

Detección y cuantificación de SARS-CoV-2 en plantas de tratamiento de aguas residuales de diferentes ciudades de Chile: hacia la implementación de una vigilancia centinela permanente

Detection and quantification of SARS-CoV-2 wastewater treatment plants from different cities in Chile; towards to a permanent sentinel surveillance

Jorge Olivares-Pacheco^{1,2,3*}, Aiko D. Adell^{2,3,4}, Matías I. Hepp^{3,5,6}, Andressa S. Reis^{3,6}, César Echeverría^{3,7}, Claudia Ibacache-Quiroga^{3,8,9}, Paulina Assmann^{3,10} y Aldo Gaggero^{3,11*}

¹Grupo de Resistencia a los Antimicrobianos en Bacterias Patógenas y Ambientales, GRABPA, Instituto de Biología, Pontificia Universidad Católica de Valparaíso, Chile.

²Núcleo Milenio para la Investigación Colaborativa en la Resistencia a los Antibióticos Microb-R, Chile.

³Consortio de laboratorios universitarios de aguas residuales, Chile.

⁴Escuela de Medicina Veterinaria, Facultad de Ciencias de la Vida, Universidad Andrés Bello. Santiago, Chile.

⁵Laboratorio de Investigación en Ciencias Biomédicas, Departamento de Ciencias Básicas y Morfología, Facultad de Medicina, Universidad Católica de la Santísima Concepción. Concepción, Chile.

⁶Centro de Vigilancia de Aguas Residuales, Centinela Biobío, Facultad de Medicina, Universidad Católica de la Santísima Concepción. Concepción, Chile.

⁷Laboratorio de Biología Molecular y Genómica, Facultad de Medicina, Universidad de Atacama. Copiapó, Chile.

⁸Escuela de Nutrición y Dietética, Facultad de Farmacia, Universidad de Valparaíso, Chile.

⁹Centro de Micro-Bioinnovación, Universidad de Valparaíso, Chile.

¹⁰Centro de Astrofísica y Tecnologías Afines, Universidad de Concepción, Chile.

¹¹Laboratorio de Virología Ambiental, Programa de Virología, Instituto de Ciencias Biomédicas, Universidad de Chile, Santiago, Chile.

Financiamiento: detalle al final de texto.

Los autores firmantes de este trabajo declaran no tener conflicto de interés.

Recibido: 29 de septiembre de 2022 / Aceptado: 30 de diciembre de 2022

Resumen

Introducción: La cuantificación de SARS-CoV-2 en aguas residuales es una herramienta que permite determinar la tendencia de la circulación viral en un área geográfica determinada. **Objetivo:** Cuantificar el virus SARS-CoV-2 en 15 plantas de tratamiento de aguas residuales en diferentes ciudades de Chile para establecer una comparación con las variables de: i) casos activos por cada 100.000 habs.; ii) positividad diaria (casos nuevos); y iii) fases del plan de confinamiento. **Metodología:** SARS-CoV-2 se concentró a partir de muestras de aguas residuales. Para obtener el número de genomas del virus por litro se realizó una cuantificación absoluta utilizando qRT-PCR. **Resultados:** Entre enero y junio de 2021 se procesaron 253 muestras, siendo todas positivas para la presencia del virus. Asimismo, se logró determinar que la tasa de casos activos por cada 100.000 habs. es la variable que mejor se ajusta a las tendencias obtenidas con la cuantificación de la carga viral en las aguas residuales. **Conclusiones:** La

Abstract

Background: The quantification of SARS-CoV-2 in wastewater is a tool that allows determining the trend of viral circulation in a particular geographical area. **Aim:** To quantify the SARS-CoV-2 virus in 15 wastewater treatment plants in different Chilean cities to establish a comparison with the variables of: i) Active cases per 100,000 inhabitants; ii) daily positivity (novel cases); and iii) phases of the lockdown strategy. **Methods:** SARS-CoV-2 was concentrated from wastewater samples. To obtain the number of virus genomes per liter, absolute quantification was performed using qRT-PCR. **Results:** Between January and June 2021, 253 samples were processed, all of which were positive for the presence of the virus. Likewise, it will be determined that the rate of active cases per 100,000 inhabitants is the variable that best fits the trends obtained with the quantification of the viral load in wastewater. **Conclusions:** The quantification of SARS-CoV-2 in wastewater as a continuous strategy is an efficient tool to

Correspondencia a:

Jorge Olivares Pacheco
jorge.olivares@pucv.cl

Aldo Gaggero Brillouet
agaggero@uchile.cl

cuantificación de SARS-CoV-2 en las aguas residuales de manera permanente es una herramienta eficiente para determinar la tendencia del virus en un área geográfica determinada y, en conjunto con una vigilancia genómica, puede constituirse en una vigilancia centinela ideal generando alertas sobre futuros brotes.

Palabras clave: SARS-CoV-2; epidemiología basada en aguas residuales (EBAR); tasa de casos activos; vigilancia genómica; vigilancia centinela.

determine the trend of the viral circulation in a delimited geographical area and, combined with genomic surveillance, it can constitute an ideal sentinel surveillance alert on future outbreaks.

Keywords: SARS-CoV-2; wastewater-based epidemiology WBE; active case rate; genomic surveillance; sentinel surveillance.

Introducción

La pandemia de COVID-19 causada por el virus SARS-CoV-2 se ha transformado en el mayor desafío de salud pública en la historia de la medicina moderna¹. El diagnóstico de esta enfermedad se realiza a través de pruebas individuales, ya sea mediante una prueba de antígenos o bien mediante reacción de polimerasa en cadena (RPC; en inglés e internacionalmente se identifica con la sigla PCR) de transcripción reversa en tiempo real (RT-RT-PCR o qRT-PCR)². De esta manera, el principal criterio utilizado para la toma de medidas sanitarias y para el desarrollo de programas de vigilancia en los diferentes países ha sido el número de casos confirmados por estas pruebas³. Sin embargo, se ha demostrado que sólo las personas que presentan los síntomas o bien aquellas que han estado en contacto directo con un caso positivo se realizan el test^{4,5} salvo que sean incluidos en operativos de búsqueda activa de casos, que permiten identificar preventivamente las personas infectadas de manera asintomática. Por otra parte, aquellas personas que presentan síntomas muy leves de la enfermedad o son asintomáticos se realizan el test con muy baja frecuencia, lo cual se ha ido incrementando a lo largo de la pandemia^{4,6,7}. Esto subestima la cantidad total de personas infectadas y por tanto, hay un desconocimiento de la circulación real del virus a nivel comunitario^{8,9}, situación que es mucho más seria en países de bajos y medianos ingresos entre los cuales se encuentra Chile¹⁰. Este escenario estimuló la implementación de un sistema de vigilancia ambiental menos costoso que el testeo persona a persona, como es la detección y cuantificación del virus en las aguas residuales¹¹.

