



VIRUSI V ODPADNI VODI: ANALIZE ODPADNE VODE ZA SPREMLJANJE EPIDEMIJE NOVEGA KORONAVIRUSA

**KATARINA BAČNIK¹, dr. DENIS KUTNJAK², OLIVERA MAKSIMOVIĆ
CARVALHO FERREIRA³, ZALA KOGEJ⁴, dr. ANA VUČUROVIĆ⁵, ANJA PECMAN⁶,
dr. NATAŠA MEHLE⁷, dr. MOJCA MILAVEC⁸, dr. MAGDA TUŠEK ŽNIDARIČ⁹,
dr. ION GUTIÉRREZ-AGUIRRE¹⁰, prof. dr. MAJA RAVNIKAR¹¹**

Povzetek

Odpadna voda predstavlja dober način za spremljanje prisotnosti virusov v določenem okolju. Spremljamo lahko, npr., prisotnost rastlinskih patogenih virusov, ki se prenašajo na druge rastline prek vode, ali potek epidemije novega koronavirusa. Nedavna potrditev, da se SARS-CoV-2 izloča z blatom okuženih posameznikov v zgodnjih fazah okužbe, ne glede na simptome bolezni, je odprla možnost za uporabo t. i. epidemiologije odpadnih vod, ki temelji na analizah odpadne vode za spremljanje prisotnosti in širjenja virusa v določenem okolju oz. populaciji ljudi. Študije iz tujine, večinoma izvedene v regijah z visoko incidenco COVID-19, so potrdile prisotnost nizke koncentracije virusa v odpadni vodi. Tudi pri nas smo konec marca začeli z vzorčenjem in analizami dotokov šestih čistilnih naprav. Prve analize aprilskih vzorcev odpadne vode so pokazale nizke koncentracije virusa v odpadni vodi; pozitivnih je bilo le nekaj vzorcev, kar pripisujemo nizkemu številu okužb v Sloveniji. Glede na trenutno situacijo je razvoj učinkovitih metod za analizo odpadnih vod pomemben, saj predstavlja komplementaren način spremljanja zgodnjega pojavljanja okužb ter je neodvisen od izbire in števila testiranih oseb.

Ključne besede: epidemiologija odpadnih vod, odpadne vode, SARS-CoV-2, virusi v vodi.

- 1 Katarina Bačnik, Nacionalni inštitut za biologijo, Oddelek za biotehnologijo in sistemsko biologijo; Mednarodna podiplomska šola Jožefa Stefana.
- 2 Dr. Denis Kutnjak, Nacionalni inštitut za biologijo, Oddelek za biotehnologijo in sistemsko biologijo.
- 3 Olivera Maksimović Carvalho Ferreira, Nacionalni inštitut za biologijo, Oddelek za biotehnologijo in sistemsko biologijo; Mednarodna podiplomska šola Jožefa Stefana.
- 4 Zala Kogej, Nacionalni inštitut za biologijo, Oddelek za biotehnologijo in sistemsko biologijo.
- 5 Dr. Ana Vučurović, Nacionalni inštitut za biologijo, Oddelek za biotehnologijo in sistemsko biologijo; Univerza v Beogradu – Poljoprivredni fakultet.
- 6 Anja Pecman, Nacionalni inštitut za biologijo, Oddelek za biotehnologijo in sistemsko biologijo; Mednarodna podiplomska šola Jožefa Stefana.
- 7 Dr. Nataša Mehle, Nacionalni inštitut za biologijo, Oddelek za biotehnologijo in sistemsko biologijo.
- 8 Dr. Mojca Milavec, Nacionalni inštitut za biologijo, Oddelek za biotehnologijo in sistemsko biologijo.
- 9 Dr. Magda Tušek Žnidarič, Nacionalni inštitut za biologijo, Oddelek za biotehnologijo in sistemsko biologijo.
- 10 Dr. Ion Gutiérrez-Aguirre, Nacionalni inštitut za biologijo, Oddelek za biotehnologijo in sistemsko biologijo.
- 11 Prof. dr. Maja Ravnikar, Nacionalni inštitut za biologijo, Oddelek za biotehnologijo in sistemsko biologijo, Univerza v Novi Gorici.



