

Las aguas residuales como detección y alerta temprana de SARS-CoV-2 en la Comunidad de Madrid, sistema VIGÍA

A. Pinilla ⁽¹⁾, A. Lastra ⁽²⁾

⁽¹⁾ Canal de Isabel II y Comunidad de Madrid, España

⁽²⁾ 915451000(3270) apinilla@canal.madrid

RESUMEN: Este estudio analiza la presencia y seguimiento del SARS-CoV-2 en el sistema de saneamiento de aguas residuales de la Comunidad de Madrid, iniciado en el segundo trimestre de 2020. Los resultados se presentan diariamente a través de una plataforma que sirve como herramienta para la monitorización del SARS-CoV-2 y detección temprana mediante técnicas basadas en aguas residuales. El proyecto recibe el nombre de SISTEMA VIGÍA. El sistema dispone de 289 puntos de muestreo que recogen los vertidos de casi siete millones de habitantes y más de 300 análisis semanales.

En este documento se resume la metodología referente a los análisis de laboratorio y estadísticos, así como la interpretación de resultados. Se establecen comparaciones de los resultados de las muestras recogidas en campo, con los indicadores de salud, observando correlación entre estas variables. Esta información se comparte diariamente con las autoridades sanitarias para el aseso

1. INTRODUCCIÓN

A principios de 2020, a consecuencia de la evolución de la pandemia COVID-19, se llevaron a cabo diferentes estudios en los cuales se validaron procesos de monitorización y detección de trazas del SARS-CoV-2 en las aguas. Canal de Isabel II, como empresa responsable de la gestión de la infraestructura hídrica en la Comunidad de Madrid, ideó desde la Subdirección de I+D+i un sistema para la monitorización de la propagación del SARS-CoV-2 en las aguas residuales que sirviera como herramienta en la toma de decisiones para las autoridades sanitarias de la Comunidad de Madrid residuales en múltiples países, Países Bajos (Medema et al., 2020) [1], Australia (Ahmed et al., 2020a) [2] e Italia (La Rosa et al., 2020) [3].

En este estudio, el objetivo fue analizar la presencia y evolución del material genético del SARS-CoV-2 en el sistema de saneamiento de aguas residuales de la Comunidad de Madrid basado en el método RT-qPCR como una herramienta potencial para la detección de alerta temprana de la propagación del SARS-CoV-2 en la población. Dicho trabajo se inició a principios del mes de abril del 2020, cuando las cifras epidemiológicas en España de COVID-19 se encontraban en niveles máximos de la primera ola. (Worldometer.info, 2020) [4]. El proyecto partió con el reto de monitorizar las aguas residuales de prácticamente toda la región de Madrid, lo cual supuso la definición de cada una de las cuencas de alcantarillado de la Comunidad de Madrid y se tuvo que realizar una selección exhaustiva de puntos de muestreo de la red de saneamiento.

Para la definición de dichas cuencas de alcantarillado se tuvieron en cuenta varias variables como la distancia al centro de la ciudad o el número de habitantes. Cada punto de muestreo recoge las aguas residuales de las diferentes cuencas de alcantarillado definidas, esto significa que semanalmente se monitorean más de seis millones y medio de habitantes. En la actualidad, este estudio se lleva a cabo en toda la Comunidad de Madrid mediante 289 puntos de muestreo estratégicamente ubicados en colectores a lo largo de la red de alcantarillado y en estaciones depuradoras de agua residual.

Este estudio, desarrollado por el Canal de Isabel II en las aguas residuales, detecta la propagación de SARS-CoV-2 a través de un enfoque epidemiológico. Estos datos se comparten diariamente con la Consejería de Sanidad de la región de Madrid con fines de consulta y toma de decisiones.