La epidemiología basada en las aguas residuales (EBAR) ha sido aplicada desde el año 2005 para trazar drogas ilícitas y medicamentos de alto uso en la población¹²⁻¹⁴. Aunque su potencial para la detección de diversos patógenos ha sido comprobado, el caso más exitoso de una vigilancia sistemática en aguas residuales ha sido la iniciativa de erradicación de la polio^{15,16}.

Si bien todos los coronavirus epidémicos humanos (SARS-CoV, SARS-CoV-2 y MERS-CoV) producen síntomas respiratorios, han demostrado que también causan síntomas gastrointestinales. Pero no sólo los pacientes que presentan síntomas gastrointestinales están eliminando el virus a través de las heces, ya que se ha comprobado que las personas asintomáticas también presentan una elevada carga viral, tanto en orina como en las deposiciones^{17,18}; por tanto, estos virus han podido ser detectados en forma exitosa en las aguas residuales. Esto ha permitido que en más de 70 países se haya implementado un

seguimiento del virus SARS-CoV-2 en esta matriz, constituyéndose en una medida complementaria a la vigilancia realizada por los sistemas de salud¹⁹. La acumulación de evidencia en este sentido ha llevado a la comunidad científica a proponer la detección del SARS-CoV-2 en aguas residuales como una herramienta de vigilancia permanente, que permita una monitorización constante del agente y que, a su vez, sea complementaria con la vigilancia de otros patógenos²⁰.

Materiales y Métodos

Ciudades participantes del estudio

En este estudio participaron 15 plantas de tratamiento de aguas residuales ubicadas en cuatro regiones de Chile. En la Figura 1 se muestran las ciudades involucradas. En la Región de Atacama fueron consideradas las ciudades de Copiapó, Chañaral, Caldera, Tierra Amarilla y Diego de Almagro, cada una con su respectiva planta de tratamiento. En la Región de Valparaíso se consideraron cuatro plantas de tratamiento: la planta Almendral en la ciudad de San Felipe; la planta Cordillera en la ciudad de Los Andes; la planta 2 Norte que presta servicios a las ciudades de Viña del Mar, Quilpué y Villa Alemana; y la planta Loma Larga que presta servicios a la ciudad de Valparaíso. En la Región Metropolitana se evaluaron dos plantas de tratamiento: Mapocho-Trebal y La Farfana, que prestan servicio al conurbano más grande de Chile, el Gran Santiago. Finalmente, en la Región del Biobío se consideraron cuatro plantas de tratamiento: San Pedro de la Paz, Coronel y Los Ángeles que prestan servicio a las ciudades del mismo nombre y en la misma región se consideró la planta de tratamiento de Concepción que presta servicio a las ciudades de Chiguayante, Hualpén, Talcahuano y Concepción. En cuanto a las características demográficas de las ciudades participantes, en la Región de Atacama se incluyó a 75% del total regional, 61% en la Región de Valparaíso, 71% en la Región Metropolitana y 64% en la Región del Biobío. Esto equivale a 42% del total de la población del país según el censo de 2017. Los mapas se crearon utilizando el software de código abierto Quantum GIS versión (QGIS) 3.18-Zürich (qgis.org/es/site/) bajo una licencia Creative Commons (www.gnu.org/licenses).

Obtención de muestras

En cada una de las plantas de tratamiento participante de este estudio, se tomó una muestra semanal entre los meses de enero y julio de 2021. La muestra consiste en una composición de 24 horas del