Abstract

Analysing wastewater is a good way to monitor the presence of viruses in a particular environment. For example, we can monitor the presence of plant pathogenic viruses that can be transmitted by water to other plants or the course of an epidemic of a new coronavirus. The recent confirmation that SARS-CoV-2 is excreted in the faeces of infected individuals in the early stages of infection and regardless of disease symptoms has opened up the possibility of using so-called wastewater based epidemiology, that uses wastewater analyzes to monitor virus presence and spread in specific environment or population of people. Studies from abroad, mostly conducted in regions with a high incidence of COVID-19, have confirmed the presence of low concentrations of the virus in wastewater. At the end of March, we also started sampling and analyzing the influents of six wastewater treatment plants. The first results of April wastewater samples showed low virus concentrations in wastewater; only a few samples were positive, which is attributed to the low number of infections in Slovenia. Given the current situation, the development of effective methods for wastewater analysis is important, as it is a complementary way to monitor the early onset of virus spread and is independent of the choice and number of people tested.

Keywords: SARS-CoV-2, viruses in water, wastewater based epidemiology, wastewater.

1. UVOD

Humani, živalski, bakterijski in rastlinski virusi so lahko prisotni v različnih tipih vodá. Tudi v odpadni vodi virusi predstavljajo pomemben del mikrobiote oz. vseh organizmov, prisotnih v odpadni vodi. Številne metagenomske študije, ki preučujejo prisotnost vseh virusov v odpadni vodi, opisujejo kot najpogosteje zastopane predstavnike virusov bakteriofage oz. viruse bakterij. Pogosti pa so tudi rastlinski virusi, ki lahko preživijo pot prek prebavnega trakta človeka, nato pa prek kanalizacijskega sistema zaidejo v odpadno vodo. Infektivnost ohranjajo tudi po prehodu čistilne naprave (Bačnik et al., 2020), in voda tako predstavlja možen način širjenja rastlinskih virusov na daljše razdalje. Najbolj raziskani pa so zagotovo živalski in človeški patogeni virusi, ki se namnožijo v prebavnem traktu gostitelja in jih prav tako lahko zaznamo v odpadni vodi (Steyer et al., 2015), pri čemer je zelo pomembna učinkovita metoda koncentriranja virusov. Takšni človeški patogeni so adenovirusi, astrovirusi, enterovirusi, hepatitis A in E, norovirusi ter rotavirusi (Xagorarakis in Brien, 2019). Gre večinoma za enterične viruse, ki povzročajo gastro-intestinalne težave, vendar pa v odpadni vodi lahko zaznamo tudi respiratorne viruse, vključno s koronavirusi (Gundy et al., 2009). Nedavni izbruh bolezni COVID-19 je po vsem svetu hitro postal velik javnozdravstveni problem. SARS-CoV-2, virus, odgovoren za COVID-19, se širi s človeka na človeka kapljično ali z neposrednim stikom. Nedavne študije so poročale o najdbi SARS-CoV-2 tudi v blatu (Chen et al., 2020; Wölfel et al., 2020) in urinu (Peng et al., 2020) okuženih posameznikov. Študije kažejo, da se virus izloča v blatu zgodaj po okužbi (Chan et al., 2020) kar pomeni, da veliko simptomatskih in asimptomatskih okuženih posameznikov virus izloča v blato, ki prek kanalizacijskega sistema pride do čistilne naprave. Pomembna lastnost virusov je, da se zunaj svojega gostitelja, npr. v odpadni vodi, ne namnožujejo in zato njihove koncentracije predstavljajo stanje v populaciji ljudi, ki jo pokriva čistilna naprava (Xagorarakis in Brien, 2019).

Čeprav so virusi v odpadni vodi široka tema, pa se bomo v nadaljevanju prispevka zaradi aktualnosti osredotočili na določanje SARS-CoV-2 v odpadni vodi in spremljanje trenutne epidemije SARS-Cov-2 z epidemiologijo odpadnih vodá.

