



Escola Tècnica Superior  
d'Enginyeria Agronòmica  
i del Medi Natural

## UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA



### Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica y del Medio Natural

Grado en Ciencia y Tecnología de los Alimentos

---

#### DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE SARS-CoV-2 Y SU POSIBLE CORRELACIÓN CON LA PRESENCIA DE CRASSPHAGE

---

#### Trabajo Final de Grado

Alumno: D. Daniel Lozano Yubero

Tutor académico: Prof. Dr. Pau Talens Oliag

Cotutoras: Dra. Gloria Sánchez Moragas/ Dra. Alba Pérez Cataluña

Valencia, julio de 2021

## Resumen

### **Detección y cuantificación de SARS-CoV-2 y normalización de los resultados con el indicador de contaminación fecal vírica crAssphage.**

El SARS-CoV-2 (del inglés severe acute respiratory síndrome coronavirus 2) es un virus respiratorio causante de la COVID-19. Como ya ocurre con otros virus respiratorios, el SARS-CoV-2 se excreta también en heces lo que nos permite poder detectarlo y cuantificarlo en las aguas residuales con técnicas de biología molecular como la RT-qPCR. Gracias a la detección del ARN de SARS-CoV-2 en aguas residuales podemos utilizar los resultados como una herramienta epidemiológica complementaria a las ya utilizadas a nivel clínico, pudiendo así adelantarnos a la situación que se va a dar en clínica y ejercer una mejor y rápida respuesta sanitaria, previa a la aparición de casos clínicos severos. Por otro lado, el bacteriófago crAssphage se encuentra de forma natural en el tracto gastrointestinal de los seres humanos y, por tanto, se excreta en las heces. Esta característica nos permite utilizarlo como indicador de contaminación fecal vírica en el agua. Se han realizado estudios (Wilder et al. 2021; Haramoto et al. 2018; Polo et al. 2020) los cuales demuestran que esta técnica de co-cuantificación con crAssphage en aguas residuales ayuda a estandarizar los resultados debido al factor de dilución que presentan las muestras de agua residual al mezclarse con agua pluviales.

El objetivo del trabajo se centró tanto en la detección y cuantificación de SARS-CoV-2 para observar su dinámica poblacional y su incidencia, como en normalizar los resultados obtenidos con el indicador de contaminación fecal vírica crAssphage en aguas residuales procedentes de colectores de la ciudad de Valencia. Para ello se utilizaron técnicas de biología molecular, como la RT-qPCR para SARS-CoV-2 y la qPCR para crAssphage, para la detección y cuantificación de ambos virus en muestras de colectores de la provincia de Valencia y un control de proceso (PEDV) para evaluar la eficiencia del proceso de concentración y extracción. Los resultados obtenidos se utilizaron para seguir la evolución de SARS-CoV-2 en la provincia de Valencia.

En este estudio se analizaron un total de 53 muestras, obtenidas de diferentes colectores de la provincia de Valencia entre el 15 de febrero y el 6 de abril de 2021. Del total de muestras obtenidas, 38 muestras (71,7%) fueron positivas para SARS-CoV-2 con una media de  $5,77 \pm 1,29 \log_{10}$  copias genómicas (CG)/L. Los porcentajes de recuperación de PEDV resultaron en un rango de 25-40% con una media de  $31,20\% \pm 20,11\%$ . Los resultados de la concentración del ARN del SARS-CoV-2 en los colectores se compararon con los casos clínicos diagnosticados como positivos en COVID-19 en la provincia de Valencia. Se observó que entre el ratio SARS-CoV-2:crAssphage y N1 no había diferencia a la hora de analizar los datos, por ello se debería hacer un estudio con una mayor cantidad de muestras y su posterior análisis estadístico para, de esta manera, demostrar si hay diferencias significativas.

Se ha evidenciado que los casos clínicos fueron descendiendo a lo largo de todo el muestreo tal y como indicaban previamente los resultados de la concentración de ARN de SARS-CoV-2 obtenidos en las muestras. Esta estrategia sería una herramienta muy interesante para aplicarla en efluentes de plantas depuradoras, que pueden utilizarse como agua de riego de cultivos para poder garantizar la seguridad microbiológica de frutas y hortalizas e inclusive

para confirmar que el agua de lavado de frutas y verduras es seguro, es decir, que está libre de contaminación fecal tanto bacteriana como vírica.

## Summary

Detection and quantification of SARS-CoV-2 and normalization of the results with the indicator of fecal viral contamination crAssphage.

SARS-CoV-2 (severe acute respiratory syndrome coronavirus 2) is a respiratory virus that causes COVID-19. As with other respiratory viruses, SARS-CoV-2 is also excreted in faeces, which allows us to detect and quantify it in wastewater with molecular biology techniques such as RT-qPCR. Due to the detection of SARS-CoV-2 RNA in wastewater, we can use the results as an epidemiological tool complementary to those already used at the clinical level, thus being able to anticipate the situation that will occur in the clinic and exercise a better and rapid health response, prior to the appearance of severe clinical cases. On the other hand, the bacteriophage crAssphage is found naturally in the gastrointestinal tract of humans and is therefore excreted in faeces. This characteristic allows us to use it as an indicator of viral fecal contamination in water. Studies have been carried out (Wilder et al. 2021; Haramoto et al. 2018; Polo et al. 2020) which show that this co-quantification technique with crAssphage in wastewater helps to standardize the results due to the dilution factor presented by the wastewater samples when mixed with rainwater.

The objective of the work focused both on the detection and quantification of SARS-CoV-2 to observe its population dynamics and its incidence, and on normalizing the results obtained with indicator of viral fecal contamination crAssphage in wastewater. For this, molecular biology techniques were used, such as RT-qPCR for SARS-CoV2 and qPCR for crAssphage, for the detection and quantification of both viruses in samples from collectors in the city of Valencia and a process control (PEDV) to monitor the efficiency of the concentration and extraction process. The results obtained were used to follow the evolution of SARS-CoV-2 in the city of Valencia.

In this study, a total of 53 samples were analyzed, obtained from different collectors in the city of Valencia between February 15 and April 6, 2021. Of the total samples obtained, 38 samples (71.7%) were positive for SARS-CoV-2 with a mean of  $5.77 \pm 1.29 \log_{10}$  genome copies (GC)/L. PEDV recovery percentages resulted in a range of 25-40% with an average of  $31.20\% \pm 20.11\%$ . The results of the concentration of SARS-CoV-2 RNA in the collectors were compared with the clinical cases diagnosed as positive for COVID-19 in the city of Valencia. It was observed that between the ratio SARS-CoV-2:crAssphage and N1 there was no difference when analyzing the data, so further studies should be done with a larger number of samples and its subsequent statistical analysis to, in this way, demonstrate if there are significant differences.

Overall, it has been shown that the clinical cases were decreasing throughout the entire sampling period as previously indicated by the results obtained in the samples. This strategy would be a very interesting tool to apply in effluents from treatment plants, which can be used as irrigation water for crops to guarantee the microbiological safety of fruits and vegetables

and even to confirm that the washing water for fruits and vegetables is safe that is, it is free from both bacterial and viral fecal contamination.

## **Palabras claves (español e inglés):**

SARS-CoV-2, seguridad alimentaria, agua residual, epidemiología, crAsphage, RT-qPCR

SARS-CoV-2, food safety, wastewater, epidemiology, crAsphage, RT-qPCR

## **Dedicatorias y agradecimientos**

El autor agradece a la empresa Gamaser por la cesión de las muestras de colectores de la provincia de Valencia y al Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos por autorizarle el acceso al uso de los equipos necesarios para la realización de este estudio en sus instalaciones.

También agradece tanto a sus cotutoras Gloria Sánchez Moragas y Alba Pérez Cataluña como su tutor Pau Talens Oliag por el acompañamiento y guía en este estudio, así como su ayuda y docencia para el desarrollo correcto de este trabajo.

Por último, agradece a la Universitat Politècnica de València por los conocimientos adquiridos y servicios prestados al alumno durante estos años en el Campus de Vera.

## Índice

1.	INTRODUCCIÓN.....	- 1 -
2.	OBJETIVOS .....	- 2 -
2.1.	DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE SARS-COV-2.....	- 2 -
2.2.	NORMALIZACIÓN DE DATOS CON CRASSPHAGE.....	- 2 -
2.3.	CORRELACIÓN DE LOS NIVELES DE SARS-CoV-2 EN AGUAS RESIDUALES CON DATOS CLÍNICOS.....	- 3 -
3.	MATERIALES Y MÉTODOS .....	- 3 -
3.1.	MUESTREO .....	- 3 -
3.2.	CONCENTRACIÓN .....	- 3 -
3.3.	EXTRACCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS .....	- 4 -
3.4.	DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN MEDIANTE RT-qPCR.....	- 4 -
3.5.	DATOS EPIDEMIOLÓGICOS.....	- 7 -
4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS .....	- 7 -
4.1.	RENDIMIENTO DEL PROCESADO DE LAS MUESTRAS.....	- 7 -
4.2.	DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE SARS-CoV-2 .....	- 8 -
4.3.	CORRELACIÓN DE LOS NIVELES DE SARS-CoV-2 EN AGUAS CON DATOS CLÍNICOS ..	- 9 -
5.	CONCLUSIONES.....	- 15 -
6.	BIBLIOGRAFÍA O REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	- 15 -
7.	ANEXOS.....	- 18 -

## 1. INTRODUCCIÓN

En diciembre de 2019 se produjo un aviso por parte de China a la Organización Mundial de la Salud (OMS) acerca un brote de una enfermedad respiratoria de causa desconocida detectado en la ciudad de Wuhan ([WHO, 2020a](#)). Las pruebas que se realizaron revelaron la presencia de una nueva especie de coronavirus (CoV), el cual se nombró oficialmente como SARS-CoV-2, ya que está relacionado, junto a otros coronavirus, con el síndrome respiratorio agudo severo (SARS por sus siglas en inglés) (Zhu et al. 2020; Gorbalenya et al. 2020; Kitajima et al. 2020).