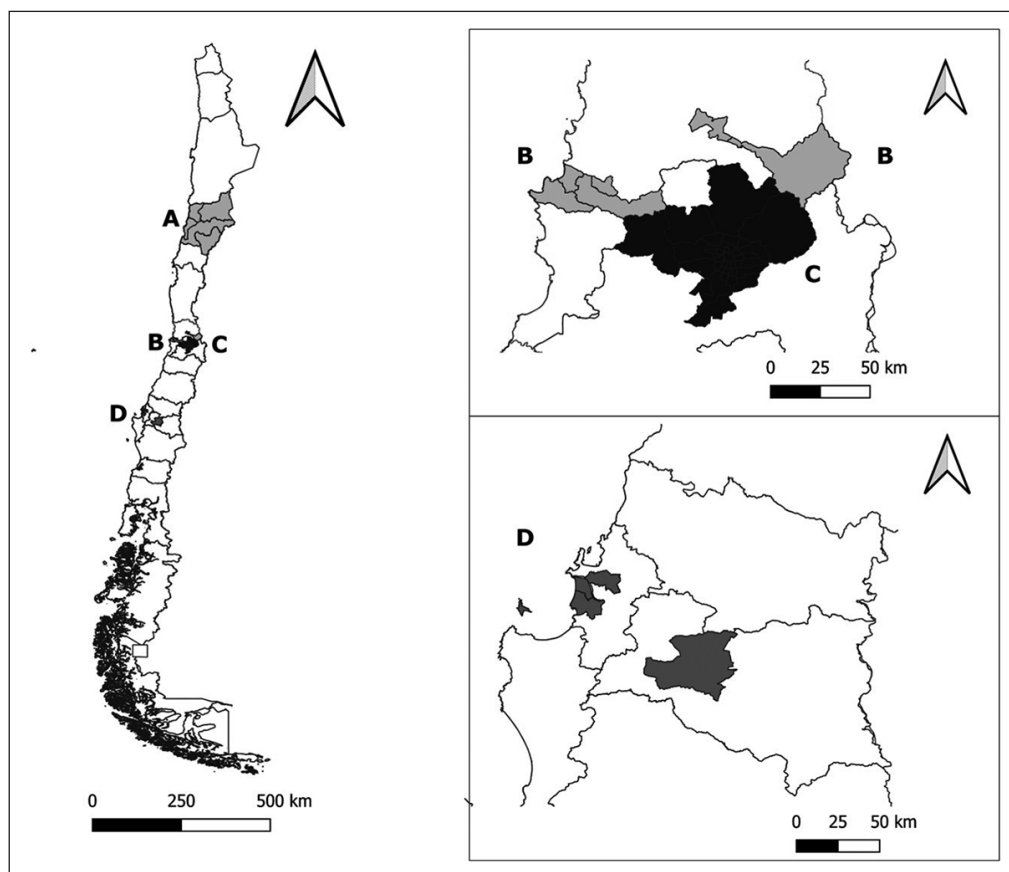


Figura 1. Ciudades donde se recolectaron muestras de aguas residuales desde plantas de tratamiento de aguas residuales: **(A)** Región de Atacama; ciudades: Copiapó, Chañaral, Caldera, Tierra Amarilla y Diego de Almagro. **(B)** Región de Valparaíso; ciudades: Valparaíso, Viña del Mar, Quilpué, Villa Alemana, Los Andes y San Felipe. **(C)** Región Metropolitana; ciudad: Conurbano del Gran Santiago. **(D)** Región del Biobío; ciudades: San Pedro de la Paz, Coronel, Los Ángeles, Chiguayante, Hualpén, Talcahuano y Concepción. Los mapas de la derecha representan un aumento de (B), (C) y (D).

agua del afluente de las plantas de tratamiento (previo a cualquier tratamiento) con un volumen final de 1 litro de agua. Una vez tomada la muestra, esta llegaba refrigerada hasta cada uno de los laboratorios y era procesada durante el mismo día.

Métodos de concentración del virus

Para concentrar las partículas virales en una muestra de agua residual se pueden usar diferentes metodologías, como son la *ultrafiltración*, *ultracentrifugación*, *precipitación* con polietilenglicol (PEG) o *floculación* con leche descremada, entre otras. La elección del método de concentración depende de varios factores tales como la disponibilidad de equipos, de reactivos de laboratorio, el tiempo requerido para el procesamiento de las muestras y la naturaleza de la matriz de aguas residuales. Los laboratorios integrantes de este consorcio utilizaron tres métodos para la concentración de partículas virales desde matrices de aguas residuales, los que se describen a continuación:

- Floculación con leche descremada: Para concentrar en forma efectiva el virus SARS-CoV-2 se modificaron los protocolos presentados por Melgaço et al., (2018) Guerrero-Latorre et al., (2020) y Calgua et al.,

(2008)²¹⁻²³. Brevemente, un volumen entre 100 y 500 mL de agua residual fue llevado a un pH final de 3,5 utilizando HCl 1N, para luego añadir 5 mL de leche desnatada prefloculada al 1% p/v. Esta mezcla se mantuvo en agitación por 8 h a temperatura ambiente. Posteriormente la muestra fue centrifugada a 4.000 x g por 40 min a 4 °C. Finalmente, el *pellet* obtenido fue resuspendido en 4 mL *buffer* fosfato 1X (PBS) y almacenado a -80 °C hasta su uso.

- Concentración por polietilenglicol 8000 (PEG): Se modificó el protocolo descrito por Wu et al., (2020)²⁴. A partir de 120 mL de muestras de aguas residuales con pH neutro, se añaden PEG y NaCl a la muestra en proporciones de 10 y 2% p/v, respectivamente. Luego de una incubación a 20 °C durante 15 min en un agitador orbital ajustado a 150 rpm. Después de la incubación, la muestra se centrifugó a 8.000 x g durante 30 min a 4 °C para producir un sedimento. La mayor parte del sobrenadante se descartó, dejando 2-5 mL volumen en el cual se resuspendió el sedimento. Luego de centrifugar nuevamente a 8.000 x g durante 5 min a 4 °C, se obtuvo un precipitado final (1 mL) que se procesó para obtener el ARN.

- Ultracentrifugación: 42 mL de cada muestra se concentraron mediante ultracentrifugación a 100.000 x g por 1 h y el sedimento se resuspendió en 3,5 mL de *buffer* glicina 0,25 N pH 9,5. Luego de una incubación durante 30 min, los virus se concentraron mediante ultracentrifugación a 100.000 x g durante 1 h. El sedimento se resuspendió en 200 µL de PBS estéril pH 7,2 y se almacenó a -80 °C hasta su uso²⁵.

Método de extracción de ARN

Los métodos de extracción utilizados constan de dos pasos. El primero es la resuspensión del *pellet* obtenido en TRIZOL® (Thermo-Fisher), siguiendo el protocolo de Rio y cols., (2010)²⁶ hasta la obtención de la fase acuosa. Posteriormente, para extraer el ARN desde la fase acuosa se utilizó un *kit* de purificación comercial. Los *kits* utilizados por los diferentes laboratorios miembros del consorcio fueron los siguientes: i) Quick-RNA-tm Viral Kit (Zymo Research, USA); ii) E.Z.N.A Nucleic Acid Purification System (Omega, USA); iii) QIAamp® Viral RNA Mini (QIAGEN, USA).

Detección del virus mediante qRT-PCR

La detección del virus se realizó cargando entre 3 y 5 µL del extracto de ARN, amplificando las dianas N1, N2, ORF1ab* y S*. El gen que codifica para la RNAsaP humana se utilizó como control de calidad del material genético. Las secuencias de los cebadores para la amplificación de cada una de las dianas se muestran en la Tabla 1. Los *kits* de amplificación utilizados por los diferentes laboratorios fueron los siguientes: i) Master Mix Taqman® Fast Viral 1-Step (ThermoFisher Scientific, USA); ii) TaqMan 2019-nCoV Assay Kit v1 (ThermoFisher Scientific,

USA); iii) Brilliant III Ultra-fast qRT-PCR Master Mix (Agilent Technologies); iv) KiCqStart® One-Step Probe RT-qPCR ReadyMix™ (Sigma Aldrich). Todos estos *kits* se encuentran validados por el Instituto de Salud Pública de Chile para su uso en la detección del virus SARS-CoV-2. En todos los laboratorios se utilizó más de una diana para la amplificación del material genético de SARS-CoV-2. Una muestra se considera positiva cuando amplifica positivamente para N1, RNAsaP y cualquiera de las otras dianas utilizada para la amplificación del virus y cuyo Ct sea inferior a 40.