2. EPIDEMIOLOGIJA ODPADNIH VODÁ

Trenutna pandemija COVID-19 je pripeljala do uvedbe številnih ukrepov za preprečevanje širjenja virusa SARS-CoV-2, pri čemer testiranje in zaznavanje virusa predstavljata osnovo za razumevanje poteka epidemije. Nedavna potrditev, da se SARS-CoV-2 izloča z blatom okuženih posameznikov v zgodnjih fazah okužbe, ne glede na simptome bolezni, je odprla možnost za uporabo t. i. epidemiologije odpadnih vodá, ki temelji na analizah odpadne vode za spremljanje prisotnosti in širjenja virusa v določenem okolju oz. populaciji ljudi. Klasična epidemiologija opisuje potek epidemij na podlagi kliničnih testiranj, ki najpogosteje temeljijo na kliničnih znakih obolelih posameznikov, ter s tem težje predvidi kritične lokacije in časovne okvire novih žarišč širjenja virusa. Epidemiologija odpadnih vodá pa temelji na predpostavki, da odpadna voda reflektira zdravstveno stanje populacije ljudi (Xagorarakis in Brien, 2019). Časovno in krajevno spremljanje prisotnosti virusa v odpadni vodi tako omogoča zgodnje odkrivanje izbruhov oz. ponovnega širjenja virusa. Skrbno izbran način vzorčenja na različnih lokacijah pa lahko omogoči zaznavo kritičnih lokacij širjenja virusa.

Podoben in bolj poznan pristop epidemiologije odpadnih vodá je že vzpostavljen za opisovanje porabe drog oz. prepovedanih substanc (Zuccato et al., 2008). Zelo pomemben korak v takšnih ocenah porabe določenih substanc je določitev števila posameznikov, ki prispevajo k zaznani koncentraciji v odpadni vodi (Xagorarakis in Brien, 2019). Pristop epidemiologije odpadnih vod je bil tudi že uporabljen za spremljanje virusnih bolezni. Takšen primer je virus otroške ohromelosti oz. poliovirus, ki je zaradi učinkovitega cepljenja že skoraj izkoreninjena bolezen (Obregón et al., 2009). V predelih, kjer pa se virus še pojavlja, lahko z analizami odpadne vode sledimo uspešnosti cepljenja oz. zaznavamo pojav novih žarišč širjenja virusa (Lago et al., 2003).

Že na primeru virusa SARS-CoV leta 2003 so ugotovili, da se virus lahko razmnožuje tudi v človeških črevesnih celicah in izloča z blatom okuženih posameznikov (Leung et al., 2003). Njegovo nukleinsko kislino so zaznali v odpadnih vodah (Gundy et al., 2009). Tudi za novi koronavirus SARS-CoV-2 vemo, da se izloča v blatu okuženih posameznikov (Chen et al., 2020; Wölfel et al., 2020). Rezultati posameznih študij kažejo, da so nukleinske kisline virusa zaznali pri 29 % okuženih posameznikov (Wang et al., 2020) oz. 53 % hospitaliziranih bolnikov s COVID-19 (Xiao et al., 2020). Nekatere klinične študije poročajo o daljšem času izločanja virusne nukleinske kisline v blatu, in sicer do sedem tednov po pojavu prvih simptomov (Xiao et al., 2020). SARS-CoV-2 pa so zaznali tudi v blatu asimptomatskih posameznikov (Tang et al., 2020), ki predstavljajo pomemben delež vseh okuženih. V zadnjih mesecih so se vrstile objave o odkrivanju SARS-CoV-2 v odpadni vodi iz različnih držav po svetu.



