

ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD
ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD

**La Vigilancia de Salud Pública Ambiental de SARS-CoV-2
en aguas y lodos residuales**

REPORTE DE LA ENCUESTA DE LABORATORIOS LATINOAMERICANOS QUE
REALIZAN MONITOREO DEL SARS-CoV-2 EN MUESTRAS AMBIENTALES

Equipo Técnico Regional de Agua y Saneamiento (ETRAS)
Unidad de Cambio Climático y Determinantes Ambientales de la Salud - CDE/CE
Oficina de OPS/OMS en Perú

Pontificia Universidad Católica de Valparaíso
Valparaíso- Chile

Instituto Oswaldo Cruz – FIOCRUZ
Rio de Janeiro, RJ - Brasil

Companhia Ambiental do Estado de São Paulo – CETESB
São Paulo, SP – Brasil

Marzo 2021



El 4 de diciembre de 2020 se llevó a cabo una reunión técnica del grupo de apoyo de la OPS a la iniciativa sobre la Vigilancia de Salud Pública Ambiental de SARS-CoV-2 en aguas y lodos residuales, con el objetivo de construir la agenda de la segunda reunión de esta iniciativa. La reunión fue organizada por la Oficina Regional de Agua y Saneamiento (Dra. Patricia Rodezno Segurado), del Equipo Técnico Regional de Agua y Saneamiento (ETRAS), Taller OPS / OMS en Perú y contó con la participación representantes de la PAHO, FIOCRUZ, CETESB, Instituto Costarricense de Acueductos y Alcantarillados (AYA) y Pontificia Universidad Católica de Valparaíso PUCV).

Esta reunión discutió la importancia de realizar una encuesta con todos los laboratorios participantes de la iniciativa sobre la Vigilancia de Salud Pública Ambiental SARS-CoV-2 en aguas y lodos residuales, coordinada pela OPAS, para tener un primer diagnóstico de cómo están trabajando los laboratorios en el monitoreo del SARS-CoV-2 en aguas residuales, superficiales y otras matrices.

CETESB con el apoyo de PUCV y FIOCRUZ elaboró la encuesta, a cuál se estructuró en siete ejes centrales, con preguntas objetivas sobre el monitoreo ambiental del SARS-CoV-2 que están realizando las Instituciones, a saber:

1. Datos Generales;
2. Muestreo;
3. Concentración de Muestra;
4. Purificación de ARN;
5. Teste de RT-qPCR;
6. Control de Calidad Analítica, y
7. Modelado de datos.

El cuestionario fue desarrollado sobre la plataforma de Google Drive, una herramienta fácil de interactuar, y fue puesto a disposición de los participantes en el link: [https://docs.google.com/forms/d/e/1FAIpQLSdgPw_wNJJjsFQVM8Fierjd5oKvfpU-8lg3QhEPjPQL83E-LA/viewform?usp=sf link](https://docs.google.com/forms/d/e/1FAIpQLSdgPw_wNJJjsFQVM8Fierjd5oKvfpU-8lg3QhEPjPQL83E-LA/viewform?usp=sf_link). De las instituciones que fueron invitadas a participar en esta iniciativa, 10 respondieron la encuesta.

El presente informe recopila las respuestas de estos laboratorios al cuestionario y su discusión es de suma importancia para el intercambio de conocimientos, y un paso crucial para la discusión de protocolos básicos para la implementación y mejora de la vigilancia del SARS-CoV-2 en aguas y lodos residuales en la región, para producir resultados que sean comparables. Además, los resultados de esta investigación fortalecen la formación de una red de colaboración, como parte de la red de vigilancia en salud pública ambiental.

1. DATOS GENERALES

Instituciones Participantes de la Encuesta

Nombre de la Institución	Nombre del laboratorio	Dirección del laboratorio	Responsable del laboratorio
1. Instituto Oswaldo Cruz-Fundação Oswaldo Cruz-FIOCRUZ	Laboratório de Virologia Comparada y Ambiental	Avenida Brasil 4365 - Pavilhão Hélio & Peggy Pereira 2o. andar. CEP 21040-360, Manguinhos - Rio de Janeiro - RJ Brasil	Marize Pereira Miagostovich marizepm@ioc.fiocruz.br
2. Pontificia Universidad Católica de Valparaíso -PUCV	Grupo de Resistencia Antimicrobiana en Bacterias Patógenas y Ambientales	Avenida Universidad 330, Valparaíso, Chile	Jorge Olivares Pacheco jorge.olivares@pucv.cl
3. Facultad de Ciencias Químicas-Universidad Nacional de Asunción - UNA	Depto de Biotecnología.	Campus UNA, San Lorenzo, Paraguay	Pablo H. Sotelo phsotelo@qui.una.py
4. Companhia Ambiental do Estado de São Paulo -CETESB	División de Microbiología y Parasitología	Av. Prof. Frederico Hermann Jr, 345. Alto de Pinheiros. CEP: 05459-900, São Paulo, SP, Brazil.	Mikaela Renata Funada Barbosa elp_cetesb@sp.gov.br
5. Universidade Federal do Espírito Santo - UFES	Laboratório de Saneamento – LabSan, Depto Engenharia Ambiental	Av. Fernando Ferrari, 514 - Goiabeiras, CEP: 29075-910, Vitória, ES, Brasil	Regina Keller Kellygtr@gmail.com
6. Universidad de Barcelona - UB	Laboratorio de Virus Contaminantes de Agua y Alimentos	Diagonal 643, Facultad Biología, Barcelona, España	Rosina Girones/Sílvia Bofill sbofill@ub.edu
7. Instituto Costarricense de Acueductos y Alcantarillados - AYA	Laboratorio Nacional de Aguas	Tres Rios (La Union), Cartago, Costa Rica	Andrei Badilla-Aguilar abadilla@aya.go.cr
8. Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires - UBA	Instituto de Bacteriología y Virología Molecular	Junin 956, Buenos Aires, Argentina	Viviana Mbayed vmbayed@gmail.com
9. Universidad Nacional de Salta y CONICET - UNSa	Laboratorio de Aguas y Suelos	Av. Bolivia 5150, Salta, 4400, Argentina	Verónica Beatriz Rajal vbrajal@gmail.com
10. Universidad de la República -UdelaR	Laboratorio de Virología Molecular	Rivera 1350, Salto, Salto, Uruguay	Rodney Colina rodneycolina@gmail.com

1.1. Monitoreo de SARS-CoV-2 en muestra ambientales

Todos los 10 laboratorios que respondieron a la encuesta están trabajando en la investigación del SARS-CoV-2 en muestras de aguas residuales, agua dulce y superficies marinas.



1.2. Bioseguridad de laboratorio

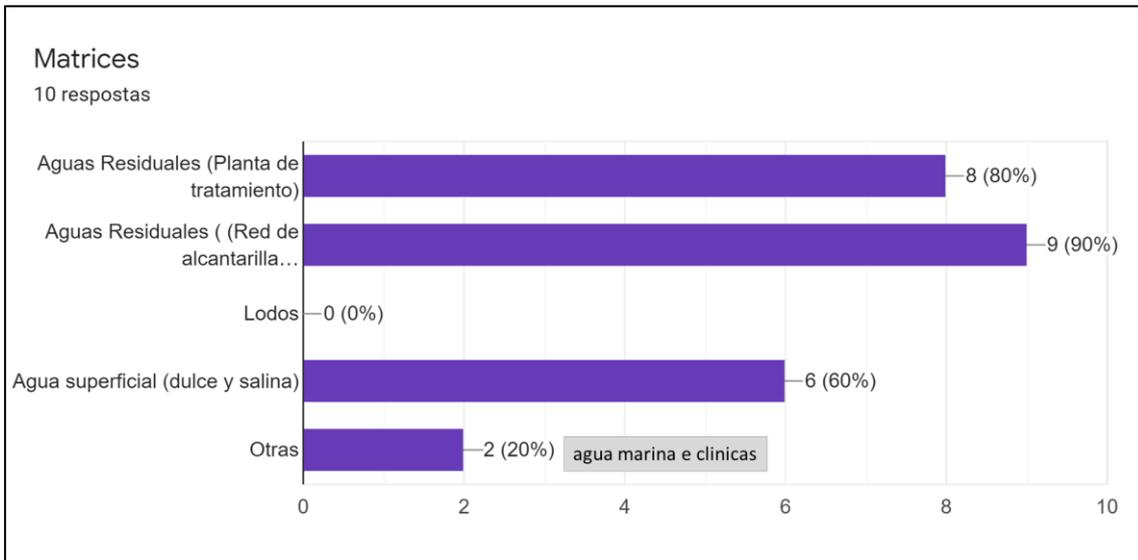
El nivel de bioseguridad instalado en los laboratorios es el nivel 2, adecuado para este trabajo, que involucra concentraciones de muestras ambientales y ensayos de biología molecular. Ningún laboratorio realiza cultivos celulares para pruebas de viabilidad, lo que requeriría un laboratorio de nivel 3.



