



universidad
de león



FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AMBIENTALES

**COVID-19 EN AGUAS RESIDUALES: VALOR
INDICADOR DE INCIDENCIA Y PAPEL DE LAS
DEPURADORAS EN SU ELIMINACIÓN**

**COVID19 IN WASTEWATER: WATER BASED
EVIDENCE AND REMOVAL EFFICIENCY IN
WASTEWATER TREATMENT PLANTS**

Celia Matanza López

GRADO EN BIOTECNOLOGÍA

Julio, 2021

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	2
3. PRESENCIA DE SARS-COV-2 EN AGUAS RESIDUALES Y SU RELACIÓN CON LA INCIDENCIA DE CASOS EN LA POBLACIÓN	3
4. ELIMINACIÓN DE SARS-COV-2 DE AGUAS RESIDUALES.	10
5. PROTOCOLO DE ESTUDIO DEL SARS-CoV-2 EN AGUAS RESIDUALES. MÉTODO DE DETECCIÓN.	13
6. CONCLUSIONES.....	19
7. REFERENCIAS	21

RESUMEN

El objetivo de este trabajo es llevar a cabo una revisión bibliográfica sobre estudios basados en la epidemiología basada en aguas residuales (WBE) con el fin de determinar su validez para el seguimiento de la incidencia del SARS-CoV-2 en la población, así como, el de evaluar la eficacia de los tratamientos de aguas residuales en la eliminación del virus y, por último, una revisión de los protocolos de estudios del SARS-CoV-2 en aguas residuales. Los estudios revisados en este trabajo demuestran que existe una clara relación entre el número de casos de COVID-19 en la población y la concentración de ARN viral en aguas residuales, sin embargo, esta relación varía mucho según el estudio por lo que la WBE no es de validez general y depende de las condiciones locales. Pese a que la mayoría de los procesos de tratamiento de aguas residuales son eficaces en la eliminación del virus, este sigue presente en los efluentes de algunas depuradoras por lo que sería necesario un tratamiento que asegure su completa eliminación. Parte de las dificultades en la comparación de resultados se debe a las diferentes metodologías empleadas por lo que es evidente la necesidad de un protocolo estandarizado que permita la correcta comparación e interpretación de los resultados.

Palabras clave: ARN viral, COVID-19, epidemiología basada en aguas residuales, incidencia, plantas de tratamiento de aguas residuales, SARS-CoV-2.

ABSTRACT

The main goal of this work is to carry out a bibliographic review on studies based on wastewater-based epidemiology (WBE) in order to determine its validity for monitoring the incidence of SARS-CoV-2 in the population, as well as, to evaluate the efficacy of wastewater treatments in eliminating the virus and, finally, a review of the SARS-CoV-2 study protocols in wastewater. The studies reviewed in this work show that there is a clear relationship between the number of COVID-19 cases in the population and the concentration of viral RNA in wastewater, however, this relationship varies greatly depending on the study, so the WBE does not it is of general validity and depends on local conditions. Despite the fact that most wastewater treatment processes are effective in eliminating the virus, it is still present in the effluents of some treatment plants, so a treatment would be necessary to ensure its complete elimination. Part of the difficulties in the comparison of results is due to the different methodologies used, which is why the need for a standardized protocol that allows the correct comparison and interpretation of the results is evident.

Keywords: COVID-19, incidence, SARS-CoV, sewage treatment plants, viral RNA, wastewater-based epidemiology.

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

WBE: Epidemiología basada en aguas residuales

EDARS: Plantas de tratamiento de aguas residuales

SARS-CoV-2: Coronavirus de tipo 2 causante del síndrome respiratorio agudo severo

AR: Agua residual

1. INTRODUCCIÓN

El virus SARS-CoV-2 fue identificado por primera vez en diciembre de 2019 en Wuhan y se ha ido extendiendo por diferentes países hasta que finalmente, el 11 de marzo de 2020, la OMS declaró un estado de pandemia mundial (Feng *et al.*, 2021).

El SARS-CoV-2 pertenece al orden *Nidovirales* (Weiss y Leibowitz, 2011) y es uno de los siete coronavirus que infecta a humanos. El tamaño de la partícula viral es de unos 120 nm (Sharma, 2020) y tiene como material genético ARN monocatenario de sentido positivo, perteneciendo a la familia de virus con genoma de ARN más grande (aproximadamente de 30 kb) (Weiss y Navas-Martin, 2005). Este virus es el causante de la nueva enfermedad respiratoria COVID-19, afectando al tracto respiratorio superior y pulmones, desarrollando en la mayoría de personas infectadas síntomas moderados, aunque también pueden ser asintomáticas, y en otras, síntomas graves como fiebre alta y neumonía aguda (Sharma, 2020).

Los coronavirus se transmiten a través de aerosoles o por vía oral-fecal, siendo el principal modo de transmisión de los coronavirus humanos las gotas respiratorias. El SARS-CoV-2 ha sido detectado en heces humanas durante la infección, lo que sugirió que las aguas residuales (AR) podrían usarse para monitorear la prevalencia viral en la comunidad (Gundy *et al.*, 2009).

La gestión de aguas residuales ha supuesto una preocupación generalizada en la población por la transmisión de enfermedades a través de ellas. Además, los virus actúan en las AR como marcadores biológicos de su propia circulación en la población, de manera que su detección en afluentes de plantas de tratamiento de aguas residuales (EDARS) pueden indicar las enfermedades que se encuentran circulando en la población a tiempo casi real (Polo *et al.*, 2020).

Las investigaciones llevadas a cabo han sugerido el monitoreo de la propagación del virus basado en aguas residuales como herramienta para apoyar la epidemiología y conocer el grado de propagación de la infección en la población. Estos estudios han sido realizados en varios países europeos como Alemania, Australia, Países Bajos, España, Italia, etc (Ahmed *et al.*, 2020; Medema *et al.*, 2020; Randazzo *et al.*, 2020; La Rosa *et al.*, 2021; Westhaus *et al.*, 2021).

A pesar del auge en los trabajos de investigación científica sobre el comportamiento del SARS-CoV-2 en el agua y su propagación, la información disponible es limitada y sigue en curso ya que, debido a la novedad de la enfermedad, hay que destacar los obstáculos encontrados a la

hora de llegar a conclusiones, así como la necesidad de realizar más trabajos para poder contrastar los datos o determinar las metodologías más adecuadas.

Debido a la incertidumbre y las grandes lagunas acerca de la transmisión del virus, uno de los objetivos de este trabajo ha sido el de llevar a cabo una revisión bibliográfica sobre estudios basados en la epidemiología basada en aguas residuales (WBE) con el fin de determinar su validez para el seguimiento de la incidencia del SARS-CoV-2 en la población, y por tanto demostrar la potencial relación entre la incidencia de casos de COVID-19 y la cantidad de copias de SARS-CoV-2 en aguas residuales. Otro objetivo es el de evaluar la eficacia de los tratamientos de aguas residuales en la eliminación del virus. Por último, se revisaron los protocolos de estudio del SARS-CoV-2 en aguas residuales y se hace un análisis crítico sobre los diferentes procedimientos utilizados. La idea de este trabajo fue planteada y desarrollada en plena pandemia, cuando aún no se habían publicado revisiones sobre el tema.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

Para la realización del presente trabajo se ha llevado a cabo una búsqueda bibliográfica de artículos que han pasado por una revisión por pares en las siguientes páginas web:

- Base de datos Scopus, de Elsevier: <https://www.scopus.com/home.uri>
- Biblioteca Nacional de Medicina de Estados Unidos, PubMed: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/>
- Base de datos ScienceDirect, de Elsevier: <https://www.sciencedirect.com/>

En el buscador Scopus, se han obtenido las siguientes referencias según las palabras clave utilizadas y el rango de años seleccionado:

- Palabras clave: wastewater and coronavirus; referencias: 125; rango años: 2020-2021.
- Palabras clave: coronavirus taxonomy; referencias: 140; rango años: 2020-2021.
- Palabras clave: deltacoronavirus; referencias: 240; rango años: no seleccionado.
- Palabras clave: gammacoronavirus; referencias: 121; rango años: no seleccionado.
- Palabras clave: wastewater and COVID-19 and effluent; referencias: 10; rango años: 2020-2021.

