



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA



1-10-2020

ANÁLISIS PARA LA DETECCIÓN DE SARS-COV2 EN AGUA DE MAR EN PLAYAS DEL RINCÓN DE LA VICTORIA (MÁLAGA)

Director de la Cátedra:
Francisco Ignacio Franco Duro

Equipo técnico:
Marta Domínguez Maqueda
Laura Pardo Canales

Equipo de Análisis:
Miguel Ángel Moriñigo Gutiérrez
M^a Carmen Balebona Accino
Silvana Teresa Tapia-Paniagua

Recogida de muestras

Durante los meses de mayo y junio se recogieron muestras de agua de mar en diferentes playas del Rincón de la Victoria. Se establecieron cuatro puntos de muestreo a lo largo de la costa de todo el municipio:

- Playa Cala del Moral (**Figura 1**).
- Playa del Rincón de la Victoria (Ermita Virgen del Carmen) (**Figura 2**).
- Playa del Rincón de la Victoria (Chiringuito Guirado) (**Figura 3**).
- Playa Torre de Benagalbón (Arroyo Granadillas) (**Figura 4**).

Las muestras se recogieron en tres ocasiones, concretamente los días 21 de mayo, 4 de junio y 18 de junio de 2020 entre las 9:00 y 10:00 am. La recogida se llevó a cabo en botellas de vidrio esmerilado estériles, se transportaron y mantuvieron en frío hasta su procesamiento. Cada muestra se analizó en un periodo inferior a 24 h desde su depósito en las instalaciones de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Málaga (UMA).



Figura 1. Vista satélite de la playa Cala del Moral donde se recogieron las muestras. Las flechas rojas señalan la ubicación exacta en la playa.

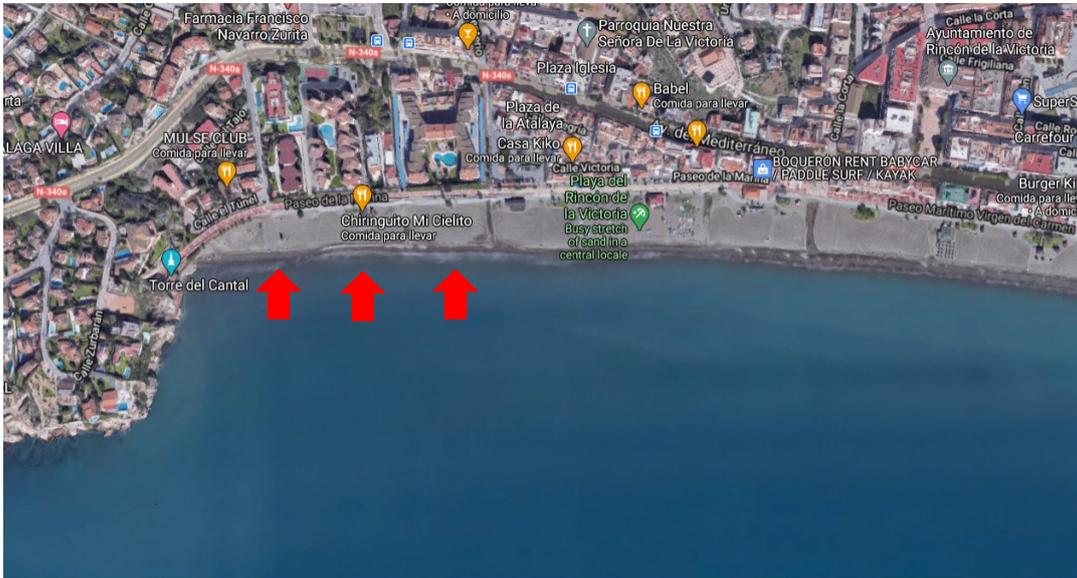


Figura 2. Vista satélite de la playa Rincón de la Victoria donde se recogieron las muestras. Las flechas rojas señalan la ubicación exacta en la playa.

