

VIGILANCIA EPIDEMIOLÓGICA DE SARS-CoV-2 MEDIANTE EL ANÁLISIS DE AGUAS RESIDUALES

Néstor Gabriel Iglesias^{1,2,3}, Silvina Ambrosolio², Ignacio Aiello^{1,3}, Sandra Goñi¹, Juan Manuel Carballeda^{1,3} & Leopoldo Gebhard^{1,3}

¹Laboratorio de Virus Emergentes, Departamento de Ciencia y Tecnología, Universidad Nacional de Quilmes, Buenos Aires, Argentina.

²Organismo Provincial para el Desarrollo Sostenible de la provincia de Buenos Aires, Argentina.

³Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Argentina.

RESUMEN

Para la vigilancia epidemiológica de COVID-19 es fundamental contar con una prueba que permita determinar infecciones activas, es decir detectar la presencia del virus. La prueba que se utiliza es la PCR en tiempo real (RT-qPCR), ya que puede detectar el material genético del virus, pero realizar un testeo masivo y sostenido en el tiempo de individuos resulta extremadamente costoso. Una forma alternativa de realizar vigilancia epidemiológica masiva en la población es determinar la presencia del virus en el ambiente, en este caso en aguas residuales. Esta alternativa posibilita evaluar la presencia del virus a nivel poblacional de manera más económica. Se tomaron muestras de aguas cloacales compuestas (4 a 6hs) en algunos barrios populares de la provincia de Buenos Aires. Para la extracción de RNA se puso a punto un método de concentración del virus por centrifugación en presencia de PEG y cloruro de sodio, luego se purificó el ARN utilizando Trizol y columnas de sílica. La cuantificación del RNA de SARS-CoV-2 se realizó mediante RT-qPCR. Se analizaron más de 100 muestras tomadas en distintos barrios desde el mes de mayo hasta la actualidad. Se logró la detección de material genético del virus en este tipo de muestras con alta sensibilidad. La detección de material genético de SARS-CoV-2 en aguas residuales es una herramienta útil para la identificación temprana de brotes en barrios sin casos o con pocos casos de COVID19 y para evaluar la tendencia en la cantidad de casos a nivel poblacional en función del tiempo.

MUESTRAS

La toma de muestras se realizó en distintos barrios populares en colaboración con el Organismo Provincial de Integración Social y Urbana (OPISU), a partir de cámaras de inspección que correspondían a la población a analizar. La obtención se realizó con un muestreador automático que toma muestras durante un período de tiempo de entre 4 y 6 hs durante la mañana. Las mismas se almacenaron en envases de vidrio refrigeradas hasta su análisis. Las determinaciones se realizaron el mismo día de la toma de muestra. Una vez en el laboratorio las muestras se sometieron a 60°C durante 1h 30' con el fin de inactivar el virus SARS-CoV-2 que pueda estar presente en la muestra.