En el buscador PubMed, se han obtenido las siguientes referencias según las palabras clave utilizadas y el rango de años seleccionado:

- Palabras clave: alphacoronavirus; referencias: 1687; rango años: no seleccionado.
- Palabras clave: coronavirus species; referencias: 1330; rango años: no seleccionado.

En el buscador ScienceDirect se han obtenido las siguientes referencias según las palabras clave utilizadas y el rango de años seleccionado:

- Palabras clave: coronavirus and wastewater; referencias: 691; rango años: no seleccionado.
- Palabras clave: SARS-CoV-2 and wastewater; referencias: 532; rango años: no seleccionado.

La última búsqueda de información fue realizada el 5 de febrero de 2021. Al inicio de este trabajo no se había publicado ninguna revisión sobre el tema ni existían métodos analíticos oficialmente propuestos para el estudio del COVID-19 en aguas residuales.

3. PRESENCIA DE SARS-COV-2 EN AGUAS RESIDUALES Y SU RELACIÓN CON LA INCIDENCIA DE CASOS EN LA POBLACIÓN

Las principales vías de transmisión descritas del virus SARS-CoV-2 son las gotitas respiratorias y aerosoles producidos al toser o estornudar, así como rutas de contacto directo (Han y He, 2021). Además, se ha detectado SARS-CoV-2 en heces y orina humanas donde puede permanecer durante días y mostrar infectividad, por lo que las aguas residuales pueden ser utilizadas como indicadores del estado de salud de la población (Han y He, 2021).

Las aguas residuales y las plantas de tratamiento de aguas residuales son el principal punto de interés por su posible potencial predictivo como indicadoras de la presencia y extensión de la infección incluso antes de que se registren casos en los centros sanitarios. El estudio de las aguas residuales como indicadores de infección surge de estudios previos, en los que se vio que eran buenas indicadores del consumo de drogas o medicinas en la población, así como la presencia de otros virus (Li *et al.*, 2021).

Estudios realizados (Ahmed *et al.*, 2020), indicaron que el monitoreo de aguas residuales tiene una gran capacidad para proporcionar señales de advertencia temprana sobre la circulación del SARS-CoV-2 en la comunidad, especialmente en aquellos casos en los que las personas son asintomáticas o presentan síntomas leves. Con el fin de detectar la presencia del virus en la

población y controlar su propagación, se ha aplicado lo que se conoce como la epidemiología basada en aguas residuales (WBE) (Westhaus *et al.*, 2021).

La WBE es una herramienta de vigilancia que proporciona información sobre la presencia de contaminantes en el agua y su relación con la incidencia en la población. Esta herramienta ya ha sido utilizada para la vigilancia de enfermedades infecciosas como la poliomielitis y la hepatitis A (Hart y Halden, 2020). El uso de la WBE podría servir para detectar el virus antes de que se detectasen síntomas en la población (La Rosa *et al.*, 2021) o la vigilancia de las aguas residuales de aeropuertos para la detección de la entrada del virus en un país (Medema *et al.*, 2020).

Ante la pandemia de COVID-19, se espera que las aguas residuales desempeñen un importante papel de vigilancia y seguimiento por lo que la detección y cuantificación del ARN viral de SARS-CoV-2 en aguas residuales ha sido estudiado por muchos investigadores a lo largo del mundo. En los diferentes estudios, las muestras han variado según la ubicación, el tipo de EDAR y los métodos de recolección. El análisis de los resultados se ha centrado en calcular la relación entre el número de copias del virus frente al número de infecciones detectadas en la población.

Hasta el momento, hay un gran número de estudios en los que se ha relacionado el número de personas enfermas de COVID-19 y la presencia de SARS-CoV-2 en el agua. Sin embargo, en la presente revisión, solo se presentan aquellos cuyos datos han permitido estudiar la potencial regresión existente entre el número de copias del virus en AR y la población infectada.

Westhaus *et al.*, (2021) encontraron correlación en el número de casos de COVID-19 y la concentración de ARN del virus SARS-CoV-2 en el agua influente de 9 EDARS diferentes en el norte de Alemania (Figura 1). El ajuste de la recta refleja una buena capacidad predictiva del seguimiento del virus en aguas residuales, con valores próximos a cero en el término independiente de la recta, lo que implica que cuando no hay casos de COVID-19 en la población, no se detectarán copias de ARN viral en las AR (si $X=0$, $Y=0$).

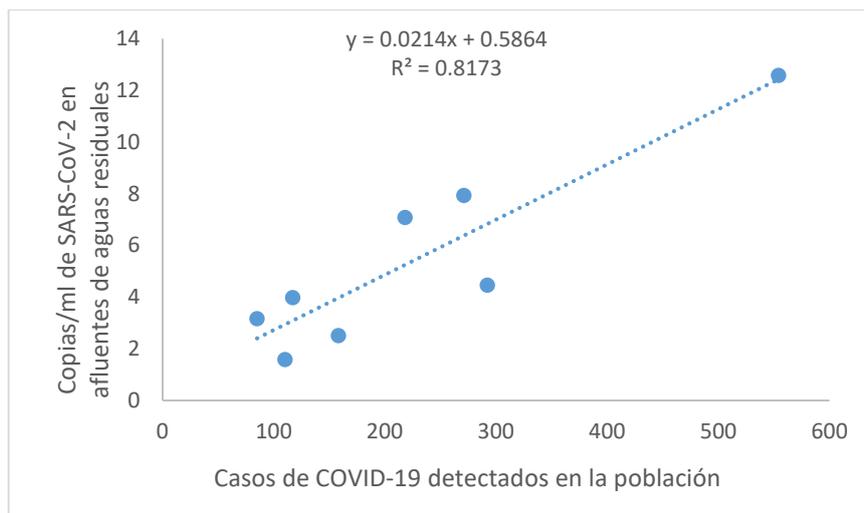


Figura 1: Correlación entre las copias de ARN de SARS-CoV-2 medidas y los casos de COVID-19 absolutos detectados en Alemania. Datos elaborados a partir de Westhaus *et al.*, (2021).

Otra alta regresión es la que se obtuvo graficando los datos aportados por Medema *et al.*, (2020), quienes realizaron un estudio en 6 ubicaciones diferentes de los Países Bajos donde buscaron la presencia de ARN del SARS-CoV-2 en los afluentes de EDARS. La detección la iniciaron el 4 de marzo, días antes del primer caso informado en la zona. No se encontraron copias de ARN del SARS-CoV-2 en las muestras previas al primer caso, pero a medida que aumentó el número de casos, el número de copias de ARN en agua aumentó (Figura 2).

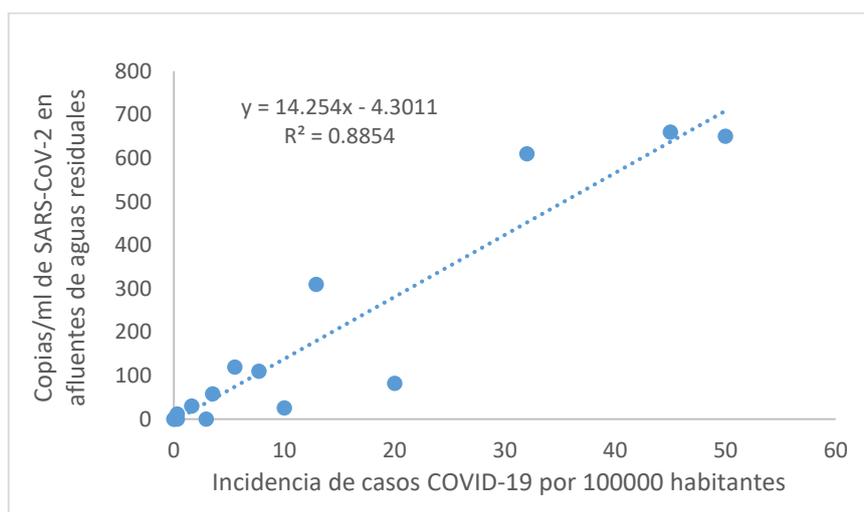


Figura 2: Correlación entre las copias de ARN de SARS-CoV-2 y la incidencia de casos de COVID-19 por 100.000 habitantes en los Países Bajos. Datos elaborados a partir de Medema *et al.*, (2020).