2. MUESTREO

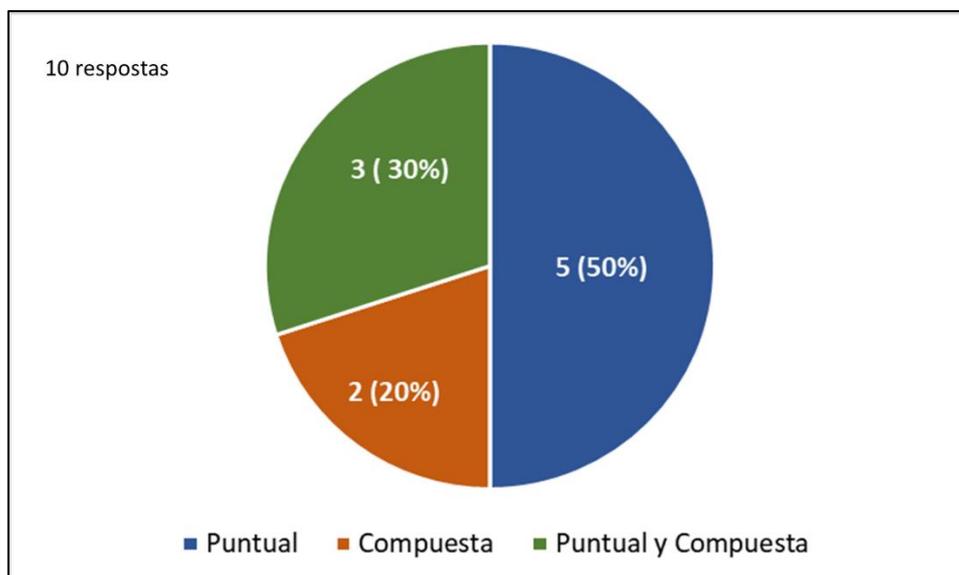
2.1. Matrices

Todos los laboratorios realizan monitorización de aguas residuales, la mayoría tanto en plantas de tratamiento o en la red de alcantarillado. Las excepciones son UNSa y UNA que no realizan muestreos en las PTAR y UFES que no recogen muestras en la red de alcantarillado. Varios laboratorios también están realizando análisis en aguas superficiales (dulce, salina, salobre). El Laboratorio de Virus Contaminantes de Agua y Alimentos de la UB también realiza análisis de material clínico.

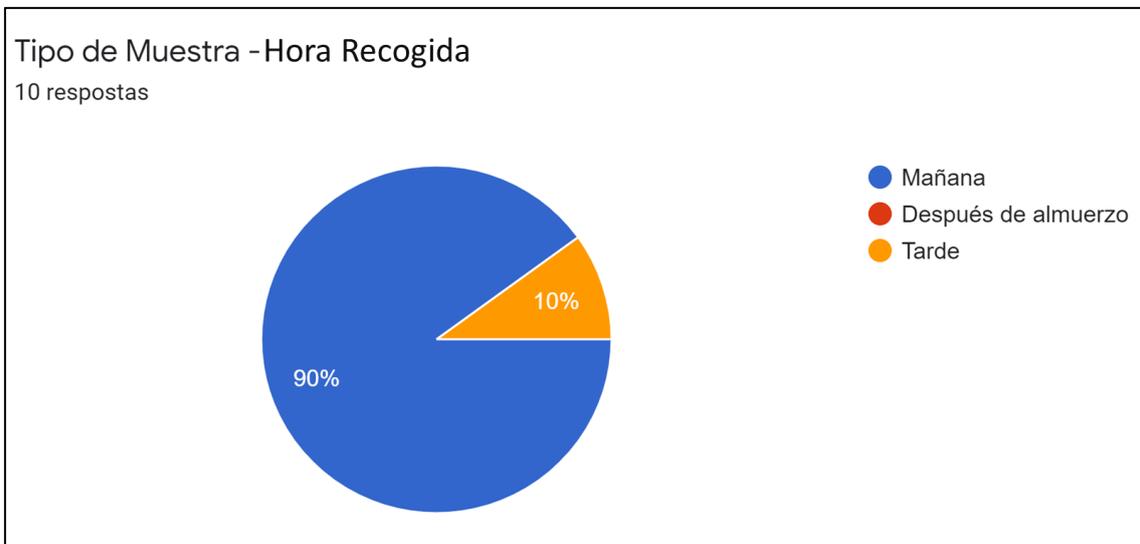


2.2. Tipo de Muestra

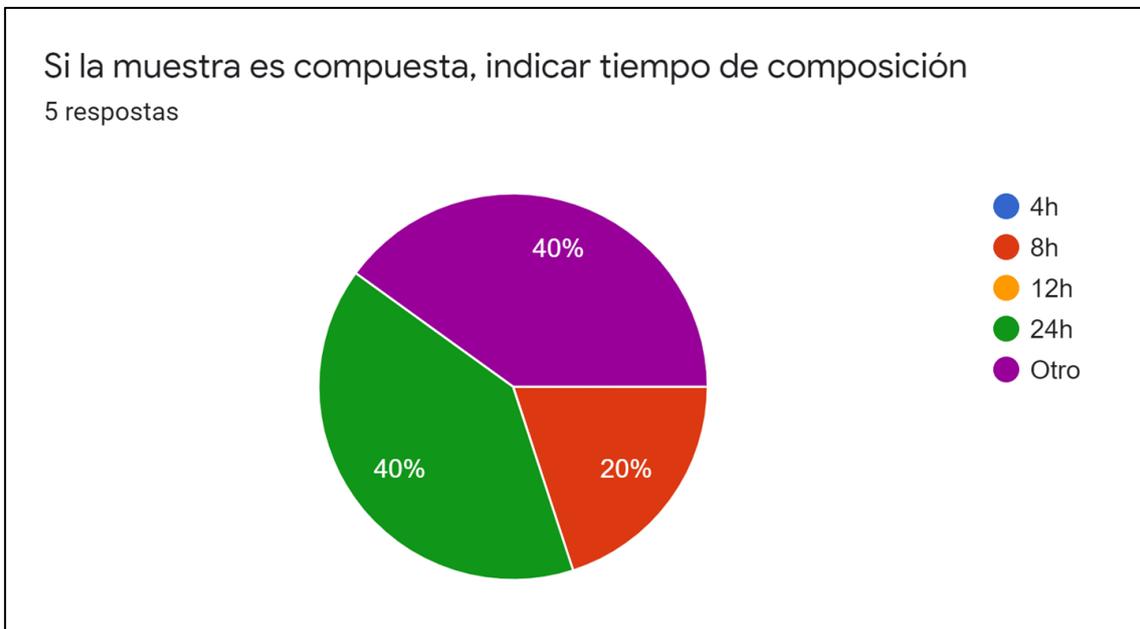
En cuanto al tipo de muestreo, puntual o compuesta, el 80% de los laboratorios realizan muestreos puntuales y, de estos 8 laboratorios, 3 también realizan muestras compuestas (FIOCRUZ, CETESB y AYA). Los laboratorios de la UNA y la UB solo recogen muestras compuestas.



Todos los laboratorios recogen muestras por la mañana, o finalizan la composición en ese período, excepto en el caso del laboratorio de la UNA que recoge sus muestras por la tarde, posiblemente por el hecho de que toman muestras compuestas por 8 horas.



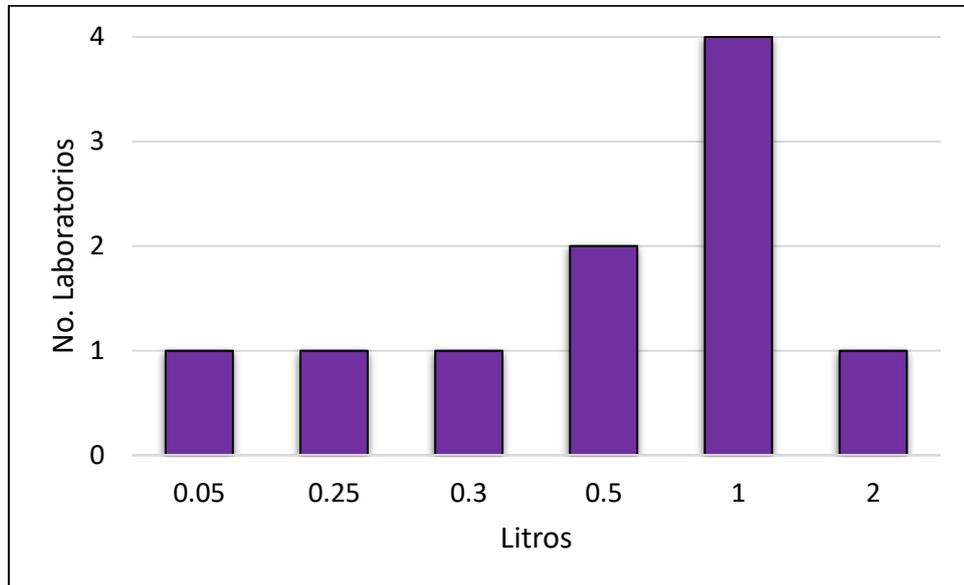
El período de composición de las muestras varía según el laboratorio. La UB y CETESB trabajan con muestras compuestas por 24 h; FIOCRUZ con una composición de 10 horas; UNA, 8 h y YAY, 2 h.



Otro: FIOCRUZ: 10h; AYA: 2h

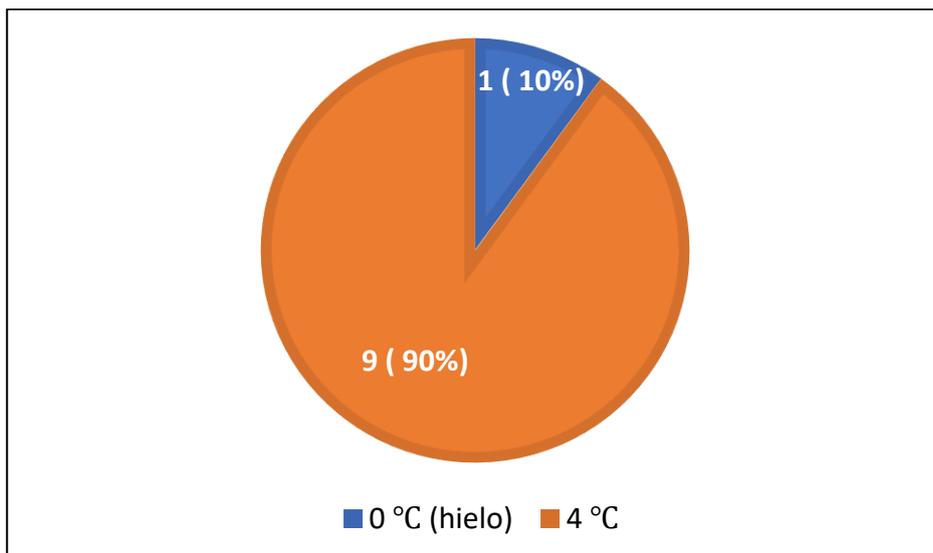
2.3. Volumen recolectado (L)

El volumen de muestra recolectado por los 10 laboratorios es bastante diverso y osciló entre 50 mL (0.05L) y 2L, siendo el volumen de 1 litro el más recurrente.



