

EPIDEMIOLOGÍA DE AGUAS RESIDUALES PARA EL MONITOREO, DETECCIÓN DE NUEVOS BROTES Y EVALUACIÓN DE LA EFICACIA DE LAS MEDIDAS DE SALUD PÚBLICA EN LA PANDEMIA DE COVID-19

Yaxk'in Coronado González y Mayra de la Torre.

Centro de Investigación y Desarrollo en Agrobiotecnología Alimentaria (Unidad Regional del CIAD A.C.). Ciudad del Conocimiento y la Cultura de Hidalgo; Blvd. Circuito La Concepción 3, CP 42156, San Agustín Tlaxiaca, Hgo. yaxkin.coronado@cidea.mx

RESUMEN

Los modelos actuales para correlacionar los datos sobre la concentración del genoma del virus SARS-CoV-2 en aguas residuales con la población infectada en una comunidad, ciudad o región se basan en la estimación de parámetros. El presente trabajo es una revisión de los modelos empleados en esta herramienta para anticipar la llegada de nuevos brotes de la enfermedad, fundamentada en la detección y cuantificación de la carga viral. Finalmente, se presentan algunas sugerencias para el monitoreo de SARS-CoV-2 en aguas residuales, brindando una respuesta más rápida ante posible incremento en el número de contagios por este virus y otros que afectan la salud humana.

Palabras clave: Aguas residuales, epidemiología, SARS-CoV-2, biotecnología, modelos matemáticos.

Abstract

Current models for correlation between virus genome concentration of SARS-CoV-2 in wastewater and the infected population in a community, city or region are based on parameter estimation. This work is a review of the models used in this tool to anticipate the arrival of new outbreaks of the disease, based on the detection and quantification of viral load. Finally, some suggestions are presented for the monitoring of SARS-CoV-2 in wastewater, providing a faster response to a possible increase in the number of infections by this virus and others that affect human health.

Keywords: Wastewater, epidemiology, SARS-CoV-2, biotechnology, mathematical models.

INTRODUCCIÓN

La actual pandemia de la enfermedad del coronavirus 2019 (COVID-19), sigue siendo un reto global para identificar su presencia y dispersión del virus que la ocasiona el denominado SARS-CoV-2. El prologado tiempo de incubación y la presencia de infectados asintomáticos han permitido la dispersión rápida del virus, a pesar de las medidas de confinamiento. La estimación de los casos de SARS-CoV-2 en regiones donde se realizan pruebas clínicas individuales de manera extensiva, es la estrategia más precisa para saber cómo se encuentra la población y que el gobierno tome las medidas adecuadas para contener la epidemia, pero en pocos países se ha podido llevar a cabo por su costo. En la mayoría de los países la baja tasa de pruebas realizadas hace que se reporte una incidencia de la enfermedad muy por abajo de la real. Hoy por hoy algunos países están tratando de evaluar a cada individuo (por ejemplo, Islandia) para obtener datos de toda la población, este enfoque es poco práctico, lento y como se mencionó tiene un alto costo, por lo que difícilmente se puede utilizar esa estrategia en la mayoría del mundo.

La epidemiología basada en aguas residuales (WBE por sus siglas en inglés) ha sido identificada como una herramienta de vigilancia de enfermedades infecciosas en toda la población, por ejemplo se ha utilizado con éxito en el caso de polio y hepatitis A (Asghar et al., 2014; Hellmér et al., 2014), y es muy prometedora para la vigilancia de toda la población en la pandemia COVID-19. Cuando se propuso por primera vez para el seguimiento de SARS-CoV-2, la opinión científica predominante era que la concentración del virus en las aguas residuales probablemente era muy baja para permitir su detección y seguimiento de la evolución de la pandemia, además de que el virus y su genoma eran muy lábiles por lo que se descartaba la opción. Sin embargo, informes recientes sobre la presencia de coronavirus en heces humanas (Gao et al., 2020; Holshue et al., 2020; Jiehao et al., 2020; Tang et al., 2020; Wölfel et al., 2020; Zhang et al., 2020a, 2020b, 2020c, 2020d, 2020e) y tres informes preliminares de detección exitosa de SARS-CoV-2 en aguas residuales municipales de los Países Bajos, los Estados Unidos y Australia ha disipado algunas de estas preocupaciones (Ahmed et al., 2020, Lodder y de Roda Husman, 2020, Medema et al., 2020; Wu et al. 2020). No obstante hay incertidumbre sobre qué información puede extraerse del monitoreo del ARN (ácido ribonucleico) del SARS-CoV-2 en aguas residuales y si el ensayo, una vez perfeccionado y habiéndose demostrado la reproducibilidad de los datos obtenidos por diferentes laboratorios, será lo suficientemente sensibles como para hacer el seguimiento epidemiológico y tomar medidas preventivas. Este seguimiento podría ayudar a reducir el daño económico y la carga social asociada al confinamiento masivo, al tomar medidas basadas en la tendencia de la concentración del virus en las aguas residuales de una comunidad, región específica de una ciudad, etc. y así saber aproximadamente con 7 días de anticipación a la aparición de síntomas en la población, que se presentará un aumento de casos. En la actualidad, las intervenciones de salud pública se implementan con brocha gorda; tomando medidas de confinamiento y otras, en áreas donde el virus puede no representar una amenaza, lo que genera contención de la población y los problemas adyacentes, tales medidas no solo son ineficaces sino también económica y socialmente disruptivas.

