

Revisão dos Procedimentos e Desafios Associados à Vigilância Epidemiológica do SARS-CoV-2 em Águas Residuais

Review of Procedures and Challenges Associated with an Epidemiological Surveillance of SARS-CoV-2 in Wastewater

Pedro H. Mainardi,^{a,*} Ederio D. Bidoia^a

^a Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Instituto de Biociências, Departamento de Biologia Geral e Aplicada, CEP 13506-900, Rio Claro-SP, Brasil.

*E-mail: pedro.h.mainardi@unesp.br

Recebido em: 27 de Junho de 2021

Aceito em: 5 de Janeiro de 2022

Publicado online: 31 de Março de 2022

COVID-19 patients, including asymptomatic, pre-symptomatic and mild cases, were frequently seen to contain in feces and urine samples particles of SARS-CoV-2. Hence, studies to detect the new coronavirus in residual water, which gather and concentrate excrements, have been useful as a viral screening tool. This type of monitoring, in addition to have a great potential to serve as a non-invasive early warning tool of possible outbreaks of COVID-19, would provide better predictions about the propagation of SARS-CoV-2 and contribute to the maintenance of public health. From a literature review based on articles indexed in the main scientific databases, it was evident that, although current viral detection procedures in wastewater are considered as reliable and effective, they have been facing major challenges in relation to the SARS-CoV-2 monitoring. In this review article, it was described the procedures used to detect SARS-CoV-2 in wastewater, usually through RT-qPCR methods, and the challenges associated with the epidemiological surveillance of the new coronavirus in this environment, especially in the stages of sampling, preservation, sample processing, interpretation and experimental validation, in addition to the management and dissemination of the monitoring data.

Keywords: Molecular Biochemistry; environmental monitoring; epidemiological monitoring; WBE; collective health; preventive medicine.

1. Introdução

O SARS-CoV-2 é um novo tipo de coronavírus capaz de infectar humanos e causar a síndrome respiratória aguda grave COVID-19, doença responsável por graves infecções no sistema respiratório humano¹. Embora de origem controversa, o SARS-CoV-2, que filogeneticamente pertence à família *Coronaviridae*, gênero *Betacoronavirus* e subgênero *Sarbecovirus*, foi detectado pela primeira vez em 31 de dezembro de 2019 na cidade de Wuhan, na China^{2,3}. A COVID-19, devido a sua alta taxa e disseminação e letalidade, foi considerada uma emergência de saúde global pela Organização Mundial da Saúde (OMS) no final de janeiro de 2020 e adquiriu proporções pandêmicas em março de 2020⁴. De acordo com dados da OMS, no ano de 2020, cerca de 222 países, áreas ou territórios tinham sido afetados pela COVID-19, com aproximadamente 81 475 000 casos confirmados e 1 798 050 óbitos⁵.

Pacientes com COVID-19, incluindo casos leves, pré-sintomáticos e assintomáticos, frequentemente foram vistos por conter fragmentos do SARS-CoV-2 em amostras de fezes e urina⁶⁻¹⁰. A presença desses fragmentos, infecciosos em alguns casos, trouxe a importância do monitoramento viral em águas residuais¹¹. O primeiro relato foi feito por Medema e colaboradores¹², que detectou o SARS-CoV-2 em amostras de águas residuais coletadas em 4 de março de 2020 na Holanda. Outros estudos também indicaram a presença do SARS-CoV-2 em amostras de águas residuais arquivadas, coletadas nos respectivos meses de março, novembro e dezembro de 2019 na Espanha, Brasil e Itália, datas anteriores ao primeiro caso oficial relatado na China¹³⁻¹⁵. Os achados, embora requeiram estudos detalhados e verificações¹⁶, corroboraram evidências clínicas, imunológicas e moleculares que indicavam que o SARS-CoV-2 estava em circulação antes do suposto¹⁷⁻²⁴.

Subsequentes estudos indicaram a presença de SARS-CoV-2 em amostras de águas residuais coletadas em fevereiro de 2020 na Inglaterra, China e Dinamarca, e em março do mesmo ano nos Estados Unidos, França, Japão, Paquistão, Austrália e Israel²⁵⁻³³. Em abril de 2020, o novo coronavírus foi detectado em amostras de águas residuais coletadas na Alemanha, Grécia e

República Tcheca, em maio de 2020 nos Emirados Árabes Unidos, Índia, Turquia e Chile, e em julho do mesmo ano em Bangladesh³⁴⁻⁴¹.

Análises em águas residuais, que coletam e concentram os excrementos humanos, têm sido frequentemente utilizadas para monitorar quali ou quantitativamente a presença de compostos químicos, poluentes e patógenos nas comunidades^{42,43}. A abordagem tem sido usada como um diagnóstico rápido, não invasivo e econômico para gerar informações em tempo real, ou quase real, sobre hábitos e comportamentos das populações^{44,45}. Esse tipo de monitoramento, denominado Epidemiologia Baseada em Águas Residuais (EBAR), tem proporcionado a elucidação da dinâmica da circulação de diferentes tipos de substâncias e patógenos na comunidade, e sido comumente utilizado como uma ferramenta de vigilância epidemiológica^{46,47}.

A vigilância em águas residuais, quando focada na detecção de patógenos virais, como o SARS-CoV-2, tem o potencial de contribuir enormemente para a manutenção da saúde pública⁴⁸. A abordagem tem sido considerada como uma forma rápida, robusta, econômica e não invasiva de rastreamento viral e controle epidemiológico⁴⁹⁻⁵¹. A detecção de SARS-CoV-2 em águas residuais, de acordo com pesquisadores, forneceria melhores previsões acerca da propagação de COVID-19 nas comunidades, e poderia ser utilizado para gerar alertas rápidos sobre surtos emergentes e/ou reemergentes de COVID-19, assim, promover a implementação de melhores medidas de coordenação de esforços e contenção viral⁵²⁻⁵⁴.

A vigilância do SARS-CoV-2 em águas residuais possibilitaria a enumeração de pessoas que não têm acesso aos atendimentos de saúde, além de casos pré-sintomáticos e assintomáticos que não são detectados pelos diagnósticos clínicos e que ainda podem disseminar a COVID-19⁵⁵⁻⁵⁸. A abordagem poderia ser utilizada para avaliar a diversidade genética das cepas variantes do SARS-CoV-2 que estão circulando nas comunidades, inferir uma ancestralidade viral, e estimar sua prevalência em escalas temporais e espaciais⁵⁹⁻⁶¹. Além disso, a vigilância do SARS-CoV-2 em águas residuais poderia ser utilizada para avaliar a eficiência dos sistemas de desinfecção viral e direcionar recursos para administrar as vacinas^{47,49,52,62,63}.

Nesse contexto, diante da importância de promover estudos que visam melhores previsões acerca da disseminação do SARS-CoV-2 nas populações e abordagens que garantam a manutenção da saúde mundial, este artigo de revisão teve o objetivo de apresentar os procedimentos utilizados na detecção do SARS-CoV-2 em esgotos, e descrever os desafios inerentes à vigilância epidemiológica do novo coronavírus nesse ambiente.

