



Madrid, 18 de mayo de 2020

REUNIÓN SOBRE EL CONTROL MICROBIOLÓGICO EN AGUAS RESIDUALES COMO INDICADOR EPIDEMIOLÓGICO DE ALERTA TEMPRANA DE PROPAGACIÓN DE COVID-19

28 de Mayo de 2020

Pedro Simón Andreu
Director Técnico ESAMUR

Enteric involvement of coronaviruses: is faecal-oral transmission of SARS-CoV-2 possible?

The end of 2019 was marked by the emergence of a novel coronavirus, severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2), which caused an outbreak of viral pneumonia (COVID-19) in Wuhan, China. At the time of writing, SARS-CoV-2, previously known as 2019-nCoV, has spread to more than 26 countries around the world. According to the WHO COVID-19 situation report-28 released on Feb 17, 2020, more than 71000 cases have been confirmed and at least 1770 deaths.

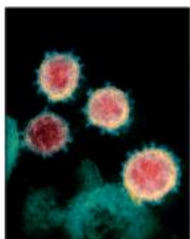
Coronaviruses are a family of single-stranded enveloped RNA viruses that are divided into four major genera. The genome sequence of SARS-CoV-2 is 82% similar to severe acute respiratory syndrome coronavirus (SARS-CoV),¹ and both belong to the β -genus of the coronavirus family.² Human coronaviruses such as SARS-CoV and Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV), are known to cause respiratory and enteric symptoms.

In the SARS outbreak of 2002-03, 16-73% of patients with SARS had diarrhoea during the course of the disease, usually within the first week of illness.³

development of pneumonia and brain infection.⁸ These results suggest that MERS-CoV pulmonary infection was secondary to the intestinal infection.

In early reports from Wuhan, 2-10% of patients with COVID-19 had gastrointestinal symptoms such as diarrhoea, abdominal pain, and vomiting.^{9,10} Abdominal pain was reported more frequently in patients admitted to the intensive care unit than in individuals who did not require intensive care unit care, and 10% of patients presented with diarrhoea and nausea 1-2 days before the development of fever and respiratory symptoms.⁹ SARS-CoV-2 RNA has been detected in the stool of a patient in the USA.¹¹ The binding affinity of ACE2 receptors is one of the most important determinants of infectivity, and structural analyses predict that SARS-CoV-2 not only uses ACE2 as its host receptor, but uses human ACE2 more efficiently than the 2003 strain of SARS-CoV (although less efficiently than the 2002 strain).⁷

Data exist to support the notion that SARS-CoV and MERS-CoV are viable in environmental conditions that could facilitate faecal-oral transmission. SARS-CoV



Lancet Gastroenterol Hepatol
2020

Published Online
February 19, 2020
[https://doi.org/10.1016/S2468-1253\(20\)30048-0](https://doi.org/10.1016/S2468-1253(20)30048-0)

For more on the WHO COVID-19
situation report-28 see
https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/situation-reports/20200217-sitrep-28-covid-19.pdf?sfvrsn=a19cf2ad_2

The Lancet 19 de Febrero 2020

Motivos para llevar a cabo el estudio :

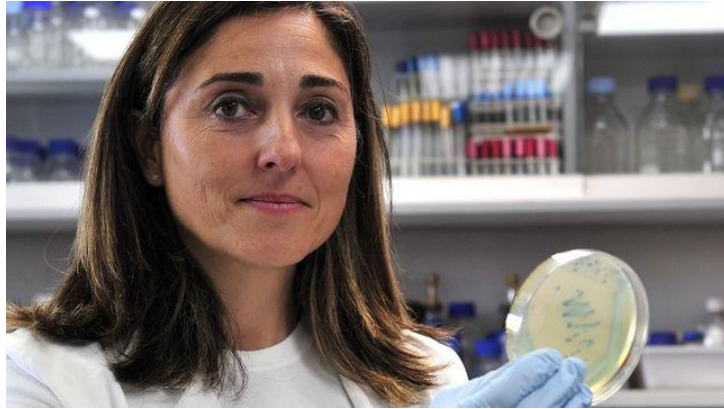
- ¿ Podrían ser un factor de transmisión las aguas residuales ?
- ¿ Podría afectar a los trabajadores una hipotética llegada del virus a las depuradoras ?
- ¿ Podría suponer un problema para los usos del agua tratada ?
- ¿ Podría suponer un problema para el vertido del agua tratada ?
- En caso de que atravesara el tratamiento secundario, ¿ son suficientes nuestros sistemas de desinfección ?