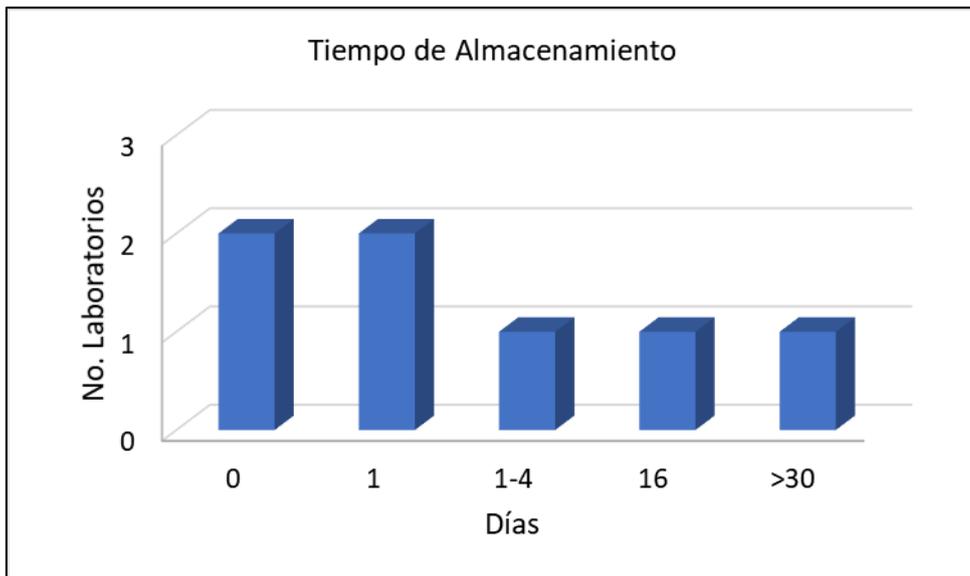
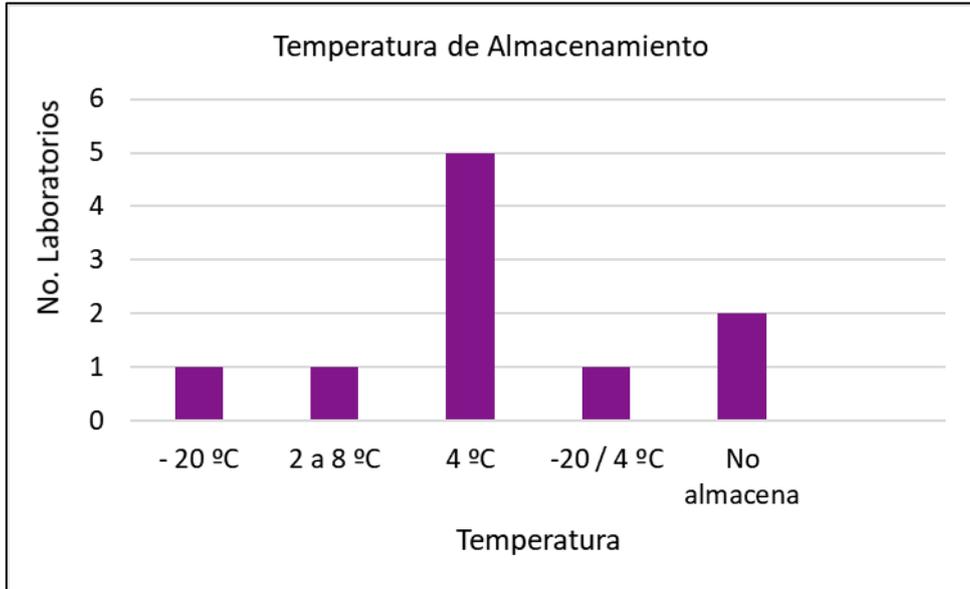
2.4. Temperatura de Transporte (°C)

La temperatura de transporte reportada por casi todos los laboratorios fue de 4°C, sin embargo, no está claro si realmente se monitorea esta temperatura en la muestra, ya que el transporte se realiza normalmente en cajas térmicas con hielo, lo que da una temperatura en torno a los 4°C para la muestra.



2.5. Temperatura (°C) y Días de Almacenamiento

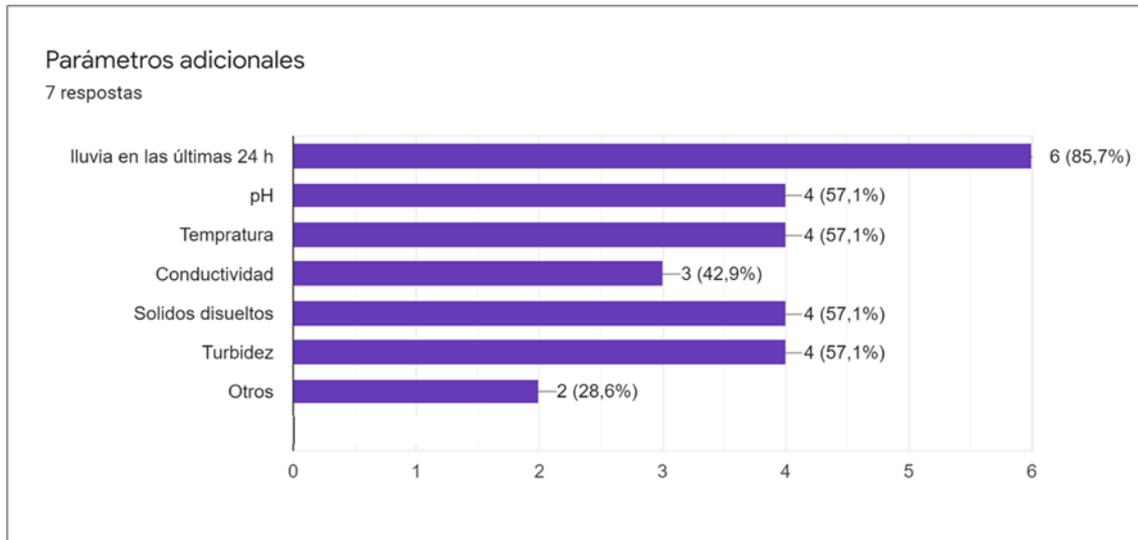
La temperatura de almacenamiento más común informada por los laboratorios es de 4 °C y la mayoría de los laboratorios almacenan muestras hasta por 4 días. De los 10 laboratorios que respondieron el cuestionario, 4 realizan los análisis el mismo día de la recolección, es decir, no almacenan las muestras. El laboratorio que reportó un período de almacenamiento superior a 30 días mantiene la muestra a 20 °C.



Obs. Uno de los laboratorios no registró el tiempo de almacenamiento de la muestra, razón por la que solo tenemos 7 respuestas

2.6. Parámetros adicionales

De los 10 laboratorios que respondieron a la encuesta, 3 no respondieron si se realizaron parámetros adicionales. La mayoría de los laboratorios evaluaron la ocurrencia de lluvia en las últimas 24 horas antes del momento del muestreo, un parámetro de campo importante para evaluar la dilución de las aguas residuales. Varios laboratorios también realizan mediciones de pH, temperatura de sólidos disueltos y turbidez.



Otros: UFES:DBO, oxígeno disuelto; UB: virus indicadores; unas: los parámetros adicionales solo se miden en aguas superficiales, ninguno en las residuales

3. CONCENTRACIÓN DE MUESTRA

3.1. Método de concentración y referencia

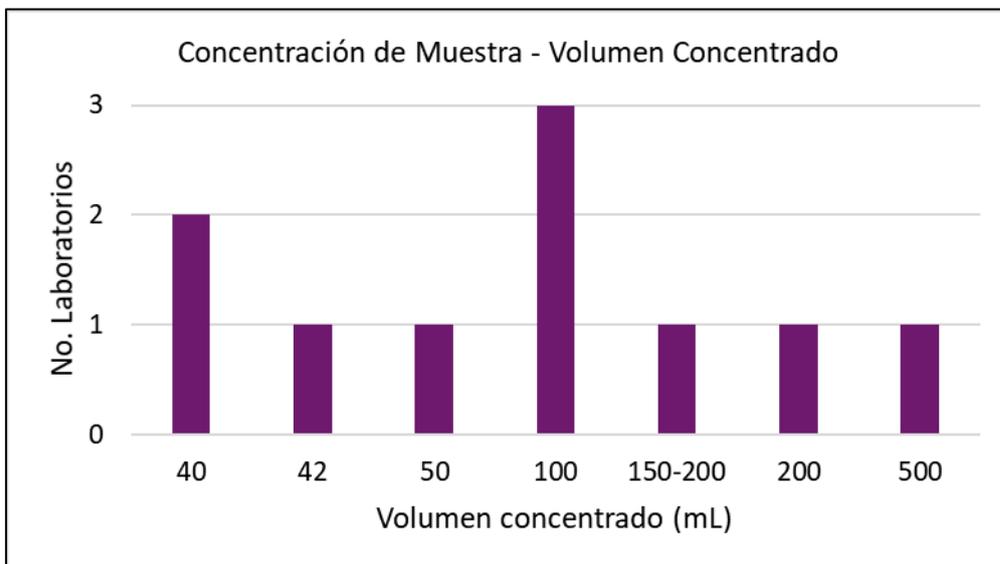
Los laboratorios emplean diferentes métodos, todos los cuales ya han sido reportados en la literatura, adaptados para la investigación del SARS-CoV-2. La mayoría de los laboratorios no proporcionaron la referencia de los métodos, sin embargo, podemos agruparlos en las metodologías de ultracentrifugación, ultrafiltración, adsorción y extracción en membrana filtrante, precipitación con PEG y floculación de la leche. Los métodos informados por los laboratorios se especifican a continuación.