2. DESARROLLO

Este estudio se ha realizado sobre toda la red de saneamiento de la Comunidad de Madrid, la cual se encuentra principalmente combinada y da servicio a 179 municipios. La red cuenta con más de 15.000 km de colectores y emisarios y 157 estaciones depuradoras de aguas residuales, todas ellas responsables del tratamiento de las aguas residuales de más de seis millones y medio de habitantes (Lastra et al., 2019). En estudios previos se apunta a que una estrategia de muestreo semanal ofrece una cuantificación adecuada (La Rosa et al., 2020) [5], y esto es especialmente relevante en sistemas con gran número de puntos de muestreo y amplia extensión geográfica, en los que hay que alcanzar un compromiso entre representatividad y capacidad de análisis.

Para ello se ha dispuesto un complejo sistema logístico de entre cuatro y seis rutas diarias de recogida de muestras puntuales de 500 ml, las cuales se planifican diariamente desde aguas arriba hasta aguas abajo. Además, las muestras se toman a una hora fija en cada punto buscando obtener una “foto” comparable entre tomas sucesivas, evitando así las variaciones que experimenta el flujo de agua residual a lo largo del día y que son consecuencia directa de los hábitos de la población (Peccia et al., 2020; The Water Research Foundation, 2020) [6]. Cada muestra debe mantenerse refrigerada en el entorno de los 4 °C y enviarse al laboratorio tan pronto como finalice el proceso de recolección, ya que la temperatura juega un papel importante en términos de degradación viral a lo largo del tiempo (Gundy et al., 2009) [7].

Los vertidos industriales y los eventos de lluvia podrían afectar potencialmente la detección de presencia de ARN del virus en la red de alcantarillado, por lo que se analizan parámetros fisicoquímicos adicionales (Ahmed et al., 2020b) [8] para evaluar concentraciones inusuales en las aguas residuales.

2.1. Definición de cuenca de alcantarillado

Durante el mes de abril de 2020 se llevó a cabo una prueba piloto en un municipio de la Comunidad de Madrid de más de 100.000 habitantes basada en RT-qPCR y con ello obtener unos criterios de definición de las cuencas de alcantarillado y estandarizarlo para toda la Comunidad de Madrid. Se seleccionaron 10 pozos de la red de alcantarillado para evaluar la ubicación de cada punto de muestreo en términos de distancia de los centros de población y tiempos de retención hidráulica.

Los resultados permitieron a los investigadores establecer criterios de definición de cuencas para poder escalar el sistema de seguimiento a toda la red de saneamiento de Madrid. Es por ello, que se definieron los siguientes criterios de selección de puntos de muestreo:

- Una cuenca de alcantarillado de un máximo de 25.000 hab/equivalentes
- Una distancia de no más de 3,5 km del centro de la población y no más de 2,5 km de distancia desde la última descarga de saneamiento, “**Fig. 1**”