La familia *Coronaviridae* es una familia de virus de ARN con envuelta lipídica y patógenos de vertebrados, responsables de los resfriados comunes y otras infecciones respiratorias en humanos (Chan et al. 2020). En las últimas dos décadas se han producido tres procesos zoonóticos relacionados con coronavirus: el Síndrome Respiratorio Agudo Severo (SARS), el Síndrome Respiratorio de Oriente Medio (MERS) (Chan et al. 2013; 2020) y, finalmente, el SARS-CoV-2. Como resultado de la aparición de SARS-CoV-2 y su rápida diseminación a nivel mundial, nos encontramos en una situación de pandemia, la cual está produciendo graves pérdidas humanas y económicas por la COVID-19 (del inglés, CoronaVirus Disease 2019). Hasta la fecha, más de 178 millones personas en todo el mundo han sido infectadas por SARS-CoV-2 y alrededor de 3.868.010 han fallecido a causa de las complicaciones producidas por el virus (<https://coronavirus.jhu.edu/map.html>, consultado el 21/06/2021). En la Comunitat Valenciana, el SARS-CoV-2 ha infectado a un total de 398.362 personas, causando la muerte a más de 7.400 (<http://coronavirus.san.gva.es/es/estadisticas>, consultado el 21/06/2021). La transmisión del virus se produce principalmente a través de aerosoles y secreciones respiratorias (Polo et al. 2020), pero también se ha descrito que el SARS-CoV-2 se replica a nivel del epitelio intestinal, excretándose en heces de donde se han aislado virus infecciosos (Xiao et al. 2020; Cheung et al. 2020). Por ello, la vía de transmisión fecal-oral del SARS-CoV-2, y por ende el posible papel del agua y los alimentos en su transmisión, todavía no es descartable. Las evidencias que tenemos hasta la fecha indican que esta vía de transmisión es muy poco probable, sin embargo, es necesario estudiar las dinámicas poblacionales del virus, así como su presencia en la línea de aguas (alcantarillado) y fangos, ya que estas aguas pueden utilizarse tras sus tratamientos para riego de cultivos, o verterse en ríos o mar lo que puede derivar en la presencia de patógenos virales en estas aguas.

El uso de aguas residuales como herramienta para control epidemiológico ha sido utilizado en salud pública, sobre todo para virus entéricos como son poliovirus, el virus de la hepatitis A, norovirus o el virus de la hepatitis E entre otros (Hellmér et al. 2014; Prevost et al. 2015; Santiso-Bellón et al. 2020; Cuevas-Ferrando et al. 2020; Miura et al. 2016). En la actualidad, esta aproximación ha sido implementada para el seguimiento del SARS-CoV-2 en las aguas residuales (Ahmed et al. 2020; La Rosa et al. 2020; Lodder and de Roda Husman 2020; Medema et al. 2020; Rimoldi et al. 2020; Wu et al. 2020; Wurtzer et al. 2020; Randazzo, Truchado, et al. 2020; Randazzo, Cuevas-Ferrando, et al. 2020). De este modo, se puede prever la tendencia de infectados por SARS-CoV-2, complementando a los servicios de salud pública y pudiendo así anticipar una respuesta ante incrementos del número de contagiados (Daughton 2020; Mallapaty 2020; Naddeo and Liu 2020). De este modo, es posible hacer una vigilancia epidemiológica mediante la toma de muestras de colectores paralelamente a pruebas diagnósticas como hisopados nasofaríngeos en un área geográfica concreta como puede ser un edificio o barrio para paliar así la propagación del SARS-CoV-2 en la zona (Davó et al. 2021). Esta misma vigilancia también puede hacerse en zonas más amplias realizando la toma de muestras directamente a la entrada de las Estaciones Depuradoras de Aguas Residuales (EDARs), pudiendo así saber las

tendencias en el aumento o disminución de casos relacionándolo con las concentraciones de material genético de SARS-CoV-2 halladas (Polo et al. 2020).

En el control microbiológico de aguas y alimentos, las bacterias han sido comúnmente utilizadas como indicadores de la contaminación fecal bacteriana en aguas. Debido a que los virus presentan una mayor resistencia ambiental, estos indicadores bacterianos no correlacionan con la presencia de virus, por lo que actualmente se están utilizando indicadores de contaminación fecal vírica como son los colifagos o más recientemente se ha propuesto el bacteriófago crAssphage, el cual es un virus que infecta a bacterias y se ha descrito que se encuentra en el intestino de animales y humanos (Dutilh et al. 2014; Shkoporov et al. 2018; Crank et al. 2020). Diversos estudios han demostrado la utilidad de crAssphage como indicador fecal vírico, ya que existe una relación con otros patógenos virales en las aguas, incluso en casos donde los indicadores fecales bacterianos estuvieran en niveles normales o bajos (Stachler et al. 2017; Hauri et al., 2005; Rose et al., 1987; Sinclair et al., 2009). Una de las problemáticas asociadas a la detección de virus en aguas residuales son las características intrínsecas de la muestra que, por factores meteorológicos, vertidos en colectores, etc. pueden diluir la muestra y por ende dificulta la comparación de resultados entre distintas EDARs o distintos colectores. Por ello, a nivel internacional se han propuesto distintos parámetros para normalizar los resultados, como es la carga de materia orgánica, los niveles de nitrato o el uso de algún marcador vírico, como el virus moteado del pimiento, PMMoV, o el crAssphage. Este último se ha establecido como factor normalizador por parte del CDC (<https://espanol.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/cases-updates/wastewater-surveillance/testing-methods.html>). La normalización con este virus puede ayudar a obtener una mejor estimación de los niveles de SARS-CoV-2 en aguas residuales y permitir una mejor estimación de los casos activos de COVID-19 en una determinada población o región (Green et al. 2020).

Por todo ello, el objeto de este trabajo fue la detección de SARS-CoV-2 y su cuantificación en aguas residuales de colectores de la provincia de Valencia, así como la normalización de los resultados obtenidos con el virus de indicador de contaminación fecal crAssphage.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE SARS-COV-2**

Detección y cuantificación del SARS-CoV-2 en muestras de aguas residuales obtenidas de colectores de diferentes puntos de la ciudad de Valencia.

### **2.2. NORMALIZACIÓN DE DATOS CON CRASSPHAGE**

Normalización de los datos de concentraciones de SARS-CoV-2 con el indicador el fago de ensamblaje cruzado (crAssphage), que se ha propuesto como indicador de contaminación vírica, con el fin de estandarizar los resultados de la cuantificación de SARS-CoV-2 con relación al factor de dilución presente en las muestras de agua residual.

## **2.3. CORRELACIÓN DE LOS NIVELES DE SARS-CoV-2 EN AGUAS RESIDUALES CON DATOS CLÍNICOS**

Comparación de los niveles de SARS-CoV-2 y ratio SARS-CoV-2:crAssphage con los casos clínicos diagnosticados en la provincia de Valencia con objeto de comprobar que es posible predecir la evolución de los casos clínicos estudiando los niveles de material genético del virus en aguas residuales.

## **3. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **3.1. MUESTREO**

La toma de muestra la realizó la empresa Gamaser. Para ello, se tomó 1L del agua residual proveniente de los colectores de la ciudad de Valencia en recipientes previamente enjuagados con el agua a muestrear y con los equipos de toma desinfectados. Durante el transporte de las muestras, éstas se mantuvieron a una temperatura de almacenamiento de  $5 \pm 3^{\circ}\text{C}$  para evitar la degradación del material genético del virus.

Se recibieron un total de 53 muestras de colectores de 6 zonas de la ciudad de Valencia, tomadas desde el 15 de febrero al 6 de abril del 2021. Éstas fueron concentradas según el protocolo de concentración de floculación con hidróxido de aluminio (Randazzo et al. 2020).

### **3.2. CONCENTRACIÓN**

La concentración de las muestras recibidas de los colectores de distintas zonas de la provincia de Valencia se realizó en una cabina de seguridad biológica de tipo II. Para ello, se tomaron 200 mL de cada envase utilizando probetas estériles, y se trasvasaron a botes de centrifuga estériles donde se inocularon con 100  $\mu\text{L}$  del virus de la diarrea porcina epidémica (PEDV) cepa CV777 proporcionada por el Friedrich-Loeffler-Institut (Greifswald, Alemania), a una concentración de  $10^5$  copias genómicas (CG)/L como control de proceso para así evaluar la eficiencia del proceso de concentración y extracción. A continuación, se ajustó el pH de las muestras a 6 utilizando disoluciones de HCl 1M, en función del grado de alcalinidad de las muestras. Para medir el pH se emplearon tiras de pH. Una vez ajustado el pH, se procedió a la adición de 2 mL de  $\text{AlCl}_3$  al 4% (p/V) para favorecer la formación de flóculos en las muestras. Acto seguido, se volvió a ajustar el pH a 6 con HCl 1M o NaOH 10 M. Después, se cerraron los botes y se incubaron en un agitador orbital durante 15 min a 150 rpm y a continuación, se introdujeron en la centrifuga a  $1.700 \times g$  durante 20 min. Una vez centrifugadas las muestras, se descartó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en 10 mL de extracto de carne al 3% y la mezcla se agitó durante 10 min a 200 rpm en el agitador orbital. Por último, las muestras se centrifugaron a  $1.900 \times g$  durante 30 min. Se descartó el sobrenadante y el pellet se resuspendió en 1 mL de PBS.