- FIOCRUZ: **Ultracentrifugación** - Pina et al.,1998. Appl. Environ. Microbiol. 1998;64:4485–4488. doi: 10.1128/AEM.64.11.4485-4488.1998
- PUCV: **Floculación con leche descremada** (Sin referencia)
- UNA: **Precipitación con PEG** (Sin referencia)
- CETESB: **Ultracentrifugación** - Pina et al.,1998. Appl. Environ. Microbiol. 1998;64:4485–4488. doi: 10.1128/AEM.64.11.4485-4488.1998
- UFES: **Membrana filtrante** (Sin referencia)
- UB: **Ultrafiltración** centricon o innovaprep (Sin referencia)
- AYA: **Adsorción-extracción en membranas de nitrocelulosa** de 0.45 µm. Con adición de MgCl₂ - Ahmed et al., 2020.STOTEN, 139960.

- UBA: **PEG modificado** - Wu FQ et al. 2020. Sin filtrado previo
- UNSa: **Precipitación con PEG** (aguas residuales) y **Ultrafiltración** (aguas superficiales) (Sin referencia)
- UdelaR: **Floculación con leche** en polvo (Sin referencia).

3.2. Volumen Concentrado

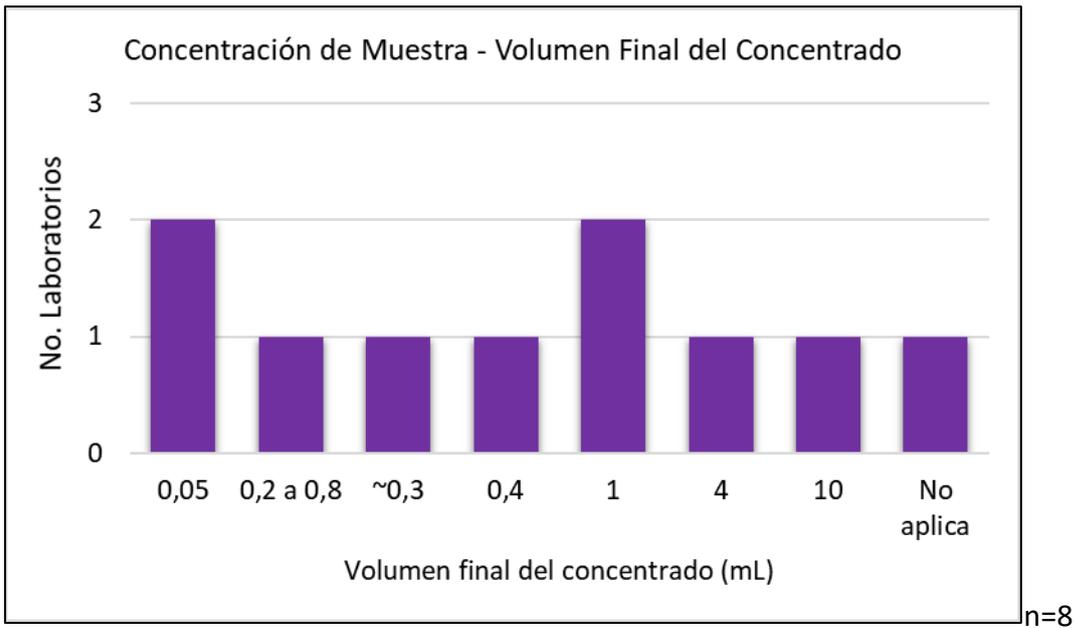
El volumen de muestra que se concentrará para el ensayo RTqPCR está directamente asociado con el método de concentración seleccionado. Los valores utilizados por los 110 laboratorios varían de 40 a 500 mL, siendo los volúmenes más bajos los utilizados en las técnicas de ultracentrifugación. Los volúmenes más utilizados rondan los 100-200 mL. La concentración de mayores volúmenes de muestra puede favorecer la detección del virus, sin embargo, también puede provocar una mayor interferencia en la reacción de RTqPCR por la presencia de inhibidores.



Obs. UNSa: aguas superficiales – 20 L.

3.3. Volumen Final del Concentrado

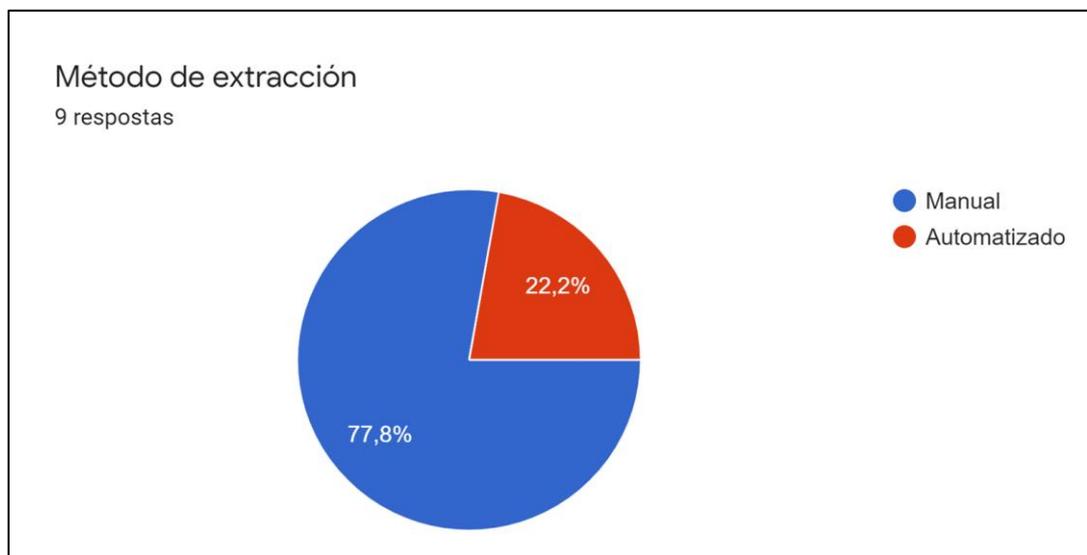
El volumen final del concentrado está directamente asociado con la técnica de concentración utilizada y el volumen concentrado. Así, se puede notar una amplia variación en los volúmenes finales de concentrados reportados por los laboratorios, que van desde 50 µl a 10 mL.



4. PURIFICACIÓN DE ARN

4.1. Método de Extracción

Las extracciones de ARN se realizan manualmente en la mayoría de los laboratorios, excepto en FIOCRUZ y UB. Uno de los laboratorios no informó su proceso de extracción.



n=9

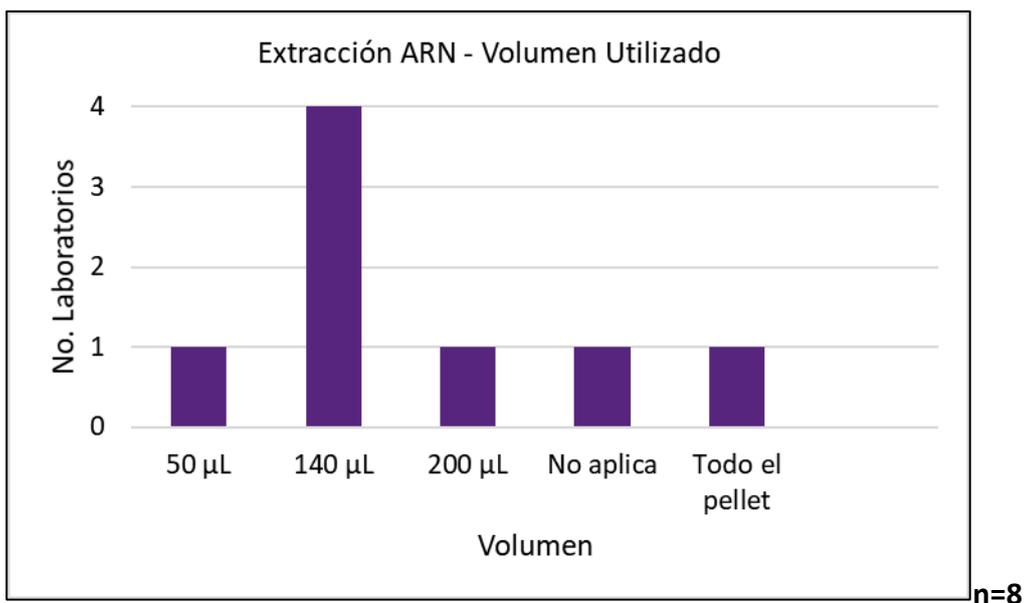
4.2. Método de extracción – Referencia

Los métodos utilizados en la rutina de los laboratorios se describen a continuación y son básicamente los Kit de QIAGEN y la extracción trizol+columna sílica