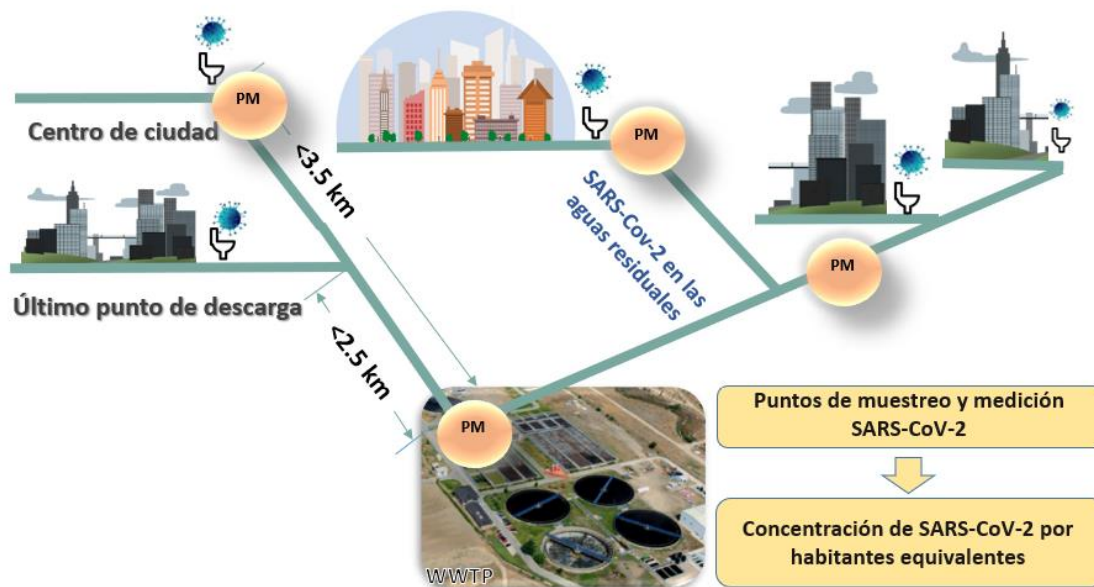


Fig. 1. Criterios de definición de cuencas de alcantarillado y selección de puntos de muestreo

Teniendo en cuenta las particularidades de la Comunidad de Madrid (alta densidad de población en el centro de la región y muchas áreas dispersas con baja densidad de población a su alrededor), y para poder cumplir con los criterios establecidos, se han utilizado un total de 289 puntos de muestreo para recoger los datos de toda la población de la Comunidad de Madrid “Fig. 2”. De estos 289 puntos de muestreo, se han seleccionado 116 en estaciones depuradoras de agua residual cuando ha sido posible, para facilitar la recogida de muestras y el resto en pozos de la red de alcantarillado.

El proyecto depende significativamente del sistema logístico para la recogida y el transporte de las muestras, por lo que se considera prioritario la labor de muestreo sobre el terreno. El funcionamiento de este sistema logístico es fluido y no implica que los técnicos de recogida de muestras entren en contacto directo con las aguas residuales sin tratar. Para cumplir con este requisito y estar del lado de la seguridad y salud de las personas que recogen las muestras se han reubicado más del 60 % de los pozos de acceso a la red de alcantarillado para garantizar la seguridad.

2.2. Análisis de los datos muestreados

El proceso de análisis de los resultados obtenidos en laboratorio tiene una alta complejidad debido a la sensibilidad y variabilidad de la señal de ARN del SARS-CoV-2 en la red de saneamiento, es por ello por lo que se lleva a cabo un cribado de datos, normalización y validación de los resultados obtenidos previamente en el laboratorio. Las muestras no se analizan únicamente para detectar la presencia del SARS-CoV-2, además se analizan parámetros fisicoquímicos como la temperatura, DQO, niveles de cloruro y conductividad

eléctrica para verificar la composición de las aguas residuales y detectar el efecto de la escorrentía en días de lluvia o los vertidos industriales que se pueden producir a la red de alcantarillado.