### 3.3. EXTRACCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

La extracción de los ácidos nucleicos se realizó utilizando un sistema semi automatizado con el kit Maxwell® RSC PureFood GMO and Authentication y el equipo Maxwell RSC (Promega). Para ello, se utilizaron 300 µL de muestra concentrada a la cual se le añadieron 400 µL de bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTAB) el cual se utilizó como solución tamponante para la extracción del ADN/ARN, y 40 µL de proteinasa K suministrada en el kit. Esta mezcla se incubó durante 10 min a 60°C y se centrifugó a 16.000 × g durante 10 min. El sobrenadante se añadió al cartucho de extracción del sistema Maxwell junto a 300 µL de tampón de lisis. Se añadieron también 100 µL del tampón de elución a los tubos de elución y se utilizó el programa de ejecución “Maxwell RSC Viral Total Nucleic Acid”. En paralelo se realizó la extracción de ácidos nucleicos del control de proceso utilizando una dilución 1/10 del PEDV en PBS. El material genético se conservó a -80°C para su posterior análisis.

### 3.4. DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN MEDIANTE RT-qPCR

El material genético de SARS-CoV-2 se detectó mediante RT-qPCR utilizando la diana N1, presente en el gen N el cual codifica para la nucleocápside del virus. Para ello se utilizaron cebadores y sondas previamente descritos (Tabla 1) (CDC, 2020). Para la detección de PEDV, virus control del proceso, se utilizaron los cebadores y sondas descritos por Zhou et al. (2017) para el gen M, que codifica para la membrana vírica (Tabla 1). También se detectó mediante qPCR la presencia del indicador fecal vírico crAssphage con los cebadores y las sondas descritos en la Tabla 1 (Stachler et al. 2017), los cuales detectan un fragmento comprendido entre los nucleótidos 14.731 y 14.856 del genoma de crAssphage.

Las muestras de RNA se ensayaron por duplicado y, además se analizó también por duplicado la dilución 1/10 de cada extracto de RNA para monitorizar la presencia de inhibidores de la PCR. Para cada reacción se utilizó un control negativo (C-), el cual consistió en agua libre de RNAasas, y un control positivo (C+), que fue el Twist control SARS-CoV-2 Wuhan-Hu-1 genome (Twist Bioscience HQ, USA) para SARS-CoV-2, ARN extraído de cultivo celular para PEDV y un fragmento de ADN correspondiente a la región de amplificación para crAssphage (Tabla 1).

Las cuantificaciones se realizaron mediante la preparación de curvas estándar a partir de diluciones seriadas de los materiales de referencia utilizados como control positivo (C+) para cada uno de los virus analizados, Twist control SARS-CoV-2 Wuhan-Hu-1 genome (Twist Bioscience HQ, USA), para SARS-CoV-2, ARN extraído a partir de cultivo celular de PEDV y un fragmento gBlock™ (IDT) de ADN que comprendía el fragmento de amplificación para crAssphage (Tabla 1). Cada uno de los puntos se analizó por triplicado. La curva de calibración para N1 ( $y = -4,0477x + 44,19$ ,  $R^2 = 0,9775$ ) mostró un límite de detección (LOD) de  $5,93 \cdot 10^4$  cg/L, para crAssphage ( $y = -3,7387x + 44,761$ ,  $R^2 = 0,9987$ ) se calculó un LOD de  $1,15 \cdot 10^5$  cg/L) y para el control de recuperación PEDV ( $y = -3,6861x + 36,423$ ,  $R^2 = 0,9679$ ) se obtuvo un LOD de  $6,76 \cdot 10^2$  cg/L.

Para el ARN de SARS-CoV-2 se utilizó el kit One Step PrimeScript™ RT-PCR (Perfect Real Time; Takara Bio Inc) y como mezcla de reacción se utilizó 5 µL de 2X One Step RT-PCR Buffer III, 0,2

μL de PrimeScript RT enzyme Mix II, 0,2 μL de TaKaRa Ex Taq HS, 0,4 μL de un colorante de referencia (ROX), 0,95 μL de agua libre de nucleasas, 0,75 μL por cada juego de primers y sondas incluidos en el kit 2019-nCoV RUO (Tabla 2) y 2,5 μL de extracto de ARN del concentrado de la muestra.

Para el ARN del control de proceso PEDV se utilizó el kit One Step PrimeScript™ RT-PCR y como mezcla de reacción se utilizó 5 μL de 2X One Step RT-PCR Buffer III, 0,2 μL de PrimeScript RT enzyme Mix II, 0,2 μL de TaKaRa Ex Taq HS, 0,2 μL de un colorante de referencia (ROX), 0,4 μL de agua libre de nucleasas, 0,5 μL por cada juego de primers y sondas incluidos en el kit 2019-nCoV RUO (Tabla 2) y 2,5 μL de extracto de ARN del concentrado de la muestra.

Para la detección y cuantificación de crAssphage se utilizó un kit diferente al de SARS-CoV-2 debido a que la detección era de ADN. Se usó el Kit Premix Ex Taq™ (Takara Bio Inc) donde siguiendo las instrucciones del fabricante, la cual se modificó aumentando la cantidad de ROX como optimización de la qPCR: 10 μL de Premix, 0,4 μL de Forward primer (056F1), 0,4 μL de Reverse primer (056R1), 0,2 μL de Sonda (056P1), 6,1 μL de agua libre de nucleasas, 0,4 μL de un colorante de referencia (ROX) y 2,5 μL de extracto de ADN del concentrado de la muestra para la detección y cuantificación de crAssphage (Tabla 2).

Las reacciones de qPCR se llevaron a cabo utilizando el sistema StepOne Plus de Applied Biosystems con los programas de RT-qPCR y qPCR incluidos en la Tabla 3.

La normalización de los valores de las concentraciones del ARN de SARS-CoV-2 se realizó mediante el cálculo del ratio SARS-CoV-2:crAssphage a partir de la ecuación 1.

$$ratio = \frac{\log_{10}(CG \text{ N1/L})}{\log_{10}(CG \text{ crAssphage/L})} \quad (\text{Ecuación 1})$$

Se consideraron positivas todas las muestras las cuales obtenían un resultados en Ct (del inglés, cycle threshold) inferior a 40 (Medema et al. 2020; Wu et al. 2020) y aquellas que, según el protocolo SARS-CoV-2 de VIARAL (Randazzo, Truchado, Allende y Sánchez 2020), una diana (N1) haya sido positiva.

**Tabla 1.** Secuencias de cebadores y sondas

<b>Diana</b>	<b>Tipo</b>	<b>Cebador/Sonda</b>	<b>Secuencia</b>	<b>Referencia</b>
<b>CrAssphage (CPQ56)</b>	qPCR	056F1	CAGAAGTACAAACTCCTAAAAACGTAGAG	(Stachler et al. 2017)
		056R1	GATGACCAATAACAAGCCATTAGC	
		056P1	[FAM]AATAACGATTTACGTGATGTAAC[MGB]	
<b>N1 (SARS-CoV-2)</b>	RT-qPCR	2019-nCoV_N1-F	GACCCAAAATCAGCGAAAT	(CDC, 2019)
		2019-nCoV_N1-R	TCTGGTTACTGCCAGTTGAATCTG	
		2019-nCoV_N1-P	[FAM]ACCCCGCATTACGTTTGGTGGACC[BHQ1]	
<b>PEDV (gen M)</b>	RT-qPCR	PEDV_forward	CAGGACACATTCTTGGTGGTCTT	(Zhou et al.)
		PEDV_reverse	CAAGCAATGTACCACTAAGGAGTGTT	
		PEDV_probe	FAM-ACGCGCTTCTCACTAC-MGB	

**Tabla 2.** Composición de las reacciones de RT-qPCR en el equipo StepOne Plus para una sola muestra

(μL)	SARS-CoV-2	Control de proceso	CrAssphage
	N1	PEDV	
Premix	-	-	10
2x One Step	5	5	-
Takara Ex Taq	0,2	0,2	-
Prime Script Enzyme	0,2	0,2	-
Forward primer [10 μM]			0,4
Reverse primer [10 μM]	0,75	0,5	0,4
Sonda [10 μM]			0,2
ROX [50 nM]	0,2	0,2	0,4
H <sub>2</sub> O	1,15	0,4	6,1
RNA/DNA	2,5	2,5	2,5

**Tabla 3.** Programas de RT-qPCR y qPCR utilizados para las distintas dianas moleculares

Paso	SARS-CoV-2			CrAssphage			PEDV		
	Tª (°C)	Tiempo	Ciclos	Tª (°C)	Tiempo	Ciclos	Tª (°C)	Tiempo	Ciclos
<b>Retrotranscripción</b>	50	10 min	1x	-	-	-	45	15 min	1x
<b>Desnaturalización</b>	95	3 min	1x	95	10 min	1x	95	2 min	1x
<b>PCR</b>	95	3 s	45x	95	15 s	45x	95	15 s	45x
	55	30 s		60	1 min		60	1 min	

### 3.5. DATOS EPIDEMIOLÓGICOS

Los datos epidemiológicos sobre los casos clínicos diarios diagnosticados (PCR positivas y test de antígenos positivos) en SARS-CoV-2 que se dieron entre el 15 de febrero y 20 de abril del 2021 en la provincia de Valencia se obtuvieron a través de la web del Instituto de Salud Carlos III (<https://cnecovid.isciii.es/covid19/#provincias>).