3. PREGLED OBJAV O PRISOTNOSTI SARS-CoV-2 V ODPADNIH VODAH

Spremljanje začetka, širjenja in spreminjanja trendov prisotnosti virusa SARS-CoV-2 v celotni populaciji s pomočjo kliničnih testiranj se je izkazalo za velik izziv, saj asimptomatski okuženi pogosto ostanejo prezrti. V ta namen so raziskovalne skupine po vsem svetu, vključno z nami, začele analizirati odpadno vodo za SARS-CoV-2 kot komplementaren način za spremljanje širjenja virusa. Po nekaj mesecih po pojavu COVID-19 so začele izhajati prve publikacije, ki so poročale o prisotnosti SARS-CoV-2 v odpadni vodi. Objave, ki so večinoma še vedno objavljene le kot preprinti, poročajo o pojavu SARS-CoV-2 v komunalnih odpadnih vodah po vsem svetu; na Nizozemskem (Medema et al., 2020), v Massachusettsu (Wu, 2020), Avstraliji (Ahmed et al., 2020), Franciji (Wurtzer et al., 2020), Španiji (Randazzo et al., 2020), Italiji (la Rosa et al., 2020) in Turčiji (Kocamemi et al., 2020). Poročali so tudi o korelacijah med analizami odpadne vode in podatki o kliničnih testiranjih (Peccia et al., 2020). Večina teh raziskav je bila opravljena v državah ali regijah, kjer je epidemija COVID-19 potekala v večjem obsegu, kar kaže na to, da je bila »kritična masa« ljudi že okužena pred začetkom množičnega kliničnega testiranja. Večina študij poroča o relativno nizkih koncentracijah virusa v koncentriranih vzorcih odpadne vode. Kljub temu nekatere ocene, ki temeljijo na rezultatih modeliranja in analizah, opravljenih na drugih enteričnih virusih (tj. norovirusih), kažejo, da bi enega okuženega posameznika na 100 000 ljudi že zaznali z analizami odpadne vode (Hata in Honda, 2020). Poleg objav o odkrivanju virusa v odpadni vodi iz različnih držav pa se začenjajo izvajati tudi številni monitoringi SARS-CoV-2 v odpadni vodi v različnih geografskih regijah.

4. DOLOČANJE SARS-CoV-2 V ODPADNIH VODAH

Ker so virusi v odpadni vodi pogosto prisotni v nizkih koncentracijah, jih moramo za uspešno odkrivanje najprej skoncentrirati. Za koncentriranje lahko uporabljamo različne metode, ki temeljijo na adsorpciji-eluciji, filtraciji, precipitaciji, flokulaciji in ultracentrifugiranju (Ikner et al., 2012). Pred uporabo molekularnih metod za odkrivanje virusov moramo iz izbranega vzorca izolirati nukleinske kisline. Nato pa s pomočjo verižne reakcije s polimerazo v realnem času (qPCR) lahko zaznavamo že zelo nizke koncentracije virusnih nukleinskih kislin v vzorcu. Viruse v zadostnih koncentracijah lahko opazujemo tudi z elektronskim mikroskopom, kjer lahko prepoznavamo njihovo strukturo oz. celovitost virusnih delcev. Velik preskok pri odkrivanju virusov pa so omogočile metode visokozmogljivega sekvenciranja, ki se uporabljajo tudi za odkrivanje virusov v odpadni vodi (Bačnik et al., 2020). Te nam omogočajo netarčno zaznavo vseh organizmov, prisotnih v vzorcih, in s tem tudi identifikacijo novih, prej neznanih virusov. V nadaljevanju sledi bolj podroben opis metod, uporabljenih za odkrivanje SARS-CoV-2 v odpadni vodi.

4.1 Koncentriranje virusov

Obstajajo različne metode za koncentriranje virusov v vodnih vzorcih, ki pa so večinoma prilagojene študijam enteričnih virusov, ki nimajo zunanje lipidne ovojnice (Kitajima et al., 2020). Večina dosedanjih raziskav za koncentriranje virusov za odkrivanje SARS-CoV-2 opisuje uporabo majhnih volumnov odpadne vode (100 mL) in uporabo filtrov za ultrafiltracijo, Centricons MWCO (Millipore). Potek dela z omenjenimi filtri je sestavljen iz dveh delov; najprej

vzorec centrifugiramo in s tem odstranimo večje delce, nato pa vodni vzorec filtriramo ter na ta način skoncentriramo vse delce, vključno z virusi, večjimi od por uporabljenega filtra. Pogosto uporabljena metoda za koncentriranje za odkrivanje SARS-CoV-2 je tudi polietilen glikol precipitacija, kjer lahko postopek prilagodimo uporabi večjih volumnov vode. Prav tako večje volumne vode lahko koncentriramo z uporabo CIM monolitne kromatografije. Pri tej metodi vodni vzorec z relativno visokim pretokom vodimo skozi kolono, pri čemer se virusi vežejo na monolitni nosilec z določenimi kemijskimi lastnostmi. Metodo CIM monolitne kromatografije smo uspešno uporabili za koncentriranje humanih virusov iz sladke (Steyer et al., 2015) in morske vode (Balasubramanian et al., 2016), bakteriofagov (Alič et al., 2017) ter rastlinskih virusov (Bačnik et al., 2020). Ni še povsem jasno, ali je SARS-CoV-2 v odpadni vodi prisoten v obliki bolj ali manj poškodovanih virionov ali kot fragmentirana nukleinska kislina, kar lahko močno vpliva na koncentracijo. Zato je pomembno učinkovitost koncentracije preizkusiti z uporabo ustreznih referenčnih materialov oz. pozitivnih kontrol za SARS-CoV-2.

