

Resumen

El objetivo inicial de esta tesis era detectar y rastrear virus entéricos (en especial el virus de la hepatitis E) en diferentes matrices acuáticas mediante la combinación de protocolos moleculares y metagenómicos. Para ello se establecieron como objetivos principales el desarrollo de procedimientos para la concentración de virus en muestras de aguas residuales, el análisis de virus indicadores de contaminación fecal y la caracterización del viroma de estas muestras.

Los virus de transmisión alimentaria, o virus entéricos, se encuentran entre los principales riesgos sanitarios asociados al consumo de alimentos, y por ende repercuten en la seguridad alimentaria. Son responsables de diversas patologías: desde gastroenteritis, normalmente leves, hasta patologías más graves como hepatitis agudas, miocarditis o incluso meningitis o encefalitis aséptica. Son transmitidos principalmente por la vía fecal-oral y, por tanto, pueden estar potencialmente presentes en alimentos que hayan sufrido contaminación directa con materia fecal, o a través de aguas contaminadas. El agua se ingiere como parte de la dieta, se utiliza para el riego de cultivos, para el lavado y limpieza de los alimentos durante su preparación y, además, es parte esencial en muchos productos alimentarios. La presencia de virus entéricos humanos en agua también está bien documentada pudiendo representar una importante amenaza para la salud del consumidor.

En cuanto al desarrollo de procedimientos para la concentración de virus entéricos emergentes en muestras de aguas residuales, el protocolo de adsorción-precipitación de hidróxido de aluminio, utilizado habitualmente en el grupo para la concentración de otros virus entéricos, resultó muy eficaz para el virus de la Hepatitis E, permitiendo su detección en muestras de aguas de entrada y salida de estaciones depuradoras de aguas residuales (EDAR). En cuanto al seguimiento de la prevalencia de otros virus entéricos e indicadores virales en muestras de entrada y salida de EDARs, esta tesis proporciona información cuantitativa sobre la presencia del indicador crAssphage y otros virus entéricos (el virus de la hepatitis A, norovirus, rotavirus y astrovirus) de cápside intacta en aguas de diferentes EDARs ubicadas en la región de Valencia. Además, los resultados de la correlación muestran que crAssphage podría no ser un indicador óptimo de la presencia de virus entéricos infecciosos en las aguas residuales regeneradas.

En cuanto a la caracterización del viroma de las muestras de agua de las EDARs analizadas, en la presente tesis se describe un procedimiento de referencia que permite la detección y caracterización de las poblaciones virales en las muestras de aguas residuales recogidas a la entrada y salida de la planta depuradora. Este trabajo también muestra el sesgo existente en los perfiles del viroma que se obtienen según las librerías de secuenciación que se empleen. En este sentido, esta investigación arroja luz sobre la diversidad de las comunidades virales en influentes y efluentes de aguas residuales, proporcionando información valiosa también en términos de indicadores fecales virales.

Con la llegada de la pandemia de COVID-19 a principios de 2020, se incluyó el SARS-CoV-2 como objeto de estudio, pasando a ser el protagonista de la segunda parte de la tesis. En este aspecto, se marcaron como objetivos implementar un sistema de monitorización de SARS-CoV-2 en aguas residuales y desarrollar y optimizar métodos moleculares rápidos para inferir la infectividad del SARS-CoV-2.

Los resultados de esta tesis han demostrado que la aplicación de la epidemiología basada en aguas residuales (WBE) es eficiente para estimar la presencia e incluso la prevalencia de COVID-19 en comunidades y puede servir de herramienta para la salud pública como alerta temprana

ante situaciones pandémicas. Asimismo, esta tesis incluye el primer estudio publicado en España que realizó un análisis metagenómico de la diversidad del SARS-CoV-2 presente en las aguas residuales en las tres primeras oleadas epidemiológicas que se produjeron entre el año 2020 y 2021. Paralelamente, estos resultados confirmaron el potencial de la secuenciación masiva de aguas residuales para detectar nuevas mutaciones y linajes del SARS-CoV-2. Además, en esta tesis también se han comparado y optimizado los protocolos de concentración, extracción y detección de ácidos nucleicos de coronavirus a partir de muestras de aguas residuales, superficiales y de mar. Así, este trabajo amplía el conocimiento sobre los procedimientos analíticos y sus eficiencias para la detección del SARS-CoV-2 en aguas residuales constituyendo un paso adelante para la implementación global del COVID-19 WBE.

En relación con el desarrollo y la optimización de métodos moleculares rápidos para inferir la infectividad viral del SARS-CoV-2, esta tesis ha implementado un protocolo de RT-qPCR de integridad de la cápside basado en el cloruro de platino que actúa como marcador de viabilidad para evitar la amplificación por RT-qPCR del ARN del SARS-CoV-2 no infeccioso. Además, se ha validado con éxito en muestras de aguas residuales contaminadas de forma natural. Así, los resultados de esta tesis apoyan la idea de que el SARS-CoV-2 presente en las aguas residuales no es infeccioso. En general, en el marco de esta tesis doctoral se ha desarrollado una herramienta analítica rápida basada en la RT-qPCR de viabilidad para inferir la infectividad del SARS-CoV-2 con potencial aplicación en la evaluación de riesgos, la prevención y el control en los programas de salud pública.