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS

### 4.1. RENDIMIENTO DEL PROCESADO DE LAS MUESTRAS

El proceso de concentración y extracción de ARN se evaluó añadiendo PEDV a las muestras. Se obtuvieron porcentajes de recuperación de PEDV en un rango de 25-40% con una media de 31,20% ± 20,11%. Según los criterios establecidos en el marco de la ISO 15216-1 estos

resultados se consideran válidos ya que el porcentaje de recuperación del control de proceso es  $\geq 1\%$  en alguna de las dos diluciones ensayadas.

## 4.2. DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE SARS-CoV-2

En este estudio, entre el 15 de febrero y 6 de abril del 2021, se recogieron un total de 53 muestras de colectores de 6 zonas de la provincia de Valencia, de las cuales 38 muestras (71,7%) correspondientes a las zonas 3, 4, 5 y 6 fueron positivas para SARS-CoV-2. En el resto de las zonas analizadas en el estudio (zonas 1 y 2) se obtuvieron resultados negativos para SARS-CoV-2.

Se compararon los niveles de SARS-CoV-2 obtenidos en las muestras de los colectores de la provincia de Valencia, entre la tercera y cuarta ola, con los niveles detectados en la EDAR de Pinedo (Valencia) (Tabla 4), y como era de esperar, se observó que los niveles eran más altos en los colectores que en la entrada de la EDAR debido a que en esta última se produce una dilución de todos los componentes y hay una mayor cantidad de sustancias degradantes del ARN vírico.

Se obtuvieron los datos de las qPCRs (para CrAssphage) y RT-qPCRs (para SARS-CoV-2) calculados en copias genómicas por litro y se normalizaron mediante su logaritmo en base 10.

**Tabla 4.** Niveles de SARS-CoV-2 en colectores y la EDAR de Pinedo de la provincia de Valencia entre la tercera y cuarta ola. Fuente: (Sanjuán y Domingo-Calap 2021)

Rango de fechas	Niveles de SARS-CoV-2 en colectores	Rango de SARS-CoV-2 en la EDAR Pinedo
	N1 log <sub>10</sub> (CG/L)	log <sub>10</sub> (CG/L)
Semana 3 de febrero	6,74	4,30 – 4,05
	6,71	
	6,91	
	6,87	
	6,27	
	6,89	
Semana 4 de febrero	4,80	3,05 – 2,60
	6,12	
	5,88	
	6,40	
	6,66	
Semana 1 de marzo	6,60	2,60 – 2,20
	5,77	
	6,20	
	4,71	

### **4.3. CORRELACIÓN DE LOS NIVELES DE SARS-CoV-2 EN AGUAS CON DATOS CLÍNICOS**

Los resultados obtenidos, tanto de la cuantificación de SARS-CoV-2 como del ratio SARS-CoV-2:crAsphage, se compararon con los datos epidemiológicos de casos diarios diagnosticados positivos en la provincia de Valencia que se dieron entre el 15 de Febrero y 20 de Abril del 2021. Estos datos fueron obtenidos a través de la web del Instituto de Salud Carlos III <https://cneccovid.isciii.es/covid19/#provincias>.

Los datos se representaron gráficamente agrupados por zonas (Tabla 5 y Figuras 1 a 8). Para cada zona se representó, por un lado la concentración de material genético del SARS-CoV-2 en aguas residuales en función de la fecha donde se realizó la toma de la muestra junto a los casos clínicos diarios diagnosticados como positivos en la provincia de Valencia, y por otro lado el ratio SARS-CoV-2:crAssphage junto con los casos positivos en SARS-CoV-2.

En el análisis de los resultados obtenidos por zonas, se observó que en la zona 3 (Figuras 1 y 2) las muestras seguían una tendencia general de descenso en cuanto a la cuantificación de material genético de SARS-CoV-2 se refiere, al igual que los casos clínicos, pero cuando sucedía un repunte en la concentración de ARN del SARS-CoV-2 unos días después había un repunte en los casos de clínica y, al contrario, si había una bajada drástica de ARN detectado, aparecía también una bajada en los casos clínicos unos días después. Se puede ver como hay un pequeño repunte en la fecha final del muestreo (6 de abril) y este se manifiesta en clínica a la semana siguiente (15 de abril).

En la zona 4, se vio que también coincidían los repuntes en la cantidad de ARN con el aumento de casos en los días siguientes, así como en la disminución de ARN y los casos clínicos (Figuras 3 y 4). Puede verse como el 1 de marzo había un repunte y éste es seguido de un aumento de casos en clínica el día 12 de marzo, y que a continuación, hay una bajada de ARN al igual que en los casos clínicos en los días posteriores al 12 de marzo. El punto álgido de los niveles de SARS-CoV-2 de esta zona sucedió el 22 de marzo seguido de una bajada según el ARN detectado en las muestras. Esto es visible en los casos clínicos detectados a día 5 de abril y posteriores.

En la zona 5 se obtuvieron pocos datos de muestreo debido a la poca cantidad de muestras de esta zona y que solo 5 muestras estaban por encima del límite de detección, pero si es posible diferenciar dos picos coincidentes (Figuras 5 y 6) el 25 de febrero con la subida de casos el 5 de marzo y el 23 de marzo, donde hubo una subida en la detección de ARN en la zona que podría coincidir con la subida de casos clínicos el 5 de abril.

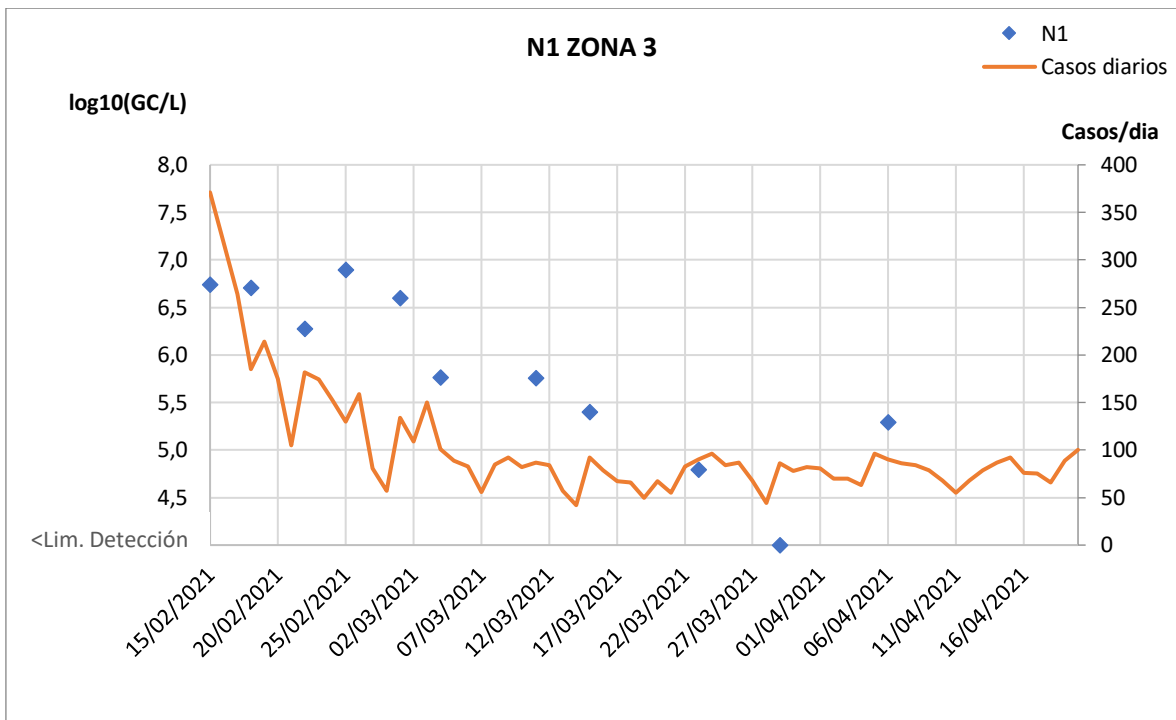
En la última zona (zona 6), se puede ver como el 25 de febrero había un aumento en la concentración del ARN de SARS-CoV-2 coincidente con un aumento en los casos clínicos una semana después (3 de marzo), así como una bajada en la concentración de ARN del virus en las muestras entre el 23 de marzo y 6 de abril que coincide con un descenso en los casos que se da entre el 5 de abril y 15 de abril.

En la mayoría de las muestras se observó un claro descenso de los niveles de SARS-CoV-2 en las aguas residuales, tanto en las figuras de N1 como en las del ratio SARS-CoV-2: crAssphage, y en ambos casos se pudo predecir la evolución de los casos en clínica. Bien es cierto que no