EPIDEMIOLOGÍA BASADA EN AGUAS RESIDUALES

La contaminación de las aguas con excretas humanas y animales ha sido históricamente reconocida como un riesgo a la salud humana; ya que el agua se convierte en un vehículo de la dispersión de patógenos, creando las condiciones para brotes o casos esporádicos de infección. Virus patógenos para el hombre son comúnmente detectados en ambientes acuáticos y se consideran los responsables de acarrear diversas enfermedades.

(Hamza and Bibby, 2019; Haramoto et al., 2018; La Rosa et al., 2012; Moreira and Bondelind; Rusinol, and Girones, 2017; WHO, 2017). Los virus que son potencialmente transmitidos a través del agua son en su mayoría son del grupo de los enterovirus. Estos son virus sin envoltura, que se pueden multiplicar en el tracto gastrointestinal y causan padecimientos gastrointestinales, pero también son origen de un amplio espectro de otras enfermedades, tales como conjuntivitis, síntomas respiratorios, hepatitis viral e infecciones del sistema nervioso central.

La pandemia de COVID-19, es una emergencia de salud pública (WHO, 2020a, 2020b). El reporte de síntomas en pacientes con COVID-19 incluye tos, fiebre, dificultad para respirar y diarrea; es importante resaltar que, el virus SARS-CoV-2 ha sido detectado en heces tanto de enfermos sintomáticos como asintomáticos (Gao et al., 2020; Holshue et al., 2020; Jiehao et al., 2020; Tang et al., 2020; Wölfel et al., 2020; Zhang et al., 2020a; Zhang et al., 2020b).

Así pues, las observaciones clínicas y la detección del virus en heces de pacientes sintomáticos y asintomáticos, así como su detección en aguas residuales (Sinclair et al., 2008; Xagorarakis y O'Brien, 2020). implican que la epidemiología basada en aguas residuales podría ser especialmente útil para la alerta temprana de COVID-19, detección de rebrotes y obtener información sobre la eficacia de las intervenciones de salud pública; tal y como se ha demostrado para virus entéricos, como norovirus, hepatitis, A virus y poliovirus (Hellmér et al., 2014; Asghar et al., 2014).

ANTECEDENTES EN OTROS PAÍSES

Australia

Utilizando RT-PCR (reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa) se cuantificó el ARN viral y estimó el número de copias virales por litro de ARN de SARS-CoV-2 en aguas residuales no tratadas. Con este dato de concentración de genomas del virus por litro se estimó el número de contagiados por el método Monte Carlo, realizando un balance de masa sobre el número total de copias de ARN viral en las aguas residuales cada día y el número de copias ARN del SARS-CoV-2 eliminadas en las heces por cada individuo infectado por día. La incertidumbre y variabilidad de las variables independientes se incorporó empleando métodos Monte Carlo, estimando la media de infectados en un periodo de tiempo. (Ahmed et. al. 2020). En el artículo se enfatiza que los métodos de concentración del virus son esenciales para mejorar la sensibilidad de la detección de SARS-CoV-2 en las aguas residuales.

Francia

Se demostró que existe una correlación entre el número de infectados por SARS-CoV-2 y el incremento del virus en aguas residuales, al igual que entre la disminución del virus y el número de infectados en el periodo de cuarentena

con un retraso de una semana, es decir el incremento de la concentración del virus se detecta una semana antes de la aparición de infectados sintomáticos. Se evaluaron los cambios conforme a estudios semanales en diferentes plantas de tratamiento ubicadas en la periferia de París, en periodos previos y posteriores a la cuarentena. En esta publicación se sugiere la epidemiología basada en aguas residuales como una herramienta de evaluación de la población (Wurtzer, et. al., 2020)

Italia

Se realizó la cuantificación de SARS-CoV-2 en aguas residuales por PCR anidado en las ciudades de Milán y Roma durante los meses de febrero a abril con intervalos desde algunos días hasta un mes, se demostró que las Directrices para el protocolo de vigilancia ambiental del virus de la polio de la OMS 2013 con algunas modificaciones son satisfactorias para el control del virus. Se resalta la eficacia y lo novedoso del método de PCR anidado diseñado, con el fin de elevar la detección así como la implementación de monitoreos en plantas de tratamiento para generar alertas a la población. (La Rosa et al. 2020).