En otros estudios, tanto en Turquía (Aydın *et al.*, 2020) como en Francia (Trottier *et al.*, 2020), analizan la detección de SARS-CoV-2 en aguas residuales sin tratar, pero no se observó una regresión clara entre las copias de ARN detectado y el número de casos reportados (Figura 3). Además, en Turquía, no se detectaron copias de ARN del virus a pesar de haber casos confirmados de COVID-19 en la zona, en concreto, en dos muestras analizadas se obtuvieron 0 copias/ml de ARN viral pese a la detección de 2354 y 320 casos de COVID-19 en el momento del estudio.

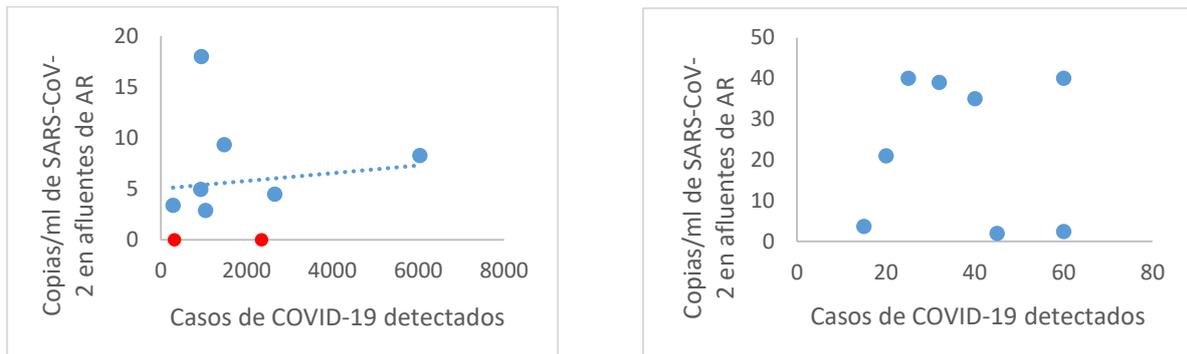


Figura 3: Relación entre las copias de ARN de SARS-CoV-2 por ml y los casos de COVID-19 absolutos detectados en Turquía (izquierda) y Francia (derecha). Datos elaborados a partir de Aydın *et al.*, (2020) y Trottier *et al.*, (2020).

En un estudio realizado en la Región de Murcia, España (Randazzo *et al.*, 2020), se analizaron muestras de agua residual del afluyente de 6 EDARS tomadas entre el 12 de marzo y 14 de abril. Tal y como se observa en los resultados mostrados en la Figura 4, no se encontró relación clara entre el número de casos y las copias de SARS-CoV-2 detectadas en el agua.

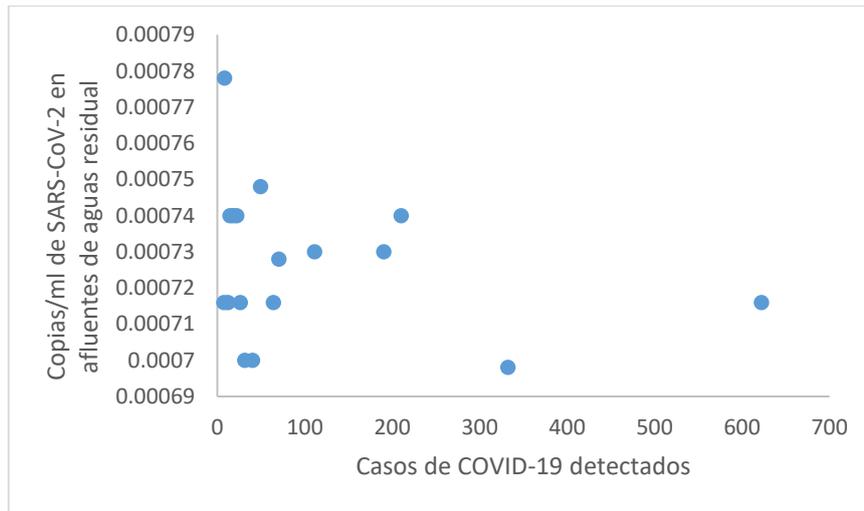
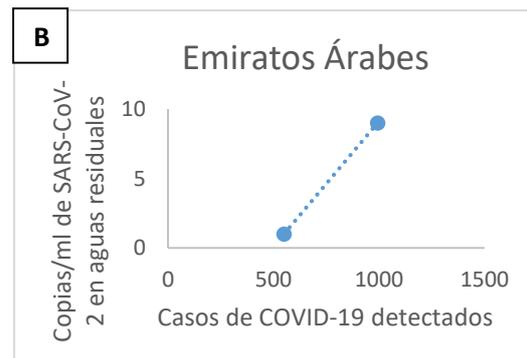
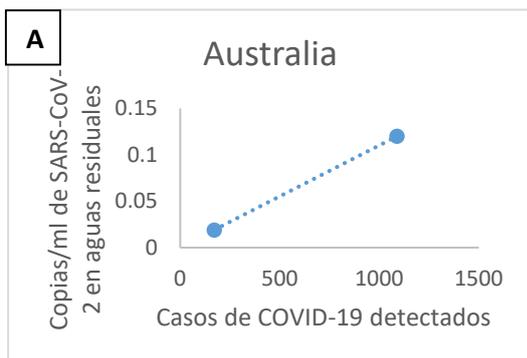


Figura 4: Relación entre la incidencia de casos COVID-19 y las copias por ml de SARS-CoV-2 detectadas en agua residual en Murcia. Elaborado a partir de los resultados de Randazo *et al.*, (2020).

Un número cada vez más abundante de artículos en diferentes países de todo el mundo, como, por ejemplo, Australia (Ahmed *et al.*, 2020), Japón (Haramoto *et al.*, 2020), Brasil (Prado *et al.*, 2020), Emiratos árabes (Hasan *et al.*, 2021) e India (Kumar *et al.*, 2021), han demostrado también la presencia de ARN de SARS-CoV-2 en aguas residuales y la posibilidad de monitorear la prevalencia de casos en la población a través de la WBE (Figura 5). El número de muestras era muy pequeño (solo dos en cada caso) pero si reflejan una tendencia creciente con los casos detectados.



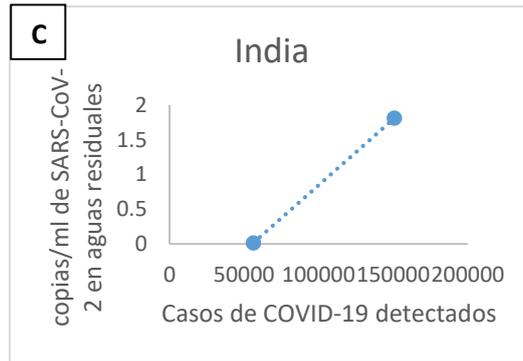


Figura 5: Casos de COVID-19 absolutos detectados con relación a las copias de SARS-CoV-2 detectadas en aguas residuales en A. Australia, B. Emiratos Árabes y C. India. Datos elaborados a partir de Ahmed *et al.*, (2020), Hasan *et al.*, (2021) y Kumar *et al.*, (2021).

En la Figura 6, se muestra un análisis conjunto de los estudios anteriormente citados, indicando la relación entre las infecciones en cada área de estudio y el número de copias/ml del virus en aguas residuales. Como se ha comprobado, la pendiente de los datos varía según la etapa de la pandemia y el número de copias varía según el lugar a pesar de presentar datos similares en los casos infectados. La agrupación de todos los resultados no evidencia ningún tipo de tendencia significativa, lo que parece apoyar la hipótesis de que el uso potencial de esta herramienta predictiva debe aplicarse teniendo en cuenta las condiciones locales (tipo de agua residual, población, etc.), no pudiéndose generalizar a otras ciudades o países.