EXTRACCIÓN DE ARN

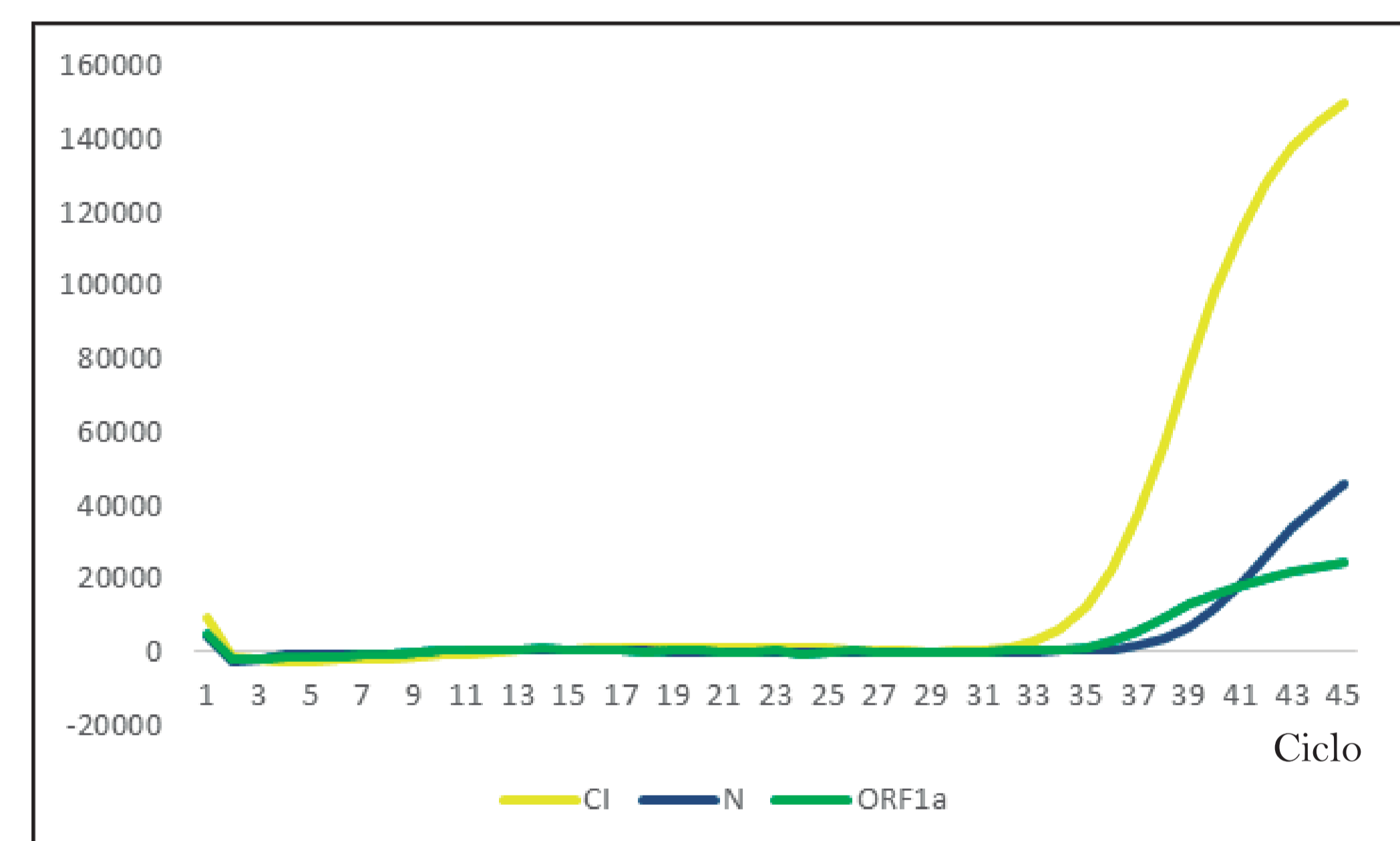
La extracción de ARN se realizó a partir de 250 ml de muestra de aguas residuales. Se concentró la muestra cruda en presencia de 20 g de PEG8000 y 4,5 g de NaCl mediante centrifugación a 12.000 g durante 1h a 4°C. Una vez concentrada se descartó el sobrenadante y el pellet se resuspendió en 1ml de Trizol (Invitrogen). Se realizó la extracción de ARN siguiendo el protocolo estándar, luego el pellet de ARN obtenido se limpió (clean-up) mediante la utilización de columnas de sílica (Qiagen). El ARN total se eluyó en 50 ul de agua libre de RNAsas.

DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN

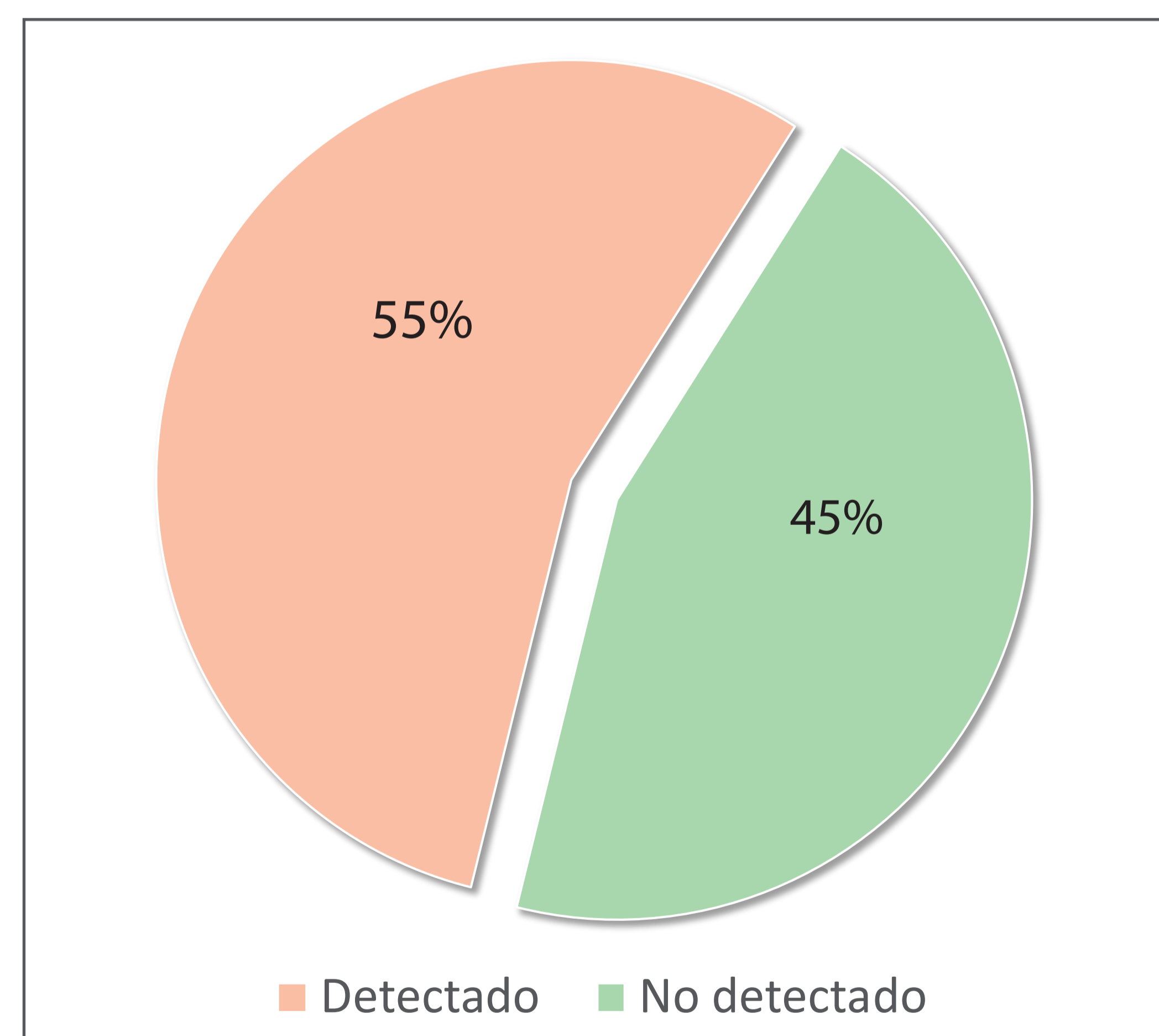
La detección del ARN se realizó por real-time utilizando el kit fapon (China) en un equipo de Applied Biosystems Q53 utilizando 5 ul de eluido. El kit fapon tiene como targets las regiones del genoma viral correspondientes al ORF1ab y N, además posee un control interno el cual detecta ARN humano (no se especifica el gen). Se utilizó la detección del virus PMMoV como indicador de contenido de material fecal cuantificado por real-time PCR.

RESULTADOS

Se analizaron 116 muestras de aguas residuales tomadas durante los meses de mayo a septiembre en más de 15 barrios de la provincia de Buenos Aires. En la siguiente figura se muestra a modo de ejemplo una curva de amplificación para una muestra positiva.



A continuación se muestra el porcentaje de muestras de aguas residuales analizadas hasta el momento en las cuales se detectó presencia de ARN de SARS-CoV-2.



En todas las muestras analizadas se detectó presencia de ARN correspondiente al virus PMMoV. Los resultados obtenidos fueron confirmados mediante la utilización de otro kit de real-time para la detección de ARN de SARS-CoV-2 (Promega).

CONCLUSIONES

Se logró poner a punto un método sensible para la detección de material genético de SARS-CoV-2 a partir de muestras de aguas residuales tomadas en barrios populares de la provincia de Buenos Aires. La metodología permitió purificar ARN de calidad a partir de estas muestras, ya que en todas se detectó presencia del virus PMMoV control. La detección de material genético de SARS-CoV-2 se está utilizando actualmente como herramienta adicional para la vigilancia epidemiológica en la provincia de Buenos Aires.