- FIOCRUZ: QIAamp® Viral RNA Mini kit (QIAGEN, CA, USA) - QIAcube® automated system (QIAGEN).
- PUCV: Trizol + columna
- UNA: Trizol + columna
- CETESB: QIAmp Viral Mini kit (QIAGEN)
- UB: Qiagen mini viral amb con QUIACUBE
- AYA: Extracción a partir de membrana de 0.45 µm. Symonds et al. 2017. Water Research, 111, 177-184. Extracción RNA: RNeasy Power Water (Qiagen) RT-PCR:
- UBA: Trizol + columna sílica
- UNAs: Viral Mini Spin (QIAGEN) - Puro Virus (Productos Bio-Logicos)
- UdelaR: Zymo Research

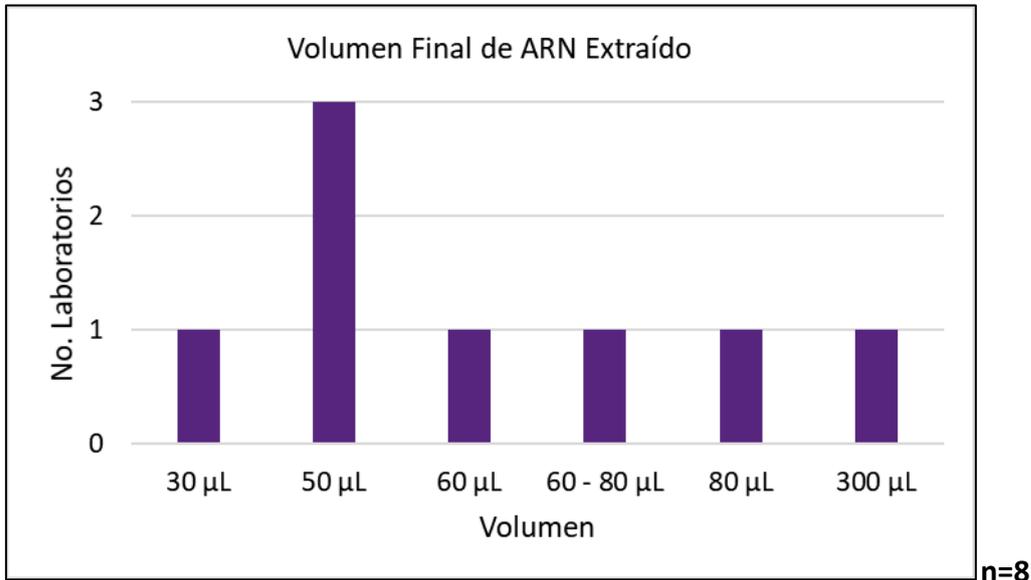
4.3. Volumen Utilizado

En cuanto al volumen de concentrado aplicado para la extracción de ARN, el volumen más utilizado es de 140 µL. Para el método de concentración de extracción y adsorción por membrana, esta pregunta no aplica, ya que la extracción se realiza a partir de la membrana de 0,45 µm. Uno de los laboratorios (PUCV) se equivocó al completar el formulario, insertando el método de extracción en este ítem en lugar del volumen de extracción, por lo que computamos solo 8 respuestas a esta pregunta.



4.4. Volumen final de ARN extraído

Los volúmenes de ARN extraído están asociados con el método de extracción empleado. La mayoría de los valores estaban en el rango de 50 a 80 uL. Solo 8 laboratorios reportaron esta información. (FIOCRUZ y UFES no).



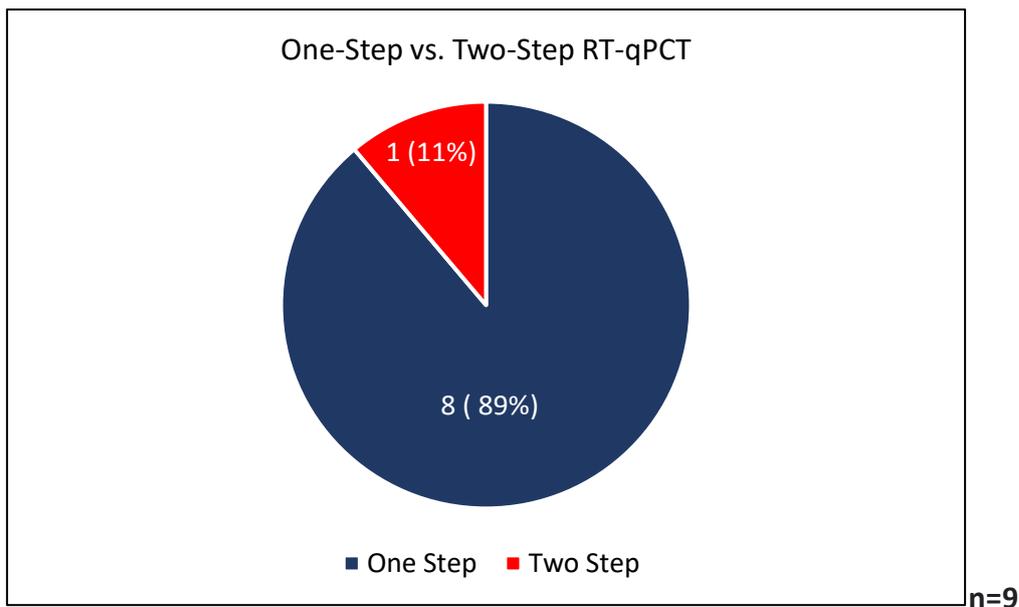
4.5. Tiempo de almacenamiento previo a la purificación

Solo 6 laboratorios respondieron a este ítem. La mayoría de los laboratorios someten los concentrados a extracción inmediatamente o en 1 día. Solo 1 laboratorio mencionó 2 días. Si la purificación de lo ARN no es posible de inmediato, los laboratorios almacenan la muestra concentrada a -80°C .

5. TEST RT qPCR

5.1. Método: One Step vs. Two Steps RTqPCR

El método que han utilizado los laboratorios para realizar RT-qPCR es el One-Step. Solo el laboratorio de AYA informó que utiliza el método de Two-Step.



5.2. Equipos utilizados

Todos los laboratorios realizan la reacción de amplificación en la PCR Real-Time. Ningún laboratorio utiliza instrumento convencional o sistema de PCR digital. Sigue las marcas de los instrumentos utilizados:

- Applied Biosystems - No especificaron el modelo: FIOCRUZ y UB
- Applied Biosystems – Stepone: UNA
- Applied Biosystems - StepOne Plus: CETESB, UBA y UNSa -
- Applied Biosystems - QuantStudio 3: PUCV
- Roche - LightCycler 480: AYA
- Qiagen – Rotor gene

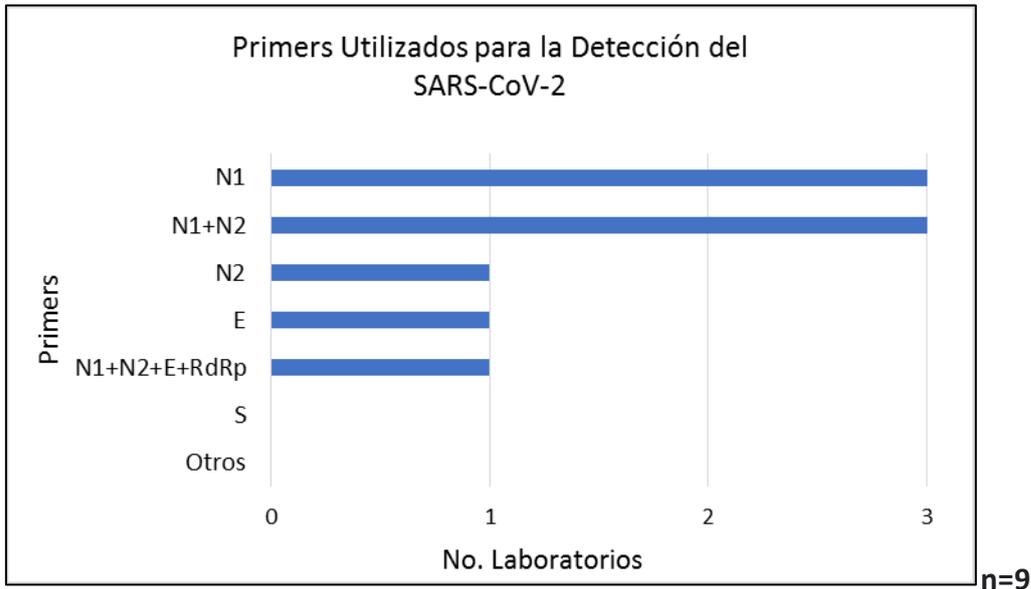
5.3. Nombre y Marca de los Kits

Los kits utilizados en las reacciones de PCR son bastante diversos, como se muestra a continuación, y posiblemente reflejen lo que los laboratorios ya han estado utilizando en la rutina del laboratorio de virología. Los laboratorios UNA y UdelaR no respondieron a este ítem.