Estados Unidos

Los diversos estudios muestran las dificultades para el análisis computacional y modelado del virus en los canales de aguas residuales, ya que la degradación del genoma viral depende de la temperatura que se presenta durante la trayectoria del virus a través de tiempo en los canales y del tiempo transcurrido, por lo que la compensación por los efectos de la temperatura es crítica (Hart & Halden, 2020). Las estimaciones del número de contagios fueron mayores a las basadas en las pruebas médicas aleatorias debido a la población infectada asintomática. Se demostró que la herramienta de la epidemiología basada en aguas residuales es fundamental para comprender la propagación del virus en grandes comunidades y regiones, permitiendo una mejor toma de decisiones públicas y que representan un costo mucho menor que la prueba del virus en los individuos de la población. (Wu et al. 2020)

Países Bajos

El estudio se enfocó en la detección de SARS-CoV-2 en siete plantas de tratamiento de aguas residuales para rastrear la persistencia del virus en el agua, su propagación antes de la pandemia, durante la misma y cuando ésta declinó en el periodo de febrero a marzo (Medema et al., 2020). Los estudios con aguas residuales permiten detectar desde 1 a 3.5 casos por cada 100,000 habitantes, dicha detección no corresponde a los casos médicos reportados en las fechas de recolección de muestras, indicando la presencia de individuos asintomáticos o con síntomas leves, siendo una herramienta muy útil para estimar los casos no registrados de contagio.

En resumen, estos estudios en diversos países muestran la aplicación de WBE para la vigilancia de COVID-19 como una herramienta para el monitoreo a nivel comunitario y para poder tomar medidas a tiempo cuando se presenten rebrotes. En varios países tales como España, Canadá, Reino Unido y Australia han iniciado el monitoreo a gran escala del ARN del coronavirus en aguas residuales en determinadas ciudades, con el fin de que las autoridades puedan detectar nuevos brotes y monitorear la epidemia actual. Lo que hace falta es validar entre varios países las metodologías para la toma de muestras, incluyendo la frecuencia, y las técnicas analíticas.

METODOLOGÍAS DE DETECCIÓN

Todas las metodologías de detección del coronavirus en aguas residuales se basan en las cargas virales en las heces de los pacientes con COVID-19. Puesto que ARN del SARS-CoV-2 se puede encontrar en concentraciones menores que las de muchos virus entéricos ($\sim 10^8$ virus por gramo de heces) (Bosch, 1998; Prüss et al., 2002; Wyn-Jones y Sellwood, 2001), es necesario realizar un paso de concentración antes de la detección de ARN del virus (Ahmed et al., 2020; Lodder y de Roda Husman, 2020; Medema et al., 2020; Nemudryi et al., 2020; F. Wu et al., 2020b; Wurtzer et al., 2020).

Se han desarrollado diferentes métodos para concentrar virus en aguas residuales; en su mayoría para virus entéricos, los cuales a diferencia del SARS-CoV-2 no tienen envoltura. También se han utilizado como modelos, virus que se pueden propagar fácilmente en líneas celulares, así como bacteriófagos (Haramoto et al., 2018). Para concentrar los virus a partir de aguas residuales tratadas y no tratadas se utilizan membranas electropositivas o electronegativas (Cashdollar y Wymer, 2013; Haramoto et al., 2018; Ikner et al., 2012). Esta metodología se basa en interacciones electrostáticas entre las membranas y los virus; la mayoría de los virus entéricos tienen una carga neta negativa cercana a pH neutro. Los virus cargados negativamente se adsorben directamente sobre el filtro electropositivo, en el caso de los filtros electronegativos se utiliza un puente salino con un ion multivalente (Ikner et al., 2012; Michen y Graule, 2010). Otro método comúnmente utilizado es la concentración mediante ultrafiltración, basándose en la exclusión por tamaño (Hill et al., 2005, 2007). También se emplean polietilenglicol (PEG) (Lewis y Metcalf, 1988), ultracentrifugación (Fumian et al., 2010) y floculación con leche descremada (Calgua et al., 2013).

Estos métodos de concentración han sido exitosos para detección de varios tipos de virus endógenos entéricos (Fong y Lipp, 2005; Haramoto et al., 2018) y la eficiencia de recuperación de los virus depende del tipo de virus y del agua (Haramoto et al., 2018). Es importante considerar que SARS-CoV-2 tiene características estructurales y propiedades físicas muy diferentes de las de los virus

entéricos.