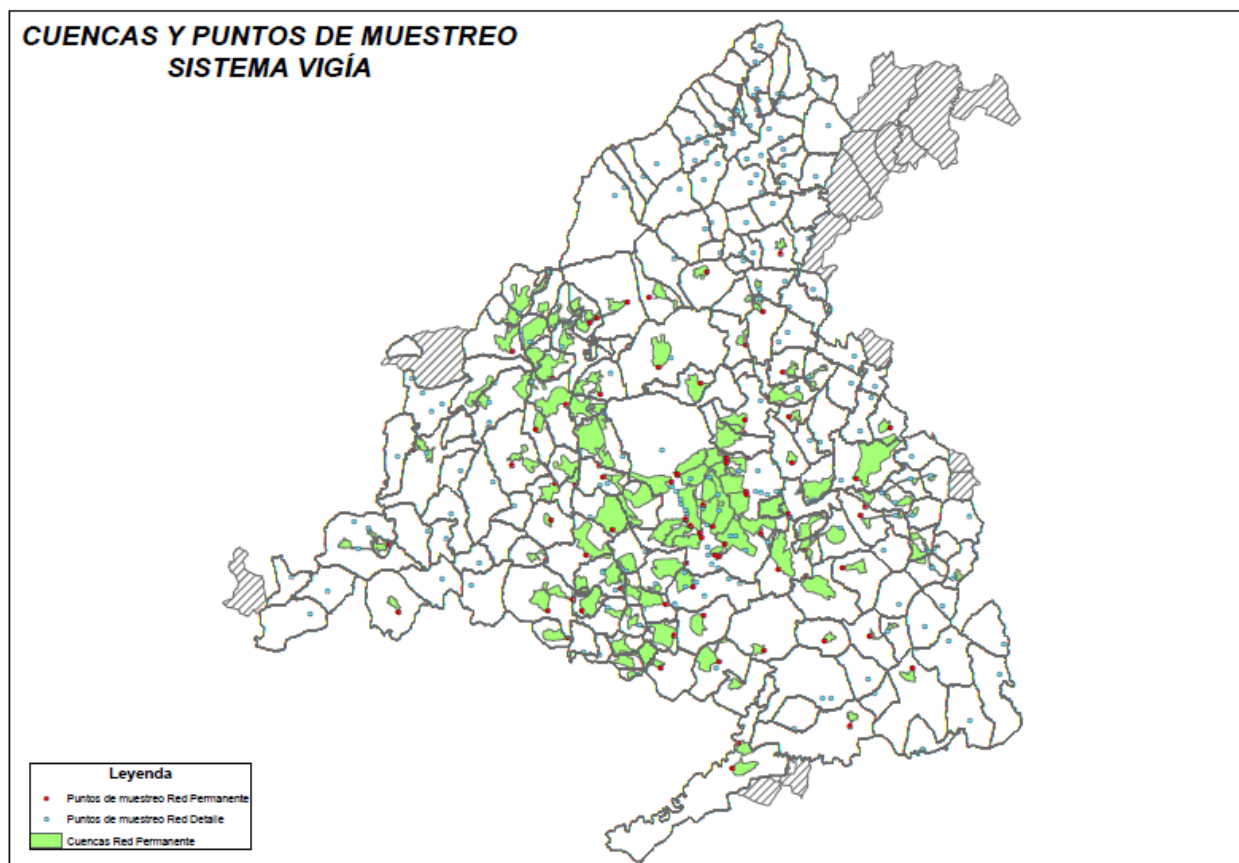


Fig. 2. Mapa de cuencas y puntos de muestreo del sistema Vigía

Canal de Isabel II analiza las muestras en tres laboratorios de los cuales uno de ellos es propio de Canal, de esta manera se establecen procedimientos de control de calidad internos para el análisis de los resultados obtenidos y así poder disponer de un sistema de control en caso de que se produzca una incidencia en alguno de los laboratorios que conlleve la alteración de los resultados. Además, se sigue el criterio de que aquellas muestras tomadas del mismo punto de muestreo deben ser analizadas en el mismo laboratorio.

Es importante tener en cuenta que se trabaja con una variedad importante en cuanto a las características de las cuencas, tanto por su tamaño como por sus usos. Este es el motivo por el que los parámetros se controlan individualmente. Por ejemplo, se observan claras diferencias entre cuencas urbanas (DQO \approx 800 mg/L), rurales (DQO \approx 300 mg/L) y cuencas con una actividad industrial significativa (DQO superiores a 1.000 mg/L en promedio y mayor variabilidad).

Cuando un nuevo parámetro tiene un valor extremo (Ahmed et al., 2020a; Hart y Halden, 2020), se solicita una muestra nueva en ese punto para la validación del resultado, que se recoge en los siguientes 2 o 3 días hábiles (Candel et al., 2021) [9]. En definitiva, este contranálisis podría validar o descartar la primera muestra. Durante este periodo sin datos

reales, la concentración de material genético del SARS-CoV-2 se extrapola provisionalmente (Kumar et al., 2020) [10] utilizando resultados anteriores para dar una visión global de toda la región de Madrid y en los puntos de muestreo que no se dispone de datos se completan utilizando la media móvil de los dos últimos valores.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En esta sección se realiza un análisis e interpretación de los resultados obtenidos de los muestreos recogidos en la red de saneamiento. Además, se realiza un análisis comparativo con los indicadores de hospitalización y los casos notificados por la Consejería de Sanidad de la Comunidad de Madrid.