- SuperScript™ III Platinum™ One-Step qRT-PCR Kit (Invitrogen) FIOCRUZ
- Taqman Fast Virus (Thermo Fisher): PUCV y UBA
- TaqPath 1-Step RT-qPCR Master Mix - ThermoFisher Scientific: CETESB
- Ultrasense ThermoFisher: UB
- SuperScript™ IV First-Strand Synthesis System (Invitrogen): AYA
- No se usan kits, se usan oligonucleotidos y master mix: UNSa

5.4. Primers

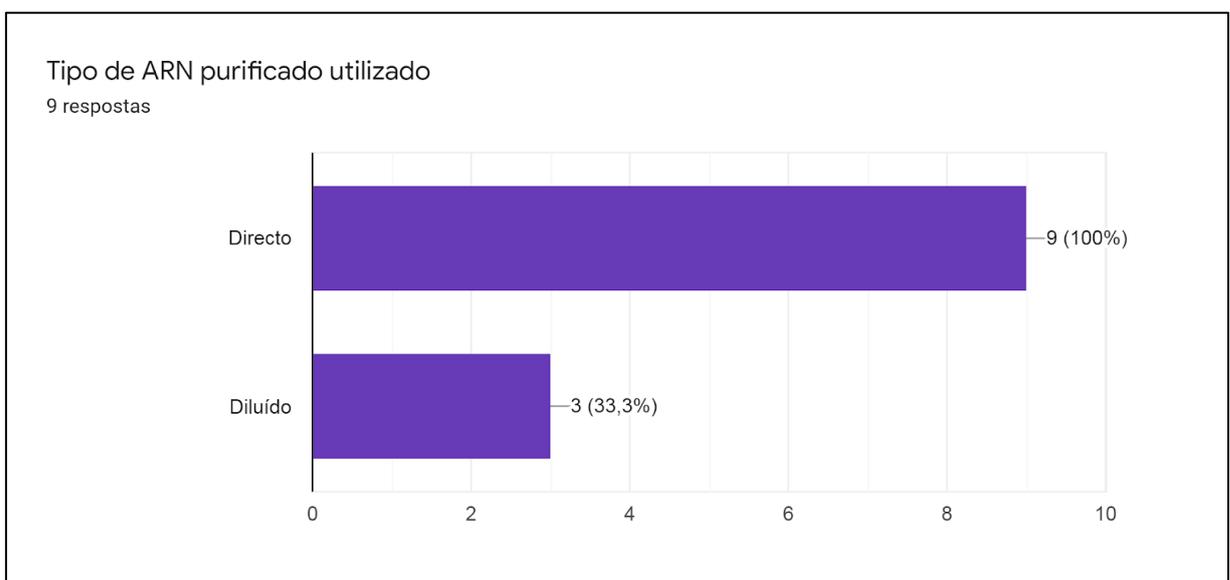
El primer más utilizado por los laboratorios ha sido el N1, seguido del N2. Cuatro de los laboratorios trabajan con más de un gen y solo el laboratorio de la UNA no ha utilizado el gen de la cápside (N) en la estrategia de detección del SARS-CoV-2, sino el gen de la envoltura (E).



Las marcas de los primers utilizados fueron informadas por solo 5 laboratorios, a saber, IDT (PUCV y CETESB), Invitrogen (AYA), Eurofins (UBA) y CDC (UB)

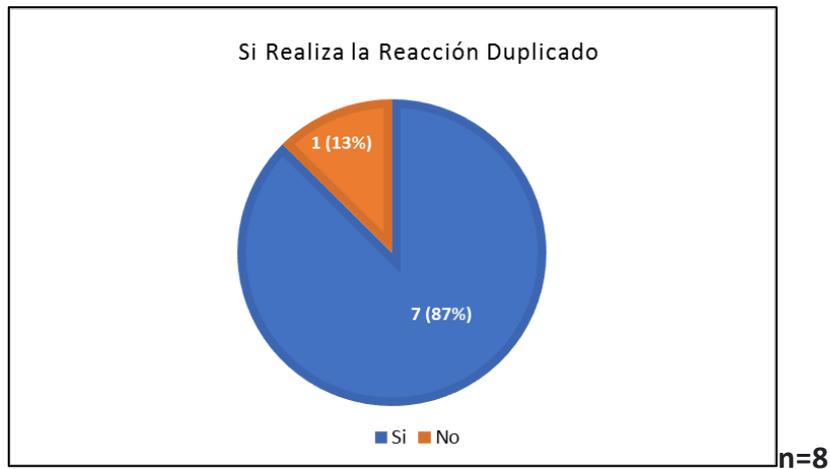
5.5. Tipo de ARN purificado utilizado

Los nueve laboratorios que respondieron a este ítem informan haber analizado lo extracto directo (puro), y tres de ellos también realizan la prueba con la muestra diluida 10 veces (1:10). Uno de los laboratorios también mencionó que, cuando se sospecha inhibición de la PCR, también diluye la muestra 1:10.



5.6. Indique si realiza duplicado/triplicado

La gran mayoría de laboratorios realiza las pruebas por duplicado; solo un laboratorio no lo hace. Dos laboratorios no respondieron a este ítem (UB y UFES).



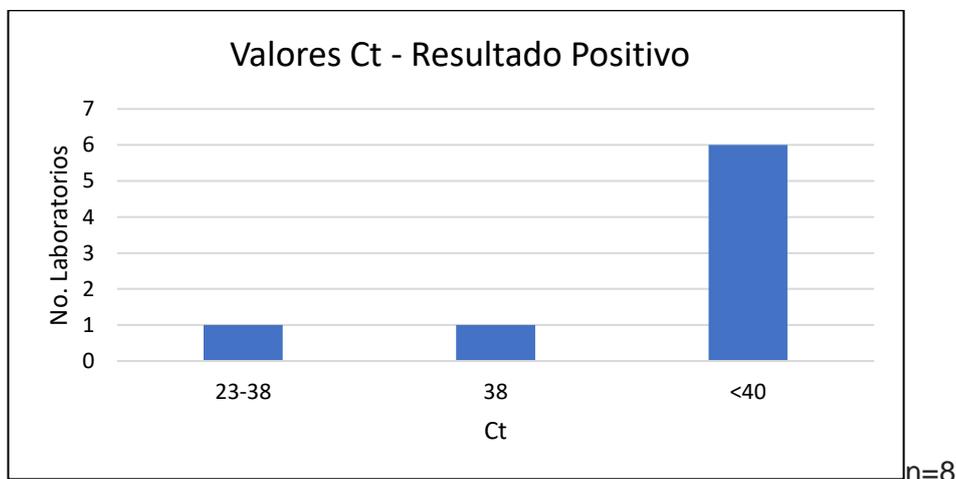
5.7. Tipo de curva estándar utilizada: Especificar (Plásmido/genoma viral/genoma viral inactivado)

Para el establecimiento de la curva estándar, los laboratorios informaron utilizar:

- Plásmido: PUCV; UNA; CETESB; UBA; UNAs y UdelaR
- Fragmento del gen gBlock - Integrated DNA Technologies (diluciones 10^5 - 10^1 GC por reacción de un fragmento de ADN de doble hebra): FIOCRUZ.
- Genoma viral sintético - Referencia JRC (UE): UB
- Gene ArtString (Thermo Fisher Scientific): AYA

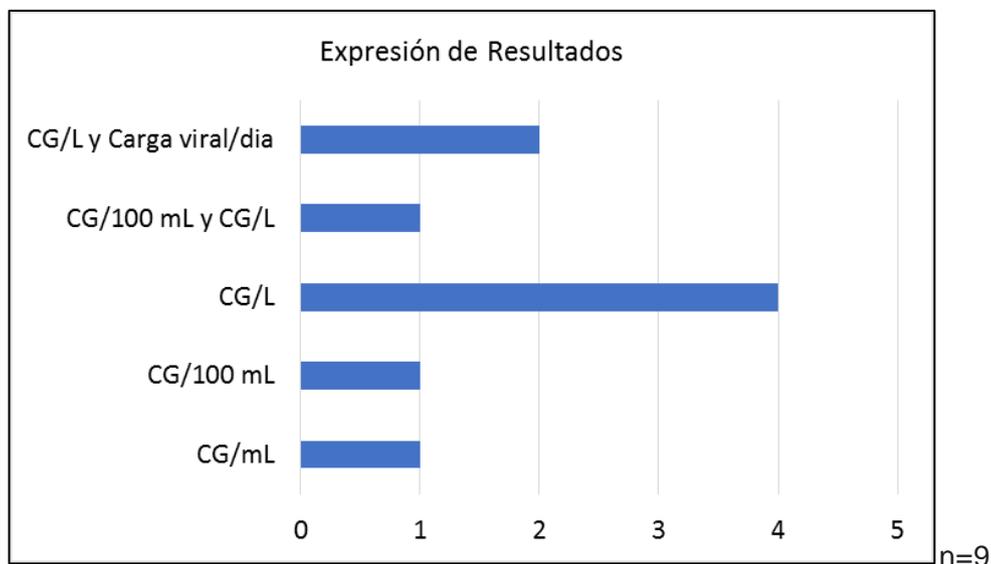
5.8. Resultado positivo

De los 8 laboratorios que respondieron a este ítem, 6 consideran positivas las muestras cuya amplificación resultó en un Ct <40 y 2 Ct \leq 38, con curva sigmoidea característica. Uno de los laboratorios no entendió la pregunta.



5.9. Expresión de resultados y límite de detección del método

Los laboratorios expresan sus resultados de manera diferente, siendo la más común copias genómicas (CG) por litro. CETESB y UB también reportan las concentraciones de SARS-CoV-2 como carga viral diaria, en este caso, es necesario tener las medidas de caudal en los puntos de recogida. Menos comunes son las expresiones CG / 100 mL y CG / mL.



