla B, Thakali O, Kitajima M. First environmental surveillance for the presence of SARS-CoV-2 RNA in wastewater and river water in Japan. *Sci Total Environ.* 2020; 737:140405.
18. Hata A, Hara-Yamamura H, Meuchi Y, Imai S, Honda R. Detection of SARS-CoV-2 in wastewater in Japan during a COVID-19 outbreak. *Sci Total Environ.* 2021; 758: 143578.
19. Martin J, et al. Tracking SARS-CoV-2 in Sewage: Evidence of Changes in Virus Variant Predominance during COVID-19 Pandemic. *Viruses.* 2020; 12:1144.
20. Lundy L, et al. Making Waves: Collaboration in the time of SARS-CoV-2 - rapid development of an international co-operation and wastewater surveillance database to support public health decision-making. *Water Res.* 2021; 199:117167.
21. Kumar M, Joshi M, Shah AV, Srivastava V, Dave S. Wastewater surveillance-based city zonation for effective COVID-19 pandemic preparedness powered by early warning: a perspective of temporal variations in SARS-CoV-2-RNA in Ahmedabad, India. *Sci Total Environ.* 2021; 792:148367.
22. Xu X, et al. The first case study of wastewater-based epidemiology of COVID-19 in Hong Kong. *Sci Total Environ.* 2021; 790:148000.
23. Weidhaas J, et al. Correlation of SARS-CoV-2 RNA in wastewater with COVID-19 disease burden in sewersheds. *Sci. Total Environ.* 2021; 775:145790.
24. Pillay L, et al. Monitoring changes in COVID-19 infection using wastewater-based epidemiology: A South African perspective. *Sci Total Environ.* 2021; 786:147273.
25. Furuse Y. Genomic sequencing effort for SARS-CoV-2 by country during the pandemic. *Int. J. Infect. Dis.* 2021; 103:305-307.
26. Bar-Or I, et al. Detection of SARS-CoV-2 variants by genomic analysis of wastewater samples in Israel. *Sci Total Environ.* 2021; 789:148002.
27. Crits-Christoph A, et al. Genome sequencing of sewage detects regionally prevalent SARS-CoV-2 variants. *mBio.* 2021; 12:e02703-20.
28. Dharmadhikari T, et al. High throughput sequencing based direct detection of SARS-CoV-2 fragments in wastewater of Pune, West India. *Sci Total Environ.* 2022. 807(Pt 3):151038.
29. Herold M, et al. Genome Sequencing of SARS-CoV-2 Allows Monitoring of Variants of Concern through Wastewater. *Water.* 2021; 13:3018.
30. Izquierdo-Lara R, et al. Monitoring SARS-CoV-2 Circulation and Diversity through Community Wastewater Sequencing, the Netherlands and Belgium. *Emerg. Infect. Dis.* 2021; 27:1405-1415.
31. La Rosa G, et al. Key SARS-CoV-2 Mutations of Alpha, Gamma, and Eta Variants Detected in Urban Wastewaters in Italy by Long-Read Amplicon Sequencing Based on Nanopore Technology. *Water.* 2021; 13:2503.
32. Rios G, et al. Monitoring SARS-CoV-2 variants alterations in Nice neighborhoods by wastewater nanopore sequencing. *Lancet Reg. Heal.* 2021; 10:100202.
33. Jahn, K. et al. Detection and surveillance of SARS-CoV-2 genomic variants in wastewater. medRxiv, 2021. <https://www.medrxiv.org/content/medrxiv/early/2021/07/15/2021.01.08.21249379.full.pdf>.
34. Rimoldi, S. G. et al. Presence and infectivity of SARS-CoV-2 virus in wastewaters and rivers. *Sci Total Environ.* 2020; 744:140911.
35. Valieris R, Drummond RD, Defelicibus A, Dias-Neto E, Rosales RA, Tojal da Silva I. A mixture model for determining SARS-Cov-2 variant composition in pooled samples. *Bioinformatics.* 2022, to appear.
36. Pollán M, et al. Prevalence of SARS-COV-2 in Spain (ENE-COVID): a nationwide, population-based seroepidemiological study. *The Lancet.* 2020; 396:535-544.
37. Vallejo J A, et al. Modeling the number of people infected with SARS-COV-2 from wastewater viral load in Northwest Spain. *Sci Total Environ.* 2022; 811:152334.