3.1. Interpretación de los datos diarios

El sistema de alcantarillado de Madrid es principalmente combinado, lo que significa que, junto con los vertidos domésticos, el alcantarillado recoge escorrentía y vertidos industriales. Todavía no está claro cómo los fragmentos detectables del virus SARS-CoV-2 de personas infectadas

interactúan con los efluentes anteriores. Sin embargo, para anticipar una dilución inusual que podría afectar potencialmente la detectabilidad del virus, también se monitorizan los parámetros fisicoquímicos para detectar valores atípicos. Según los datos disponibles la DQO parece ser el parámetro más relevante para detectar una composición de la dilución inusual en las aguas residuales, dado que es más sensible a ambos escenarios (altas diluciones por episodios de lluvia y mayor presencia de contaminantes de lo habitual por vertidos industriales). Además, los niveles de cloruro y la conductividad eléctrica también se controlan como criterios adicionales para detectar una composición inusual, aunque son más estables.

Las muestras con valores fuera de rango se vuelven a muestrear para verificar o descartar los resultados de la PCR en un plazo de 2 a 3 días. En la “**Fig. 3**” se puede ver un ejemplo de muestras descartadas, con valores altos y bajos de DQO asociados con valores atípicos de gc/L de SARS-CoV-2.

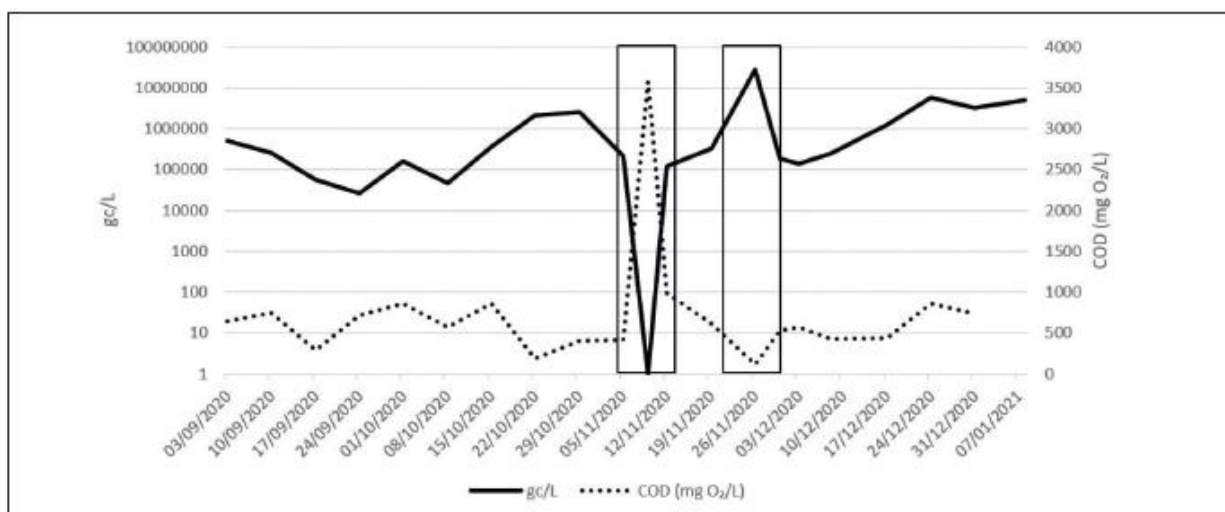


Fig. 3. Detección de valores atípicos en DQO

Este procedimiento para la validación de los resultados corresponde a una parte del procedimiento completo “Fig. 4”. La repetición de muestras no ha dado lugar a un aumento significativo del trabajo de campo. Los eventos de lluvia han sido la principal causa de dispersión, donde las muestras mensuales descartadas representan el 10 % desde que se inició el estudio hasta la actualidad.