En cuanto al límite de detección del método, solo 5 Laboratorios proporcionaron esta información, a saber:

- PUCV: 1 copia/L
- UBA: 10 CG en el pocillo de la qPCR = 0,5 CG/ml de muestra
- AYA: ALOD - 30 copias/reacción
- CETESB: 1000 copias/L
- UNAs: 40 copias

5.10. Pruebas de viabilidad

Solo los Laboratorios UPCV y CETESB informaron que están evaluando la viabilidad de las muestras, siendo los métodos empleados el de RNAsa P y cultivo celular en Vero E, respectivamente



5.11. Secuenciación de las muestras

De los 8 laboratorios que respondieron a este ítem, 4 (50%) secuencian las muestras, utilizando las técnicas que se enumeran a continuación:

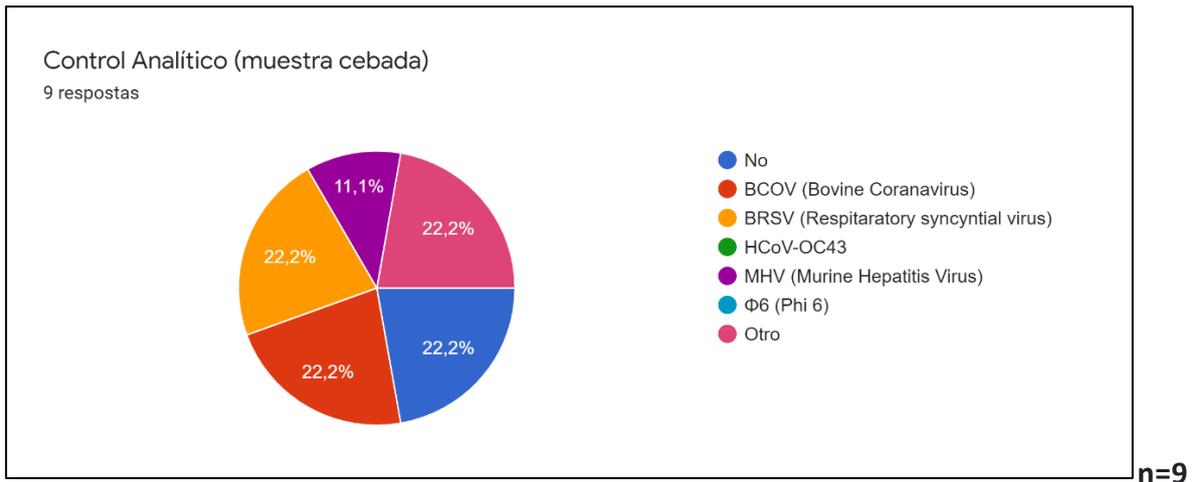
- Secuenciación NGS Illumina (Protocolo Resende et al. 2020. bioRxiv preprint doi:10.1101/2020.04.30.069039)
- Secuenciación NGS por nanoporos
- Metagenómica



6. CONTROL DE CALIDAD ANALÍTICA

6.1. Desempeño analítico de los métodos

Los laboratorios han utilizado varios virus para evaluar la recuperación total del método utilizado, a saber: BCOV (coronavirus bovino), BRSV (virus sincitial respiratorio, MHV (virus de la hepatitis murina), Coronavirus aviar atenuado (virus de la bronquitis infecciosa) y SARS-CoV -2 Inactivado. Dos laboratorios informaron que no están evaluando el desempeño del método con la muestra cebada.

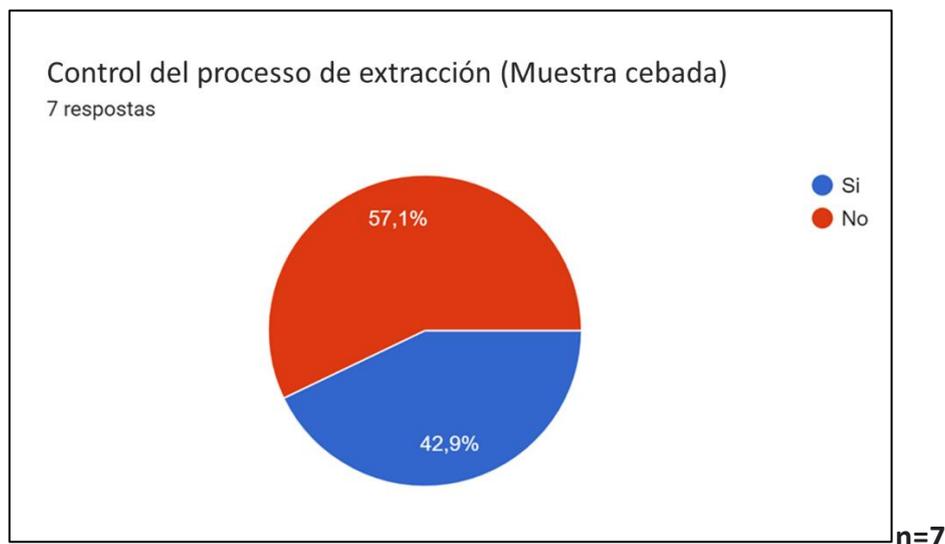


6.2. Control del proceso de extracción

Solo 3 laboratorios, de los 7 laboratorios que respondieron este ítem, informaron realizar control del desempeño del proceso de extracción, a saber:

- FIOCRUZ: Muestra positiva de Sars-CoV-2
- UNA: El virus atenuado se agrega a la muestra antes de purificar
- UB: MS2

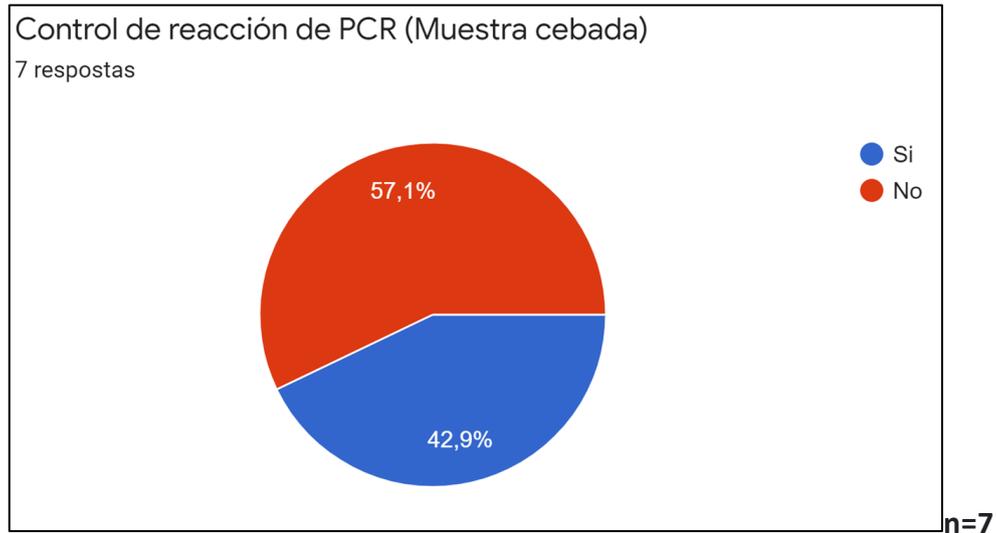
Tres laboratorios no respondieron a esta pregunta.



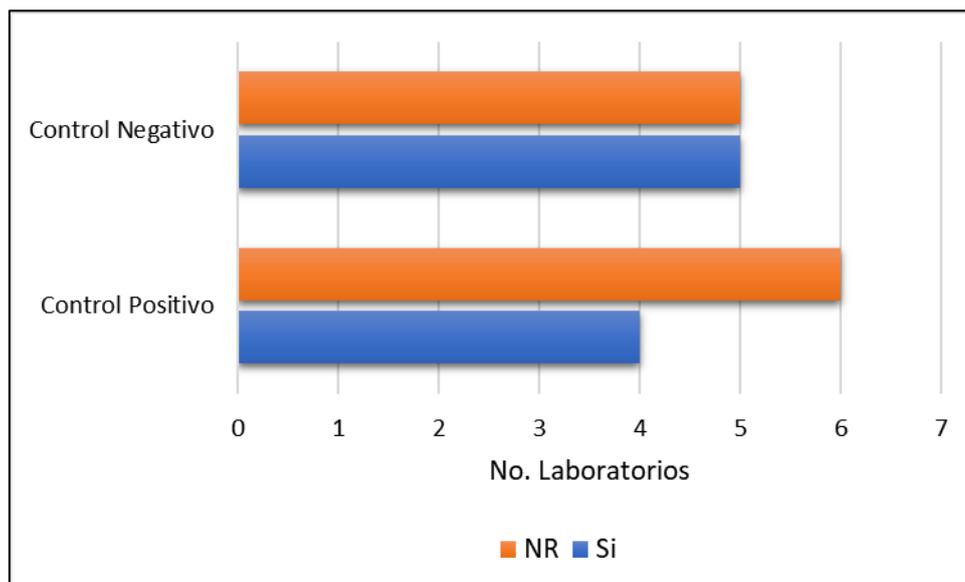
6.3. Control de reacción de PCR

Igualmente, que el proceso de extracción, solo tres laboratorios informaron realizar control de calidad específico para evaluar el desempeño de la reacción de PCR, a saber:

- FIOCRUZ: Curva estándar
- CETESB: VetMAX™ Xeno™ Internal Positive Control RNA - ThermoFisher
- MS2



En cuanto a los controles de calidad positivos y negativos, la tasa de respuesta para estos ítems fue baja. Los cuatro laboratorios que respondieron que realizan control positivo citaron el uso de genomas virales, muestras de pacientes y plásmidos. El control de calidad negativo usado pelos laboratorios é agua (5 repuestas).