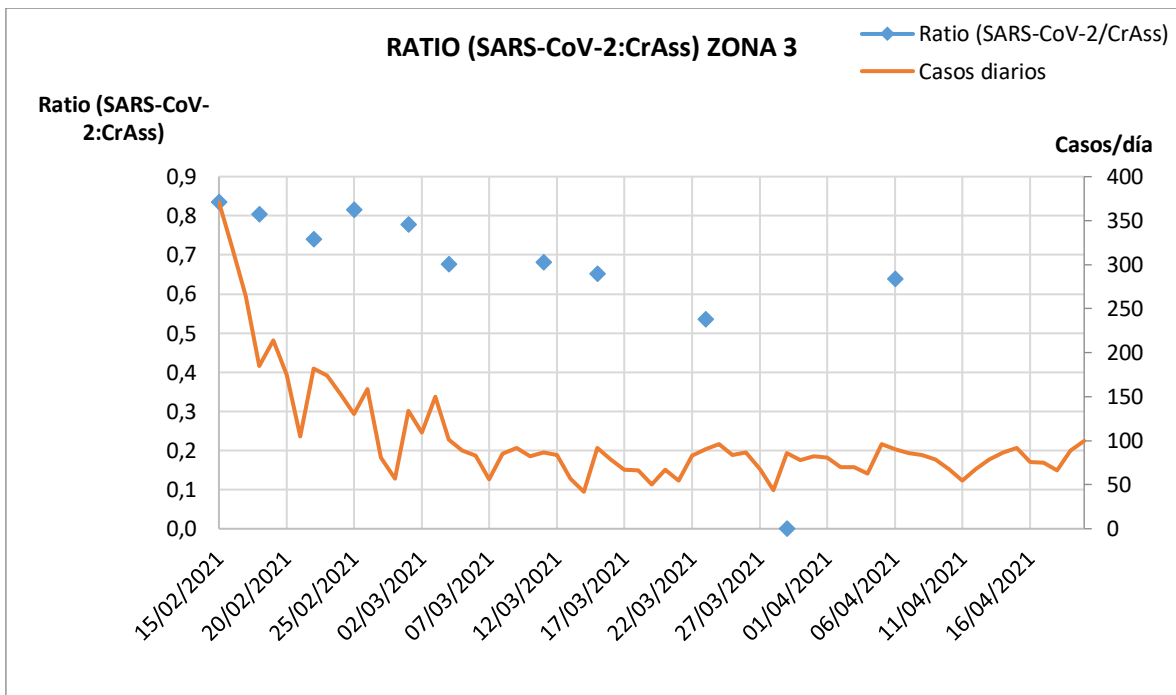
se pudo encontrar diferencias entre las figuras de N1 y el ratio SARS-Cov-2:crAssphage, por lo que se necesitaría una mayor cantidad de muestras y un estudio estadístico para observar si se encuentran diferencias significativas.

**Tabla 5.** Niveles de SARS-CoV y crAssphage en las Zonas 3, 4, 5 y 6 de la provincia de Valencia

Zona	Fecha muestreo	crAssphage log <sub>10</sub> (CG/L)	N1 log <sub>10</sub> (CG/L)	Ratio (SARS-CoV-2:CrAss)	Casos diarios
3	15/02/2021	8,08	6,74	0,83	367
3	18/02/2021	8,34	6,71	0,80	187
3	22/02/2021	8,47	6,27	0,74	186
3	25/02/2021	8,46	6,89	0,81	123
3	01/03/2021	8,49	6,60	0,78	133
3	04/03/2021	8,52	5,77	0,68	101
3	11/03/2021	8,44	5,76	0,68	87
3	15/03/2021	8,28	5,40	0,65	91
3	23/03/2021	8,94	4,79	0,54	89
3	29/03/2021	9,39	< Límite	0	84
3	06/04/2021	8,29	5,29	0,64	91
<hr/>					
4	22/02/2021	8,54	4,80	0,56	186
4	25/02/2021	8,68	6,12	0,71	123
4	01/03/2021	8,81	6,20	0,70	133
4	04/03/2021	8,56	< Límite	0	101
4	15/03/2021	8,44	< Límite	0	91
4	18/03/2021	9,40	4,78	0,51	66
4	22/03/2021	8,57	6,29	0,73	85
4	23/03/2021	8,83	5,39	0,61	89
4	29/03/2021	8,69	< Límite	0	84
4	06/04/2021	7,91	< Límite	0	91
<hr/>					
5	22/02/2021	8,13	5,88	0,72	186
5	25/02/2021	8,43	6,40	0,76	123
5	04/03/2021	8,38	4,71	0,56	101
5	15/03/2021	8,37	< Límite	0	91
5	23/03/2021	8,78	7,67	0,87	89
5	29/03/2021	8,37	4,80	0,57	84
<hr/>					
6	15/02/2021	8,22	6,91	0,84	367
6	18/02/2021	8,56	6,87	0,80	187
6	25/02/2021	8,79	6,66	0,76	123
6	01/03/2021	6,14	< Límite	0	133
6	05/03/2021	7,59	< Límite	0	90
6	18/03/2021	9,12	6,07	0,67	66
6	23/03/2021	8,88	6,70	0,76	89
6	29/03/2021	6,42	< Límite	0	84
6	06/04/2021	8,07	5,67	0,70	91