Estimación del número de copias del genoma de SARS-CoV-2 en las aguas residuales

Para determinar el número de copias genómicas en las aguas residuales se realizó una cuantificación absoluta del material genético. Para ello se construyeron curvas de calibración en base a plásmidos individuales que contenían copias de las dianas de SARS-CoV-2. Los plásmidos fueron adquiridos en IDT DNA Technologies. Para las dianas basadas en el gen N se utilizó el plásmido 2019-nCoV_N_Positive control. Con este plásmido se construyeron curvas de calibración basadas en el número de copias entre 1×10^6 hasta 1×10^0 copias (1.000.000 a 1 copias). El número de copias genómicas se obtuvo mediante el valor del Ct de cada una de las muestras en cada reacción de qRT-PCR el cual es interpolado en la ecuación de la recta obtenida con las curvas de calibrado. El valor obtenido corresponde al número de copias de equivalentes genómicos del virus SARS-CoV-2 por litro de agua residual²⁷. Como consenso a nivel de múltiples estudios, la carga viral se reporta en base al número de equivalentes genómicos entregados por la diana N1²⁸⁻³¹.

*La detección de las dianas ORF1ab y S son en contexto de un kit cerrado protegido [TaqMan 2019-nCoV Assay Kit v1 (ThermoFisher Scientific, USA)]; por tanto, no se cuenta con la secuencia de los cebadores utilizados para su amplificación por qRT-PCR.

Tabla 1. Cebadores utilizados en la amplificación de diferentes dianas de SARS-CoV-2

	Secuencia	Nombre original	Orientación
N ₁ F	GACCCCAAATCAGCGAAAT	2019-nCoV_N1-F	Forward
N ₁ R	TCTGGTTACTGCCAGTTGAATCTG	2019-nCoV_N1-R	Reverse
Sonda	FAM-ACCCCGCATTACGTTTGGTGGACC-BH1	2019-nCoV_N1-P	
N ₂ F	TTACAAACATTGGCCGCAAA	2019-nCoV_N2-F	Forward
N ₂ R	GCGCGACATTCCGAAGAA	2019-nCoV_N2-R	Reverse
Sonda N ₂	FAM-ACAATTTGCCCCAGCGCTTCAG-BHQ1	2019-nCoV_N2-P	
RNAsaPF	AGATTTGGACCTGCGAGCG	RP-F	Forward
RNAsaPR	GAGCGGCTGTCTCCACAAGT	RP-R	Reverse
Sonda RNAsaP	FAM-TTCTGACCTGAAGGCTCTGCGCG-BHQ1	RP-P	

Diana N: Gen que codifica para la proteína de la nucleocápside del virus. Diana RNAsaP: Codifica para gen que humano utilizado como control. *La detección de las dianas ORF1ab y S son en contexto de un kit cerrado protegido [TaqMan 2019-nCoV Assay Kit v1 (ThermoFisher Scientific, USA)], por tanto, no se cuenta con la secuencia de los cebadores utilizados para su amplificación por qRT-PCR.

Análisis de datos

Con el fin de establecer una relación entre los casos de COVID-19 y la concentración de copias de ARN de SARS-CoV-2 detectadas en las aguas residuales, se obtuvo un promedio mensual de los datos obtenidos y se realizó una comparación gráfica con tres variables oficiales reportadas por el Ministerio de Salud de Chile (MINSAL-gob.cl/pasoapaso/cifrasoficiales/) para cada una de las regiones. Las variables utilizadas fueron las siguientes:

- Casos activos comunales totales, los cuales fueron divididos por la población total comunal generando de esta forma la tasa de incidencia de casos activos reportados por cada 100.000 habs.;
- Positividad del test de PCR al día de toma de la muestra; y
- Las fases de nivel de confinamiento establecidas por las autoridades gubernamentales (Tabla 2). Si la fecha de los datos del MINSAL no coincidiera con la fecha de la obtención de muestras, se utilizaron los datos de la fecha inmediatamente posterior. En Chile, el plan de confinamiento (denominado “Plan paso a paso”) consistió en cuatro fases bien caracterizadas siendo la fase 1 la más restrictiva y la fase 4 la más

permissiva. La fase 1 consistía en un nivel máximo de confinamiento, con restricción completa de movilidad para las personas los siete días de la semana. Por otra parte, la fase 2 consistía en un nivel máximo de confinamiento y restricción completa de movilidad para las personas durante el fin de semana. En la fase 3, se elimina el confinamiento, pero se establecen aforos limitados de personas en el transporte público y en los lugares cerrados. Finalmente, en la fase 4 se eliminan completamente las restricciones de movilidad y se aumenta el aforo de las personas en lugares cerrados. Los casos activos fueron representados como tasa, que se calcula como número de casos activos reportados por cada 100.000 habs. (Tabla 2). El promedio, el valor máximo, el valor mínimo y la moda de todos los datos analizados (concentración de las copias de ARN de SARS-CoV-2, tasa de casos activos por 100.000 habs., positividad de la prueba de PCR y fases de nivel de confinamiento) fueron obtenidos en las cuatro regiones en el periodo de enero y junio 2021 (Tabla 2).

Resultados y Discusión

Entre enero y junio de 2021, fueron procesadas 253 muestras de plantas de tratamiento en todas las ciudades mencionadas, de las cuales todas resultaron positivas, abarcando a más de 8 millones de personas, lo que equivale según el censo de 2017 a casi un 42% de la totalidad de habitantes del país. La media de los valores de Ct detectadas fue de 34,25. En lo que respecta a la cuantificación, la carga más alta obtenida se logró en la ciudad de Santiago el día 20 de enero de 2021, con un valor de 6.675.720 UG/L, mientras que el valor de carga más bajo detectado se observó en la ciudad de Los Andes el día 17 de marzo de 2021, con un valor de 494 UG/L (Tabla 3). De manera general, una de las características más importantes de los resultados obtenidos es que, en todas las ciudades, excepto en la Región Metropolitana, la tendencia de aumento y disminución de ambas (i) la tasa de casos activos por cada 100.000 habs. (Figura 2A, 2D, 2G y 2J) y de (ii) la positividad de la prueba de PCR (Figura 2C, 2F, 2I y 2L), siguieron la tendencia de aumento y disminución de la concentración de copias de ARN de SARS-CoV-2 detectadas en las aguas residuales. Por otra parte, cuando se analiza la tendencia comparada con las fases del plan de confinamiento (Plan paso a paso) vemos que también hay una gran coincidencia, ya que, si bien hay una baja sustancial en la movilidad de las personas, el número de personas infectadas que permanece en sus hogares es alto; por tanto, hay una constante eliminación de partículas virales al sistema (Figura 2B, 2E, 2H y 2K). La fase 1 de confinamiento total es también la fase de mayor circulación viral detec-