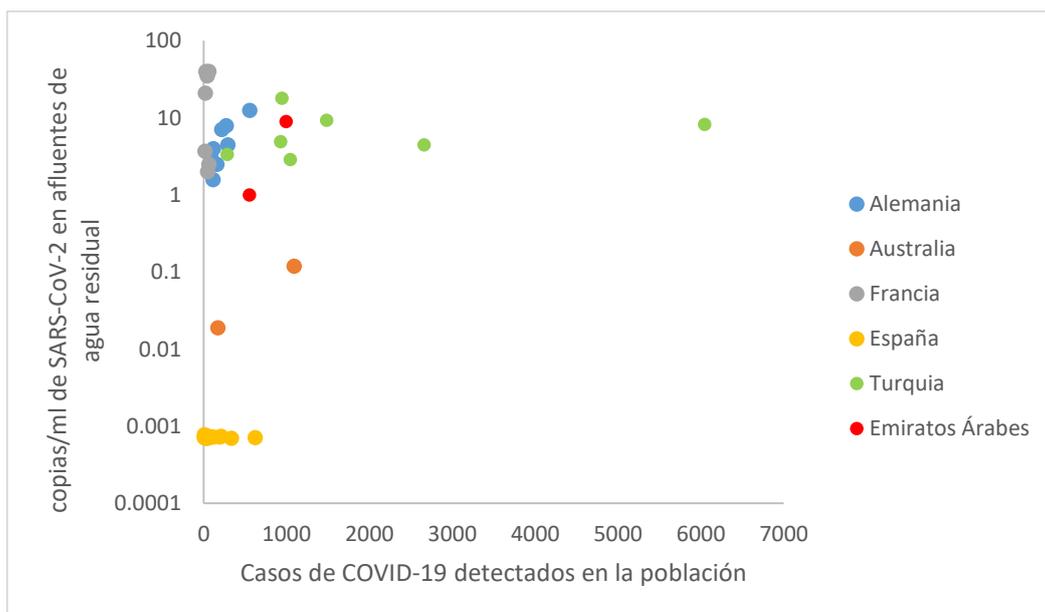


Figura 6: Relación entre el número de casos de COVID-19 detectados en la población y las copias de virus por ml en aguas residuales para cada localización estudiada para el SARS-CoV-2. Elaborado a partir de los resultados de

Westhaus *et al.*, (2021), Ahmed *et al.*, (2020), Hasan *et al.*, (2021), Aydın *et al.*, (2020), Trottier *et al.*, (2020) y Randazo *et al.*, (2020).

Los resultados del análisis de las aguas residuales en Alemania y Países Bajos muestran que el uso de las aguas residuales como indicadores de infección es bueno, al presentar una clara correlación entre el número de copias de ARN detectado y el número de casos COVID-19 de la población, pudiendo utilizar esta herramienta para predecir la infección en la población. En el resto de países, como España, Turquía o Francia, no se ha encontrado relación entre el número de casos y el número de copias del virus por lo que no podría aplicarse el potencial predictivo de las aguas residuales. Destacar que incluso en algunos casos no se han detectado copias del virus a pesar de haber casos documentados de COVID-19 en la zona.

En revisiones más recientes, como la de Hamouda *et al.*, (2021), se indica que la correlación de la pendiente de la relación entre el número de copias de ARN y el número de casos de infecciones detectadas en la población sugiere que los resultados del análisis de muestras de aguas residuales podrían ayudar a estimar el número de nuevas infecciones y que la correlación mejora cuando se introduce un periodo de retraso para dar cuenta de las infecciones asintomáticas.

Por el contrario, los datos aportados de Italia (La Rosa *et al.*, 2021), donde se analizaron 40 muestras de afluentes de aguas residuales recolectadas entre el 9 de octubre de 2019 y 28 de febrero de 2020 en 5 EDARS, no permitieron un estudio de regresión. En dicho trabajo solo se indica el porcentaje de positividad, detectándose 15 muestras positivas, 8 de ellas recolectadas antes del 21 de febrero de 2020, es decir, antes del primer caso autóctono documentado en Italia, por lo que los resultados mostraron que el virus ya estaba circulando por el norte de Italia a finales de 2019.

En Lousiana, EEUU, (Sherchan *et al.*, 2020), se obtuvieron muestras de afluentes de aguas residuales positivas en ARN de SARS-CoV-2 en abril, cuando el número de casos de COVID-19 documentado era de 6173 y 308 en las zonas respectivas a las 2 EDARS estudiadas. Se analizaron también muestras de enero, pero no se detectó ARN viral. Teniendo en cuenta que el primer caso de COVID-19 en la comunidad fue el 9 de marzo y no se detectó ARN viral en las aguas residuales hasta abril, se concluyó que el ARN viral en aguas residuales no es detectable hasta que los casos de COVID-19 son elevados (Sherchan *et al.*, 2020).

A pesar del enfoque prometedor de la WBE para determinar la prevalencia de COVID-19 en la población, hay una elevada incertidumbre (20-40 %) en los resultados obtenidos debido a un

gran número de variables que influyen en el muestreo y análisis del agua (Li *et al.*, 2021) siendo necesario el uso de virus sustitutos como estándares internos y la necesidad de mejorar aún más los enfoques analíticos para disminuir dicha incertidumbre. Debe también tenerse en cuenta que los trabajos no suelen indicar los caudales totales de aguas residuales por lo que el estudio ha tenido que centrarse en las concentraciones. Este aspecto introduce también una importante fuente de error dado que el caudal de aguas residuales puede ser muy variable entre ciudades con el mismo número de habitantes como consecuencia de las infiltraciones, lo que afectaría a la detección del virus a bajas concentraciones.

Se puede concluir que el potencial predictivo de las aguas residuales no es inequívoco, y que varía según el estudio realizado. Hay que tener en cuenta la elevada incertidumbre en los resultados obtenidos debido al número de variables que influyen. La cantidad de SARS-CoV-2 detectado en agua podría reflejar la verdadera prevalencia de la infección por COVID-19, incluyendo los pacientes no diagnosticados, mientras que los resultados clínicos solo informan de los pacientes diagnosticados.

Autores como Haramoto *et al.*, (2020) han resaltado la necesidad de realizar más investigaciones para establecer una metodología consenso y obtener resultados más uniformes.

4. ELIMINACIÓN DE SARS-COV-2 DE AGUAS RESIDUALES.

Los tratamientos de aguas residuales llevados a cabo en las EDARS tienen una gran importancia en evitar la liberación de SARS-CoV-2 al medio ambiente. Con el fin de determinar el rendimiento de las EDARS y la capacidad de eliminación del virus de los efluentes, este apartado se centrará en la revisión de estudios en los que se presentan concentraciones de virus en afluentes y efluentes de EDARS de diferentes partes del mundo.

La preocupación por la liberación del SARS-CoV-2 viene por la posible evasión del virus al tratamiento del agua en las EDARS, ya que los tratamientos con cloro, ozono o irradiación UV son efectivos cuando hay pocos sólidos en suspensión o disueltos en el agua. Por el contrario, el virus puede encontrar un huésped o escondite resistente a cloración u ozonización y no ser eliminado (Aydın *et al.*, 2020).

Estudios recientes (Kumar *et al.*, 2021) concluyen que el ARN del SARS-CoV-2 se elimina en los tratamientos de aguas residuales que incluyen tratamientos secundarios (lodos activos y

aireación) y tratamientos terciarios (decantación, coagulación, floculación, desinfección, filtros de arena, irradiación UV y NaClO).

Kumar *et al.*, (2021) analizaron la cantidad de ARN del SARS-CoV-2 de una EDAR en Ahmedabad, India, a lo largo de un tratamiento de las aguas con un sistema de manta de lodo anaeróbico de flujo ascendente (UASB) y tanque de aireación. Se observó la eliminación completa del virus en los efluentes, de 0,016 copias/ml a 0 copias/ml, presentando la EDAR un rendimiento del 100 % y un rendimiento del 6,25 % después del tanque de aireación (de 0,016 copias/ml a 0,015 copias/ml).