MODELAJE DEL SARS-CoV-2 PARA EPIDEMIOLOGÍA BASADA EN AGUAS RESIDUALES.

Los modelos aplicados para realizar la epidemiología en aguas residuales se basan en la presencia y persistencia del virus SARS-CoV-2 conforme al tiempo y la temperatura de las aguas residuales durante el trayecto. La mayoría de los estudios buscan relacionar la carga viral, que se refiere a la concentración del virus en el agua, contra el número de contagiados y las tendencias de las curvas epidemiológicas de contagiados.

Estudios como el de Ahmed et. al. (2020) buscan además estimar el número de contagiados asintomáticos dado que la carga viral corresponde a un número mayor que el esperado. Por medio de simulaciones Monte Carlo se estima el valor de la población contagiada sintomática y asintomática por medio de los datos de concentración viral, obteniendo para una distribución uniforme entre 1.9 y 12 copias del virus por 100 mililitros, con una media del número de infectados de 563.

Por otra parte, Wurtzer, et. al. (2020) han encontrado que la tendencia de las curvas de contagio previas al confinamiento y posteriores determinadas con base a la concentración del genoma del coronavirus en las aguas residuales se desfazan con una semana de antelación respecto al número de contagios médicos reportados, por lo que WBE ofrece un diagnóstico de posible población infectada con una semana de anticipación y permite evaluar estrategias de gobierno para preparar a los sistemas de salud ante nuevos brotes o cambios en el comportamiento de la curva de contagios.

Los modelajes más complejos involucran la estimación del tiempo de vida del virus en las aguas residuales y su dependencia con la temperatura ambiental en zonas tropicales y sub-tropicales de acuerdo a los biomarcadores empleados, así como predicciones de acuerdo a los valores mínimos de detección. (Hart & Halden, 2020).

El modelaje principalmente se basa en la presencia y supervivencia del virus SARS-CoV-2 en el agua residual mediante un decaimiento exponencial de la presencia del virus en el agua residual en, función del tiempo.

$$N(t) = N_0 \left(\frac{1}{2}\right)^{\left(\frac{t}{t_{1/2}}\right)}$$

Donde $N(t)$ es la cantidad que se mantiene y no decae después de un tiempo, es decir la cantidad medida por la muestra de campo); N_0 es la cantidad inicial de la sustancia que fue excretada y descargada en el sistema de aguas residuales; $t_{1/2}$ es la vida media del biomarcador y t es el tiempo transcurrido entre el tiempo de excreción ($t=0$) y el tiempo de observación o recolección de la muestra ($t=t$).

El ajuste de los biomarcadores que realizan la detección en aguas residuales depende fuertemente de la temperatura, reportándose una vida media a temperatura ambiente, está dado por la ecuación de Arrhenius:

$$R_2 = R_1 \times Q_{10}^{(T_2 - T_1 / 10^\circ C)}$$

Donde R_1 es la tasa de decaimiento inicial, igual al logaritmo natural negativo de dos dividido por la vida media inicial reportada (Laidler, 1984). Resolviendo para la vida media, se obtiene.

$$t_{1/2,2} = t_{1/2,1} \times \frac{\ln(2)}{\ln(2) \times Q_{10}^{(T_2 - T_1 / 10^\circ C)}}$$

Donde $t_{1/2,1}$ es la vida media inicial, T_1 es la temperatura a la cual la vida media inicial fue derivada, $t_{1/2,2}$ es la vida media estacional y espacialmente ajustada a la temperatura del agua residual, T_2 es la temperatura calculada dado el ajuste de la vida media inicial, y Q_{10} es un factor de la temperatura dependiente de la tasa de cambio, con un rango entre 2 y 3 para la mayoría de los sistemas biológicos (Hart & Halden 2020).

El análisis de la presencia y concentración de la carga viral del SARS-CoV-2 en conjunto con los modelos hidráulicos aplicados a los sistemas de drenaje de aguas negras, empleando valores históricos de las tasas de descarga per cápita, densidad de la población, nodos de mantenimiento y curvas diurnas.

A partir de la temperatura se puede estimar la carga viral detectada en aguas residuales, y con datos del número de contagiados es posible calibrar las estimaciones de contagios a futuro, sin embargo, se necesita de monitoreos semanales para calibrar los métodos de epidemiología en aguas residuales (WBE).

Una de las ventajas de WBE es que la determinación de las áreas de contagio por medio de los mapas de aguas residuales de una ciudad permiten hacer una zonificación y tener un semáforo específico para plantear en donde hacer los análisis clínicos por persona, hacer el seguimiento de sus contactos y evitar la búsqueda aleatoria de los posibles contagiados.