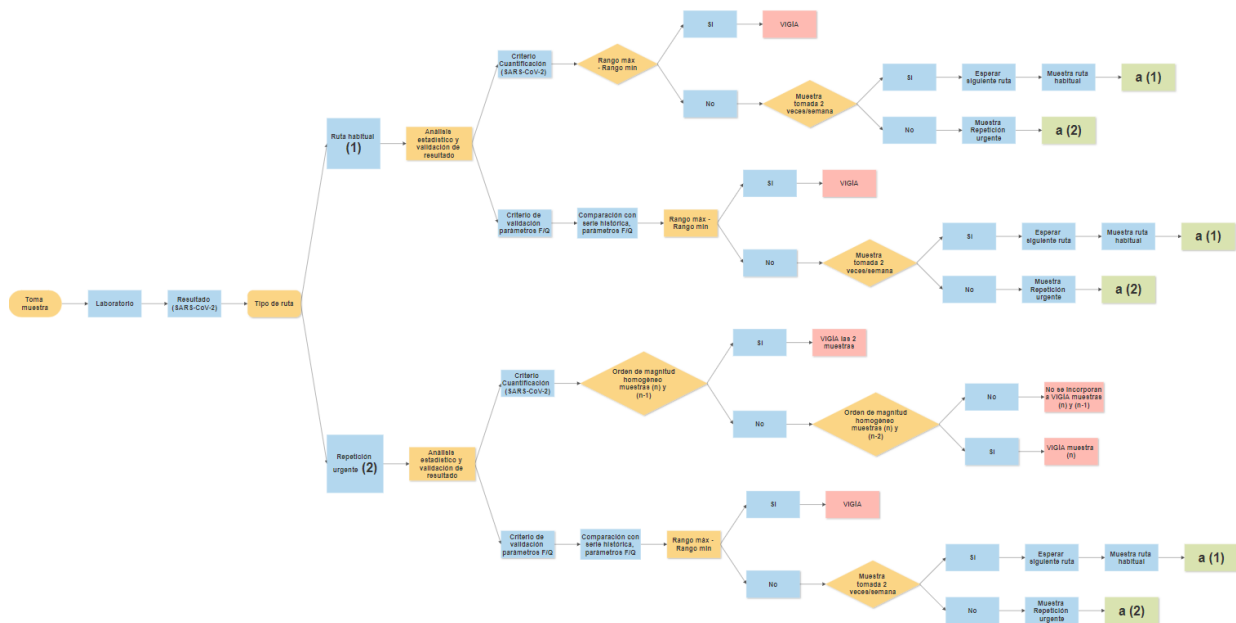


Fig. 4. Proceso completo de validación de resultados

Entre los criterios de control descritos anteriormente, se considera el valor de DQO como más representativo, ya que se ha observado que tiene mayor sensibilidad a las composiciones inusuales de las muestras que el resto, tanto para los episodios de lluvia con diluciones importantes como para los picos de contaminación.

Esta información analítica también se complementa con observaciones en campo, que en muchas ocasiones alertan de caudales inferiores o superiores a lo habitual (posibles operaciones de mantenimiento aguas arriba) o color inusual de la muestra (posibilidad de vertidos industriales), por nombrar algunos ejemplos.

3.2. Agregación de los resultados

Teniendo en cuenta que los resultados obtenidos son mayoritariamente semanales, se establece una serie diaria de resultados con las siguientes consideraciones:

- La señal o valor se estima constante en los días entre tomas.
- Cuando el lapso entre dos muestras excede el período de 7 días (por repetición de la muestra o alguna dificultad en el trabajo de campo), los resultados se extrapolan para completar la información restante, aplicando la pendiente de la serie de promedios móviles para los dos resultados anteriores.

Luego, las series para diferentes puntos se agregan y normalizan en función de los datos de población que contiene cada cuenca asociada a cada punto de muestreo y, como resultado, se compara una señal global agregada con los siguientes indicadores sanitarios: las hospitalizaciones diarias y las tasas de incidencia.