2. Experimental

A revisão de literatura foi fundamentada em artigos indexados nas bases de dados Google Scholar, PubMed,

Scopus, ScienceDirect, Web of Science e MedRxiv, utilizando nas pesquisas eletrônicas a combinação dos seguintes termos: “SARS-CoV-2”, “presença”, “detecção”, “águas residual”, “esgoto”, “monitoramento”, “vigilância”, “desafios”, “questões” e “problemas”. As pesquisas foram realizadas até o dia 15 de maio de 2021 e incluíram artigos publicados em inglês e português, tanto de acesso público quanto disponíveis através de instituições acadêmicas. Após obtenção dos documentos, os mesmos foram triados quanto aos seus títulos e resumos a fim de verificar se atendiam ao tema proposto e também de eliminar as duplicatas. Em seguida, os trabalhos foram classificados de acordo com os seguintes temas: (i) Características do SARS-CoV-2 e COVID-19, (ii) Vigilância epidemiológica do SARS-CoV-2 em águas residuais, (iii) Procedimentos de detecção do SARS-CoV-2 em águas residuais, (iv) Desafios do monitoramento do SARS-CoV-2 em águas residuais, (v) Infectividade e viabilidade viral do novo coronavírus em águas residuais e (vi) Adequação e disseminação dos resultados.

3. Resultados e Discussão

A revisão bibliográfica, após busca nas bases de dados, localizou 291 diferentes trabalhos científicos que apresentavam aderência quanto ao tema proposto pelo presente artigo. Destes, 93 foram classificados como pertencentes ao tema (i), 147 como pertencentes ao tema (ii), 24 ao tema (iii), 20 ao tema (iv), 2 ao tema (v) e 5 ao (vi). Após a leitura na íntegra dos textos obtidos, 111 trabalhos que apresentavam estudos inéditos ou discussões relevantes foram escolhidos para serem utilizados como base teórica na elaboração deste trabalho e incluídos nas referências desta revisão.

3.1. Procedimentos de detecção do SARS-CoV-2 em águas residuais

Os procedimentos utilizados na detecção do SARS-CoV-2 em águas residuais têm sido feitos através de técnicas de biologia molecular, que propiciam a cópia e análise da presença de fragmentos de material genético do vírus em amostras através de replicações *in-vitro*, denominada “Reação em Cadeia da Polimerase” (PCR)⁶⁴. As cópias dos fragmentos do genoma viral do SARS-CoV-2, por serem compostos de ácido ribonucleico (RNA)⁶⁵, têm sido iniciados com a produção de fitas de DNA complementar (cDNA) a partir do RNA viral. Métodos de PCR que amplificam fragmentos de RNA, chamados de “Transcrição Reversa seguida de Reação em Cadeia da Polimerase” (RT-PCR), tem se utilizado de uma enzima específica, denominada transcriptase reversa⁶⁶.

A maior parte dos estudos voltados para amostras providas de águas residuais, entretanto, tem sido feito através de procedimentos de RT-PCR em tempo real,

denominados RT-qPCR (Tabela 1). Diferente do RT-PCR, o RT-qPCR tem possibilitado à amplificação dos ácidos nucleotídeos e também a simultânea quantificação das sequências alvo⁶⁷. Outra grande vantagem do RT-qPCR, de acordo com CORPUZ e colaboradores⁶⁶, tem sido a eliminação da etapa de eletroforese em gel de agarose. Análises que se utilizam do PCR em tempo real, também chamadas de PCR quantitativos, têm sido consideradas como “padrão ouro” na detecção de baixas quantidades de material genético de forma sensível e específica⁶⁸. Dependendo do grau da epidemia, os procedimentos de RT-qPCR foram capazes de detectar concentrações de até 1,9 cópias de partículas gênicas do SARS-CoV-2 por mL de água residual²⁵.

3.2. Desafios associados ao monitoramento epidemiológico do SARS-CoV-2 em águas residuais

Os procedimentos que se utilizam do RT-PCR e RT-qPCR na detecção de vírus em águas residuais, em geral, têm demonstrado alta confiabilidade, especificidade e sensibilidade. De acordo com relatos, os métodos capazes de determinar com sucesso a diversidade e a abundância de diferentes vírus em amostras de águas residuais, incluindo o Herpesvírus humano 6 e 8, Salivírus, Hepatite A e E, Aichi, Norovírus GII, Sapovírus, Rotavírus, Zika e Poliovírus⁶⁹⁻⁷⁴. Ainda que a viabilidade das técnicas de detecção tenha sido comprovada, a obtenção de informações úteis para

o monitoramento epidemiológico do SARS-CoV-2, entretanto, dependem de muitos fatores relevantes^{75,76}.

Os métodos, primeiramente, requerem adequados procedimentos de amostragem, preservação e processamento amostral⁴⁶. Os dados de detecção também têm requerido apropriadas interpretações e validações dos resultados, feitas através de modelos epidemiológicos que abrangem um grande número de variáveis e planos que garantem a qualidade dos processos de monitoramento^{76,77}. Além disso, um sistema eficaz de vigilância do SARS-CoV-2 em águas residuais têm requerido laboratórios especializados, com infraestruturas modernas, adequados níveis de biossegurança e profissionais qualificados⁴⁶. Nos seguintes tópicos, foram detalhados os desafios associados à implementação de um sistema de monitoramento epidemiológico do SARS-CoV-2 em águas residuais, voltados para resultados mais precisos e melhores estimativas quanto à incidência e prevalência viral do novo coronavírus.

3.3. Amostragem, preservação e transporte

Os resultados das análises de detecção do SARS-CoV-2 em águas residuais dependem de uma adequada amostragem para que possam representar de forma adequada as características de toda uma população. Nessa etapa, têm sido consideradas tanto as resoluções espaciais quanto temporais, além do modo, volume e frequência do procedimento amostral. Em geral, as pesquisas têm

Tabela 1. Relatos de detecção do SARS-CoV-2 em águas residuais

País	Localização aproximada	Método de detecção	Data da amostragem	Autores
Espanha	Barcelona	RT-qPCR	12 de março de 2019	[13]
Brasil	Florianópolis, Santa Catarina	RT-qPCR	27 de novembro de 2019	[14]
Itália	Milão, Lombardia e Turim, Piemonte	<i>Nested</i> RT-PCR e RT-qPCR	18 de dezembro de 2019	[15]
Inglaterra	Região Sudeste	<i>Nested</i> RT-PCR e RT-qPCR	11 de fevereiro de 2020	[29]
China	Hangzhou, Zhejiang	RT-qPCR	19 de fevereiro de 2020*	[31]
Dinamarca	Solrød, Zealand.	RT-qPCR	24 de fevereiro de 2020	[28]
Estados Unidos	Massachusetts	RT-qPCR	03 de março de 2020	[32]
Holanda	Haia	RT-qPCR	04 de março de 2020	[12]
França	Paris	RT-qPCR	05 de março de 2020	[33]
Japão	Prefeitura de Ishikawa	<i>Nested</i> RT-PCR e RT-qPCR	19 de março de 2020	[27]
Paquistão	Distrito de Quetta	<i>Nested</i> RT-PCR e RT-qPCR	20 de março de 2020	[30]
Austrália	Sudeste de Queensland	RT-qPCR	27 de março de 2020	[25]
Israel	Jerusalém	RT-qPCR	30 de março de 2020	[26]
Alemanha	Renânia do Norte-Vestfália	RT-qPCR	08 de abril de 2020	[41]
Grécia	Thessaloniki	RT-qPCR	21 de abril de 2020	[40]
República Tcheca	Várias regiões	RT-qPCR	26 de abril de 2020*	[39]
Emirados Árabes Unidos	Diferentes localizações	RT-qPCR	03 maio de 2020	[37]
Índia	Jaipur	RT-qPCR	04 de maio de 2020	[36]
Turquia	Istanbul	RT-qPCR	07 de maio de 2020	[38]
Chile	Santiago	RT-qPCR	25 de maio de 2020	[35]
Bangladesh	Noakhali	RT-qPCR	10 de julho de 2020	[34]

*data aproximada

sido feitas coletando volumes de 50 a 1000 mL de água residual, porém, somente uma alíquota tem sido utilizada para as análises de RT-qPCR⁶⁸. Ainda que grande parte dos autores tenham feito amostragens em períodos específicos, as coletas tem sido preferivelmente feitas em alíquotas fixas, coletadas em definidos intervalos de tempo durante o dia. Esse tipo de amostragem, chamada de “composta de 24h”, tem sido utilizada para representar as características médias das águas residuais durante o dia e, assim, incluir pulsos de águas residuais relevantes⁷⁸.