IMPLEMENTACIONES EN EL SISTEMA DE AGUAS RESIDUALES

Los costos de la implementación se pueden reducir considerablemente hasta menos de una centésima del costo de hacer las pruebas individuales a una población con SARS-CoV-2. Por ejemplo, para los Estados Unidos se reduciría el costo a cientos de miles de dólares comparado con el costo de algunos billones de dólares requeridos para realizar la prueba a toda la población de manera individual, permitiendo el monitoreo de regiones desde 1 infectado en una población de 144 habitantes hasta la detección de 1 infectado entre dos millones de personas en el caso teórico de mejor estimación. (Hart & Halden, 2020).

CONCLUSIONES

En la actualidad, existen importantes lagunas de conocimiento sobre el papel potencial de aguas residuales en la transmisión de SARS-CoV-2. Por ejemplo, la supervivencia del SARS-CoV-2 en los medios ambientales, incluidas las aguas residuales, se desconoce. Datos recientes indican que la estabilidad del SARS-CoV-2 es similar a la del SARS-CoV en aerosoles y en superficies (Van Doremalen et al., 2020). Por lo que la persistencia de SARS-CoV-2 en aguas residuales, aguas receptoras y los efectos de la temperatura, depredación, UV, luz solar sobre su degradación e inactivación deben investigarse.

También hay escasa información sobre la eliminación del SARS-CoV-2 y / o inactivación en aguas residuales y en los procesos de tratamiento de agua, tales como lodos activados, filtración por membrana, sedimentación por coagulación y desinfección (cloro, cloramina, UV, ozono, etc.). Si bien es difícil determinar los valores de reducción de log 10 del SARS-CoV-2 debido a las restricciones para el manejo del virus y las instalaciones de bioseguridad requeridas, se podrían utilizar como modelos virus tales como CoVs (Leung et al., 2003; Memish et al., 2015), MHV (Casanova et al., 2009, Ye et al., 2016) y el fago $\Phi 6$ de *Pseudomonas* (Casanova and Weaver, 2015, Aquino de Carvalho et al., 2017).

Actualmente, los ensayos RT-qPCR desarrollados para la prueba de muestras clínicas siguen siendo utilizados para la detección del SARS-CoV-2 en aguas residuales, existiendo el riesgo de falsos negativos debido a un diseño incorrecto de cebadores o mutaciones en la región objetivo del genoma viral. Estos ensayos, deben ser estandarizados, en el método analítico así como en la toma de muestras y su frecuencia, además de ser evaluados por múltiples laboratorios en diferentes países.

El ensayo por RT-qPCR no proporciona información sobre el título viral, es decir la cantidad de virus con capacidad infectiva. En otras palabras se sabe que hay trazas del material genético del virus, calculándose la concentración de genomas virales; pero no se sabe si el virus permanece infectivo. A nivel nacional e internacional las campañas de vigilancia de aguas residuales deben llevarse a cabo para

comprender la dinámica temporal y espacial de la prevalencia de la enfermedad del COVID-19, la epidemiología y evolución del virus, así como la eficacia de las intervenciones en la salud pública. Además, un monitoreo continuo y sistemático de las aguas residuales puede proporcionar una alerta temprana en el caso de otros virus y bacterias patógenas, así se pueden identificar enfermedades no diagnosticadas o sucesivas a nivel de la población, alertando a los funcionarios de salud pública sobre la marcha y sobre futuros brotes. En síntesis, la vigilancia de las aguas residuales es crítica y la epidemiología basada en aguas residuales (WBE, por sus siglas en inglés) puede proporcionar información valiosa sobre la prevalencia de infecciones en la comunidad.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Jorge Rocha por habernos inducido a trabajar con SARS-CoV-2 en aguas residuales.