Tabla 2. Variables consideradas en este estudio

		MIN	MAX	Media
Región de Atacama	TI_CA	37,98	440,19	218,15
	RNA AR	895	1.528.708	764.802
	Fase	1	4	-
	Positividad	1%	25%	10%
Región de Valparaíso	TI_CA	125,8	635,2	308,3
	RNA AR	494	57.040.630	28.520.562
	Fase	1	3	-
	Positividad	6%	17%	10%
Región Metropolitana	TI_CA	949,2	5.835,1	2.908,9
	RNA AR	5.000	6.675.721	3.340.361
	Fase	1	2	-
	Positividad	6%	18%	10%
Región del Biobío	TI_CA	146,7	470,9	267,7
	RNA AR	514	118.046	16.276
	Fase	1	2	-
	Positividad	5%	16%	11%

i) TI_CA: Tasa de casos activos al día de la medición de la carga de ARN en las aguas residuales por cada 100.000 habs.; ii) RNA AR: Concentración de ARN en las aguas residuales medido en unidades genómicas (UG) por litro (L) (UG/L); iii) Fase: fase del plan de confinamiento en el momento de la medición; iv) Positividad: Casos positivos (nuevos) al momento de la medición. Para cada variable se presenta el valor mínimo, el máximo y la media para cada una de las regiones entre los meses de enero y junio de 2021.

Tabla 3. Características de las campañas de muestreo realizadas por los diferentes miembros del consorcio

	Región de Atacama UA	Región de Valparaíso UV	Región Metropolitana UdeCh-PUCV-UNAB	Región del Bío-Bío UCSC
Mayor carga obtenida UG/L*	1.528.708,24 copias/L	57.040.630 copias/L	6.675.720,89 copias/L	118.045,25 copias/L
Sitio de mayor carga obtenida	Diego de Almagro	Cordillera	La Farfana	San Pedro de la Paz
Fecha de mayor carga obtenida	22 de marzo de 2022	18 de junio de 2021	20 de enero de 2021	22 de enero de 2021
Menor carga obtenida UG/L*	895,04 copias/L	494 copias/L	5000 copias/L	514,01 copias/L
Sitio de menor carga obtenida	Diego de Almagro	Cordillera	Trebal	San Pedro de la Paz
Fecha de menor carga obtenida	26 de enero de 2021	17 de marzo de 2021	8 de marzo de 2021	19 de febrero de 2021

UA: Universidad de Atacama; UV: Universidad de Valparaíso; UdeCh: Universidad de Chile; PUCV: Pontificia Universidad Católica de Valparaíso; UNAB: Universidad Andrés Bello; UCSC: Universidad Católica de la Santísima Concepción. *La carga se expresa en unidades genómicas (UG) por litro (UG/L)

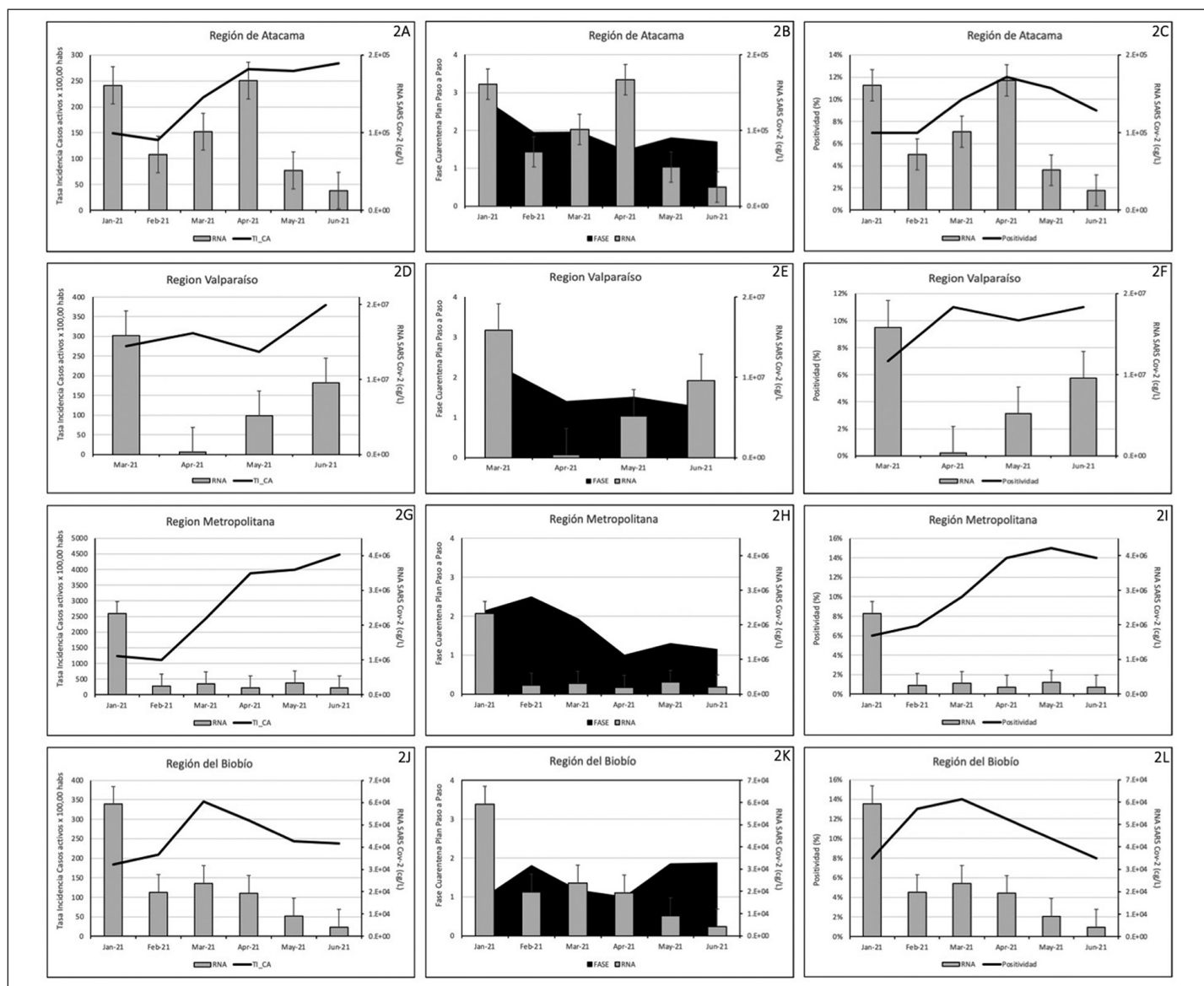


Figura 2. Gráficos de tendencia de la copias de RNA SARS-CoV-2 (cg/L) detectadas en aguas residuales con tasa de incidencia de casos activos x 100,000 hab. (2A, 2D, 2G y 2J), Fase de cuarentena “Plan paso a paso” (2B, 2E, 2H y 2K), y positividad de la prueba de PCR (%) (2C, 2F, 2I y 2L) en cuatro regiones de Chile.