En el hospital Wuchang Fangcang, en Wuhan, China, se detectaron altos niveles de ARN de SARS-CoV-2 ($14,7 \times 10^3$ y $7,5 \times 10^3$ copias/L) en fosas sépticas del hospital después de un tratamiento de desinfección con 800 g/m^3 de hipoclorito sódico. Con el fin de mejorar el rendimiento y asegurar la eliminación completa, se elevó la cantidad a 6700 g/m^3 , consiguiendo la eliminación completa de las copias de ARN (Zhang *et al.*, 2020). Los tanques sépticos podrían suponer una fuente de liberación de ARN viral al medio ambiente si no se realiza una desinfección eficiente.

En la Región de Murcia, España, se obtuvieron resultados positivos en 2/18 muestras después de un tratamiento de lodos activados y ninguna muestra positiva (0/12) después de un tratamiento terciario con hipoclorito de sodio y radiación UV (Randazzo *et al.*, 2020). En EEUU (Tabla 1), no se detectó ninguna muestra positiva en los efluentes secundarios tratados y efluentes finales examinados (lodos activos y cloración) (Sherchan *et al.*, 2020). Lo mismo ocurrió en los Emiratos Árabes después de tratamiento preliminar, primario, secundario (ASP ozono/aclarado) y terciario (filtración de arena, desinfección y cloración) pasando de 994 copias/ml en el afluente a no detectar ARN en los efluentes (Hasan *et al.*, 2021), presentando las EDARS de ambos países un rendimiento del 100 %.

Tabla 1. Rendimiento de una EDAR en EEUU determinando las copias/ml de ARN viral en el afluente, efluente y después de un tratamiento secundario. Tabla elaborada a partir de los resultados de Sherchan *et al.*, (2020).

Muestra	Muestras positivas	Rango de concentración (copias/ml)
Afluente	2/7	3,1 - 7,5
Tratamiento secundario	0/4	0

Efluente	0/4	0
RENDIMIENTO	100 %	

Al contrario de lo observado en los artículos anteriores, en algunos estudios sí se encontraron copias de ARN de SARS-CoV-2 en los efluentes de las EDARS. En el estado de Renania del Norte-Westfalia, Alemania, se evaluó la eficiencia de eliminación del SARS-CoV-2 en tres EDARS, analizando las copias/ml después de un tratamiento terciario y en el efluente (Westhaus *et al.*, 2021).

En la primera EDAR observaron una mayor concentración de copias/ml de ARN en el efluente que, en el afluente, obteniendo un rendimiento negativo, lo que justificaron como un reparto desigual de la carga viral en las muestras, al igual que en la EDAR 3. En la EDAR 2, después de un tratamiento terciario se detectó una mayor concentración de ARN viral en las aguas obteniendo un rendimiento negativo (-12,33 %), pero en el efluente, después de un tratamiento con ozonización y filtración, se redujo la carga viral, aunque no se eliminó por completo, presentando un rendimiento bajo (Tabla 2).

Tabla 2: Copias/ml de ARN de SARS-CoV-2 en agua residual en 3 EDARS de Alemania del afluente, después del tratamiento terciario y del efluente. Tabla elaborada a partir de los resultados de Westhaus *et al.*, (2021).

Muestra	EDAR 1 (copias/ml)	EDAR 2 (copias/ml)	EDAR 3 (copias/ml)
Afluente	11,22	4,46	2,51
Efluente	25,11	3,54	7,94
Tratamiento terciario		5,01	
RENDIMIENTO	-123,79 %	20,62 %*	-216,33 %
		-12,33 %	

* Tras tratamiento con ozono y filtración

En Japón, Haramoto *et al.*, (2020) detectaron ARN de SARS-CoV-2 en una de las cinco muestras recogida después del tratamiento secundario (proceso de lodos activados) con una concentración de $2,4 \times 10^3$ copias/L, menor a las $7,3 \times 10^4$ copias/L detectadas en el afluente.

En general, puede concluirse que, a pesar de que la mayoría de los procesos de tratamiento son muy eficaces en la eliminación de virus, el ARN viral puede estar presente en los efluentes de las depuradoras, aunque autores como Randazzo *et al.*, (2020) sugieren que los virus

encontrados en aguas residuales no son infectivos. Además, los virus envueltos, como es el SARS-CoV-2, son más inestables en el medio ambiente que los no envueltos, teniendo una menor propagación en el medio ambiente (Gundy *et al.*, 2009).

En la revisión de Lesimple *et al.*, (2020) exponen algunos de los tratamientos clásicos y avanzados y sistemas basados en membranas y proponen la combinación de diferentes técnicas en tratamientos primarios, secundarios y terciarias para eliminar el virus lo suficiente como para limitar la posibilidad de contaminación ambiental.

Debido a la variabilidad de los resultados, es evidente que se precisa un tratamiento de las aguas residuales que asegure la eliminación del virus en las EDARS, con el fin de garantizar un rendimiento del 100 %.

5. PROTOCOLO DE ESTUDIO DEL SARS-CoV-2 EN AGUAS RESIDUALES. MÉTODO DE DETECCIÓN.

Para la detección y estudio del SARS-CoV-2 en las aguas residuales, diferentes autores han aplicado diversas técnicas. Haciendo una revisión de los protocolos de varios trabajos (Ahmed *et al.*, 2020; Haramoto *et al.*, 2020; Mlejnkova *et al.*, 2020; Randazzo *et al.*, 2020; Sherchan *et al.*, 2020; Hata *et al.*, 2021; Kumar *et al.*, 2021; La Rosa *et al.*, 2021; Westhaus *et al.*, 2021), en el siguiente apartado se mostrarán los pasos seguidos y las técnicas que parecen dar un mejor resultado.

a. Muestreo

El proceso comienza con la recolección de muestras de aguas residuales, que pueden ser congeladas (La Rosa *et al.*, 2021; Westhaus *et al.*, 2021) o almacenada a unos 4°C para su posterior análisis (Ahmed *et al.*, 2020; Mlejnkova *et al.*, 2020).

Generalmente, antes de llevar a cabo los pasos posteriores del proceso, se realiza una inactivación del virus para aumentar la seguridad del protocolo analítico tanto para el personal de laboratorio como del medio ambiente. Para ello, una forma de inactivarlo, es someter la muestra durante 30 minutos con un tratamiento a 56°C. Este procedimiento no va a afectar a la detección del ARN del SARS-CoV-2 (La Rosa *et al.*, 2021).

Posteriormente, se centrifuga la muestra y se filtra el sobrenadante para eliminar partículas grandes y sólidos en suspensión (Sherchan *et al.*, 2020).

b. Concentración

Una vez obtenida la muestra de agua, se procede a la concentración del virus en las aguas residuales. Para este paso se han descrito diferentes formas de concentración:

- a. Centrifugación de la muestra de agua a 4700 x g durante 30 minutos recogiendo el sobrenadante y posteriores centrifugaciones seriadas (Westhaus *et al.*, 2021).
- b. Método de separación de dos fases (PEG-dextrano): Es un método recomendado por la OMS para la vigilancia ambiental de la circulación del poliovirus, realizando algunas modificaciones. La muestra de agua se centrifuga a 1200 x g durante 30 minutos para separar el pellet. Después, se purifica la muestra con cloroformo al 20 % durante 1 hora a 1400 x g para obtener una mayor sensibilidad de detección (La Rosa *et al.*, 2021).
- c. Método de polietilenglicol (PEG): Se mezcla PEG y NaCl en un volumen de agua residual filtrada y se incuba a 10 °C y 100 rpm. A continuación, la mezcla se centrifuga a 13000 x g durante 90 min, el sobrenadante se descarta y el sedimento se resuspende en 300 µl de agua libre de ARNasa (Mlejnkova *et al.*, 2020).
- d. Floculación directa: Se utiliza una solución de extracto de carne de res en tampón de glicina (0,05 M). Se acidifica la muestra de agua residual y se añade el extracto de carne floculado mediante la adición de HCl 1 y 0,1 M. Se agita la suspensión durante 10 h para permitir que los virus presentes se absorban en los flóculos y posteriormente se centrifuga a 10000 g durante 30 min a 4°C. El sedimento se disuelve en 8 ml de solución salina tamponada con fosfato (PBS) (Mlejnkova *et al.*, 2020).
- e. Extracción directa de ARN mediante membranas electronegativas: Se ajusta el pH de las muestras a 3,5 - 4 usando HCl y se pasa la muestra a través de membranas electronegativas de 0,45 µm de tamaño de poro y 90 mm de diámetro a través de un embudo de vidrio (MerckMillipore) (Ahmed *et al.*, 2020). Otra forma de extracción mediante membrana electronegativa es mezclar la muestra de agua con MgCl 25 mM y pasarlo a través de un filtro electronegativo, como puede ser una membrana mixta de éster de celulosa (Haramoto *et al.*, 2020). Los iones de magnesio se eliminan con el paso de H₂SO₄ y el virus se eluye con el paso de NaOH 1,0 mM (Sherchan *et al.*, 2020).