3.3. Comparativas con los datos sanitarios

Para evaluar la capacidad de las aguas residuales como un indicador de alerta temprana, la agregación de las concentraciones de ARN del SARS-CoV-2 para toda la Comunidad de Madrid también se compara con las nuevas hospitalizaciones por COVID-19 notificadas. Las series diarias de hospitalización presentan una fuerte estacionalidad semanal, por lo que se prefiere una media móvil de 7 días como indicador más robusto. A continuación, la “Fig. 5” muestra similitudes entre ambas series, y anticipación de la curva de resultados agregados de concentración de fragmentos de genoma de SARS-CoV-2 de aguas residuales respecto de la curva de hospitalización.

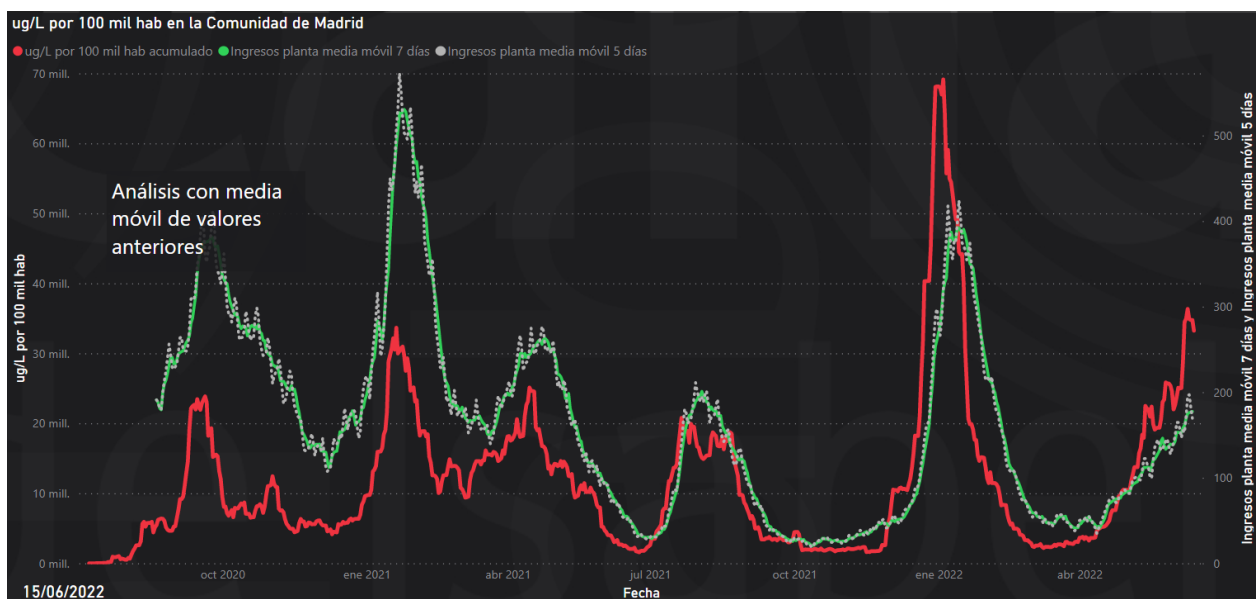


Fig. 5 Comparativa gráfica de datos de SARS-CoV-2 con los datos de hospitalizaciones en la Comunidad de Madrid

La explicación comúnmente aceptada para este desfase entre la presencia de material genético de SARS-CoV-2 en las aguas residuales y las hospitalizaciones es que el SARS-CoV-2 se puede encontrar en las heces de los pacientes antes de la aparición de los síntomas. La anticipación de las pruebas de aguas residuales puede diferir según la ubicación, el tamaño y la población de la cuenca, las estrategias de muestreo o la temperatura, entre muchos otros factores, ya que las aguas residuales son, en general, un entorno muy heterogéneo. Los resultados oscilan entre 3 y 11 días de anticipación entre las cuencas de alcantarillado estudiadas.