As amostras coletadas também têm requerido uma adequada preservação, responsável por conservar a viabilidade e a carga viral do SARS-CoV-2⁷⁸. Embora não haja um procedimento padronizado, em geral, as amostras têm sido mantidas em temperatura de 4°C e o procedimento analítico feito dentro de 2 a 3 dias⁷⁵. Alguns autores, devido a fatores como longas distancias entre o local de amostragem e o laboratório, falta de insumos para proceder as análises ou *lockdowns*, têm congelado as amostras de águas residuais a temperaturas de -80°C até o procedimento analítico⁷⁶. O congelamento e arquivamento das amostras de águas residuais, ainda que possam ocasionar reduções nas cargas virais do SARS-CoV-2, têm sido amplamente recomendadas com o intuito de fomentar futuros estudos sobre a ancestralidade e propagação do SARS-CoV-2⁷⁹.

3.4. Concentração, extração e amplificação do RNA viral

Os resultados de detecção também têm requerido um adequado processamento amostral, que inclui as etapas de concentração, extração e amplificação do RNA viral⁷⁵. A etapa de concentração, chamada de concentração primária, tem visado remover as eventuais impurezas das amostras e recuperar a maior quantidade de RNA viral⁸⁰. Embora não haja uma padronização universal, em geral, tem sido preferível métodos simples, rápidos e econômicos, que apresentem uma grande eficiência de recuperação viral, além

de uma alta repetibilidade e reprodutibilidade^{81,82}. De acordo com relatos publicados na literatura, tem sido utilizado quatro principais métodos para concentrar o SARS-CoV-2: ultrafiltração, precipitação, ultracentrifugação e filtração por membranas eletronegativas⁶⁸. Por medida de segurança, também tem sido recomendado etapas de inativação do SARS-CoV-2 antes do processamento amostral, como a pasteurização^{27,32,77,83}.

As etapas de extração e amplificação incluem a extração do material genético da amostra concentrada, produção de fitas de cDNA a partir do RNA viral por meio da transcriptase reversa, e amplificação das sequências moldes por RT-qPCR. A etapa de extração tem sido feita através de kits comerciais baseadas em técnicas de extração orgânica, geralmente com o uso de soluções como fenol tiocinato de guanidina, coluna de rotação à base de membrana de sílica ou através do uso de partículas paramagnéticas⁸¹. A etapa de amplificação, por sua vez, tem se utilizado de sequências gênicas específicas que detectam e copiam fragmentos dos genomas virais únicos do SARS-CoV-2 na reação de RT-PCR, chamados de oligonucleotídeos iniciadores ou *primers*.

Em geral, as amplificações têm sido feitas se utilizando de *primers* referentes ao gene RdRp da RNA polimerase do SARS-CoV-2, o gene E codificador do envelope viral, os genes codificadores das proteínas N, N1 e N2 do nucleocapsídeo, e o gene S codificador da proteína *spike*^{66,78} (Figura 1). Na reação de RT-qPCR, devido a sua característica quantitativa, têm sido utilizado sequências de DNA marcados com corantes fluorescentes (repórteres), chamados de sondas de hibridização, como a 6-carboxifluoresceína (FAM), *blackberry quencher* (BBA), *black hole quencher 1* (BHQ-1), carboxiroadamina e tetraclorofluoresceína⁸¹. Os principais oligonucleotídeos iniciadores e sondas utilizadas na detecção de SARS-CoV-2 em amostras de águas residuais foram sumarizados na Tabela 2.

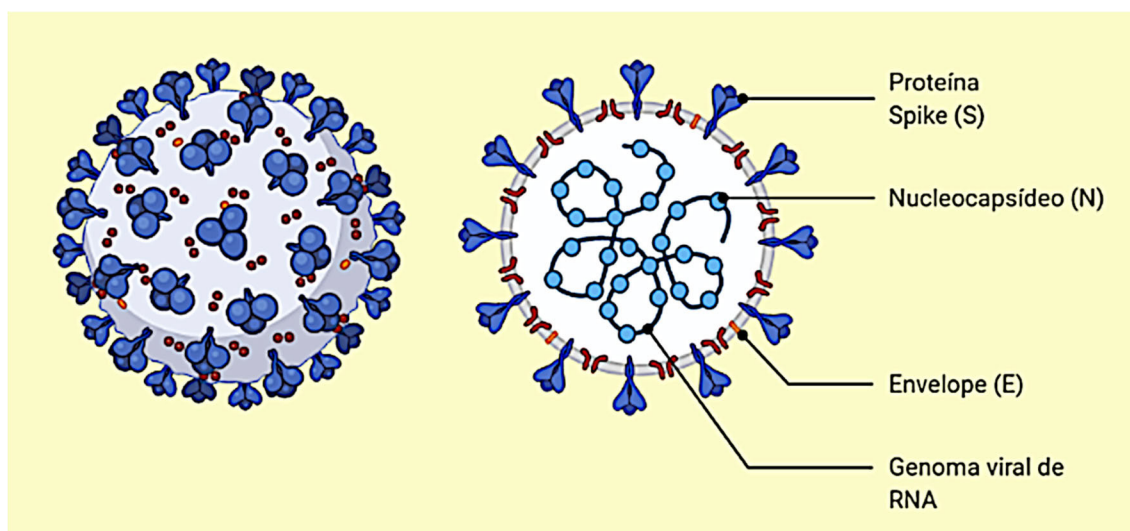


Figura 1. Representação esquemática das principais estruturas utilizadas para detectar o SARS-CoV-2 em águas residuais. A proteína S “spike”, a proteína do nucleocapsídeo N, a proteína do envelope E e o genoma viral do RNA foram indicados na ilustração. Fonte: BioRender.com

Tabela 2. Principais *Primers* (oligonucleotídeos iniciadores) e sondas de marcadores gênicos utilizados com a finalidade de detectar o SARS-CoV-2 em águas residuais