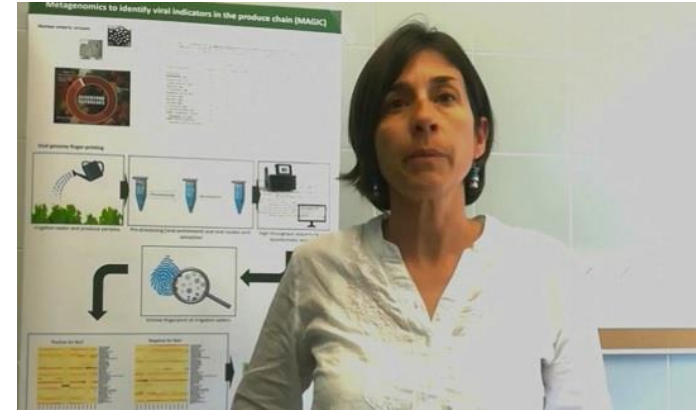
Científicos y centros participantes en estudio

Primeros pasos

Contacto con científicos y centros especializados en el tema (Convenio ESAMUR-CSIC)



Ana Allende de CEBAS-CSIC



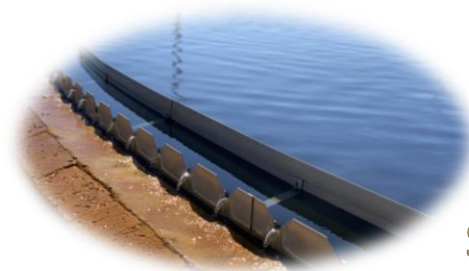
Gloria Sánchez de IATA-CSIC

Dificultades para conseguir reactivos

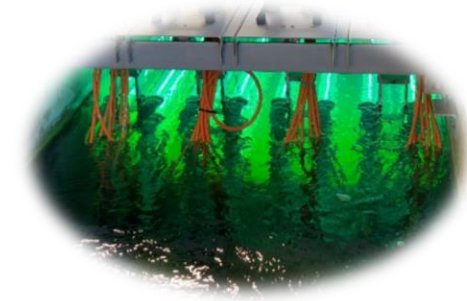
¿ Dónde medir ?



Entrada



Secundario



Terciario



Selección de depuradoras





Metodología del estudio

- Periodicidad de las muestras : Se decidió semanal, en principio.
 - 4 primeras muestras (12 a 26 de Marzo) INFLUENTE únicamente
 - Sigüientes muestras (Abril y principio Mayo) INFLUENTE, SALIDA SECUNDARIO, SALIDA TERCARIO Y LODOS (20 Abril)
 - Mes Mayo en adelante INFLUENTE Y LODOS Periodicidad 2 muestras semanales **ADAPTACIÓN**