tada en las aguas residuales. En resumen, la tendencia de la concentración de copias de ARN de SARS-CoV-2 en las aguas residuales en el periodo estudiado siguió la tendencia que era esperada para todas las variables consideradas. Al ver la robustez de todas las variables, sin duda alguna la que presenta mayor valor epidemiológico para este trabajo es la de casos acumulados por cada 100.000 hab. En primer lugar, porque esta variable refleja mucho mejor la historia natural de la enfermedad, ya que las personas contagiadas están liberando el virus constantemente a las aguas residuales, tanto cuando son pre-sintomáticas como después que han terminado los síntomas. En segundo lugar, se propone la tasa de casos acumulados por cada 100.000 hab. porque los pasos del plan de confinamiento dependen precisamente de este valor. Finalmente, hay que mencionar que la positividad diaria varía demasiado entre una ciudad y otra, incluso a lo largo del tiempo; por tanto, es la variable menos robusta para establecer una relación con la carga de ARN medida en las aguas residuales³².

Después de analizar los resultados se puede afirmar que, la detección de SARS-CoV-2 en las aguas residuales es una herramienta eficiente y rápida para ser utilizada como un sistema de alerta de brotes de COVID-19 y complementario a otros sistemas de vigilancia para implementar acciones en salud pública efectivas.

Uno de los principales problemas de este tipo de estudios es que las correlaciones o modelos obtenidos necesitan de una gran cantidad de datos para que tengan un valor estadístico aceptable. En el caso de los resultados presentados por el consorcio, uno de los problemas fue precisamente encontrar un período en que la medición fuese consistente en todas las ciudades donde se realizó el estudio. Esto redujo sustancialmente la cantidad de datos, de allí que sea necesario incorporar un mayor número de muestras para realizar análisis más complejos. Además, para que dichos análisis estadísticos de correlación y modelamiento predictor complejos sean exitosos, se requiere que se consideren y ajusten múltiples variables como por ejemplo: (i) se desconoce el número real de casos positivos dentro de las ciudades estudiadas, debido a la gran cantidad de portadores con sintomatología leves y asintomáticos que no se han incluido en las estadísticas epidemiológicas del MINSAL, ya que no acuden a hacerse alguna prueba confirmatoria; (ii) la duración de la excreción varía entre individuos y a lo largo del tiempo; y (iii) las variables ambientales (por ejemplo, eventos de lluvia, temperatura, entre otros), aumentan las incertidumbres vinculadas a la correlación entre la detección de ARN del SARS CoV-2 en muestras de aguas residuales y el número de casos activos de COVID-19 reportados²⁷. Esto podría estar entregando una posible explicación del porqué de todas las regiones medidas, la Región Metropolitana fue la que menos se ajustó la tendencia entre las variables

epidemiológicas y la concentración de SARS-CoV-2 en las aguas residuales. Uno de los motivos principales a que haya ocurrido esta respuesta es el elevado volumen recibido por las plantas de tratamiento; esto podría diluir la concentración de las partículas virales dificultando la detección real del virus siendo necesario un ajuste de concentración por caudal tal como lo sugerido en algunas publicaciones^{33,34}.

Con el apoyo de la SEREMI de Ciencias de la Macrozona Centro Sur, a comienzos de 2021 conformamos el Consorcio de Laboratorios Universitarios de Aguas Residuales donde participan la Universidad de Atacama, la Universidad de Valparaíso, la Pontificia Universidad Católica de Valparaíso, la Universidad Andrés Bello, la Universidad de Chile y la Universidad Católica de la Santísima Concepción. Uno de los principales desafíos que se debieron enfrentar para hacer una comparación de los resultados a nivel nacional, fue armonizar y validar los protocolos de trabajo. Para la concentración del virus desde las aguas residuales se validaron tres métodos: *precipitación* con polietilenglicol; *floculación* con leche descremada y *ultracentrifugación*. Otro punto importante fue establecer el tipo de curva patrón para realizar la cuantificación absoluta. Todos los laboratorios del consorcio trabajaban ya con plásmidos que contienen el gen específico que va a ser amplificado; por tanto, es la metodología que quedó validada para la implementación de esta técnica a nivel nacional. Finalmente, se estableció que el valor de carga viral sería reportado en base al gen N1; sin embargo, para que la muestra sea válida, al menos tiene que ser positiva para N1 y cualquiera de las otras dianas propuestas por la CDC³⁵ o la Unión Europea³⁶. Respecto al *kit* de amplificación por PCR se sugiere utilizar cualquiera de los autorizados por el MINSAL de Chile.

Conclusiones

La detección y cuantificación permanente de SARS-CoV-2 en aguas residuales permite medir la tendencia de personas infectadas con el virus (asintomáticos y sintomáticos) en un área geográfica determinada, sin la necesidad de llegar a realizar pruebas masivas de qRT-PCR o de antígeno en la población. El mayor valor epidemiológico de esta técnica se consiguió al ser comparada con la tasa acumulada de casos activos; asimismo, el consorcio pudo confirmar que la carga viral entregada por el valor de la diana N1 es el más robusto, tanto geográfica como temporalmente; por tanto, es el que se debe utilizar para entregar este valor.

Una de las grandes conclusiones obtenidas es que esta tecnología representa una alternativa mucho más económica, menos invasiva, anonimizada y nos permite conocer la tendencia de la circulación viral en el área

seleccionada. Por otra parte, también nos permite obtener información de zonas donde no llega el sistema de salud, universalizando así la información en zonas menos favorecidas. Esta herramienta, en conjunto con una vigilancia genómica, se constituye como una verdadera vigilancia centinela que nos permitirá conocer de forma anticipada las nuevas variantes que van circulando y el comportamiento que van teniendo. Todo esto nos lleva a concluir que la implementación de la vigilancia centinela de las aguas residuales es una necesidad país y no sólo para SARS-CoV-2, ya que muchos otros patógenos pueden ser monitoreados (influenza, poliovirus, enterovirus, virus respiratorios estacionales, vibrio cólera, bacterias resistentes a los antimicrobianos, etc). El consorcio universitario es sólo el primer paso, pero constituye la plataforma ideal para la implementación a nivel país.