Alvo	Nome	Sequência (5' para 3')	Referência
Gene RdRp	RdRp_SARsR-F	GTGARATGGTCATGTGTGGCGG	[109]
Gene RdRp	RdRp_SARsR-R	CARATGTTAAASACACTATTAGCATA	[109]
Gene RdRp	RdRp_SARsR-P2	FAM_CAGGTGGAACCTCATCAGGAGATGC ^{-BBQ}	[109]
Gene RdRp	RdRp_SARsR-P1	FAM_CCAGGTGGWACRTCATCMGGTGTATGC ^{-BBQ}	[109]
Gene E (Envelope)	E_Sarbeco_F	ACAGGTACGTTAATAGTTAATAGCGT	[109]
Gene E (Envelope)	E_Sarbeco_R	ATATTGCAGCAGTACGCACACA	[109]
Gene E (Envelope)	E_Sarbeco_P1	FAM_ACACTAGCCATCCTTACTGCGCTTCG ^{-BBQ}	[109]
Gene N (Nucleocapsídeo)	N_Sarbeco_F	CACATTGGCACCCGCAATC	[109]
Gene N (Nucleocapsídeo)	N_Sarbeco_R	GAGGAACGAGAAGAGGCTTG	[109]
Gene N (Nucleocapsídeo)	N_Sarbeco_P	FAM_ACTTCCTCAAGGAACAACATTGCCA ^{-BBQ}	[109]
Gene N1 (Nucleocapsídeo)	2019-nCoV_N1-F	GACCCCAAATCAGCGAAAT	[110]
Gene N1 (Nucleocapsídeo)	2019-nCoV_N1-R	TCTGGTTACTGCCAGTTGAATCTG	[110]
Gene N1 (Nucleocapsídeo)	2019-nCoV_N1-P	FAM_ACCCCGCATTACGTTTGGTGGACC ^{-BHQ1}	[110]
Gene N2 (Nucleocapsídeo)	2019-nCoV_N2-F	TTACAAACATTGGCCGCAA	[110]
Gene N2 (Nucleocapsídeo)	2019-nCoV_N2-R	GCGCGACATTCCGAAGAA	[110]
Gene N2 (Nucleocapsídeo)	2019-nCoV_N2-P	FAM_ACAATTTGCCCCAGCGCTTCAG ^{-BHQ1}	[110]
Gene S (Proteína <i>spike</i>)	WuhanCoV-sp1-f	TTGGCAAATTCAGACTCACTTT	[111]
Gene S (Proteína <i>spike</i>)	WuhanCoV-sp2-r	TGTGGTTCATAAAAATTCCTTTGTG	[111]
Gene S (Proteína <i>spike</i>)	NIID_WH-1_F24381	TCAAGACTCACTTTCTCCAC	[111]
Gene S (Proteína <i>spike</i>)	NIID_WH-1_R24873	ATTTGAAACAAAGACACCTTCAC	[111]

FAM: 6-carboxifluoresceína; BBQ: *blackberry quencher*; BHQ-1: *Black Hole Quencher 1*

Os kits, juntamente com as sequências iniciadoras e a qualidade dos reagentes utilizados nos procedimentos, também têm influenciado de forma significativa os resultados de detecção do SARS-CoV-2^{75,84}. Os procedimentos destas etapas foram também vistos por serem altamente sensíveis quanto a presença de compostos capazes de inibir a transcrição reversa e o PCR presentes na complexa matriz de água residual, como metais, gorduras, proteínas, ácidos húmicos, fúlvicos, matéria orgânica e enzimas RNases e nucleases^{44,81,85,86}. Com o intuito de mitigar os efeitos inibitórios do PCR, tem sido aconselhado procedimentos de purificação, como a extração por solvente, utilização de esferas magnéticas de sílica, cromatografia por coluna de sílica, resinas de troca catiônica, além da diluição das amostras de águas residuais, assim, diluição imediata das substâncias inibidoras^{28,81,85}.

3.5. Interpretação e validação dos resultados

Os resultados de detecção do SARS-CoV-2, quando utilizados como uma ferramenta de vigilância epidemiológica, tem se baseado no pressuposto da existência de uma relação quantitativa entre a concentração do RNA do SARS-CoV-2 nas águas residuais e a circulação do vírus na população⁷⁶. A interpretação desses resultados, sendo assim, tem requerido a racionalização de parâmetros que compensam a variabilidade do fluxo de entrada de águas residuais provenientes de atividades não

humanas, como eletrodomésticos, efluentes industriais, águas pluviais, esgotos combinados, além da estimação do tamanho da população que contribui para o volume de água residual^{45,76}. Os cálculos referentes ao tamanho da população contribuidora, chamada de *de facto population*, em geral, têm se utilizado de marcadores exógenos e endógenos que estimam a combinação de residentes, passageiros e visitantes ocasionais em uma devida localidade⁸⁷.

Marcadores exógenos, como a cafeína, nicotina, adoçantes artificiais, fármacos (atenolol e hidroclorotiazida), e marcadores endógenos (ligados ao metabolismo humano), como amônia, ácido hidroxindolacético (5-HIAA), coprostanol e creatinina, têm sido utilizados estimar o tamanho da população alvo e normalizar os resultados de detecção de compostos químicos e patógenos em águas residuais^{41,43,87}. Em pesquisas voltadas para a detecção do SARS-CoV-2, alguns pesquisadores têm se utilizado de vírus ubíquos em tratos intestinais humanos, como o crAssphage e *pepper mild mottle virus*⁸⁸⁻⁹⁰. Outros autores têm se utilizado de parâmetros como consumo de água, eletricidade e dados referentes a utilização de celulares no momento da coleta⁷⁶. Ressalta-se, entretanto, que ainda não há um consenso sobre um indicador normalizador padrão e, em geral, com o intuito de inferir o tamanho real da população estudada, a quantidade de cópias virais do SARS-CoV-2 tem sido relacionada com o número de habitantes registrados no local de amostragem⁷⁶.

A qualidade dos resultados de detecção tem sido validada através da utilização de controles positivos de processo, geralmente cepas virais não patogênicas que se assemelham estruturalmente e morfológicamente ao SARS-CoV-2, como o coronavírus bovino, o *Pseudomonas* phage $\phi 6$, o murine hepatitis vírus, ou sequências nucleotídicas não infecciosas, como o Hep G Armored RNA⁹¹⁻⁹⁵. Os pesquisadores também têm conduzido sequenciamentos confirmatórios dos produtos de PCR que geravam resultados positivos, inclusão de controles negativos que evidenciavam a presença de falsos positivos e contaminações cruzadas, além da adição de múltiplas réplicas que asseguravam a variabilidade e a eficácia dos procedimentos de detecção^{75,76,92}.

3.6. Infectividade viral

Os resultados dos testes de RT-PCR e RTqPCR, baseados na detecção dos ácidos nucleicos do SARS-CoV-2, não têm sido capazes de distinguir partículas infecciosas das não infecciosas⁹⁶. Métodos virológicos, fundamentados em técnicas de cultivo celular *in vitro*, têm sido utilizados para fornecer estimativas referentes a quantidade de vírus infectantes existentes nas águas residuais^{41,97}. Em geral, os protocolos utilizados para caracterizar o estado de infectividade de vírus envelopados, como o SARS-CoV-2, têm sido feitos através de técnicas e reagentes que não causam o rompimento da sensível bicamada lipídica que envolve o capsídeo do SARS-CoV-2^{84,98}. Os procedimentos, ainda que requeiram técnicas laboriosas, equipamentos especializados e laboratórios com elevados graus de biossegurança, têm sido cruciais para avaliar o risco que uma amostra representa para a saúde humana ou para hospedeiros animais⁹⁰.