BIBLIOGRAFIA

- Asghar H, Diop OM, Weldegebriel G, Malik F, Shetty S, Bassioni L El, Akande AO, Maamoun E Al, Zaidi S, Adeniji AJ, Burns CC, Deshpande J, Oberste MS, Lowther SA (2014). Environmental surveillance for polioviruses in the global polio eradication initiative. *J. Infect. Dis.* <https://doi.org/10.1093/infdis/jiu384>.
- Hellmér M, Paxéus N, Magnius L, Enache L, Arnholm B, Johansson A, Bergström T, Norder H (2014) Detection of pathogenic viruses in sewage provided early warnings of hepatitis A virus and norovirus outbreaks. *Appl. Environ. Microbiol.* <https://doi.org/10.1128/AEM.01981-14>.
- Gao QY, Chen YX, Fang JY (2020) 2019 novel coronavirus infection and gastrointestinal tract. *J. Dig. Dis.* <https://doi.org/10.1111/1751-2980.12851>.
- Holshue ML, DeBolt C, Lindquist S, Lofy KH, Wiesman J, Bruce H, Spitters C, Ericson K, Wilkerson, S, Tural A, Diaz G, Cohn A, Fox LA, Patel A, Gerber SI, Kim L, Tong S, Lu X, Lindstrom S, Pallansch MA, Weldon WC, Biggs HM, Uyeki TM, Pillai SK (2020). First case of 2019 novel coronavirus in the United States. *N. Engl. J. Med.* <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2001191>.
- Jiehao C, Jing X, Daojiong L, Lei X, Zhenghai Q, Yuehua Z, Hua Z, Xiangshi W, Yanling G, Aimei X, He T, Hailing C, Chuning W, Jingjing L, Jianshe W, Mei Z, Children N, Women H, Central S, Zeng M, (2020). A case series of children with 2019 novel coronavirus infection: clinical and epidemiological features. *Clin. Infect. Dis.* <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa198> [Epub ahead of print].
- Tang A, Tong Z, Wang H, Dai Y, Li K, Liu J, Wu W, Yuan C, Yu M, Li P, Yan J (2020). Detection of novel coronavirus by RT-PCR in stool specimen from asymptomatic child, China. *Emerg. Infect. Dis.* <https://doi.org/10.3201/eid2606.200301>.
- Wölfel R, Corman VM, Guggemos W, Seilmaier M, Zange S, Müller MA, Niemeyer D, Jones TC, Vollmar P, Rothe C, Hoelscher M, Bleicker T, Brünink S, Schneider J, Ehmann R, Zwirgmaier K, Drosten C, Wendtner C (2020). Virological assessment of hospitalized patients with COVID-2019. *Nature*, 1–10 <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2196-x>.
- Zhang JC, Wang SB, Xue YD (2020a) Fecal specimen diagnosis 2019 novel coronavirus-infected pneumonia. *J. Med. Virol.* <https://doi.org/10.1002/jmv.25742>.
- Zhang N, Gong Y, Meng F, Bi Y, Yang P, Wang F (2020b). Virus Shedding Patterns in Nasopharyngeal and Fecal Specimens of COVID-19 Patients. *Infectious Diseases (except HIV/AIDS)*.
- Zhang W, Du RH, Li B, Zheng XS, Yang XL, Hu B, Wang YY, Xiao GF,

- Yan B, Shi ZL, Zhou P (2020c) Molecular and serological investigation of 2019-nCoV infected patients: implication of multiple shedding routes. *Emerg. Microbes Infect.* <https://doi.org/10.1080/22221751.2020.1729071>.
- Zhang Y, Chen H, Zhu S (2020d) Isolation of 2019-nCoV From a Stool Specimen of a Laboratory Confirmed Case of the Coronavirus Disease 2019 (COVID-19). 2 pp. 123–124.