4.2 Zaznavanje virusnih nukleinskih kislin s qPCR

Virusne nukleinske kisline v vzorcih lahko zaznavamo z uporabo molekularnih metod, med katere spadata qPCR in kapljična digitalna verižna reakcija s polimerazo (ddPCR), pri katerih pomnožujemo določen odsek nukleinskih kislin določenega patogena, kar nato aparatura zazna kot povečanje fluorescence. qPCR je zelo občutljiva metoda, s katero lahko dokazujemo nizke koncentracije virusov, z uporabo specifične sonde pa dosežemo visoko specifičnost. Kvantifikacija tarče temelji na umerjanju s standardom z znano koncentracijo; taki standardi pogosto niso na voljo oz. je njihova priprava zamudna in draga. Na učinkovitost pomnoževanja močno vpliva tudi prisotnost inhibitorjev v preiskovanem vzorcu (Gibson et al., 2012). Navedeni pomanjkljivosti lahko rešujemo z uporabo odkrivanja in kvantifikacije nukleinskih kislin z ddPCR (Baker, 2012). Metoda temelji na tem, da reakcijsko mešanico razbijemo na veliko število reakcij majhnega volumna, po reakciji pa preštejemo, koliko reakcij je bilo negativnih in koliko pozitivnih. Obe metodi sta primerni za analizo vzorcev vod, saj omogočata zaznavo že zelo nizkih vsebnosti virusnih nukleinskih kislin (1–10 kopij virusnega genoma v reakciji), hkrati pa sta bili že uporabljeni za odkrivanje virusov v odpadni vodi (Gutiérrez-Aguirre et al., 2011; Rački et al., 2014).

Trenutno odkrivanje SARS-CoV-2 v odpadni vodi temelji predvsem na uporabi različnih qPCR testov, ki targetirajo različne regije koronavirusnega genoma (RdRp, E in N) in jih priporočata Svetovna zdravstvena organizacija ali Ameriški center za nadzor nad nalezljivimi boleznimi. Vključevanje ustreznih pozitivnih in negativnih kontrol je ključnega pomena za končno interpretacijo rezultatov. Pomembna pa je tudi ustrezna validacija uporabljene metode, ki nam daje podlago za uporabo pridobljenih rezultatov pri spremljanju povečevanja oz. upadanja koncentracije v vzorcih odpadne vode.

4.3 Normalizacija podatkov in iskanje korelacij s kliničnimi podatki

Za uporabo epidemiologije odpadnih vodá je pomembna normalizacija podatkov glede na velikost populacije, ki jo, npr., pokriva določena čistilna naprava. To nam zagotavlja, da izmerjene spremembe v ocenah koncentracije virusa niso posledica sprememb v velikosti populacije



(Xagorarakis in Brien, 2019). Pri tem se lahko zanašamo na javno dostopne podatke, lahko pa uporabimo tudi določene snovi, prisotne v odpadni vodi, ki korelirajo z velikostjo populacije. Takšni populacijski biomarkerji so, npr., kreatinin, kortizol, holesterol in drugi (Xagorarakis in Brien, 2019). Pomembna je tudi obstojnost virusa v vodnem okolju, na katero vplivajo številni dejavniki, kot so temperatura, izpostavljenost UV-svetlobi in prisotnost drugih snovi v vodi. V zadnjih mesecih so bile opravljene številne študije o preživetju in inaktivaciji SARS-CoV-2 na površinah kot tudi v različnih matriksih. Kitajima in sodelavci (2020) so objavili pregled takšnih objav, pomembnih za analize vode, ki večinoma kažejo na nestabilnost koronavirusov v odpadni vodi. Na analize odpadne vode torej vplivajo lastnosti posameznega virusa in po- goji znotraj kanalizacijskega sistema, ki se lahko spreminjajo glede na lokacijo (Xagorarakis in Brien, 2019).