- Protocolo realización de análisis

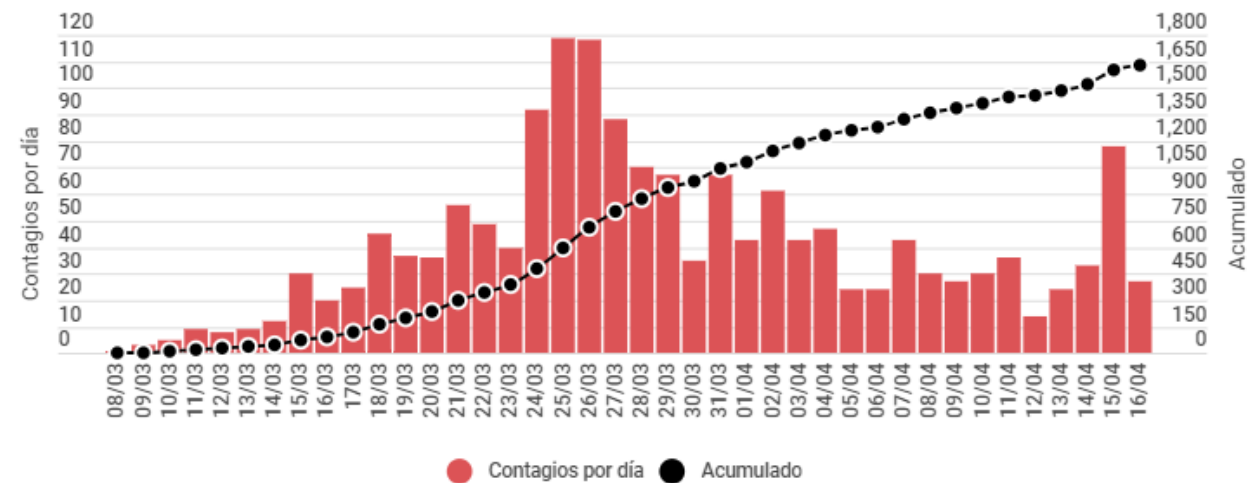
**CDC 2019-Novel Coronavirus (2019-nCoV)
Real-Time RT-PCR Diagnostic Panel**

Centers for Disease Control and Prevention
Division of Viral Diseases
1600 Clifton Rd NE
Atlanta GA 30329





8 Marzo



1ª muestra el 12 de marzo



Resultados en Región de Murcia



Murcia (Ct)			
Fecha	N1	N2	N3
12/03/2020	0,00	0,00	0,00
16/03/2020	34,77	0,00	37,82
18/03/2020	0,00	0,00	37,58
26/03/2020	35,84	36,56	35,37
02/04/2020	37,16	0,00	0,00
07/04/2020	36,97	35,93	35,69
14/04/2020	36,22	0,00	36,87
20/04/2020	0,00	0,00	
27/04/2020	36,73	0,00	0,00
04/05/2020	0,00	0,00	0,00
07/05/2020	0,00	0,00	0,00
11/05/2020	0,00	0,00	0,00

Cartagena (Ct)			
Fecha	N1	N2	N3
12/03/2020	0,00	0,00	0,00
16/03/2020	0,00	0,00	37,76
18/03/2020	0,00	0,00	
26/03/2020	37,02	37,21	0,00
02/04/2020	36,64	37,87	36,64
07/04/2020	0,00	0,00	37,65
14/04/2020	36,99	36,89	36,65
21/04/2020	0,00	0,00	0,00
28/04/2020	37,33	0,00	0,00
05/05/2020	36,87	0,00	0,00
12/05/2020	0,00	0,00	0,00

Lorca (Ct)			
Fecha	N1	N2	N3
12/03/2020	0,00	35,83	35,20
16/03/2020	0,00	0,00	0,00
18/03/2020	36,12	0,00	36,51
26/03/2020	0,00	35,30	0,00
02/04/2020	37,28	36,91	36,45
07/04/2020	35,80	0,00	35,71
14/04/2020	36,85	37,50	37,13
21/04/2020	37,62	38,06	36,76
28/04/2020	0,00	0,00	0,00
06/05/2020	36,11	36,46	0,00
12/05/2020	0,00	0,00	0,00

Molina (Ct)			
Fecha	N1	N2	N3
12/03/2020	0,00	37,17	36,45
16/03/2020	0,00	38,31	0,00
18/03/2020	0,00	0,00	36,09
26/03/2020	0,00	0,00	36,29
02/04/2020	37,04	38,39	37,86
07/04/2020	35,09	35,78	35,87
14/04/2020	36,89	36,80	36,93
20/04/2020	0,00	0,00	0,00
27/04/2020	0,00	0,00	0,00
04/05/2020	0,00	0,00	0,00
07/05/2020	0,00	0,00	0,00
11/05/2020	0,00	0,00	0,00

Cieza (Ct)			
Fecha	N1	N2	N3
12/03/2020	0,00	0,00	0,00
16/03/2020	34,68	36,52	35,83
18/03/2020	36,00	37,27	36,14
26/03/2020	0,00	37,16	36,54
02/04/2020	0,00	37,25	0,00
07/04/2020	0,00	35,10	36,45
14/04/2020	0,00	36,75	0,00
20/04/2020	37,79	0,00	0,00
27/04/2020	36,99	0,00	0,00
04/05/2020	0,00	0,00	0,00
07/05/2020	0,00	0,00	0,00
11/05/2020	0,00	0,00	0,00