- f. Ultrafiltración: Se centrifugan las muestras a 4750 g durante 30 minutos. Luego se elimina el sobrenadante y se centrifuga a 3500 g durante 15 min y se pasa a través de un filtro centrifugo Centricon® Plus-70 a 1000 g durante 2 min. La muestra concentrada se recoge con una pipeta (Ahmed *et al.*, 2020).
- g. Otros métodos como precipitación-absorción de hidróxido de aluminio (Randazzo *et al.*, 2020) y placa de filtro de 96 pocillos que tienen capacidad para filtrar moléculas de menos de 10 kD (Kumar *et al.*, 2021).

Haciendo una comparativa entre los métodos utilizados para concentrar las muestras, los más utilizados son precipitación utilizando PEG seguido de centrifugación, las columnas de ultrafiltración y la unión de virus a membranas electronegativas (Hasan *et al.*, 2021).

El uso de PEG para concentrar virus presenta un mayor rendimiento debido a la alta sensibilidad de la técnica y la eliminación de la inhibición. Además, son fáciles de usar y baratos, en comparación con las columnas de ultrafiltración que requiere de muchas rondas de centrifugación para concentrar la muestra. Sin embargo, estas columnas son más sensibles y más adecuadas para detectar concentraciones más bajas del virus en el agua residual (Hasan *et al.*, 2021). El método de concentración del virus es un factor esencial que precisa de atención para poder mejorar la sensibilidad de detección de SARS-CoV-2 en aguas residuales (Ahmed *et al.*, 2020). Algunos autores como Hasan *et al.*, (2021), recomiendan el uso del método PEG para la concentración.

c. Extracción de ARN

El siguiente paso es aislar el ARN del virus. Para ello, se utilizan diferentes kits comerciales como el Kit NucleoSpin RNA virus (Westhaus *et al.*, 2021), NucliSENS miniMAG con sílice magnético (Mlejnkova *et al.*, 2020; La Rosa *et al.*, 2021), Kit RNeasy Power Microbiome (Ahmed *et al.*, 2020) y RNeasy PowerMicrobiome Kit (Qiagen)(Ahmed *et al.*, 2020).

El uso de kits de extracción de ARN tiene la ventaja adicional de facilitar el análisis de alto rendimiento de las muestras de aguas residuales, proporcionando ARN de alta calidad sin pérdida de biodiversidad de virus (Hamouda *et al.*, 2021).

d. Cuantificación del ARN

El ARN se cuantifica posteriormente mediante RT-qPCR, una reacción inversa de PCR que permite cuantificar las copias de ARN presentes en la muestra analizada. Para ello, es necesario sintetizar ADNc de la cadena de ARN a través de una transcripción inversa y llevar a cabo varios ciclos de PCR utilizando una sonda (Tabla 3) (Westhaus *et al.*, 2021). Los resultados obtenidos se visualizan mediante electroforesis en gel (La Rosa *et al.*, 2021), y, por último, se utilizan diversos métodos para el análisis de la secuencia, como Sanger, MiSeq (Hata *et al.*, 2021), Illumina (Ahmed *et al.*, 2020), siendo el más utilizado el método Sanger.

Tabla 3: Resumen de las sondas más utilizadas en los diferentes estudios.

Ensayo	Nombre	Función	Secuencia (5'-3')	Referencia
2019-nCoV_N2	CDCN2-F	Forward primer	TTACAAACATTGGCCGCAA	(Hata <i>et al.</i> , 2021)
	CDCN2-R	Reverse primer	GCGCGACATTCCGAAGAA	
	CDCN2-P	TaqMan Probe	ACAATTTGCCCCCAGCGCTTCAG-	
2019-nCoV_N3	CDCN3-F	Forward primer	GGGAGCCTTGAATACACCAAAA	
	CDCN3-R	Reverse primer	TGTAGCACGATTGCAGCATTG	
	CDCN3-P	TaqMan Probe	AYCACATTGGCACCCGCAATCCTG-	
NIID_2019-nCoV_N	NIID-F	Forward primer	AAATTTGGGGACCAGGAAC	
	NIID-R	Reverse primer	TGGCACCTGTGTAGGTCAAC	
	NIID-P	TaqMan Probe	ATGTCGCGCATTGGCATGGA	
2019-nCoV_N1	CDCN1-F	Forward primer	GACCCAAAATCAGCGAAAT	(Haramoto <i>et al.</i> , 2020)
	CDCN1-R	Reverse primer	TCTGGTACTGCCAGTTGAATCTG	
	CDCN1-P	TaqMan probe	FAM-ACCCCGCATTACGTTTGGTGGACC-BHQ1	
2019-nCoV_N2	CDCN2-F	Forward primer	TTACAAACATTGGCCGCAA	
	CDCN2-R	Reverse primer	GCGCGACATTCCGAAGAA	
	CDCN2-P	TaqMan probe	FAM-ACAATTTGCCCCCAGCGCTTCAG-BHQ1	
NIID_2019-nCoV_N	NIID-F2	Forward primer	AAATTTGGGGACCAGGAAC	
	NIID-R2	Reverse primer	TGGCACCTGTGTAGGTCAAC	
	NIID-P2	TaqMan Probe	ATGTCGCGCATTGGCATGGA	
N_Sarbeco		Forward primer	CACATTGGCACCCGCAATC	(Ahmed <i>et al.</i> , 2020)
		Reverse primer	GAGGAACGAGAAGAGGCTTG	
		TaqMan Probe	FAM-ACTTCCTCAAGGAACAACA	
	Forward primer	AAATTTGGGGACCAGGAAC		

NIID_2019-nCoV_N		Reverse primer	TGGCAGCTGTGTAGGTCAAC	(Westhaus <i>et al.</i> , 2021)
		TaqMan Probe	FAM-ATGTCGCGCATTGGCA	
E_Sarbeco		Forward primer	ACAGGTACGTTAATAGTTAATAGCGT	
		Reverse primer	ATATTGCAGCAGTACGCACACA	
		TaqMan Probe	6-Fam ACACTAGCCATCCTTACTGCGCTTCG BBQ1	
RdRP_SARSr		Forward primer	GTGARATGGTCATGTGTGGCGG	
		Reverse primer	CARATGTTAAASACACTATTAGCATA	
		TaqMan Probe	6-Fam CAGGTGGAACCTCATCAGGAGATGC BBQ1	
M-475		Forward primer	TGTGACATCAAGGACCTGCC	
		Reverse primer	CTGAGTCACCTGCTACACGC	
		TaqMan Probe	6-Fam TGTTGCTACATCACGAACGC BHQ1	
SARS-CoV-2 N-gene		Forward primer	TGGCCGCAAATTGCACAATT	
		Reverse primer	TGTAGGTCAACCACGTTCCC	
		TaqMan Probe	6-Fam CGCATTGGCATGGAAGTAC BHQ1	
2019-nCoV_N1	CDC N1	Forward primer	GACCCCAAATCAGCGAAAT	(Sherchan <i>et al.</i> , 2020)
	CDC N1	Reverse primer	TCTGGTACTGCCAGTTGAATCTG	
	CDC N1	TaqMan Probe	FAM-ACCCCGCATTACGTTTGGTGGACC-BHQ1	
2019-nCoV_N2	CDC N2	Forward primer	TTACAAACATTGGCCGCAA	
	CDC N2	Reverse primer	GCGCGACATTCCGAAGAA	
	CDC N2	TaqMan Probe	FAM-ACAATTTGCCCCAGCGCTTCAG-BHQ1	

e. Virus controles

El uso de un virus sustituto adecuado como estándar interno o externo es necesario para cuantificar el proceso de detección de pérdida de ARN, minimizar la incertidumbre del análisis y mejorar la estimación de la prevalencia de SARS-CoV-2 utilizando WBE.