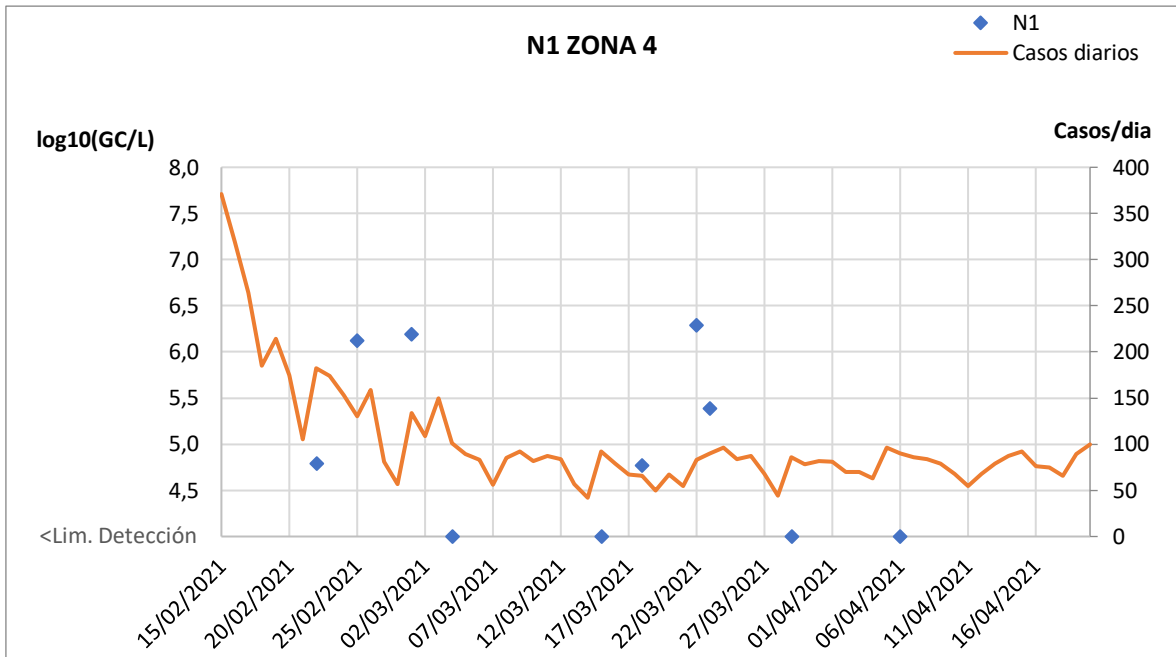


**Figura 1.** Casos diarios positivos frente a muestras positivas en SARS-CoV-2 en Zona 3

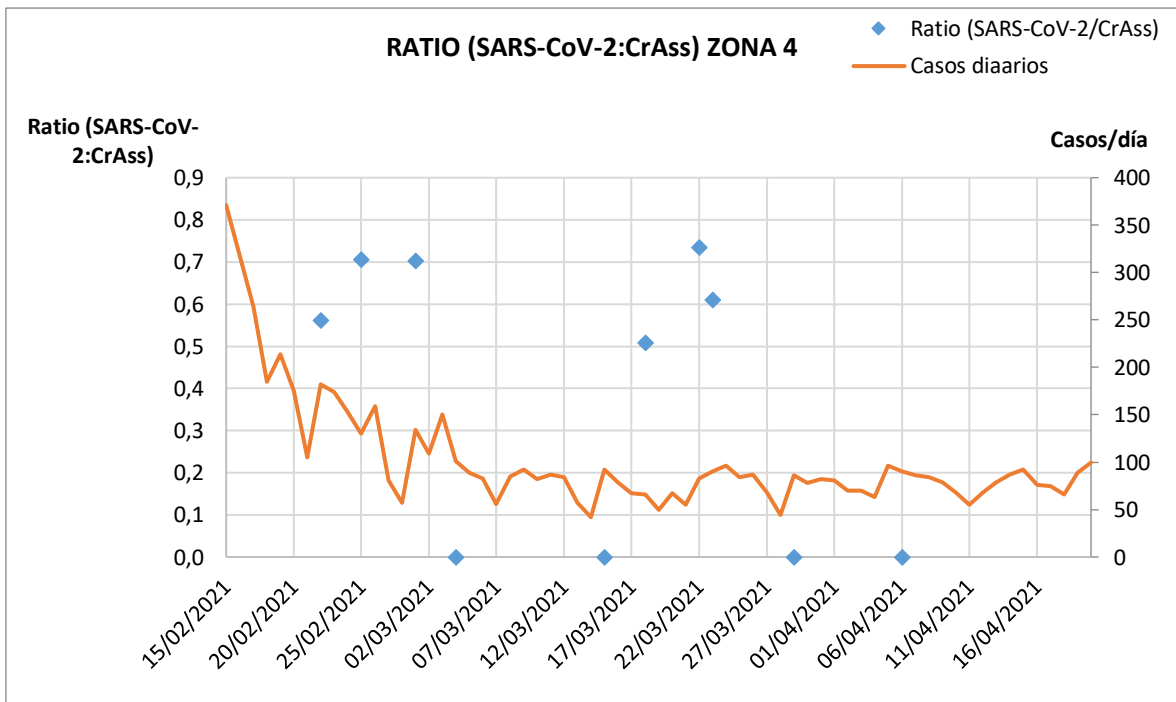


**Figura 2.** Casos diarios positivos frente a ratio (SARS-CoV-2:crAssphage) en Zona 3

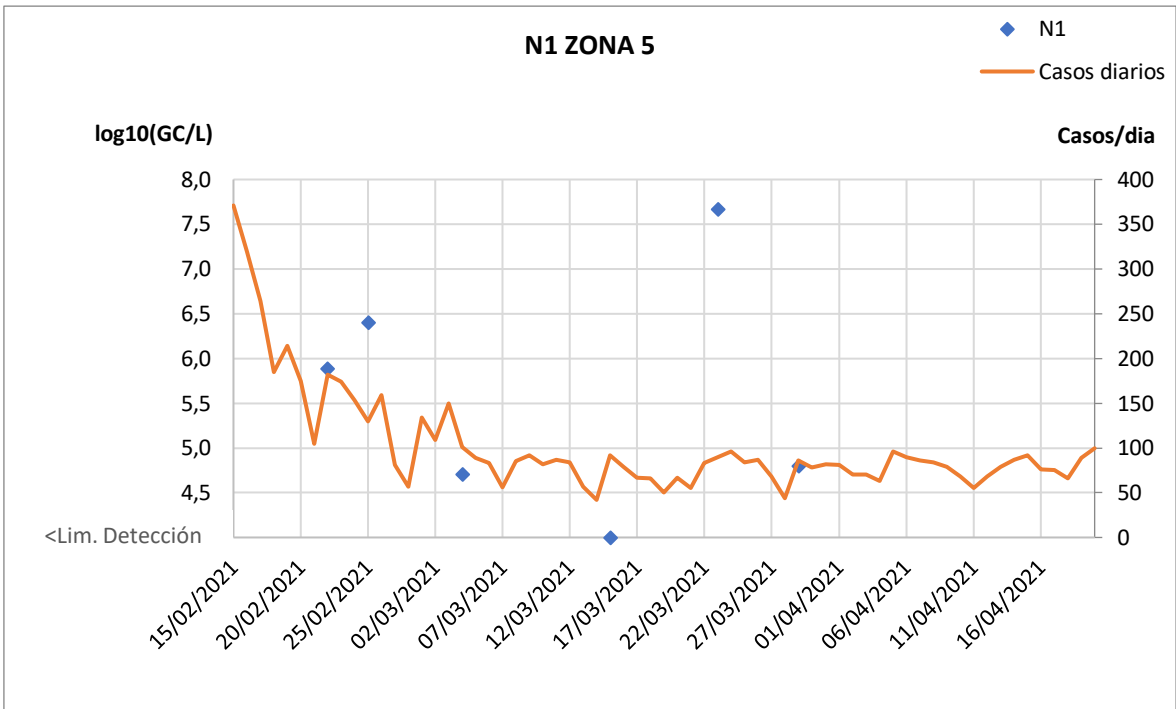




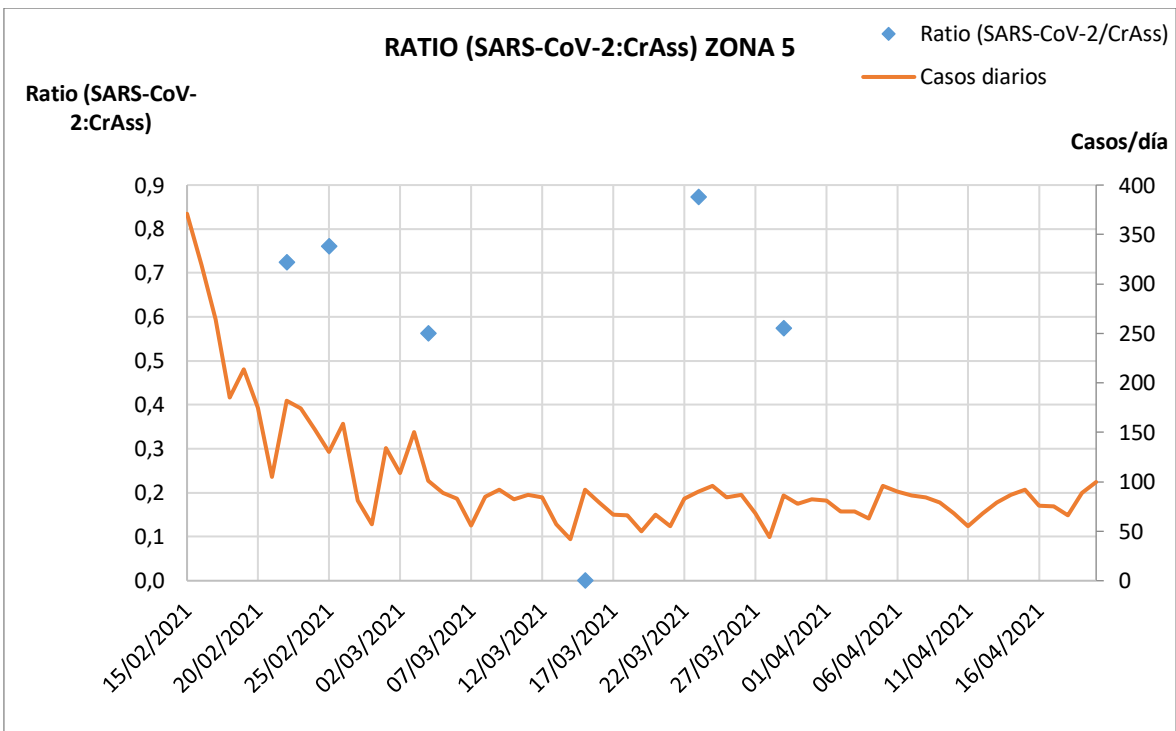
**Figura 3.** Casos diarios positivos frente a muestras positivas en SARS-CoV-2 en Zona 4



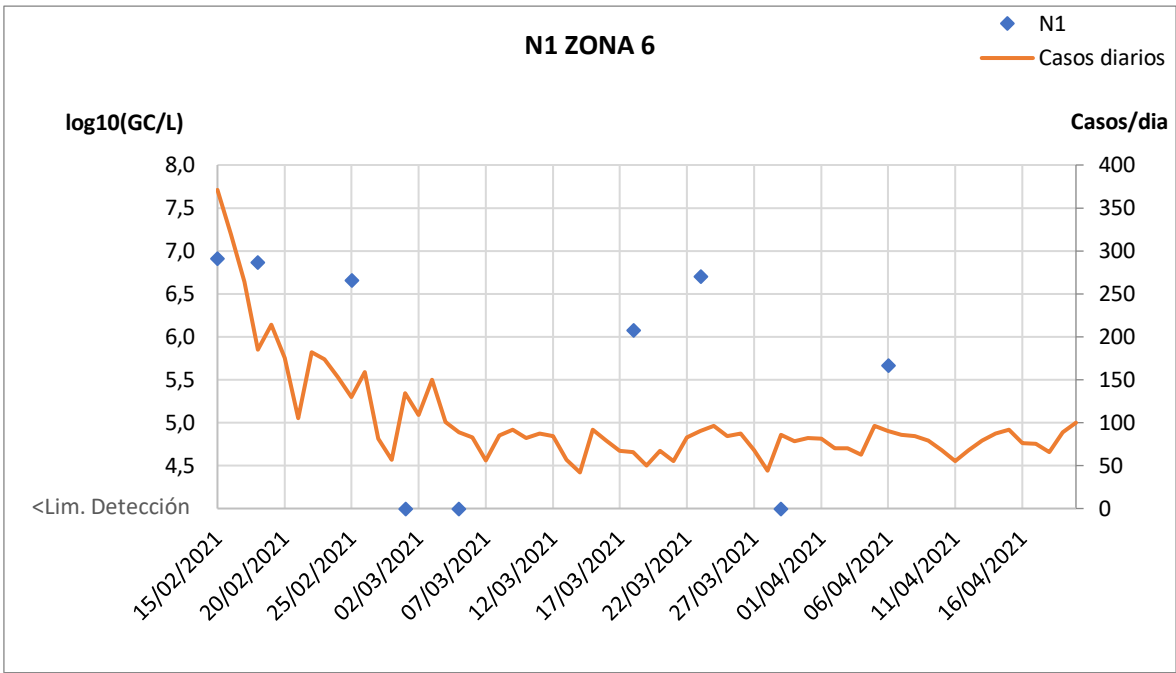
**Figura 4.** Casos diarios positivos frente a ratio (SARS-CoV-2:CrAss) en Zona 4



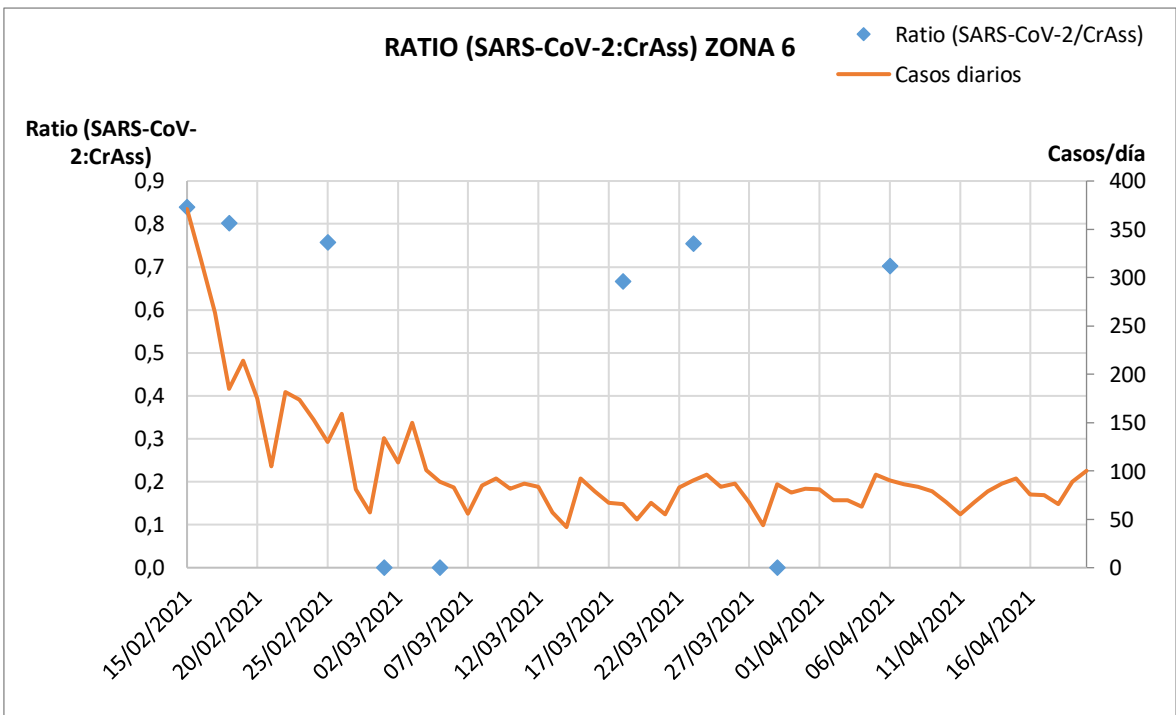
**Figura 5.** Casos diarios positivos frente a muestras positivas en SARS-CoV-2 en Zona 5