Agradecimientos: Los siguientes proyectos financiaron a los miembros del consorcio:

Universidad de Atacama: Fondos de emergencia de la Agencia Nacional de Investigación y Desarrollo (ANID) para combatir la pandemia de COVID-19, proyecto ANID-

COVID0460 y fondos de la empresa Aguas Atacama.

Universidad de Valparaíso: Agencia Nacional de Investigación y Desarrollo (ANID), Proyectos de Investigación Conjunta en Biotecnología en COVID-19, ANID Chile – CONCYTEC Perú, COVBIO0003; Universidad de Valparaíso, DIUV-CIDI 4/2016.

Pontificia Universidad Católica de Valparaíso y Universidad Andrés Bello: Fondos de emergencia de la Agencia Nacional de Investigación y Desarrollo (ANID) para combatir la pandemia de COVID-19, proyecto ANID-COVID0460 y fondos de la empresa Aguas Andinas.

Universidad de Chile: Proyecto Fondecyt 1181656. Agencia Nacional de Investigación y Desarrollo (ANID).

Universidad Católica de la Santísima Concepción: Fondos de emergencia de la Intendencia del Biobío y del Gobierno Regional del Biobío, así como de la Ilustre Municipalidad de San Pedro de la Paz (Región del Biobío, Chile). Fondos internos de la Universidad Católica de la Santísima Concepción, a través de la Vicerrectoría de investigación y Postgrado y el fondo de mantenimiento DI-FME 04/2021. El apoyo y coordinación de la Secretaría Regional Ministerial de la Macrozona Centro Sur del Ministerio de Ciencia Tecnología Conocimiento e Innovación de Chile.

Referencias bibliográficas

- Dehning J, Zierenberg J, Spitzner F P, Wibral M, Neto J P, Wilczek M, Priesemann V. Inferring change points in the spread of COVID-19 reveals the effectiveness of interventions. *Science*. 2020; 369: eabb9789. doi: 10.1126/science.abb9789.
- Guo G, Ye L, Pan K, Chen Y, Xing D, Yan K, et al. New insights of emerging SARS-CoV-2: epidemiology, etiology, clinical features, clinical treatment, and prevention. *Front Cell Dev Biol* 2020; 8: 410. doi: 10.3389/fcell.2020.00410.
- Lau H, Khosrawipour V, Kocbach P, Mikolajczyk A, Schubert J, Bania J, et al. The positive impact of lockdown in Wuhan on containing the COVID-19 outbreak in China. *J Travel Med* 2020; 27: taaa037. doi: 10.1093/jtm/taaa037.
- Schuit E, Veldhuijzen I K, Venekamp R P, van den Bijllaardt W, Pas S D, Lodder E B, et al. Diagnostic accuracy of rapid antigen tests in asymptomatic and presymptomatic close contacts of individuals with confirmed SARS-CoV-2 infection: cross sectional study. *Br Med J* 2021; 374. doi: 10.1136/bmj.n1676.
- Arons M M, Hatfield K M, Reddy S C, Kimball A, James A, Jacobs J R, et al. Presymptomatic SARS-CoV-2 infections and transmission in a skilled nursing facility. *N Engl J Med* 2020; 382: 2081-90. doi: 10.1056/NEJMoa2008457.
- Oran D P, Topol E J. The proportion of SARS-CoV-2 infections that are asymptomatic : A systematic review. *Ann Intern Med* 2021; 174: 655-62. doi: 10.7326/M20-6976.
- Peña M, Ampuero M, Garcés C, Gaggero A, García P, Velasquez M S, et al. Performance of SARS-CoV-2 rapid antigen test compared with real-time RT-PCR in asymptomatic individuals. *Int J Infect Dis* 2021; 107: 201-4. doi: 10.1016/j.ijid.2021.04.087.
- Kitajima M, Ahmed W, Bibby K, Carducci A, Gerba C P, Hamilton K A, et al. SARS-CoV-2 in wastewater: State of the knowledge and research needs. *Sci Total Environ* 2020; 139076. doi: 10.1016/j.scitotenv.2020.139076.
- Bchetnia M, Girard C, Duchaine C, Laprise C. The outbreak of the novel severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2): A review of the current global status. *J Infect Public Health* 2020; 13: 1601-10. doi: 10.1016/j.jiph.2020.07.011.
- Santaella-Tenorio J. SARS-CoV-2 diagnostic testing alternatives for Latin America. *Colomb Med* 2020; 51. doi: 10.25100/cm.v51i2.4272.
- Manuel D, Amadei C A, Campbell J, Brault J-M, Zierler A, Veillard J. Strengthening public health surveillance through wastewater testing: an essential investment for the COVID-19 pandemic and future health threats. Washington DC: 2022. World Bank report. <https://www.worldbank.org/en/news/press-release/2022/01/24/pruebas-de-aguas-residuales-pueden-mejorar-respuesta-contracovid19-america-latina-y-caribe>.
- Reddy D. Responding to pandemic (H1N1) 2009 influenza: the role of oseltamivir. *J Antimicrob Chemother* 2010; 65: ii35-ii40. doi: 10.1093/jac/dkq014.
- Zuccato E, Chiabrando C, Castiglioni S, Calamari D, Bagnati R, Schiarea S, et al. Cocaine in surface waters: A new evidence-based tool to monitor community drug abuse. *Environ Health* 2005; 4: 1-7. doi: 10.1186/1476-069X-4-14.
- Choi P M, Tschärke B J, Donner E, O'Brien J W, Grant S C, Kaserzon S L, et al. Wastewater-based epidemiology biomarkers: Past, present and future. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 2018; 105: 453-69. doi: 10.1016/j.trac.2018.06.004.
- Hovi T, Shulman L M, van der Avoort H, Deshpande J, Roivainen M, de Gourville E M. Role of environmental poliovirus surveillance in global polio eradication and beyond. *Epidemiol Infect* 2012; 140: 1-13. doi: 10.1017/S095026881000316X.
- Koopman J S, Henry C J, Park J H, Eisenberg M C, Ionides E L, Eisenberg J N. Dynamics affecting the risk of silent circulation when oral polio vaccination is stopped. *Epidemics* 2017; 20: 21-36. doi: 10.1016/j.epidem.2017.02.013.
- Leung W K, To K, Chan P K S, Chan H L Y, Wu A K L, Lee N, et al. Enteric involvement of severe acute respiratory syndrome-associated