3.7. Adequação e disseminação dos resultados

Os métodos utilizados na detecção e análise dos dados demandam laboratórios especializados, com infraestruturas modernas e níveis adequados de biossegurança. Perante a necessidade de prover resultados representativos e reprodutivos, os métodos empregados na detecção do SARS-CoV-2 têm sido fortemente aconselhados a seguirem planos que garantem a qualidade das pesquisas e diagnósticos⁹⁹. Planos como o *quality assurance project plan* (QAPP) têm fomentado o compartilhamento e comparação dos resultados de forma interlaboratorial através procedimentos que detêm um controle de qualidade. A abordagem tem visado abranger a totalidade do processo, desde a coleta, manuseio, processamento da amostra, gerenciamento de dados e validação⁷⁷. Os esforços têm sido utilizados para gerar resultados comparáveis em diferentes escalas geográficas e temporais, assim, apoiar um repositório colaborativo global de vigilância de SARS-CoV-2 em águas residuais (<https://www.covid19wbec.org/>)¹⁰⁰. Esse tipo de abordagem tem grande potencial de contribuir no refinamento das ferramentas de monitoramento de águas residuais e fomentar uma rede de vigilância útil a nível global^{56,81,101}.

As decisões de saúde pública têm sido aconselhadas a incluir cursos educacionais e de treinamento para conscientizar os cidadãos e trabalhadores sobre os riscos do SARS-CoV-2, medidas de proteção e profilaxia viral^{63,102}. As redes de esgoto e estações de tratamento de águas residuais, caso necessário, devem ser descentralizadas e reajustadas para melhor segurança, qualidade de desinfecção e eliminação de resíduos^{96,103-105}. Sobretudo, tem sido amplamente recomendado maiores investimentos em áreas de monitoramento ambiental, abastecimento de água e saneamento, além de maiores compromissos de órgãos governamentais e políticas voltadas para a saúde pública, indispensáveis para melhores medidas preventivas e manutenção da qualidade de vida nacional e mundial^{49,106-108}.

4. Conclusões

Devido ao fato de que pacientes com COVID-19, incluindo casos leves, assintomáticos e pré-sintomáticos, frequentemente foram vistos por conter fragmentos do SARS-CoV-2 em amostras de fezes e urina, o monitoramento do novo coronavírus em águas residuais, que coletam e concentram excretos humanos, tem demonstrado grande potencial em ser utilizado como ferramenta de vigilância epidemiológica. A abordagem, chamada de EBAR, propiciaria melhores previsões acerca da disseminação do SARS-CoV-2 e fomentaria a implementação de melhores estratégias de contenção viral, incluindo alertas rápidos sobre possíveis surtos emergentes e reemergentes de COVID-19. A vigilância do SARS-CoV-2 em águas residuais também possibilitaria a enumeração de pessoas que não têm acesso aos atendimentos de saúde, avaliação da diversidade genética das variantes do SARS-CoV-2 que estão circulando nas comunidades, eficácia dos sistemas de desinfecção, e o direcionamento dos recursos para administrar as vacinas. Diante da importância do tema, este artigo de revisão teve o objetivo de apresentar os procedimentos utilizados na detecção do SARS-CoV-2 em águas residuais, e descrever os desafios associados à vigilância epidemiológica do novo coronavírus nesse ambiente.

De acordo com os trabalhos encontrados na literatura, a grande maioria dos estudos relacionados com amostras providas de águas residuais foi feita através de procedimentos de PCR em tempo real, denominados RT-qPCR. Os métodos, embora considerados como confiáveis e eficazes, têm apresentado grandes desafios referentes à implementação de um sistema de vigilância epidemiológica eficaz do SARS-CoV-2 nesse ambiente. Os principais fatores destacados pelos pesquisadores foram a necessidade da adequação dos procedimentos de amostragem, preservação e processamento amostral, e também o desenvolvimento de apropriados métodos de interpretações e validações experimentais, vitais para gerar resultados comparáveis de forma interlaboratorial e em diferentes escalas espaciais e temporais. Além disso, com o intuito de promover

melhores medidas de contenção viral, os pesquisadores têm aconselhado a adequação das infraestruturas de diagnóstico e sistemas de desinfecção, qualificação dos profissionais empenhados no monitoramento e operação das plantas de tratamento de resíduos e, sobretudo, a conscientização dos cidadãos sobre os riscos do SARS-CoV-2.

Agradecimentos

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001. Os autores P.H.M. e E.D.B agradecem a CAPES pelo auxílio financeiro e a UNESP pelo suporte. P.H.M. agradece G.M., C.M., C.T.M. e J.F.M. pela fundamental colaboração.