Los virus utilizados deben ser morfológicamente similares al virus objetivo y deben de ser lo suficientemente distintos genéticamente para que en el ensayo de detección no se produzcan reacciones cruzadas. Por lo tanto, los virus más utilizados en los estudios revisados son el coronavirus de gastroenteritis transmisible (TGEV) (Mlejnkova *et al.*, 2020), el fago MS2 (Kumar *et al.*, 2021), fago F, el norovirus murino (MNV) (Hata *et al.*, 2021), colifago MS2 y el tobamovirus del moteado suave del pimiento (PMMoV) (Haramoto *et al.*, 2020).

El desarrollo de un protocolo estandarizado que pueda adoptarse a nivel mundial es necesario para la optimización en la detección de SARS-CoV-2 en aguas residuales. Se espera que la convocatoria de estudios adicionales para optimizar el método analítico para la detección de SARS-CoV-2 en aguas residuales conduzca al desarrollo de un protocolo estandarizado que pueda adoptarse a nivel mundial.

Recientemente en España, el Ministerio de Ciencia e Innovación ha propuesto un protocolo estandarizado para la detección de SARS-CoV-2 en aguas residuales basado en el protocolo descrito por Randazzo *et al.*, (2020). En dicho protocolo, se propone el almacenamiento de la muestra de agua residual a 3 ± 2 °C antes de su análisis, al igual que han sugerido otros autores como Hamouda *et al.*, (2021). Para la concentración de las muestras, se sugiere el uso de AlCl₃ seguido de centrifugación, a pesar de que el método más utilizado y recomendado en otros estudios es el uso de PEG seguido de centrifugación (Hasan *et al.*, 2021). Los kits QIAamp® Viral RNA (Qiagen) o Nucleospin RNA virus Kit serán los utilizados para la extracción del ARN viral. Por último, para la cuantificación del ARN viral, describen el uso de la PCR cuantitativa, al igual que en los otros estudios.

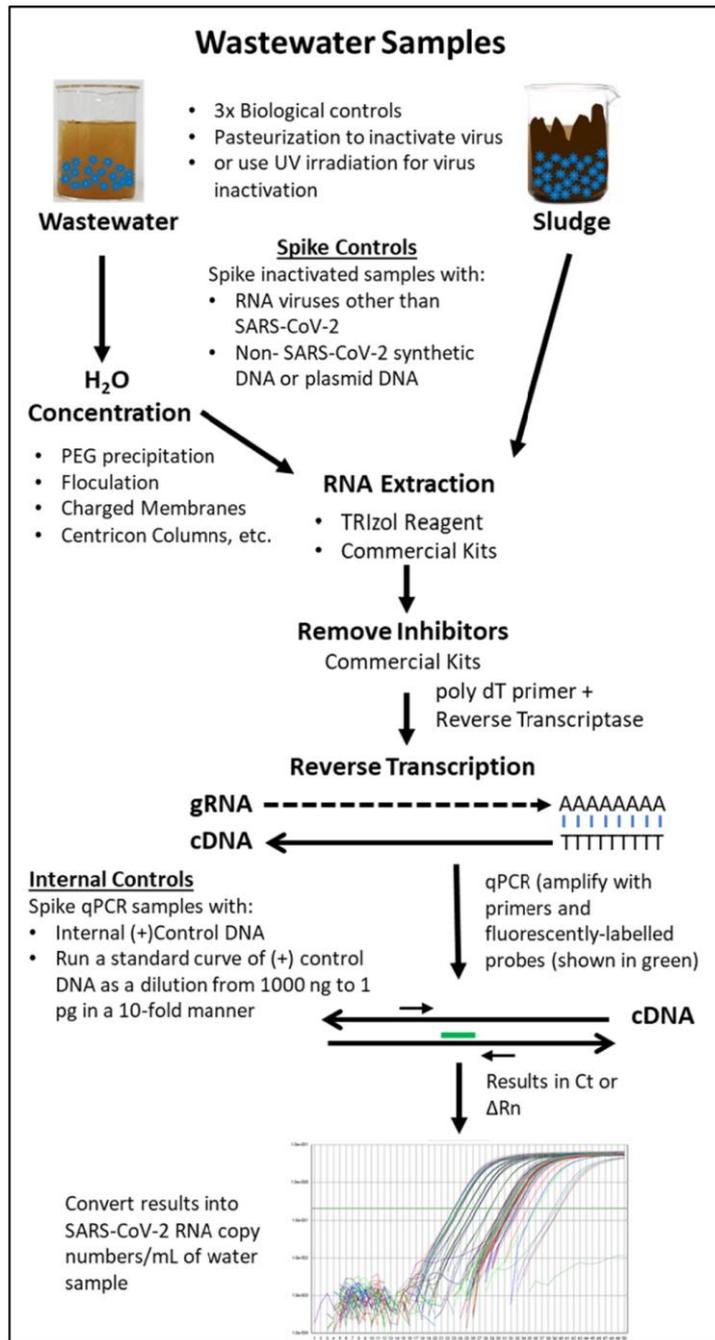


Figura 7: Resumen del protocolo de detección de SARS-CoV-2 en aguas residuales. (Hamouda *et al.*, 2021).

6. CONCLUSIONES

Ante la llegada del nuevo virus SARS-CoV-2 y la pandemia de COVID-19 a la que se enfrenta el mundo, las aguas residuales tienen un papel importante es su vigilancia y seguimiento. A pesar del enfoque prometedor del uso de la WBE para determinar la prevalencia de COVID-19 en la población, hay que destacar la elevada incertidumbre en los resultados obtenidos, así como

las variaciones según el estudio realizado debidas al gran número de variables que influyen en el muestreo y análisis del agua. Se puede concluir que el uso potencial de esta herramienta predictiva puede ser útil aplicándose a condiciones locales, no pudiéndose generalizar a otras ciudades o países.

A pesar de que la mayoría de los procesos de tratamiento son eficientes en la eliminación del virus, el ARN viral sigue presente en los efluentes de algunas depuradoras, siendo liberado este al medio ambiente, por lo que se precisa un tratamiento de las aguas residuales que asegure la eliminación del virus en las EDARS, con el fin de garantizar rendimientos del 100 %.

Existe una gran variabilidad entre los resultados obtenidos en la detección del SARS-CoV-2 en las diferentes partes del mundo, siendo, la diversidad de métodos analíticos utilizados para la detección del mismo, una de las causas de dicha variabilidad. Es necesario el uso de un protocolo analítico estandarizado a nivel mundial para el estudio del SARS-CoV-2 en aguas residuales que permita la correcta comparación e interpretación de los resultados. En este sentido, la reciente propuesta de un método oficial por parte del Ministerio favorece dicha comparación.