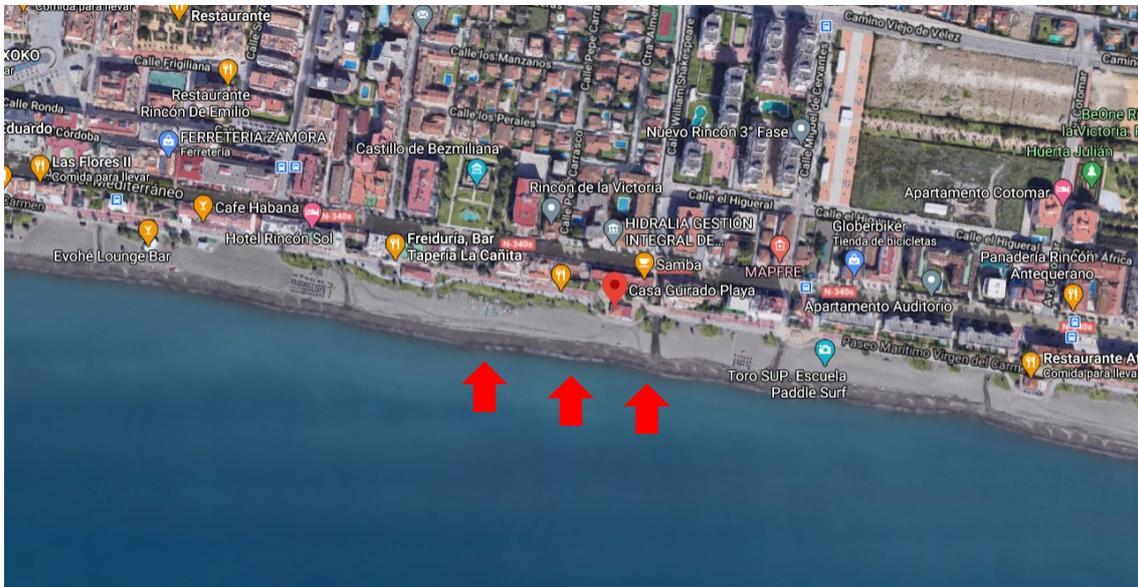


Figura 3. Vista satélite de la playa Rincón de la Victoria donde se recogieron las muestras. Las flechas rojas señalan la ubicación exacta en la playa.



Figura 4. Vista satélite de la playa Torre de Benagalbón donde se recogieron las muestras. Las flechas rojas señalan la ubicación exacta en la playa.

Metodología

Filtrado y extracción de ARN

Para el filtrado y posterior análisis de las muestras se probaron distintos protocolos con el fin de poner a punto y poder detectar de la forma más precisa, la posible presencia del virus SARS-CoV-2. En agua de mar este protocolo no estaba puesto a punto y se tuvo que hacer una búsqueda exhaustiva de la metodología más conveniente para tratar agua marina. En todo momento se analizaron simultáneamente muestras de agua de mar con controles positivos y negativos, que aseguraran una correcta manipulación durante el proceso de análisis.

Finalmente, el procesamiento de las muestras se realizó según la metodología descrita por John et al., (2011)*, filtrando volúmenes de 500 ml de agua mar a través de filtros de policarbonato de 47 mm de diámetro y tamaño de poro de 0,4 μm y 0,2 μm (Sartorius Lab Instruments, Alemania), respectivamente. Las muestras se filtraron por

triplicado con equipos de filtración de laboratorio (Merck Millipore, Thermo Fisher Scientific, Madrid).

Los filtros se resuspendieron en extracto de carne al 3% durante 24 horas, en agitación constante (80 r.p.m) y a 4°C. Tras esta incubación, a partir de 150 µl del líquido de resuspensión recuperado de los filtros, se extrajo el ARN presente mediante el kit SPEEDTOOLS RNA Virus Extraction kit (Biotools, Madrid). El ARN total extraído se congeló a -80°C hasta su transporte al servicio de genómica del SCBI (UMA) para la realización de una reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT-qPCR).