Referências Bibliográficas

- Shi, Y.; Wang, G.; Cai, X.; Deng, J.; Zheng, L.; Zhu, H.; Zheng, M.; Yang, B.; Chen, Z.; An overview of COVID-19. *Journal of Zhejiang University-SCIENCE B* **2020**, *21*, 343. [Crossref]
- Andersen, K. G.; Rambaut, A.; Lipkin, W. I.; Holmes, E. C.; Garry, R. F.; The proximal origin of SARS-CoV-2. *Nature Medicine* **2020**, *26*, 450. [Crossref]
- Tian, H.; Liu, Y.; Li, Y.; Wu, C.-H.; Chen, B.; Kraemer, M. U. G.; Li, B.; Cai, J.; Xu, B.; Yang, Q.; Wang, B.; Yang, P.; Cui, Y.; Song, Y.; Zheng, P.; Wang, Q.; Bjornstad, O. N.; Yang, R.; Grenfell, B. T.; Pybus, O. G.; Dye, C.; An investigation of transmission control measures during the first 50 days of the COVID-19 epidemic in China. *Science* **2020**, *368*, 638. [Crossref]
- Organização Mundial da Saúde; WHO Director-General's opening remarks at the media briefing on COVID-19-11 March 2020. Disponível em: <<https://www.who.int/director-general/speeches/detail/who-director-general-s-opening-remarks-at-the-media-briefing-on-covid-19---11-march-2020>>. Acesso em: 29 novembro 2021.
- Organização Mundial da Saúde; WHO Coronavirus Disease (COVID-19) Dashboard. Disponível em: <<https://covid19.who.int/>>. Acesso em: 29 de novembro de 2021.
- Furukawa, N. W.; Brooks, J. T.; Sobel, J.; Evidence Supporting Transmission of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 While Presymptomatic or Asymptomatic. *Emerging Infectious Diseases* **2020**, *26*, E1. [Crossref]
- Jeong, H. W.; Kim, S.-M.; Kim, H.-S.; Kim, Y.-I.; Kim, J. H.; Cho, J. Y.; Kim, S.; Kang, H.; Kim, S.-G.; Park, S.-J.; Kim, E.-H.; Choi, Y. K.; Viable SARS-CoV-2 in various specimens from COVID-19 patients. *Clinical Microbiology and Infection* **2020**, *26*, 1520. [Crossref]
- Li, W.; Su, Y.-Y.; Zhi, S.-S.; Huang, J.; Zhuang, C.-L.; Bai, W.-Z.; Wan, Y.; Meng, X.-R.; Zhang, L.; Zhou, Y.-B.; Luo, Y.-Y.; Ge, S.-X.; Chen, Y.-K.; Ma, Y.; Virus shedding dynamics in asymptomatic and mildly symptomatic patients infected with SARS-CoV-2. *Clinical Microbiology and Infection* **2020**, *26*, 1556.e1. [Crossref]
- Long, Q.-X.; Tang, X.-J.; Shi, Q.-L.; Li, Q.; Deng, H.-J.; Yuan, J.; Hu, J.-L.; Xu, W.; Zhang, Y.; Lv, F.-J.; Su, K.; Zhang, F.; Gong, J.; Wu, B.; Liu, X.-M.; Li, J.-J.; Qiu, J.-F.; Chen, J.; Huang, A.-L.; Clinical and immunological assessment of asymptomatic SARS-CoV-2 infections. *Nature Medicine* **2020**, *26*, 1200. [Crossref]
- Wei, W. E.; Li, Z.; Chiew, C. J.; Yong, S. E.; Toh, M. P.; Lee, V. J.; Presymptomatic Transmission of SARS-CoV-2 — Singapore, January 23–March 16, 2020. *Morbidity and Mortality Weekly Report (MMWR)* **2020**, *69*, 411. [Crossref]
- Mainardi, P. H.; Bidoia, E. D.; A importância do monitoramento do SARS-CoV-2 em redes de esgoto e estações de tratamento de águas residuárias / The importance of monitoring the SARS-CoV-2 in sewage networks and wastewater treatment plants. *Brazilian Journal of Health Review* **2021**, *4*, 5051. [Crossref]
- Medema, G.; Heijnen, L.; Elsinga, G.; Italiaander, R.; Brouwer, A.; 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 & Technology Letters* **2020**, *7*, 511. [Crossref]
- Chavarria-Miró, G.; Anfruns-Estrada, E.; Guix, S.; Paraira, M.; Galofré, B.; Sánchez, G.; Pintó, R. M.; Bosch, A.; Sentinel Surveillance of SARS-CoV-2 in Wastewater Anticipates the Occurrence of COVID-19 Cases. *medRxiv* **2020**. [Crossref]
- Fongaro, G.; Stoco, P. H.; Souza, D. S. M.; Grisard, E. C.; Magri, M. E.; Rogovski, P.; Schörner, M. A.; Barazzetti, F. H.; Christoff, A. P.; de Oliveira, L. F. V.; Bazzo, M. L.; Wagner, G.; Hernández, M.; Rodriguez-Lázaro, D.; SARS-CoV-2 in Human Sewage in Santa Catalina, Brazil, November 2019. *medRxiv* **2020**. [Crossref]
- La Rosa, G.; Mancini, P.; Ferraro, G. B.; Veneri, C.; Iaconelli, M.; Bonadonna, L.; Lucentini, L.; Suffredini, E.; SARS-CoV-2 has been circulating in northern Italy since December 2019: Evidence from environmental monitoring. *Science of The Total Environment* **2021**, *750*, 141711. [Crossref]
- Nikolaenko, D.; SARS-CoV-2 and the water environment: discovery of the pathogen in the sample dated March 12, 2019 in Barcelona and its interpretation. *Environmental Epidemiology* **2020**. [Crossref]
- Basavaraju, S. V.; Patton, M. E.; Grimm, K.; Rasheed, M. A. U.; Lester, S.; Mills, L.; Stumpf, M.; Freeman, B.; Tamin, A.; Harcourt, J.; Schiffer, J.; Semenova, V.; Li, H.; Alston, B.; Ategbale, M.; Bolcen, S.; Boulay, D.; Browning, P.; Cronin, L.; David, E.; Desai, R.; Epperson, M.; Gorantla, Y.; Jia, T.; Maniatis, P.; Moss, K.; Ortiz, K.; Park, S. H.; Patel, P.; Qin, Y.; Steward-Clark, E.; Tatum, H.; Vogan, A.; Zellner, B.; Drobeniuc, J.; Sapiano, M. R. P.; Havers, F.; Reed, C.; Gerber, S.; Thornburg, N. J.; Stramer, S. L.; Serologic Testing of US Blood Donations to Identify Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2)–Reactive Antibodies: December 2019–January 2020. *Clinical Infectious Diseases* **2021**, *72*, e1004. [Crossref]
- Birtolo, L. I.; Maestrini, V.; Severino, P.; Chimenti, C.; Agnes, G.; Tocci, M.; Colaiacomo, M. C.; Francone, M.; Mancone, M.; Fedele, F.; Coronavirus disease 2019 in Rome: was it circulating before December? *Journal of Cardiovascular Medicine* **2020**, *21*, 835. [Crossref]