7. REFERENCIAS

- 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. y 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", *Science of the Total Environment*. Elsevier B.V., 728, p. 138764. doi:10.1016/j.scitotenv.2020.138764.
- Aydın, S., Nakiyingi, B. A., Esmen, C., Güneysu, S. y Ejjada, M. (2020) "Environmental impact of coronavirus (COVID-19) from Turkish perspective", *Environment, Development and Sustainability*, (0123456789), pp. 3–10. doi:10.1007/s10668-020-00933-5.
- Feng, B., Xu, K., Gu, S., Zheng, S., Zou, Q., Xu, Y., Yu, L., Lou, F., Yu, F., Jin, T., Li, Y., Sheng, J., Yen, H. L., Zhong, Z., Wei, J. y Chen, Y. (2021) "Multi-route transmission potential of SARS-CoV-2 in healthcare facilities", *Journal of Hazardous Materials*. Elsevier B.V., 402(August 2020), p. 123771. doi:10.1016/j.jhazmat.2020.123771.
- Gundy, P. M., Gerba, C. P. y Pepper, I. L. (2009) "Survival of Coronaviruses in Water and Wastewater", *Food and Environmental Virology*, 1(1), pp. 10–14. doi:10.1007/s12560-008-9001-6.
- Hamouda, M., Mustafa, F., Maraqa, M., Rizvi, T. y Aly Hassan, A. (2021) "Wastewater surveillance for SARS-CoV-2: Lessons learnt from recent studies to define future applications", *Science of the Total Environment*. Elsevier B.V., 759, p. 143493. doi:10.1016/j.scitotenv.2020.143493.
- Han, J. y He, S. (2021) "Urban flooding events pose risks of virus spread during the novel coronavirus (COVID-19) pandemic", *Science of the Total Environment*. Elsevier B.V., 755, p. 142491. doi:10.1016/j.scitotenv.2020.142491.
- Haramoto, E., Malla, B., Thakali, O. y Kitajima, M. (2020) "First environmental surveillance for the presence of SARS-CoV-2 RNA in wastewater and river water in Japan", *Science of the Total Environment*. The Authors, 737, p. 140405. doi:10.1016/j.scitotenv.2020.140405.
- Hart, O. E. y Halden, R. U. (2020) "Computational analysis of SARS-CoV-2/COVID-19 surveillance by wastewater-based epidemiology locally and globally: Feasibility, economy, opportunities and challenges", *Science of the Total Environment*. The Authors, 730, p. 138875. doi:10.1016/j.scitotenv.2020.138875.
- Hasan, S. W., Ibrahim, Y., Daou, M., Kannout, H., Jan, N., Lopes, A., Alsafar, H. y Yousef, A. F. (2021) "Detection and quantification of SARS-CoV-2 RNA in wastewater and treated effluents: Surveillance of COVID-19 epidemic in the United Arab Emirates", *Science of the Total Environment*. Elsevier B.V., 764(xxxx), p. 142929. doi:10.1016/j.scitotenv.2020.142929.
- Hata, A., Hara-Yamamura, H., Meuchi, Y., Imai, S. y Honda, R. (2021) "Detection of SARS-CoV-2 in wastewater in Japan during a COVID-19 outbreak", *Science of the Total Environment*. Elsevier B.V., 758(xxxx), p. 143578. doi:10.1016/j.scitotenv.2020.143578.
- Kumar, M., Kuroda, K., Patel, A. K., Patel, N., Bhattacharya, P., Joshi, M. y Joshi, C. G. (2021) "Decay of SARS-CoV-2 RNA along the wastewater treatment outfitted with Upflow Anaerobic Sludge Blanket (UASB) system evaluated through two sample concentration techniques", *Science of the Total Environment*. Elsevier B.V., 754, p. 142329. doi:10.1016/j.scitotenv.2020.142329.
- Lesimple, A., Jasim, S. Y., Johnson, D. J. y Hilal, N. (2020) "The role of wastewater treatment plants as tools for SARS-CoV-2 early detection and removal", *Journal of Water Process Engineering*, 38, pp. 1–10. doi:10.1016/j.jwpe.2020.101544.
- Li, X., Zhang, S., Shi, J., Luby, S. P. y Jiang, G. (2021) "Uncertainties in estimating SARS-CoV-2 prevalence by wastewater-based epidemiology", *Chemical Engineering Journal*. Elsevier B.V., 415(February), p. 129039. doi:10.1016/j.cej.2021.129039.
- Medema, G., Heijnen, L., Elsinga, G., Italiaander, R. y Brouwer, A. (2020) "Presence of SARS-Coronavirus-2 RNA in Sewage and Correlation with Reported COVID-19 Prevalence in the Early Stage of the Epidemic in the Netherlands", *Environmental Science and Technology Letters*, 7(7), pp. 511–516. doi:10.1021/acs.estlett.0c00357.
- Mlejnkova, H., Sovova, K., Vasickova, P., Ocenaskova, V., Jasikova, L. y Juranova, E. (2020) "Preliminary study

of Sars-Cov-2 occurrence in wastewater in the Czech Republic", *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 17(15), pp. 1–9. doi:10.3390/ijerph17155508.

Polo, D., Quintela-Baluja, M., Corbishley, A., Jones, D. L., Singer, A. C., Graham, D. W. y Romalde, J. L. (2020) "Making waves: Wastewater-based epidemiology for COVID-19 – approaches and challenges for surveillance and prediction", *Water Research*. Elsevier Ltd, 186, p. 116404. doi:10.1016/j.watres.2020.116404.

Prado, T., Fumian, T. M., Mannarino, C. F., Maranhão, A. G., Siqueira, M. M. y Miagostovich, M. P. (2020) "Preliminary results of SARS-CoV-2 detection in sewerage system in niterói municipality, Rio de Janeiro, Brazil", *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 115(7), pp. 1–3. doi:10.1590/0074-02760200196.

Randazzo, W., Truchado, P., Cuevas-Ferrando, E., Simón, P., Allende, A. y Sánchez, G. (2020) "SARS-CoV-2 RNA in wastewater anticipated COVID-19 occurrence in a low prevalence area", *Water Research*, 181. doi:10.1016/j.watres.2020.115942.

La Rosa, G., Mancini, P., Bonanno Ferraro, G., Veneri, C., Iaconelli, M., Bonadonna, L., Lucentini, L. y Suffredini, E. (2021) "SARS-CoV-2 has been circulating in northern Italy since December 2019: Evidence from environmental monitoring", *Science of the Total Environment*. Elsevier B.V., 750(December 2019), p. 141711. doi:10.1016/j.scitotenv.2020.141711.

Sharma, A. K. (2020) "Novel Coronavirus Disease (COVID-19)", *Resonance*, 25(5), pp. 647–668. doi:10.1007/s12045-020-0981-3.

Sherchan, S. P., Shahin, S., Ward, L. M., Tandukar, S., Aw, T. G., Schmitz, B., Ahmed, W. y Kitajima, M. (2020) "First detection of SARS-CoV-2 RNA in wastewater in North America: A study in Louisiana, USA", *Science of the Total Environment*. Elsevier B.V., 743, p. 140621. doi:10.1016/j.scitotenv.2020.140621.

Trottier, J., Darques, R., Ait Mouheb, N., Partiot, E., Bakhache, W., Deffieu, M. S. y Gaudin, R. (2020) "Post-lockdown detection of SARS-CoV-2 RNA in the wastewater of Montpellier, France", *One Health*. Elsevier, 10(August), p. 100157. doi:10.1016/j.onehlt.2020.100157.

Weiss, S. R. y Leibowitz, J. L. (2011) *Coronavirus pathogenesis, Advances in Virus Research*. doi:10.1016/B978-0-12-385885-6.00009-2.

Weiss, S. R. y Navas-Martin, S. (2005) "Coronavirus Pathogenesis and the Emerging Pathogen Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus", *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 69(4), pp. 635–664. doi:10.1128/mmbr.69.4.635-664.2005.

Westhaus, S., Weber, F. A., Schiwy, S., Linnemann, V., Brinkmann, M., Widera, M., Greve, C., Janke, A., Hollert, H., Wintgens, T. y Ciesek, S. (2021) "Detection of SARS-CoV-2 in raw and treated wastewater in Germany – Suitability for COVID-19 surveillance and potential transmission risks", *Science of the Total Environment*. Elsevier B.V., 751, p. 141750. doi:10.1016/j.scitotenv.2020.141750.

Zhang, D., Ling, H., Huang, X., Li, J., Li, W., Yi, C., Zhang, T., Jiang, Y., He, Y., Deng, S., Zhang, X., Wang, X., Liu, Y., Li, G. y Qu, J. (2020) "Potential spreading risks and disinfection challenges of medical wastewater by the presence of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) viral RNA in septic tanks of Fangcang Hospital", *Science of the Total Environment*. Elsevier B.V., 741, p. 140445. doi:10.1016/j.scitotenv.2020.140445.