Totana (Ct)			
Fecha	N1	N2	N3
12/03/2020	0,00	0,00	0,00
16/03/2020	36,61	38,00	35,68
18/03/2020	0,00	0,00	0,00
26/03/2020	35,92	0,00	36,85
02/04/2020	37,25	36,48	36,29
07/04/2020	37,04	0,00	0,00
14/04/2020	0,00	0,00	0,00
21/04/2020	37,13		34,97
28/04/2020	35,96	0,00	0,00
06/05/2020	36,32	37,06	0,00
12/05/2020	0,00	0,00	0,00

Legenda
Ct >37
Ct= 35-37
Ct <35

- Secundarios y terciarios no hemos encontrado ARN
- En lodos se ha encontrado en algunos casos (3 de 20 y Ct próx o mayores que 38)
- Núm de copias de material génico por litro oscila entre 4,9 y 6,05 u. log.



ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

Water Research

journal homepage: www.elsevier.com/locate/watres



SARS-CoV-2 RNA in wastewater anticipated COVID-19 occurrence in a low prevalence area



Walter Randazzo ^{a, b}, Pilar Truchado ^c, Enric Cuevas-Ferrando ^b, Pedro Simón ^d,
Ana Allende ^c, Gloria Sánchez ^{b, *}

^a Department of Microbiology and Ecology, University of Valencia, Av. Dr. Moliner, 50, Burjassot, 46100, Valencia, Spain

^b Department of Preservation and Food Safety Technologies, Institute of Agrochemistry and Food Technology, IATA-CSIC, Av. Agustín Escardino 7, Paterna, 46980, Valencia, Spain

^c Research Group on Quality, Safety and Bioactivity of Plant Foods, Department of Food Science and Technology, CEBAS-CSIC, Campus Universitario de Espinardo, 25, 30100, Murcia, Spain

^d ESAMUR, Avenida Juan Carlos, s/n - Edificio Torre Jemeca, Murcia, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 24 April 2020

Received in revised form

11 May 2020

Accepted 12 May 2020

Available online 16 May 2020

Keywords:

Environmental surveillance

Influent water

Reclaimed water

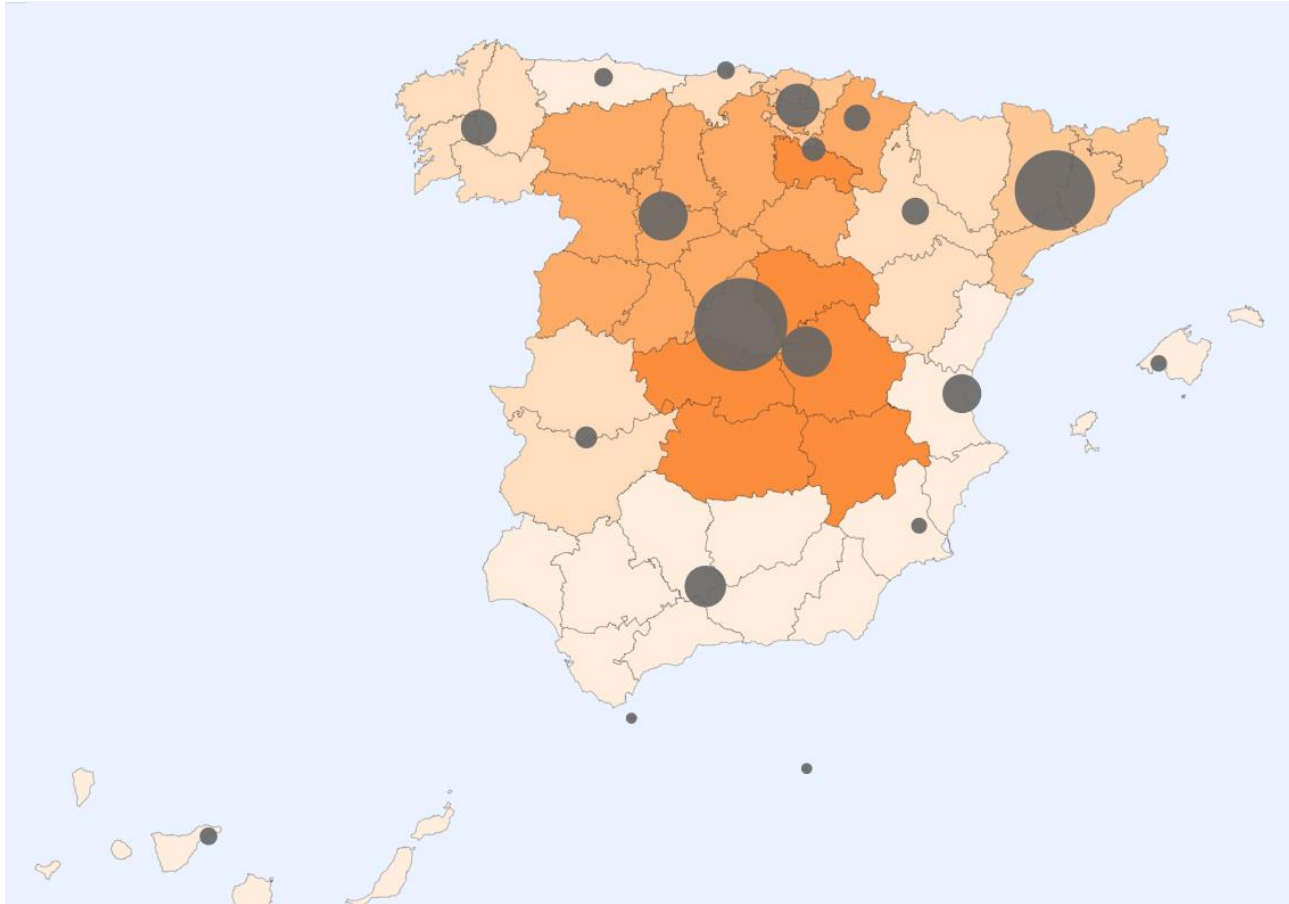
Concentration protocol

RNA virus

Coronavirus

ABSTRACT

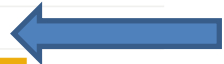
Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) has caused more than 200,000 reported COVID-19 cases in Spain resulting in more than 20,800 deaths as of April 21, 2020. Faecal shedding of SARS-CoV-2 RNA from COVID-19 patients has extensively been reported. Therefore, we investigated the occurrence of SARS-CoV-2 RNA in six wastewater treatment plants (WWTPs) serving the major municipalities within the Region of Murcia (Spain), the area with the lowest COVID-19 prevalence within Iberian Peninsula. Firstly, an aluminum hydroxide adsorption-precipitation concentration method was validated using a porcine coronavirus (Porcine Epidemic Diarrhea Virus, PEDV) and mengovirus (MgV). The procedure resulted in average recoveries of $10 \pm 3.5\%$ and $10 \pm 2.1\%$ in influent water ($n = 2$) and $3.3 \pm 1.6\%$ and $6.2 \pm 1.0\%$ in effluent water ($n = 2$) samples for PEDV and MgV, respectively. Then, the method was used to monitor the occurrence of SARS-CoV-2 from March 12 to April 14, 2020 in influent, secondary and tertiary effluent water samples. By using the real-time RT-PCR (RT-qPCR) Diagnostic Panel validated by US CDC that targets three regions of the virus nucleocapsid (N) gene, we estimated quantification of SARS-CoV-2 RNA titers in untreated wastewater samples of $5.4 \pm 0.2 \log_{10}$ genomic copies/L on average. Two secondary water samples resulted positive (2 out of 18) and all tertiary water samples tested as negative (0 out of 12). This environmental surveillance data were compared to declared COVID-19 cases at municipality level, revealing that members of the community were shedding SARS-CoV-2 RNA in their stool even before the first cases were reported by local or national authorities in many of the cities where wastewaters have been sampled. The detection of SARS-CoV-2 in wastewater in early stages of the spread of COVID-19 highlights the relevance of this strategy as an early indicator of the infection within a specific population. At this point, this environmental surveillance could be implemented by municipalities right away as a tool, designed to help authorities to coordinate the exit strategy to gradually lift its coronavirus lockdown.