Primerjava podatkov, pridobljenih z analizami odpadne vode s kliničnimi podatki o številu okuženih, je zelo pomemben korak. Korelacija med izmerjenimi koncentracijami oz. trendi v odpadni vodi in poročanimi kliničnimi podatki je ključna za ocenitev napovedne vrednosti analiz odpadne vode. Za natančno poročanje je tako bistvena tesna povezava s čistilnimi napravami za vzorčenje odpadne vode in spremljanje različnih fizikalno-kemijskih parametrov kot tudi z zdravstvenimi organi za natančna poročila o kliničnih testiranjih in ocenitev napovedne vrednosti analiz odpadne vode. Poleg tega je za vzpostavitev monitoringa odpadne vode v večjem obsegu ključnega pomena vključevanje v evropske pobude, medlaboratorijske študije in platforme za izmenjavo podatkov.

5. ZAKLJUČEK

Analiza odpadnih vod za SARS-CoV-2 lahko služi kot pomembna dopolnitev kliničnemu testiranju za spremljanje COVID-19, ki je neodvisna od izbire in števila testiranih oseb. Če so analize pravilno zasnovane in uporabljene, lahko takšna strategija predvidi nove izbruhe ali spremlja upad epidemije, kar organom upravljanja pomaga pri odločanju glede sproščanja ukrepov, ki vplivajo na družbeno in gospodarsko dogajanje v državi. Da bi to dosegli, je treba razviti metode za koncentriranje virusov in kvantifikacijo SARS-CoV-2 v odpadni vodi, nadalje pa jih ustrezno optimizirati kot tudi validirati.