**Figura 6.** Casos diarios positivos frente a ratio (SARS-CoV-2:CrAss) en Zona 5



**Figura 7.** Casos diarios positivos frente a muestras positivas en SARS-CoV-2 en Zona 6



**Figura 8.** Casos diarios positivos frente a ratio (SARS-CoV-2:CrAss) en Zona 6

## 5. CONCLUSIONES

No se pudo confirmar que esta técnica de co-cuantificación puede usarse para predecir los casos clínicos con una antelación de 6 a 14 días debido a que no fue posible realizar un estudio estadístico debido a la poca cantidad de muestras y de resultados obtenidos, pero sí que se pudo determinar cómo los picos de detección del material genético del virus iban seguidos de picos en los casos clínicos. Por lo que esta herramienta podría emplearse como herramienta epidemiológica para tomar las medidas pertinentes con la suficiente antelación para el control de la pandemia. El uso del ratio SARS-CoV-2:crAssphage no mostró ninguna diferencia junto a los niveles de SARS-CoV-2 en el agua residual, pero hay estudios que avalan que es posible estandarizar los resultados debido al factor de dilución que presentan las muestras de agua residual, por lo que se necesitaría una mayor cantidad de muestras y un buen análisis estadístico de los datos para demostrar como el uso de la técnica de co-cuantificación y el uso de esta herramienta como vigilancia epidemiológica sería posible (Wilder et al. 2021; Haramoto et al. 2018; Polo et al. 2020; Randazzo, Cuevas-Ferrando, et al. 2020). Si se pudo concluir que los casos clínicos fueron descendiendo a lo largo de todo el muestreo tal y como indicaban previamente los resultados obtenidos en las muestras.

Esta estrategia puede ser una herramienta muy interesante para aplicarla en muestras recogidas a la salida de EDARs que posteriormente se descargan en ríos o mares, y que además pueden ser utilizadas como agua de riego. La puesta a punto de la detección de crAssphage tiene el potencial de ser utilizado para normalizar los datos para la presencia de otros virus, como los norovirus o el virus de la hepatitis A, que sí que tienen una vía de transmisión a través del consumo de aguas o alimentos contaminados.

## 6. BIBLIOGRAFÍA O REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ahmed, Warish, Nicola Angel, Janette Edson, Kyle Bibby, Aaron Bivins, Jake W. O'Brien, Phil M. Choi, et al. 2020. "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 the Total Environment* 728 (August). <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.138764>.
- Chan, Jasper Fuk Woo, Kin Hang Kok, Zheng Zhu, Hin Chu, Kelvin Kai Wang To, Shuofeng Yuan, and Kwok Yung Yuen. 2020. "Genomic Characterization of the 2019 Novel Human-Pathogenic Coronavirus Isolated from a Patient with Atypical Pneumonia after Visiting Wuhan." *Emerging Microbes and Infections* 9 (1): 221–36. <https://doi.org/10.1080/22221751.2020.1719902>.
- Chan, Jasper Fuk Woo, Kelvin Kai Wang To, Herman Tse, Dong Yan Jin, and Kwok Yung Yuen. 2013. "Interspecies Transmission and Emergence of Novel Viruses: Lessons from Bats and Birds." *Trends in Microbiology*. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2013.05.005>.
- Cheung, Ka Shing, Ivan F.N. Hung, Pierre P.Y. Chan, K. C. Lung, Eugene Tso, Raymond Liu, Y. Y. Ng, et al. 2020. "Gastrointestinal Manifestations of SARS-CoV-2 Infection and Virus Load in Fecal Samples From a Hong Kong Cohort: Systematic Review and Meta-Analysis." *Gastroenterology* 159 (1): 81–95. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2020.03.065>.
- Cuevas-Ferrando, Enric, Walter Randazzo, Alba Pérez-Cataluña, and Gloria Sánchez. 2020. "HEV Occurrence in Waste and Drinking Water Treatment Plants." *Frontiers in Microbiology* 10 (January). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02937>.

- Daughton, Christian. 2020. "The International Imperative to Rapidly and Inexpensively Monitor Community-Wide Covid-19 Infection Status and Trends." *Science of the Total Environment*. Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.138149>.
- Davó, Laura, Raimundo Seguí, Pilar Botija, María José Beltrán, Eliseo Albert, Ignacio Torres, Pablo Ángel López-Fernández, et al. 2021. "Early Detection of SARS-CoV-2 Infection Cases or Outbreaks at Nursing Homes by Targeted Wastewater Tracking." *Clinical Microbiology and Infection*. Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2021.02.003>.
- Dutilh, Bas E., Noriko Cassman, Katelyn McNair, Savannah E. Sanchez, Genivaldo G.Z. Silva, Lance Boling, Jeremy J. Barr, et al. 2014. "A Highly Abundant Bacteriophage Discovered in the Unknown Sequences of Human Faecal Metagenomes." *Nature Communications* 5 (July). <https://doi.org/10.1038/ncomms5498>.
- Gorbalenya, Alexander E., Susan C. Baker, Ralph S. Baric, Raoul J. de Groot, Christian Drosten, Anastasia A. Gulyaeva, Bart L. Haagmans, et al. 2020. "The Species Severe Acute Respiratory Syndrome-Related Coronavirus: Classifying 2019-nCoV and Naming It SARS-CoV-2." *Nature Microbiology*. Nature Research. <https://doi.org/10.1038/s41564-020-0695-z>.
- Green, Hyatt, Maxwell Wilder, Mary Collins, Ariana Fenty, Karen Gentile, Brittany L. Kmush, Teng Zeng, Frank A. Middleton, and David Aaron Larsen. 2020. "Quantification of SARS-CoV-2 and Cross-Assembly Phage (CrAssphage) from Wastewater to Monitor Coronavirus Transmission within Communities." *MedRxiv*. medRxiv. <https://doi.org/10.1101/2020.05.21.20109181>.
- Haramoto, Eiji, Masaaki Kitajima, Akihiko Hata, Jason R. Torrey, Yoshifumi Masago, Daisuke Sano, and Hiroyuki Katayama. 2018. "A Review on Recent Progress in the Detection Methods and Prevalence of Human Enteric Viruses in Water." *Water Research*. Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2018.02.004>.
- Hellmér, Maria, Nicklas Paxéus, Lars Magnus, Lucica Enache, Birgitta Arnholm, Annette Johansson, Tomas Bergström, and Heléne Norder. 2014. "Detection of Pathogenic Viruses in Sewage Provided Early Warnings of Hepatitis A Virus and Norovirus Outbreaks." *Applied and Environmental Microbiology* 80 (21): 6771–81. <https://doi.org/10.1128/AEM.01981-14>.
- Kitajima, Masaaki, Warish Ahmed, Kyle Bibby, Annalaura Carducci, Charles P. Gerba, Kerry A. Hamilton, Eiji Haramoto, and Joan B. Rose. 2020. "SARS-CoV-2 in Wastewater: State of the Knowledge and Research Needs." *Science of the Total Environment*. Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.139076>.
- Lodder, Willemijn, and Ana Maria de Roda Husman. 2020. "SARS-CoV-2 in Wastewater: Potential Health Risk, but Also Data Source." *The Lancet Gastroenterology and Hepatology*. Elsevier Ltd. [https://doi.org/10.1016/S2468-1253\(20\)30087-X](https://doi.org/10.1016/S2468-1253(20)30087-X).
- Mallapaty, Smriti. 2020. "How Sewage Could Reveal True Scale of Coronavirus Outbreak." *Nature*. NLM (Medline). <https://doi.org/10.1038/d41586-020-00973-x>.
- Medema, Gertjan, Leo Heijnen, Goffe Elsinga, Ronald Italiaander, and Anke Brouwer. 2020. "Presence of SARS-Coronavirus-2 in Sewage." *MedRxiv*. medRxiv. <https://doi.org/10.1101/2020.03.29.20045880>.
- Miura, Takayuki, Sébastien Lhomme, Jean Claude Le Saux, Philippe Le Mehaute, Yvonnick Guillois, Elizabeth Couturier, Jacques Izopet, Florence Abranavel, and Françoise S. Le Guyader. 2016. "Detection of Hepatitis E Virus in Sewage After an Outbreak on a French Island." *Food and Environmental Virology* 8 (3): 194–99. <https://doi.org/10.1007/s12560-016-9241-9>.
- Naddeo, Vincenzo, and Haizhou Liu. 2020. "Editorial Perspectives: 2019 Novel Coronavirus (SARS-CoV-2): What Is Its Fate in Urban Water Cycle and How Can the Water Research Community Respond?" *Environmental Science: Water Research and Technology*. Royal Society of Chemistry. <https://doi.org/10.1039/d0ew90015j>.