- Zhang N, Gong Y, Meng F, Bi Y, Yang P, Wang F (2020e). Virus Shedding Patterns in Nasopharyngeal and Fecal Specimens of COVID-19 Patients. *medRxiv* <https://doi.org/10.1101/2020.03.28.20043059>press.
- Ahmed W, Angel N, Edson J, Bibby K, Bivins A, O'Brien JW, Choi PM, Kitajima M, Simpson SL, Li J, Tscharke B, Verhagen R, Smith WJM, Zaugg J, Dierens L, Hugenoltz P, Thomas KV, Mueller JF (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* <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.138764>
- Lodder W, de Roda Husman A (2020) SARS-CoV-2 in wastewater: potential health risk, but also data source. *Lancet Gastroenterol. Hepatol.* 1253, 30087.
- Medema G, Heijnen L, Elsinga G, Italiaander R (2020). Presence of SARS-Coronavirus-2 in Sewage. *medRxiv.* <https://doi.org/10.1101/2020.03.29.20045880>.
- Wu F, Amy X, Jianbo Z, Xiaoqiong G, Wei LL, Kathryn K, William H, Mariana M, Newsha G, Noriko E, Claire D, Katya M, Timothy E, Peter C, Janelle T, Eric A (2020) SARS-CoV-2 titers in wastewater are higher than expected from clinically confirmed cases. <https://doi.org/10.1101/2020.04.05.20051540>.
- Hamza IA, Bibby K (2019) Critical issues in application of molecular methods to environmental virology. *J Virol Methods* 266, 11e24. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2019.01.008>.
- Haramoto E, Kitajima M, Hata A, et al (2018). A review on recent progress in the detection methods and prevalence of human enteric viruses in water. *Water Res.* 135, 168e186. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2018.02.004>.
- La Rosa G, Fratini M, della Libera S, Iaconelli M, Muscillo M (2012) Emerging and potentially emerging viruses in water environments. *Ann. Ist. Super. Sanita* 48 (4), 397e406. https://doi.org/10.4415/ANN_12_04_07.
- Moreira NA, Bondelind M (2017) Safe drinking water and waterborne outbreaks. *J. Water Health* 15 (1), 83e96. <https://doi.org/10.2166/wh.2016.103>.
- Rusinol M, Girones R (2017) Summary of excreted and waterborne viruses. In: Rose, J.B., Jimenez-Cisneros, B. (Eds.), *Global Water Pathogen Project*. UNESCO, MI. <https://doi.org/10.14321/waterpathogens.19>. <http://www.waterpathogens.Org>. R. Girones (Eds) Part 3 Viruses), E. Lansing. <http://www.waterpathogens.Org/book/summary-Of-Excreted-And-Waterborne-Viruses> Michigan State University.
- WHO (2017). *Guidelines for Drinking-Water Quality*, fourth ed. incorporating the 1st addendum. https://www.who.int/water_sanitation_health/publications/drinking-water-quality-guidelines-4-including-1st-addendum/en/.
- WHO (2020a). Pneumonia of unknown cause – China [WWW document]. URL. <https://www.who.int/csr/don/05-january-2020-pneumonia-of-unknown-cause-china/en/>.
- WHO (2020b) Statement on the Second Meeting of the International Health Regulations (2005) Emergency Committee Regarding the Outbreak of Novel Coronavirus (2019-nCoV) [WWW Document].
- Sinclair RG, Choi CY, Riley MR, Gerba CP (2008) Pathogen surveillance through monitoring of sewer systems. *Adv. Appl. Microbiol.* 65, 249–269. [https://doi.org/10.1016/S0065-2164\(08\)00609-6](https://doi.org/10.1016/S0065-2164(08)00609-6)