- coronavirus infection. *Gastroenterology* 2003; 125: 1011-7. doi: 10.1016/j.gastro.2003.08.001.
- 18.- Lee I-C, Huo T-I, Huang Y-H. Gastrointestinal and liver manifestations in patients with COVID-19. *J Chinese Med Assoc* 2020; 83: 521-3. doi: 10.1097/JCMA.0000000000000319.
- 19.- Mahlknecht J. Presence and persistence of SARS-CoV-2 in aquatic environments: A mini-review. *Curr Opin Environ Sci Health* 2022; 29: 100385. doi: 10.1016/j.coesh.2022.10038.
- 20.- Masachessi G, Castro G, Cachi A M, Marinzalda M de los Á, Liendo M, Pisano M B, et al. Wastewater based epidemiology as a silent sentinel of the trend of SARS-CoV-2 circulation in the community in central Argentina. *Water Res* 2022; 219: 118541. doi: 10.1016/j.watres.2022.118541.
- 21.- Melgaço F G, Corrêa A A, Ganime A C, Brandão M L L, Medeiros V de M, Rosas C de O, et al. Evaluation of skimmed milk flocculation method for virus recovery from tomatoes. *Braz J Microbiol* 2018; 49: 34-9. doi: 10.1016/j.bjm.2018.04.014.
- 22.- Guerrero-Latorre L, Ballesteros I, Villacrés-Granda I, Granda M G, Freire-Paspuel B, Ríos-Touma B. SARS-CoV-2 in river water: Implications in low sanitation countries. *Sci Total Environ* 2020; 743: 140832. doi: 10.1016/j.scitotenv.2020.140832.
- 23.- Calgua B, Mengewein A, Grunert A, Bofill-Mas S, Clemente-Casares P, Hundesa A, et al. Development and application of a one-step low cost procedure to concentrate viruses from seawater samples. *J Virol Methods* 2008; 153: 79-83. doi: 10.1016/j.jviromet.2008.08.003.
- 24.- Wu F, Zhang J, Xiao A, Gu X, Lee W L, Armas F, et al. SARS-CoV-2 titers in wastewater are higher than expected from clinically confirmed cases. *mSystems* 2020; 5: e00614-20. doi: 10.1128/mSystems.00614-20.
- 25.- Fumian T M, Leite J P G, Castello A A, Gaggero A, Caillou M S L de, Miagostovich M P. Detection of rotavirus A in sewage samples using multiplex qPCR and an evaluation of the ultracentrifugation and adsorption-elution methods for virus concentration. *J Virol Methods* 2010; 170: 42-6. doi: 10.1016/j.jviromet.2010.08.017.
- 26.- Rio D C, Ares M, Hannon G J, Nilsen T W. Purification of RNA using TRIzol (TRI Reagent). *Cold Spring Harb Protoc* 2010; 2010:pdb.prot5439. doi: 10.1101/pdb.prot5439.
- 27.- Randazzo W, Truchado P, Cuevas-Ferrando E, Simón P, Allende A, et al. SARS-CoV-2 RNA in wastewater anticipated COVID-19 occurrence in a low prevalence area. *Water Res* 2020; 181: 115942. doi: 10.1016/j.watres.2020.115942.
- 28.- Ai Y, Davis A, Jones D, Lemeshow S, Tu H, He F, et al. Wastewater SARS-CoV-2 monitoring as a community-level COVID-19 trend tracker and variants in Ohio, United States. *Sci Total Environ* 2021; 801: 149757. doi: 10.1016/j.scitotenv.2021.149757.
- 29.- Giraud-Billoud M, Cuervo P, Altamirano J C, Pizarro M, Aranibar J N, Catapano A, et al. Monitoring of SARS-CoV-2 RNA in wastewater as an epidemiological surveillance tool in Mendoza, Argentina. *Sci Total Environ* 2021; 796: 148887. doi: 10.1016/j.scitotenv.2021.148887.
- 30.- Scott L C, Aubee A, Babahaji L, Vigil K, Tims S, Aw T G. Targeted wastewater surveillance of SARS-CoV-2 on a university campus for COVID-19 outbreak detection and mitigation. *Environ Res* 2021; 200: 111374. doi: 10.1016/j.envres.2021.111374.
- 31.- Rosiles-González G, Carrillo-Jovel V H, Alzate-Gaviria L, Betancourt W Q, Gerba C P, Moreno-Valenzuela O A, et al. Environmental surveillance of SARS-CoV-2 RNA in wastewater and groundwater in Quintana Roo, Mexico. *Food Environ Virol* 2021; 13: 457-69. doi: 10.1007/s12560-021-09492-y.
- 32.- Tang B, Xia F, Tang S, Bragazzi NL, Li Q, Sun X, et al. The effectiveness of quarantine and isolation determine the trend of the COVID-19 epidemic in the final phase of the current outbreak in China. *Int J Infect Dis* 2020; 96: 636-47. doi.org/10.1016/j.ijid.2020.05.113.
- 33.- Medema G, Been F, Heijnen L, Petterson S. Implementation of environmental surveillance for SARS-CoV-2 virus to support public health decisions: Opportunities and challenges. *Curr Opin Environ Sci Health* 2020; 17: 49-71. doi.org/10.1016/j.coesh.2020.09.006.
- 34.- Medema G, Heijnen L, Elsinga G, Italiaander R, Brouwer A. 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. *Environ Sci Technol Lett* 2020; 7: 511-6. doi.org/10.1021/acs.estlett.0c00357.
- 35.- CDC 2019-novel coronavirus (2019-nCoV) Real-time RT-PCR diagnostic panel. For emergency use only. Instructions for use. <https://www.fda.gov/media/134922/download>
- 36.- Corman V M, Landt O, Kaiser M, Molenkamp R, Meijer A, Chu D K W, et al. Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR. *Eurosurv* 2020; 25: 2000045. doi: 10.2807/1560-7917.ES.2020.25.3.2000045.