LITERATURA IN VIRI

- Ahmed, W., Angel, N., Edson, J., Bibby, K., Bivins, A., O'Brien, J. W., Choi, P. M., Kitajima, M., Simpson, S. L., Li, J., Tschärke, B., Verhagen, R., Smith, W. J. M., Zaugg, J., Dierens, L., Hugenholtz, P., Thomas, K. V. in Mueller, J. F., 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. *Sci. Total Environ.* 728, 138764. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.138764>
- Alič, Š., Naglič, T., Tušek-Žnidarič, M., Ravnikar, M., Rački, N., Peterka, M. in Dreo, T., 2017. Newly isolated bacteriophages from the Podoviridae, Siphoviridae, and Myoviridae families have variable effects on putative novel *Dickeya* spp. *Front. Microbiol.* 8, 1–14. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01870>
- Bačnik, K., Kutnjak, D., Pecman, A., Mehle, N., Žnidarič, M. T., Aguirre, I. G. in Ravnikar, M., 2020. Viromics and infectivity analysis reveal the release of infective plant viruses from wastewater into the environment. *Water Res.* 115628. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2020.115628>
- Baker, M., 2012. Digital PCR hits its stride. *Nat. Methods* 9, 541–544. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2027>
- Balasubramanian, M. N., Rački, N., Gonçalves, J., Kovač, K., Žnidarič, M. T., Turk, V., Ravnikar, M. in Gutiérrez-Aguirre, I., 2016. Enhanced detection of pathogenic enteric viruses in coastal marine environment by concentration using methacrylate monolithic chromatographic supports paired with quantitative PCR. *Water Res.* 106, 405–414. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2016.10.020>
- Chan, J. F. W., Yuan, S., Kok, K. H., To, K. K. W., Chu, H., Yang, J., Xing, F., Liu, J., Yip, C. C. Y., Poon, R. W. S., Tsoi, H. W., Lo, S. K. F., Chan, K. H., Poon, V. K. M., Chan, W. M., Ip, J. D., Cai, J. P., Cheng, V. C. C., Chen, H., Hui, C. K. M. in Yuen, K. Y., 2020. A familial cluster of pneumonia associated with the 2019 novel coronavirus indicating person-to-person transmission: a study of a family cluster. *Lancet* 395, 514–523. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30154-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30154-9)
- Chen, Y., Chen, L., Deng, Q., Zhang, G., Wu, K., Ni, L., Yang, Y., Liu, B., Wang, W., Wei, C., Yang, J., Ye, G. in Cheng, Z., 2020. The presence of SARS-CoV-2 RNA in the feces of COVID-19 patients. *J. Med. Virol.* 833–840. <https://doi.org/10.1002/jmv.25825>
- Gundy, P. M., Gerba, C. P. in Pepper, I. L., 2009. Survival of Coronaviruses in Water and Wastewater. *Food Environ. Virol.* 1, 10–14. <https://doi.org/10.1007/s12560-008-9001-6>
- Gutiérrez-Aguirre, I., Steyer, A., Banjac, M., Kramberger, P., Poljšak-Prijatelj, M. in Ravnikar, M., 2011. On-site reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction detection of rotaviruses concentrated from environmental water samples using methacrylate monolithic supports. *J. Chromatogr. A* 1218, 2368–2373. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2010.10.048>
- Hata, A. in Honda, R., 2020. Potential Sensitivity of Wastewater Monitoring for SARS-CoV-2: Comparison with Norovirus Cases. *Environ. Sci. Technol.* <https://doi.org/10.1021/acs.est.0c02271>
- Ikner, L. A., Gerba, C. P. in Bright, K. R., 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>
- Kitajima, M., Ahmed, W., Bibby, K., Carducci, A., Gerba, C. P., Hamilton, K. A., Haramoto, E. in Rose, J. B., 2020. SARS-CoV-2 in wastewater: State of the knowledge and research needs. *Sci. Total Environ.* 139076. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.139076>
- Kocamemi, B. A., Kurt, H., Hacıoğlu, S., Yaralı, C., Saatici, A. M. in Pakdemirli, B., 2020. First Data-Set on SARS-CoV-2 Detection for Istanbul Wastewaters in Turkey Authors Marmara University, Department of Environmental Engineering, Istanbul, Turkey Sağlık Bilimleri University, Faculty of Medicine, Department of Medical Biology, Istanbul. *medRxiv* 2–11. <https://doi.org/10.1101/2020.05.03.20089417>
- La Rosa, G., Iaconelli, M., Mancini, P., Ferraro, G. B., Veneri, C., Bonadonna, L. in Lucentini, L., 2020. First Detection of Sars-Cov-2 in Untreated Wastewaters in Italy. *medRxiv* 736, 2020.04.25.20079830. <https://doi.org/10.1101/2020.04.25.20079830>
- Lago, P. M., Gary, H. E., Pérez, L. S., Cáceres, V., Olivera, J. B., Puentes, R. P., Corredor, M. B., Jiménez, P., Pallansch, M. A. in Cruz, R. G., 2003. Poliovirus detection in wastewater and stools following an immunization campaign in Havana, Cuba. *Int. J. Epidemiol.* 32, 772–777. <https://doi.org/10.1093/ije/dyg185>
- Leung, W. K., To, K. F. in Chan, P. K. S., 2003. Enteric Involvement of Severe Acute Respiratory Syndrome –. *Gastroenterology* 5085, 1011–1017. [https://doi.org/10.1053/S0016-5085\(03\)01215-0](https://doi.org/10.1053/S0016-5085(03)01215-0)
- Medema, G., Heijnen, L., Elsinga, G., Italiaander, R. in Medema, G., 2020. Presence of SARS-Coronavirus-2 in sewage. *Methods Sewage samples.* *medRxiv.* <https://doi.org/https://doi.org/10.1101/2020.03.29.20045880>
- Obregón, R., Chitnis, K., Morry, C., Feek, W., Bates, J., Galway, M. in Ogden, E., 2009. Achieving polio eradication: A review of health communication evidence and lessons learned in India and Pakistan. *Bull. World Health Organ.* 87, 624–630. <https://doi.org/10.2471/BLT.08.060863>
- Peccia, J., Zulli, A., Brackney, D. E., Grubaugh, N. D., Edward, H., Casanovas-massana, A., Ko, A. I., Malik, A. A. in Wang, D., 2020. SARS-CoV-2 RNA concentrations in primary municipal sewage sludge as a leading indicator of COVID-19 outbreak dynamics 1.
- Peng, L., Liu, J., Xu, W., Luo, Q., Chen, D., Lei, Z., Huang, Z., Li, X., Deng, K., Lin, B. in Gao, Z., 2020. SARS-CoV-2 can be detected in urine, blood, anal swabs, and oropharyngeal swabs specimens. *J. Med. Virol.* 1–5. <https://doi.org/10.1002/jmv.25936>
- Rački, N., Morisset, D., Gutierrez-Aguirre, I. in Ravnikar, M., 2014. One-step RT-droplet digital PCR: A breakthrough in the quantification of waterborne RNA viruses. *Anal. Bioanal. Chem.* 406, 661–667. <https://doi.org/10.1007/s00216-013-7476-y>