4. CONCLUSIONES

Este estudio ha demostrado las capacidades de la epidemiología basada en aguas residuales como una herramienta de alerta temprana para la pandemia actual de COVID-19 en la Comunidad de Madrid. El sistema dispone de un total de 289 puntos de muestreo que se analizan sistemáticamente para la detección y cuantificación de la concentración de material genético de SARS-CoV-2.

El proceso de selección de los puntos de muestreo ha sido fundamental para este objetivo: siguiendo los criterios obtenidos tras una prueba piloto, se estableció que siempre que sea posible, es preferible para el diseño de la cuenca de alcantarillado que descarga sobre cada punto de muestreo un máximo de 25.000 habitantes equivalentes, 3,5 km de distancia a los núcleos de población y 2,5 km de distancia al último punto de descarga para obtener resultados óptimos.

Se ha comprobado que una estrategia de muestreo semanal ofrece una cuantificación adecuada, fijando las horas de toma de muestra para cada punto, de modo que se pueda reducir el efecto de las variaciones diarias. Sin embargo, los resultados de laboratorio deben ser validados con parámetros fisicoquímicos para detectar composiciones inusuales.

La presencia y evolución del ARN del SARS-CoV-2 en las aguas residuales muestran una fuerte conexión con los datos sanitarios disponibles. La información se comparte diariamente con las autoridades sanitarias para su consulta y toma de decisiones y los resultados están disponibles como un agregado para toda la región y para cada cuenca de alcantarillado.

5. REFERENCIAS

- [1] Medema, G., Heijnen, L., Elsinga, G., Italiaander, R., y Brouwer, A. (2020). Presence of SARS-coronavirus-2 RNA in sewage and correlation with reported COVID-19 prevalence in the early stage of the epidemic in The Netherlands. *Environmental Science & Technology Letters*, 7(7): pp. 511-516. <https://doi.org/10.1021/acs.estlett.0c00357>.
- [2] Ahmed, W., Angel, N., Edson, J., et al. (2020a). 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. *Science of Total Environment*, Vol. 728, 138764. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.138764>.
- [3] La Rosa, G., Iaconelli, M., Mancini, P., et al. (2020). First detection of SARS-CoV-2 in untreated wastewaters in Italy. *Science of The Total Environment*, Vol. 736, 139652. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.139652>.
- [4] Worldometer (2020). Worldometer Coronavirus (02/04/20). <https://www.worldometers.info/coronavirus/country/spain/>.
- [5] Lastra, A., Suárez, J., Puertas, J., et al. (2019). Desarrollo de un sistema inteligente para la operación de un sistema complejo de saneamiento. En: G. Mannina (ed.), *New Trends in Urban Drainage Modelling*, pp. 207-212. Palermo: Springer International Publishing.
- [6] Peccia, J., Zulli, A., Brackney, D.E., et al. (2020). Measurement of SARS-CoV-2 RNA in wastewater tracks community infection dynamics. *Nature Biotechnology*, 38, 1164–1167. <https://doi.org/10.1038/s41587-020-0684-z>.

- [7] Gundy, P.M., Gerba, C.P., y Pepper, I.L. (2009). Survival of coronaviruses in water and wastewater. *Food and Environmental Virology*, 1(10): pp. 10–14. <https://doi.org/10.1007/s12560-008-9001-6>.
- [8] Ahmed, W., Bertsch, P.M., Bibby, K., et al. (2020b). Decay of SARS-CoV-2 and surrogate murine hepatitis virus RNA in untreated wastewater to inform application in wastewater-based epidemiology. *Environmental Research*. Vol. 191, 110092. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2020.110092>.
- [9] Candel, F.J., San-Román, J., Barreiro, P., et al. (2021). Integral management of COVID-19 in Madrid: Turning things around during the second wave. *The Lancet*, Vol. 2, 100039. <https://doi.org/10.1016/j.lanpe.2021.100039>.
- [10] Kumar, M., Patel, A.K., y Shah, A.V., et al. (2020). First proof of the capability of wastewater surveillance for COVID-19 in India through detection of genetic material of SARS-CoV-2. *Science of The Total Environment*, Vol. 746, 141326. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.141326>.