- Xagorarakis I, O'Brien E (2020) Wastewater-based epidemiology for early detection of viral outbreaks. In: O'Bannon, D. (Ed.), *Women in Water Quality*. Springer Nature Switzerland, pp. 75–97. <https://doi.org/10.1007/978-3-030-17819-2>.
- Wurtzer S, Marechal V, Mouchel JM, Maday Y, Teyssou R, Richard E, Almayrac JL, Moulin L (2020) Evaluation of lockdown impact on SARS-CoV-2 dynamics through viral genome quantification in Paris wastewaters, medRxiv, doi: <https://doi.org/10.1101/2020.04.12.20062679>.
- La Rosa G, Iaconelli M, Mancini P, Bonanno Ferraro G, Veneri C, Bonadonna L, Lucentini L, Suffredini E (2020) First detection of sars-cov-2 in untreated wastewaters in Italy, Cold Spring Harbor Laboratory Press, doi: <https://doi.org/10.1101/2020.04.25.20079830>.
- Hart OE, Halden RU (2020) Computational analysis of SARS-CoV-2/COVID-19 surveillance by wastewater-based epidemiology locally and globally: feasibility, economy, opportunities and challenges. *Sci. Total Environ.* <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.138875>.
- Laidler KJ (1984) The development of the Arrhenius equation. *J. Chem. Educ.* 61 (6), 494
- Bosch A (1998) Human enteric viruses in the water environment: a minireview. *Int. Microbiol.* 1, 191–196. <https://doi.org/10.2436/im.v1i3.39>.
- Prüss A, Kay D, Fewtrell L, Bartram J (2002). Estimating the burden of disease from water, sanitation, and hygiene at a global level. *Environ. Health Perspect.* 110, 537–542. <https://doi.org/10.1289/ehp.02110537>.
- Wyn-Jones AP, Sellwood J (2001) A review: enteric viruses in the aquatic environment. *J. Appl. Microbiol.* 91, 945–962. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2001.01470.x>.
- Nemudryi A, Nemudraia A, Surya K, Wiegand T, Buyukyoruk M, Wilkinson R, Wiedenheft B (2020) Temporal detection and phylogenetic assessment of SARS-CoV-2 in municipal wastewater. medRxiv <https://doi.org/10.1101/2020.04.15.20066746>.
- Haramoto E, Kitajima M, Hata A, Torrey JR, Masago Y, Sano D, Katayama H (2018) A review on recent progress in the detection methods and prevalence of human enteric viruses in water. *Water Res.* 135, 168–186. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2018.02.004>.
- Cashdollar JL, Wymer L (2013). Methods for primary concentration of viruses from water samples: a review and meta-analysis of recent studies. *J. Appl. Microbiol.* 115, 1–11. <https://doi.org/10.1111/jam.12143>.
- Ikner LA, Gerba CP, Bright KR (2012) Concentration and recovery of viruses from water: a comprehensive review. *Food Environ. Virol.* 4, 41–67. <https://doi.org/10.1007/s12560-012-9080-2>.
- Michen B, Graule T (2010) Isoelectric points of viruses. *J. Appl. Microbiol.* 109, 388–397. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2010.04663.x>.
- Hill VR, Polaczyk AL, Hahn D, Narayanan J, Cromeans TL, Roberts JM, Amburgey JE (2005) Development of a rapid method for simultaneous recovery of diverse microbes in drinking water by ultrafiltration with sodium polyphosphate and surfactants. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 6878–6884. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.11.6878>.
- Hill VR, Kahler AM, Jothikumar N, Johnson TB, Hahn D, Cromeans TL (2007) Multistate evaluation of an ultrafiltration-based procedure for simultaneous recovery of enteric microbes in 100-liter tap water samples. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 4218–4225. <https://doi.org/10.1128/AEM.02713-06>.
- Lewis GD, Metcalf TG (1988) Polyethylene glycol precipitation for recovery of pathogenic viruses, including hepatitis A virus and human rotavirus, from oyster, water, and sediment samples. *Appl. Environ. Microbiol.* 54, 1983–1988. <https://doi.org/10.1128/aem.54.8.1983-1988.1988>.
- Fumian TM, Leite JPG, Castello AA, Gaggero A, Caillou MSLd, Miagostovich MP (2010) Detection of rotavirus A in sewage samples using multiplex qPCR and an evaluation of the ultracentrifugation and adsorption-elution methods for virus concentration. *J. Virol. Methods* 170, 42–46. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2010.08.017>.
- Calgua B, Rodriguez-Manzano J, Hundesa A, Suñen E, Calvo M, Bofill-Mas S, Girones R (2013) New methods for the concentration of viruses from urban sewage using quantitative PCR. *J. Virol. Methods* 187, 215–221. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2012.10.012>.
- Fong T-T, Lipp EK (2005) Enteric viruses of humans and animals in aquatic environments: health risks, detection, and potential water quality assessment tools. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 69, 357–371. <https://doi.org/10.1128/MMBR.69.2.357>.
- Wang, Xin W, Li JS, Jin M, Zhen B, Kong QX, Song N, Xiao WJ, Yin, J, Wei W, Wang GJ, Si BY, Guo BZ, Liu C, Ou GR, Wang MN, Fang TY, Chao FH, Li JW (2005) Study on the resistance of severe acute respiratory syndrome-associated coronavirus. *J. Virol. Methods* 126, 171–177. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2005.02.005>.
- Van Doremalen N, Bushmaker T, Morris D, Holbrook M, Gamble A, Williamson B, Tamin A, Harcourt J, Thornburg N, Gerber S, Lloyd-Smith J, de Wit E, Munster V (2020) Aerosol and surface stability of SARS-CoV-2 as compared with SARS-CoV-1. *N. Engl. J. Med.* 382, 1564–1567. <https://doi.org/10.1056/NEJMc2004973>.
- Leung WK, To KF, Chan PKS, Chan HLY, Wu AKL, Lee N, Yuen KY, Sung JY (2003) Enteric involvement of severe acute respiratory syndrome - associated coronavirus infection. *Gastroenterology* 125, 1011–1017. <https://doi.org/10.1016/j.gastro.2003.08.001>.
- Memish Z, Perlman S, Van Kerkhove M, Zumla A (2015) Middle East respiratory syndrome. *Lancet* 386, 995–1007. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(15\)60454-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(15)60454-8).
- Casanova L, Rutala WA, Weber DJ, Sobsey MD (2009) Survival of surrogate coronaviruses in water. *Water Res.* 43, 1893–1898. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2009.02.002>.
- Ye Y, Ellenberg RM, Graham KE, Wigginton KR (2016) Survivability, partitioning, and recovery of enveloped viruses in untreated municipal wastewater. *Environ. Sci. Technol.* 50, 5077–5085. <https://doi.org/10.1021/acs.est.6b00876>.
- Casanova LM, Weaver SR (2015) Inactivation of an enveloped surrogate virus in human sewage. *Environ. Sci. Technol. Lett.* 2, 76–78. <https://doi.org/10.1021/acs.estlett.5b00029>.
- Aquino de Carvalho N, Stachler EN, Cimabue N, Bibby K (2017) Evaluation of Phi6 persistence and suitability as an enveloped virus surrogate. *Environ. Sci. Technol.* 51, 8692–8700. <https://doi.org/10.1021/acs.est.7b01296>.