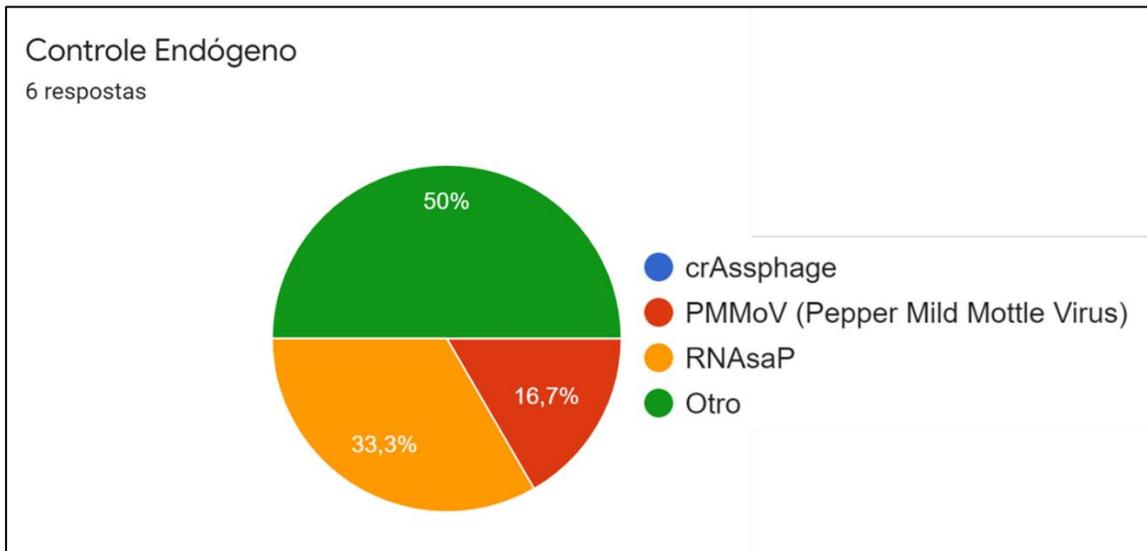


NR= No Responderán

6.4. Control Endógeno

Un total de 6 laboratorios reportaron realizar control endógeno, utilizando los siguientes indicadores:

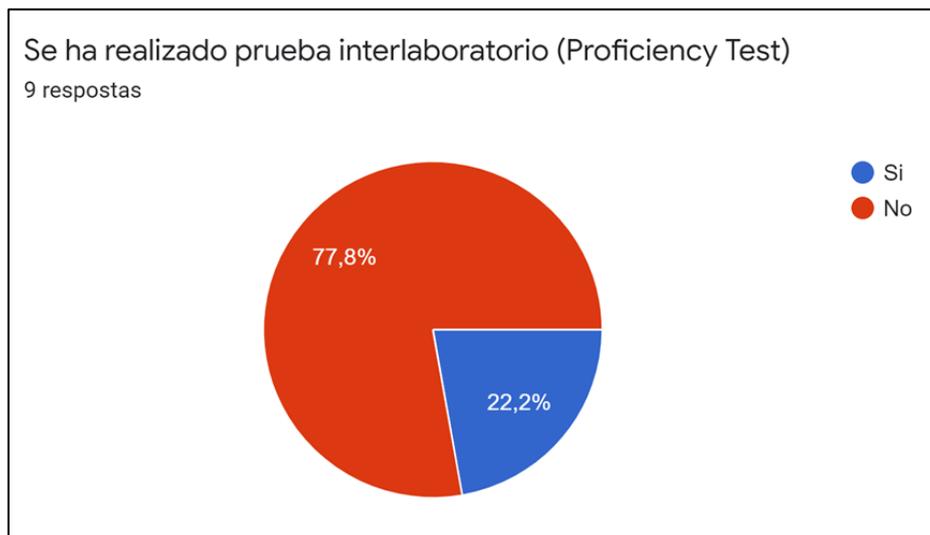
- UPCV y UdelaR: RNAasaP
- AYA: PMMoV
- UBA y UNSa: Polyomavírus
- FIOCRUZ: No informó



Otro=Polyomavirus (n=2); No informó

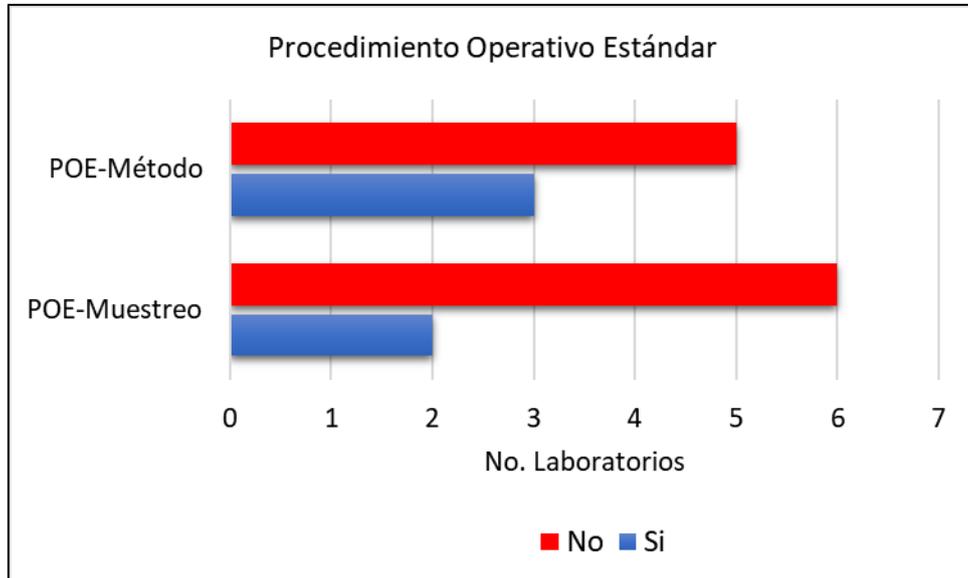
6.5. Prueba Interlaboratorio (Proficiency Test)

Los laboratorios de la UB y UNSa informaron participar en ensayos de aptitud, con resultados satisfactorios.



6.6. Procedimiento Operativo Estándar

La mayoría de los laboratorios aún no han desarrollado los procedimientos operativos estándar para el muestreo y el análisis.



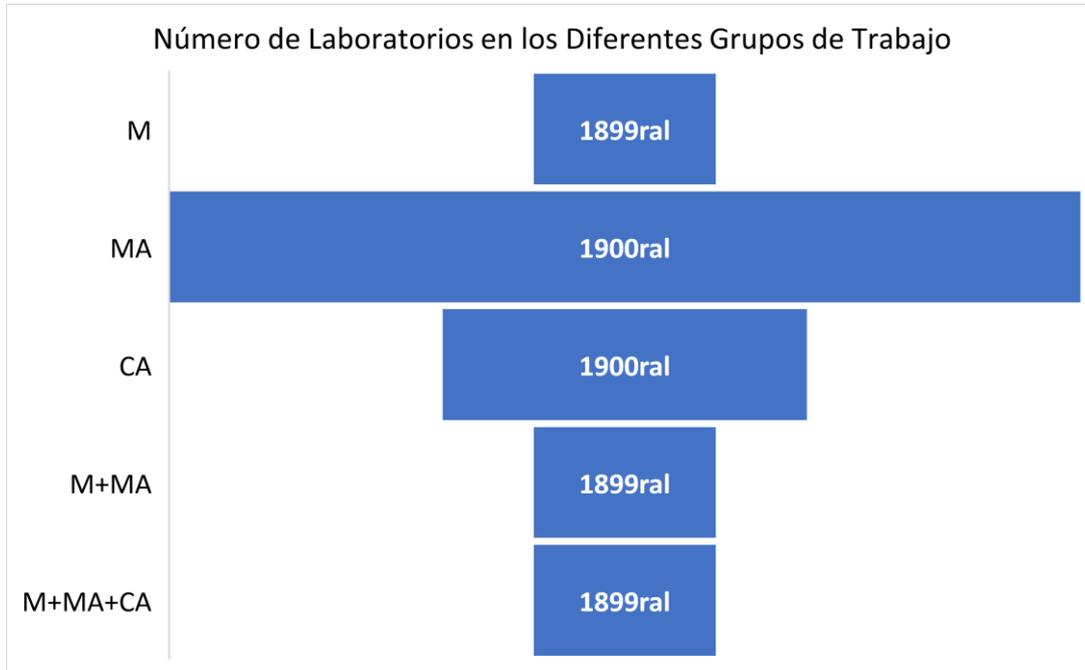
7. MODELADO DE DATOS

Es interesante notar que varios laboratorios (5/9) están realizando modelos de datos, lo que refuerza la necesidad de establecer protocolos analíticos estándar para la Región de América Latina con el fin de comparar los datos obtenidos en los diferentes laboratorios de la región.



8. GRUPO DE TRABAJO DONDE SE INSERTA EN EL "TALLER DE TRABAJO PARA LA VIGILANCIA DE SALUD PÚBLICA AMBIENTAL DE SARS-COV-2 EN AGUAS Y LODOS RESIDUALES "

El mayor número de laboratorios están interesados en el trabajo de metodología analítica, con solo tres laboratorios interesados en muestreo y tres em control de calidad analítica.



M=Muestreo; MA= Metodología Analítica; CA= Control y Calidad Analítica

9. CONCLUSIÓN

Esta investigación contó con la participación de 10 laboratorios de 7 países diferentes (Argentina, Brasil, Chile, Costa Rica, España, Paraguay y Uruguay), 6 de América Latina y uno de Europa.

La metodología adoptada por los laboratorios para el muestreo, la concentración de la muestra, la detección del SARS-CoV-2 y el control de calidad son bastante diversas, como se esperaba.

Esta información es de suma importancia y apunta a la necesidad de establecer criterios básicos y esenciales para poder utilizar la información de los monitoreos de aguas residuales realizados en diferentes países en bases de datos para realizar modelos que puedan sustentar los sistemas de vigilancia epidemiológica. SARS-CoV-2 en la población.

AGRADECIMENTOS

- Agradecemos a todos los laboratorios que dedicaron parte de su valioso tiempo en este difícil momento para completar este cuestionario.
- Agradezco al Químico Lisindo Roberto Coppoli, Asesor de la Dirección de Ingeniería y Calidad Ambiental, por configurar el cuestionario en Google Drive.