Casos de coronavirus en España por comunidades

Datos de Sanidad, del lunes 04 de Mayo de 2020.
 Pincha en cada columna para reordenar los valores

Comunidad Autónoma	Casos confirmados	Nuevos casos	Fallecidos	Curados	Incidencia acumulada últ. 14 días
Andalucía	12194	19	1263	7021	14,24
Aragón	5188	24	762	2624	40,48
Asturias	2306	1	284	917	12,22
Baleares	1908	0	197	1294	13,83
Canarias	2225	4	141	1166	7,34
Cantabria	2206	1	197	1610	40,1
Castilla - La Mancha	16050	33	2590	5794	65,18
Castilla y León	17334	51	1818	6900	106,4
Cataluña	50366	132	5220	21898	113,22
Ceuta	101	0	4	142	9,44
C. Valenciana	10436	0	1269	7506	14,55
Extremadura	2849	5	460	2090	14,7
Galicia	9011	44	569	6234	55,68
Madrid	62395	1	8376	37808	69,23
Melilla	119	2	2	101	17,34
Murcia	1492	0	134	1277	3,48
Navarra	4918	16	466	2494	71,69
País Vasco	12952	14	1341	12155	52,68
La Rioja	3961	9	335	2312	93,75
ESPAÑA	218011	356	25428	121343	50,99





A resaltar : Se ha encontrado restos de material genético del SARS-CoV-2 en las entradas a las depuradoras, pero no se han encontrado evidencias científicas de que esté presente el virus en las aguas residuales

¿ Pueden darnos información estos estudios sobre número de personas contagiadas por SARS-CoV-2 ?

Ha demostrado tener una gran sensibilidad y puede ser una herramienta valiosa, pero ...

- Conocer con cierta exactitud los contagiados en una ciudad va a requerir profundizar más en el sistema de saneamiento y en la metodología
 - Cada sistema de depuración tendrá su “ huella genética “
 - Muy útil para ver tendencias o como sistema de alerta temprana
-



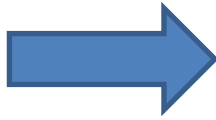
¿ Por qué es difícil predecir con exactitud el número de contagios en el área de influencia de la EDAR ?

Resultado PCR : Dato de concentración de copias del gen (nº copias/l)

Este resultado vendrá influenciado por :

- Tipo de caudales que llegan a la depuradora respecto a su carga vírica (industrias, lluvia, infiltraciones,...)
- Degradación de RNA por el camino
 1. Características físico-químicas del agua residual (Tª, pH, vertidos industriales,..)
 2. Características del alcantarillado (longitud, pendientes, bombeos, grado de limpieza alcantarillado,...)
 3. Costumbres e intensidad de limpieza
- Otros
 1. Sistema recogida muestras
 2. Virus en intestino de contagiados
 3. ...

POBLACIÓN
CONTAGIADA



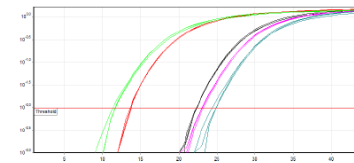
Contagiados = f (nº copias/l)



- Caudales
- Degradación ARN
- Muestreo
- ...