RT-qPCR

Las muestras procedentes del proceso de extracción de ARN anterior fueron sometidas a ensayo mediante la técnica de RT-qPCR para la detección de material genético procedente de SARS-CoV-2. Concretamente se analizó la presencia de una región del gen E (*Envelope gene*), de una región del gen N (*Nuclecapside gene*) y de una región del gen de la polimerasa de RNA dependiente de RNA (*RdRP gene*), según lo descrito por Corman et al., (2020), empleando kits comerciales (1), y siguiéndose las instrucciones de los mismos definidos solo para uso en investigación. Como control interno del proceso de PCR se empleó un fragmento del genoma del virus de la arteritis equina (*EAV RNA control*), siguiéndose las instrucciones definidas por el kit comercial empleado (2).

Todas las muestras fueron procesadas por triplicado en la PCR, incluidos los controles negativos (agua libre de nucleasas para uso en biología molecular) y los controles positivos, suministrados en los kits comerciales de cada región analizada (1).

(1) Kits comerciales para el análisis de SARS-CoV-2:

- Gen E: LightMix Modular SARS-CoV2 (COVID19) E-gene (Cat.-No 53-0776-96 TIB MOLBIOL).

- Gen N: LightMix Modular SARS-CoV-2 (COVID19) N-gene (Cat.No. 53-0775-96 TIB MOLBIOL).
- RdRP: LightMix Modular SARS-CoV-2 (COVID19) RdRP (Cat.No. 53-0777-96 TIB MOLBIOL).

Además de estos kits específicos para el análisis de cada región de interés, se empleó el kit comercial “LC Multiplex RNA Virus Master” (Ref. 6754155001), de Roche, como Master Mix y enzima de RT.

(2) Kit comercial de control interno de PCR

- Control interno de PCR EAV: LightMix Modular EAV RNA Extraction Control (Cat.No. 66-0909-96 TIB MOLBIOL).

Resultados

Los resultados que se obtuvieron en los ensayos se refieren a las muestras suministradas, NO detectándose amplificación de ninguno de los fragmentos analizados (gen E, gen N y RdRP) (Tabla 1).

Tabla 1. Resumen de los resultados obtenidos por RT-qPCR en la detección de SARS-CoV-2 en las diferentes playas.

Playa	Presencia de SARS-CoV-2
Cala del Moral	No se detecta
Rincón de la Victoria (Ermita Virgen del Carmen)	No se detecta
Rincón de la Victoria (Chiringuito Guirado)	No se detecta
Torre de Benagalbón (Arroyo Granadillas)	No se detecta

Se encontró amplificación de Control Interno de PCR (EAV) en todas las muestras suministradas sometidas a ensayo, por lo que se descartó la presencia de inhibidores de PCR en las mismas.

Los resultados de los controles positivos y negativos de PCR empleados fueron satisfactorios y según lo previsto.

Bibliografía

- Randazzo, W., Truchado, P., Cuevas-Ferrando, E., Simón, P., Allende, A., & Sánchez, G. (2020). SARS-CoV-2 RNA in wastewater anticipated COVID-19 occurrence in a low prevalence area. *Water Research*, 115942.
- John, S. G., Mendez, C. B., Deng, L., Poulos, B., Kauffman, A. K. M., Kern, S., ... & Sullivan, M. B. (2011). A simple and efficient method for concentration of ocean viruses by chemical flocculation. *Environmental microbiology reports*, 3(2), 195-202.
- Corman Victor M, Landt Olfert, Kaiser Marco, Molenkamp Richard, Meijer Adam, Chu Daniel KW, Bleicker Tobias, Brünink Sebastian, Schneider Julia, Schmidt Marie Luisa, Mulders Daphne GJC, Haagmans Bart L, van der Veer Bas, van den Brink Sharon, Wijsman Lisa, Goderski Gabriel, Romette Jean-Louis, Ellis Joanna, Zambon Maria, Peiris Malik, Goossens Herman, Reusken Chantal, Koopmans Marion PG, Drosten Christian. Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR. *Euro Surveill.* 2020;25(3):pii=2000045. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2020.25.3.2000045>