19. Deslandes, A.; Berti, V.; Tandjaoui-Lambotte, Y.; Alloui, C.; Carbonnelle, E.; Zahar, J. R.; Briclher, S.; Cohen, Y.; SARS-CoV-2 was already spreading in France in late December 2019. *International Journal of Antimicrobial Agents* **2020**, *55*, 106006. [[Crossref](#)]
20. Gerbaud, L.; Guiguet-Auclair, C.; Breysse, F.; Odoul, J.; Ouchchane, L.; Peterschmitt, J.; Dezfouli-Desfer, C.; Breton, V.; Hospital and Population-Based Evidence for COVID-19 Early Circulation in the East of France. *International Journal of Environmental Research and Public Health* **2020**, *17*, 7175. [[Crossref](#)]
21. Paolo, C.; Carmelo, S.; Marcello, M.; Ageusia, gastrointestinal symptoms and marked asthenia in late December. A single case report with positive SARS-Cov2 IgG in Italy. *International Journal of Infectious Diseases* **2020**, *97*, 352. [[Crossref](#)]
22. Apolone, G.; Montomoli, E.; Manenti, A.; Boeri, M.; Sabia, F.; Hyseni, I.; Mazzini, L.; Martinuzzi, D.; Cantone, L.; Milanese, G.; Sestini, S.; Suatoni, P.; Marchianò, A.; Bollati, V.; Sozzi, G.; Pastorino, U.; Unexpected detection of SARS-CoV-2 antibodies in the pre-pandemic period in Italy. *Tumori Journal* **2021**, *107*, 446. [[Crossref](#)]
23. Valenti, L.; Bergna, A.; Pelusi, S.; Facciotti, F.; Lai, A.; Tarkowski, M.; Berzuini, A.; Caprioli, F.; Santoro, L.; Baselli, G.; Della Ventura, C.; Erba, E.; Bosari, S.; Galli, M.; Zehender, G.; Prati, D.; SARS-CoV-2 Seroprevalence Trends in Healthy Blood Donors during the COVID-19 Milan Outbreak. *medRxiv* **2020**. [[Crossref](#)]
24. Amendola, A.; Bianchi, S.; Gori, M.; Colzani, D.; Canuti, M.; Borghi, E.; Raviglione, M. C.; Zuccotti, G. V.; Tanzi, E.; Evidence of SARS-CoV-2 RNA in an Oropharyngeal Swab Specimen, Milan, Italy, Early December 2019. *Emerging Infectious Diseases* **2021**, *27*, 648. [[Crossref](#)]
25. 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.; Mueller, J. F.; 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* **2020**, *728*, 138764. [[Crossref](#)]
26. Bar-Or, I.; Yaniv, K.; Shagan, M.; Ozer, E.; Erster, O.; Mendelson, E.; Mannasse, B.; Shirazi, R.; Kramarsky-Winter, E.; Nir, O.; Abu-Ali, H.; Ronen, Z.; Rinott, E.; Lewis, Y. E.; Friedler, E.; Bitkover, E.; Paitan, Y.; Berchenko, Y.; Kushmaro, A.; Regressing SARS-CoV-2 Sewage Measurements onto COVID-19 Burden in the Population: A Proof-of-Concept for Quantitative Environmental Surveillance. *medRxiv* **2020**. [[Crossref](#)]
27. Hata, A.; Hara-Yamamura, H.; Meuchi, Y.; Imai, S.; Honda, R.; Detection of SARS-CoV-2 in wastewater in Japan during a COVID-19 outbreak. *Science of The Total Environment* **2021**, *758*, 143578. [[Crossref](#)]
28. Jørgensen, A. C. U.; Gamst, J.; Hansen, L. V.; Knudsen, I. I. H.; Jensen, S. K. S.; Eurofins Covid-19 Sentinel™ Wastewater Test Provide Early Warning of a Potential COVID-19 Outbreak. *medRxiv* **2020**. [[Crossref](#)]
29. Martin, J.; Klapsa, D.; Wilton, T.; Zambon, M.; Bentley, E.; Bujaki, E.; Fritzsche, M.; Mate, R.; Majumdar, M.; Tracking SARS-CoV-2 in Sewage: Evidence of Changes in Virus Variant Predominance during COVID-19 Pandemic. *Viruses* **2020**, *12*, 1144. [[Crossref](#)]
30. Sharif, S.; Ikram, A.; Khurshid, A.; Salman, M.; Mehmood, N.; Arshad, Y.; Ahmad, J.; Safdar, R. M.; Angez, M.; Alam, M. M.; Rehman, L.; Mujtaba, G.; Hussain, J.; Ali, J.; Akthar, R.; Malik, M. W.; Baig, Z. I.; Rana, M. S.; Usman, M.; Ali, M. Q.; Ahad, A.; Badar, N.; Umair, M.; Tamim, S.; Ashraf, A.; Tahir, F.; Ali, N.; Detection of SARs-CoV-2 in wastewater, using the existing environmental surveillance network: An epidemiological gateway to an early warning for COVID-19 in communities. *medRxiv* **2020**. [[Crossref](#)]
31. Wang, J.; Feng, H.; Zhang, S.; Ni, Z.; Ni, L.; Chen, Y.; Zhuo, L.; Zhong, Z.; Qu, T.; SARS-CoV-2 RNA detection of hospital isolation wards hygiene monitoring during the Coronavirus Disease 2019 outbreak in a Chinese hospital. *International Journal of Infectious Diseases* **2020**, *94*, 103. [[Crossref](#)]
32. Wu, F.; Xiao, A.; Zhang, J.; Moniz, K.; Endo, N.; Armas, F.; Bonneau, R.; Brown, M. A.; Bushman, M.; Chai, P. R.; Duvallet, C.; Erickson, T. B.; Foppe, K.; Ghaeli, N.; Gu, X.; Hanage, W. P.; Huang, K. H.; Lee, W. L.; Matus, M.; McElroy, K. A.; Nagler, J.; Rhode, S. F.; Santillana, M.; Tucker, J. A.; Wuertz, S.; Zhao, S.; Thompson, J.; Alm, E. J.; SARS-CoV-2 titers in wastewater foreshadow dynamics and clinical presentation of new COVID-19 cases. *medRxiv* **2020**. [[Crossref](#)]
33. Wurtzer, S.; Marechal, V.; Mouchel, J.; Maday, Y.; Teyssou, R.; Richard, E.; Almayrac, J.; Moulin, L.; Evaluation of lockdown impact on SARS-CoV-2 dynamics through viral genome quantification in Paris wastewaters. *medRxiv* **2020**. [[Crossref](#)]
34. Ahmed, F.; Islam, Md. A.; Kumar, M.; Hossain, M.; Bhattachariya, P.; Islam, Md. T.; Hossen, F.; Hossain, Md. S.; Uddin, Md. M.; Islam, Md. N.; Bahadur, N. M.; Didar-ul-Alam, Md.; Reza, H. M.; Jakariya, Md.; First detection of SARS-CoV-2 genetic material in the vicinity of COVID-19 isolation centre through wastewater surveillance in Bangladesh. *medRxiv* **2020**. [[Crossref](#)]
35. Ampuero, M.; Valenzuela, S.; Valiente-Echeverría, F.; Soto-Rifo, R.; Barriga, G. P.; Chnaiderman, J.; Rojas, C.; Guajardo-Leiva, S.; Díez, B.; Gaggero, A.; SARS-CoV-2 Detection in Sewage in Santiago, Chile - Preliminary Results. *medRxiv* **2020**. [[Crossref](#)]
36. Arora, S.; Nag, A.; Sethi, J.; Rajvanshi, J.; Saxena, S.; Shrivastava, S. K.; Gupta, A. B.; Sewage surveillance for the presence of SARS-CoV-2 genome as a useful wastewater based epidemiology (WBE) tracking tool in India. *Water Science & Technology* **2020**, *82*, 2823. [[Crossref](#)]
37. Hasan, S. W.; Ibrahim, Y.; Daou, M.; Kannout, H.; Jan, N.; Lopes, A.; Alsafar, H.; Yousef, A. F.; 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* **2021**, *764*, 142929. [[Crossref](#)]
38. Kocamemi, B. A.; Kurt, H.; Sait, A.; Sarac, F.; Saatci, A. M.; Pakdemirli, B.; SARS-CoV-2 Detection in Istanbul Wastewater Treatment Plant Sludges. *medRxiv* **2020**. [[Crossref](#)]