PCR



ALERTA TEMPRANA

TENDENCIAS

Saneamiento = Fuente valiosa de información

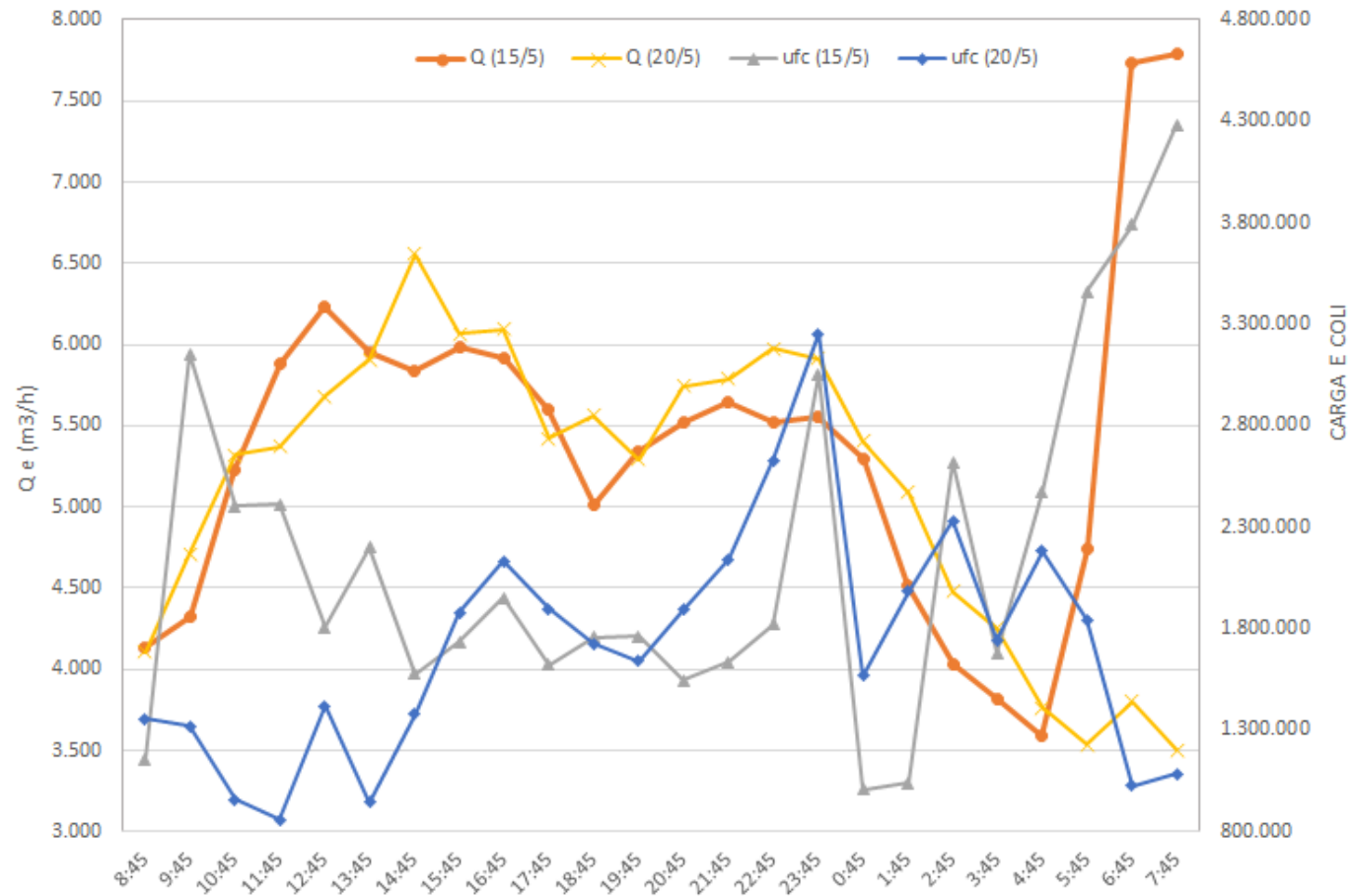


Situación actual de los trabajos:

- Seguir recopilando datos en influente, (secundario, terciario) y lodos, y vigilando tendencias
- Hemos incorporado al equipo a un experto del CEBAS-CSIC en estadística y manejo de datos (Dr. Gonzalo González)
- Reuniones con Consejería de Sanidad en Región de Murcia para compartir datos y buscar relaciones entre contagios y nuestros resultados, así como la evolución, por depuradora
- Estudiando el mejor sistema para que esta “ herramienta” tenga la máxima sensibilidad y se le pueda sacar el mayor partido



E COLI INFLUENTE-Q ENTRADA (MURCIA ESTE) 15-05-20







Región de Murcia

Consejería de Agua, Agricultura,
Ganadería, Pesca y Medio Ambiente

Entidad de Saneamiento y Depuración
de Aguas Residuales de la Región de Murcia