22. Randazzo, W., Truchado, P., Cuevas-Ferrando, E., Simón, P., Allende, A. in Sánchez, G., 2020. SARS-CoV-2 RNA in wastewater anticipated COVID-19 occurrence in a low prevalence area. *Water Res.* 181, 115942. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2020.115942>
23. Steyer, A., Gutiérrez-Aguirre, I., Rački, N., Beigot Glaser, S., Brajer Humar, B., Stražar, M., Škrjanc, I., Poljšak-Prijatelj, M., Ravnikar, M. in Rupnik, M., 2015. The detection rate of enteric viruses and *Clostridium difficile* in a waste water treatment plant effluent. *Food Environ. Virol.* 7, 164–172. <https://doi.org/10.1007/s12560-015-9183-7>
24. Tang, A., Tong, Z., Wang, H., Dai, Y., Li, K., Liu, J., Wu, W., Yuan, C., Yu, M., Li, P. in Yan, J., 2020. Detection of Novel Coronavirus by RT-PCR in Stool Specimen from Asymptomatic Child, China. *Emerg. Infect. Dis.* 26, 1337–1339. <https://doi.org/10.3201/eid2606.200301>
25. Wang, D., Hu, B., Hu, C., Zhu, F., Liu, X., Zhang, J., Wang, B., Xiang, H., Cheng, Z., Xiong, Y., Zhao, Y., Li, Y., Wang, X. in Peng, Z., 2020. Clinical Characteristics of 138 Hospitalized Patients with 2019 Novel Coronavirus-Infected Pneumonia in Wuhan, China. *JAMA – J. Am. Med. Assoc.* 323, 1061–1069. <https://doi.org/10.1001/jama.2020.1585>
26. Wölfel, R., Corman, V. M., Guggemos, W., Seilmaier, M., Zange, S., Müller, M. A., Niemeyer, D., Jones, T. C., Vollmar, P., Rothe, C., Hoelscher, M., Bleicker, T., Brünink, S., Schneider, J., Ehmann, R., Zwirgmaier, K., Drosten, C. in Wendtner, C., 2020. Virological assessment of hospitalized patients with COVID-2019. *Nature* 581. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2196-x>
27. Wu, F., 2020. SARS-CoV-2 titers in wastewater are higher than expected from clinically confirmed cases Authors: medRxiv Prepr. 1–13. <https://doi.org/https://doi.org/10.1101/2020.04.05.20051540>
28. Wurtzer, S., Marechal, V., Mouchel, J.-M., Maday, Y., Teyssou, R., Richard, E., Almayrac, J. L. in Moulin, L., 2020. Evaluation of lockdown impact on SARS-CoV-2 dynamics through viral genome quantification in Paris wastewaters. medRxiv 2020.04.12.20062679. <https://doi.org/10.1101/2020.04.12.20062679>
29. Xagorarakis, I. in Brien, E. O., 2019. Wastewater-based epidemiology for early detection of viral outbreaks, in: *Women in Water Quality*. pp. 75–97. https://doi.org/https://doi.org/10.1007/978-3-030-17819-2_5
30. Xiao, F., Tang, M. in Xiaobin, Z., 2020. Evidence for Gastrointestinal Infection of SARS-CoV-2 21, 1–9.
31. Zuccato, E., Chiabrando, C., Castiglioni, S., Bagnati, R. in Fanelli, R., 2008. Estimating community drug abuse by wastewater analysis. *Environ. Health Perspect.* 116, 1027–1032. <https://doi.org/10.1289/ehp.11022>