- Polo, David, Marcos Quintela-Baluja, Alexander Corbishley, Davey L. Jones, Andrew C. Singer, David W. Graham, and Jesús L. Romalde. 2020. "Making Waves: Wastewater-Based Epidemiology for COVID-19 – Approaches and Challenges for Surveillance and Prediction." *Water Research* 186 (November): 116404. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2020.116404>.
- Prevost, B., F. S. Lucas, A. Goncalves, F. Richard, L. Moulin, and S. Wurtzer. 2015. "Large Scale Survey of Enteric Viruses in River and Waste Water Underlines the Health Status of the Local Population." *Environment International* 79 (June): 42–50. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2015.03.004>.
- Randazzo, Walter, Enric Cuevas-Ferrando, Rafael Sanjuán, Pilar Domingo-Calap, and Gloria Sánchez. 2020. "Metropolitan Wastewater Analysis for COVID-19 Epidemiological Surveillance." *International Journal of Hygiene and Environmental Health* 230 (September). <https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2020.113621>.
- Randazzo, Walter, Pilar Truchado, Enric Cuevas-Ferrando, Pedro Simón, Ana Allende, and Gloria Sánchez. 2020. "SARS-CoV-2 RNA in Wastewater Anticipated COVID-19 Occurrence in a Low Prevalence Area." *Water Research* 181 (August): 115942. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2020.115942>.
- Rimoldi, Sara Giordana, Fabrizio Stefani, Anna Gigantiello, Stefano Polesello, Francesco Comandatore, Davide Mileto, Mafalda Maresca, et al. 2020. "Presence and Vitality of SARS-CoV-2 Virus in Wastewaters and Rivers." *MedRxiv*. medRxiv. <https://doi.org/10.1101/2020.05.01.20086009>.
- Rosa, Giuseppina La, Marcello Iaconelli, Pamela Mancini, Giusy Bonanno Ferraro, Carolina Veneri, Lucia Bonadonna, Luca Lucentini, and Elisabetta Suffredini. 2020. "First Detection of SARS-CoV-2 in Untreated Wastewaters in Italy." *Science of the Total Environment* 736 (September). <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.139652>.
- Sanjuán, Rafael, and Pilar Domingo-Calap. 2021. "Reliability of Wastewater Analysis for Monitoring COVID-19 Incidence Revealed by a Long-Term Follow-up Study." *MedRxiv*, June, 2021.05.30.21257992. <https://doi.org/10.1101/2021.05.30.21257992>.
- Santiso-Bellón, Cristina, Walter Randazzo, Alba Pérez-Cataluña, Susana Vila-Vicent, Roberto Gozalbo-Rovira, Carlos Muñoz, Javier Buesa, Gloria Sanchez, and Jesús Rodríguez Díaz. 2020. "Epidemiological Surveillance of Norovirus and Rotavirus in Sewage (2016–2017) in Valencia (Spain)." *Microorganisms* 8 (3). <https://doi.org/10.3390/microorganisms8030458>.
- Shkoporov, Andrey N., Ekaterina V. Khokhlova, C. Brian Fitzgerald, Stephen R. Stockdale, Lorraine A. Draper, R. Paul Ross, and Colin Hill. 2018. "ΦCrAss001 Represents the Most Abundant Bacteriophage Family in the Human Gut and Infects Bacteroides Intestinalis." *Nature Communications* 9 (1). <https://doi.org/10.1038/s41467-018-07225-7>.
- Stachler, Elyse, Catherine Kelty, Mano Sivaganesan, Xiang Li, Kyle Bibby, and Orin C. Shanks. 2017. "Quantitative CrAssphage PCR Assays for Human Fecal Pollution Measurement." *Environmental Science and Technology* 51 (16): 9146–54. <https://doi.org/10.1021/acs.est.7b02703>.
- Wilder, Maxwell L., Frank Middleton, David A. Larsen, Qian Du, Ariana Fenty, Teng Zeng, Tabassum Insaf, et al. 2021. "Co-Quantification of CrAssphage Increases Confidence in Wastewater-Based Epidemiology for SARS-CoV-2 in Low Prevalence Areas." *Water Research X* 11 (May): 100100. <https://doi.org/10.1016/j.wroa.2021.100100>.
- Wu, F. Q., A. Xiao, J. B. Zhang, X. Q. Gu, W. L. Lee, K. Kauffman, W. P. Hanage, et al. 2020. "SARS-CoV-2 Titers in Wastewater Are Higher than Expected from Clinically Confirmed Cases." *MedRxiv*. medRxiv. <https://doi.org/10.1101/2020.04.05.20051540>.
- Wurtzer, S., V. Marechal, J. M. Mouchel, Y. Maday, R. Teyssou, E. Richard, J. L. Almayrac, and L.

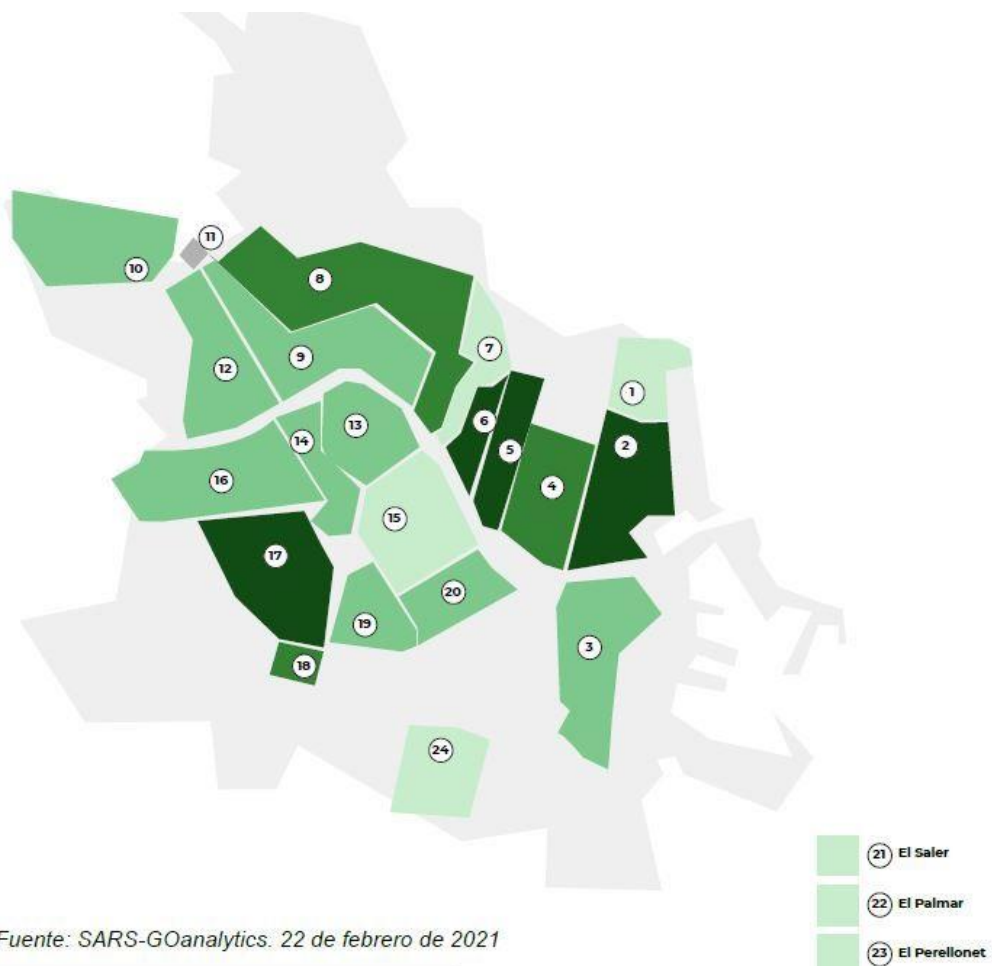
Moulin. 2020. "Evaluation of Lockdown Impact on SARS-CoV-2 Dynamics through Viral Genome Quantification in Paris Wastewaters." *MedRxiv*. medRxiv. <https://doi.org/10.1101/2020.04.12.20062679>.

Xiao, Fei, Meiwen Tang, Xiaobin Zheng, Ye Liu, Xiaofeng Li, and Hong Shan. 2020. "Evidence for Gastrointestinal Infection of SARS-CoV-2." *Gastroenterology* 158 (6): 1831-1833.e3. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2020.02.055>.

Young, Barnaby Edward, Sean Wei Xiang Ong, Shirin Kalimuddin, Jenny G. Low, Seow Yen Tan, Jiashen Loh, Oon Tek Ng, et al. 2020. "Epidemiologic Features and Clinical Course of Patients Infected with SARS-CoV-2 in Singapore." *JAMA - Journal of the American Medical Association* 323 (15): 1488–94. <https://doi.org/10.1001/jama.2020.3204>.

Zhu, Na, Dingyu Zhang, Wenling Wang, Xingwang Li, Bo Yang, Jingdong Song, Xiang Zhao, et al. 2020. "A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019." *New England Journal of Medicine* 382 (8): 727–33. <https://doi.org/10.1056/nejmoa2001017>.

## 7. ANEXOS



**Ilustración 1.** Mapa representando la concentración de ARN de SARS-CoV-2 en diferentes barrios de Valencia. La escala de colores en verde representa los diferentes grados de concentración, siendo el verde más oscuro el grado de mayor concentración y el verde claro el menor