39. Mlejnkova, H.; Sovova, K.; Vasickova, P.; Ocenaskova, V.; Jasikova, L.; Juranova, E.; Preliminary Study of Sars-Cov-2 Occurrence in Wastewater in the Czech Republic. *International Journal of Environmental Research and Public Health* **2020**, *17*, 5508. [\[Crossref\]](#)
40. Petala, M.; Dafou, D.; Kostoglou, M.; Karapantsios, Th.; Kanata, E.; Chatziefstathiou, A.; Sakaveli, F.; Kotoulas, K.; Arsenakis, M.; Roilides, E.; Sklaviadis, T.; Metallidis, S.; Papa, A.; Stylianidis, E.; Papadopoulos, A.; Papaioannou, N.; A physicochemical model for rationalizing SARS-CoV-2 concentration in sewage. Case study: The city of Thessaloniki in Greece. *Science of The Total Environment* **2021**, *755*, 142855. [\[Crossref\]](#)
41. Westhaus, S.; Weber, F.-A.; Schiwy, S.; Linnemann, V.; Brinkmann, M.; Wiedera, M.; Greve, C.; Janke, A.; Hollert, H.; Wintgens, T.; Ciesek, S.; 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* **2021**, *751*, 141750. [\[Crossref\]](#)
42. Daughton, C. G.; Monitoring wastewater for assessing community health: Sewage Chemical-Information Mining (SCIM). *Science of The Total Environment* **2018**, *619–620*, 748. [\[Crossref\]](#)
43. Choi, P. M.; Tschärke, B. J.; Donner, E.; O'Brien, J. W.; Grant, S. C.; Kaserzon, S. L.; Mackie, R.; O'Malley, E.; Crosbie, N. D.; Thomas, K. V.; Mueller, J. F.; Wastewater-based epidemiology biomarkers: Past, present and future. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **2018**, *105*, 453. [\[Crossref\]](#)
44. Sims, N.; Kasprzyk-Hordern, B.; Future perspectives of wastewater-based epidemiology: Monitoring infectious disease spread and resistance to the community level. *Environment International* **2020**, *139*, 105689. [\[Crossref\]](#)
45. Mao, K.; Zhang, K.; Du, W.; Ali, W.; Feng, X.; Zhang, H.; The potential of wastewater-based epidemiology as surveillance and early warning of infectious disease outbreaks. *Current Opinion in Environmental Science & Health* **2020**, *17*, 1. [\[Crossref\]](#)
46. Orive, G.; Lertxundi, U.; Barcelo, D.; Early SARS-CoV-2 outbreak detection by sewage-based epidemiology. *Science of The Total Environment* **2020**, *732*, 139298. [\[Crossref\]](#)
47. Messina, S.; Monitoring Human Waste. *Voices in Bioethics* **2020**, *6*. [\[Crossref\]](#)
48. Mainardi, P. H.; Bidoia, E. D.; Early detections of SARS-CoV-2 in wastewater and their use in COVID-19 epidemiological control. *Research, Society and Development* **2021**, *10*, e45910515219. [\[Crossref\]](#)
49. Sodré, F.; Brandão, C.; Vizzotto, C.; Maldaner, A.; Epidemiologia do esgoto como estratégia para monitoramento comunitário, mapeamento de focos emergentes e elaboração de sistemas de alerta rápido para COVID-19. *Química Nova* **2020**, *43*, 515. [\[Crossref\]](#)
50. Souza, L. P.; Soares, A. F.; Nunes, B. C.; Costa, F. C.; Silva, L. F. M.; Presença do novo coronavírus (SARS-CoV-2) nos esgotos sanitários: apontamentos para ações complementares de vigilância à saúde em tempos de pandemia. *Vigilância Sanitária Em Debate* **2020**, *8*, 132. [\[Crossref\]](#)
51. Thompson, J. R.; Nancharaiyah, Y. V.; Gu, X.; Lee, W. L.; Rajal, V. B.; Haines, M. B.; Girones, R.; Ng, L. C.; Alm, E. J.; Wuertz, S. Making waves: Wastewater surveillance of SARS-CoV-2 for population-based health management. *Water Research* **2020**, *184*, 116181. [\[Crossref\]](#)
52. Bogler, A.; Packman, A.; Furman, A.; Gross, A.; Kushmaro, A.; Ronen, A.; Dagot, C.; Hill, C.; Vaizel-Ohayon, D.; Morgenroth, E.; Bertuzzo, E.; Wells, G.; Kiperwas, H. R.; Horn, H.; Negev, I.; Zucker, I.; Bar-Or, I.; Moran-Gilad, J.; Balcazar, J. L.; Bibby, K.; Elimelech, M.; Weisbrod, N.; Nir, O.; Sued, O.; Gillor, O.; Alvarez, P. J.; Cramer, S.; Arnon, S.; Walker, S.; Yaron, S.; Nguyen, T. H.; Berchenko, Y.; Hu, Y.; Ronen, Z.; Bar-Zeev, E.; Rethinking wastewater risks and monitoring in light of the COVID-19 pandemic. *Nature Sustainability* **2020**, *3*, 981. [\[Crossref\]](#)
53. Kitajima, M.; Ahmed, W.; Bibby, K.; Carducci, A.; Gerba, C. P.; Hamilton, K. A.; Haramoto, E.; Rose, J. B.; SARS-CoV-2 in wastewater: State of the knowledge and research needs. *Science of The Total Environment* **2020**, *739*, 139076. [\[Crossref\]](#)
54. Lodder, W.; Husman, A. M. R.; SARS-CoV-2 in wastewater: potential health risk, but also data source. *The Lancet Gastroenterology & Hepatology* **2020**, *5*, 533. [\[Crossref\]](#)
55. La Rosa, G.; Iaconelli, M.; Mancini, P.; Ferraro, G. B.; Veneri, C.; Bonadonna, L.; Lucentini, L.; Suffredini, E.; First detection of SARS-CoV-2 in untreated wastewaters in Italy. *Science of The Total Environment* **2020**, *736*, 139652. [\[Crossref\]](#)
56. Larsen, D. A.; Wigginton, K. R.; Tracking COVID-19 with wastewater. *Nature Biotechnology* **2020**, *38*, 1151. [\[Crossref\]](#)
57. Lee, S.; Kim, T.; Lee, E.; Lee, C.; Kim, H.; Rhee, H.; Park, S. Y.; Son, H.-J.; Yu, S.; Park, J. W.; Choo, E. J.; Park, S.; Loeb, M.; Kim, T. H.; Clinical Course and Molecular Viral Shedding Among Asymptomatic and Symptomatic Patients With SARS-CoV-2 Infection in a Community Treatment Center in the Republic of Korea. *JAMA Internal Medicine* **2020**, *180*, 1447. [\[Crossref\]](#)
58. Nabi, G.; Siddique, R.; Khan, S.; Detecting viral outbreaks in future using enhanced environmental surveillance. *Environmental Research* **2020**, *188*, 109731. [\[Crossref\]](#)
59. Crits-Christoph, A.; Kantor, R. S.; Olm, M. R.; Whitney, O. N.; Al-Shayeb, B.; Lou, Y. C.; Flamholz, A.; Kennedy, L. C.; Greenwald, H.; Hinkle, A.; Hetzel, J.; Spitzer, S.; Koble, J.; Tan, A.; Hyde, F.; Schroth, G.; Kuersten, S.; Banfield, J. F.; Nelson, K. L.; Genome sequencing of sewage detects regionally prevalent SARS-CoV-2 variants. *medRxiv* **2020**. [\[Crossref\]](#)
60. Izquierdo-Lara, R.; Elsinga, G.; Heijnen, L.; Munnink, B. B. O.; Schapendonk, C. M. E.; Nieuwenhuijse, D.; Kon, M.; Lu, L.; Aarestrup, F. M.; Lycett, S.; Medema, G.; Koopmans, M. P. G.; de Graaf, M.; Monitoring SARS-CoV-2 circulation and diversity through community wastewater sequencing. *medRxiv* **2020**. [\[Crossref\]](#)
61. Nemudryi, A.; Nemudraia, A.; Wiegand, T.; Surya, K.; Buyukyuruk, M.; Cicha, C.; Vanderwood, K. K.; Wilkinson, R.; Wiedenheft, B.; Temporal Detection and Phylogenetic Assessment of SARS-CoV-2 in Municipal Wastewater. *Cell Reports Medicine* **2020**, *1*, 100098. [\[Crossref\]](#)

62. 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.; Qu, J.; 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* **2020**, *741*, 140445. [[Crossref](#)]
63. Stadler, L. B.; Ensor, K. B.; Clark, J. R.; Kalvapalle, P.; LaTurner, Z. W.; Mojica, L.; Terwilliger, A.; Zhuo, Y.; Ali, P.; Avadhanula, V.; Bertolusso, R.; Crosby, T.; Hernandez, H.; Hollstein, M.; Weesner, K.; Zong, D. M.; Persse, D.; Piedra, P. A.; Maresso, A. W.; Hopkins, L.; Wastewater Analysis of SARS-CoV-2 as a Predictive Metric of Positivity Rate for a Major Metropolis. *medRxiv* **2020**. [[Crossref](#)]
64. Toze, S.; PCR and the detection of microbial pathogens in water and wastewater. *Water Research* **1999**, *33*, 3545. [[Crossref](#)]
65. Rangan, R.; Zheludev, I. N.; Hagey, R. J.; Pham, E. A.; Wayment-Steele, H. K.; Glenn, J. S.; Das, R.; RNA genome conservation and secondary structure in SARS-CoV-2 and SARS-related viruses: a first look. *RNA* **2020**, *26*, 937. [[Crossref](#)]
66. Corpuz, M. V. A.; Buonerba, A.; Vigliotta, G.; Zarra, T.; Ballesteros, F.; Campiglia, P.; Belgiorno, V.; Korshin, G.; Naddeo, V.; Viruses in wastewater: occurrence, abundance and detection methods. *Science of The Total Environment* **2020**, *745*, 140910. [[Crossref](#)]
67. Mackay, I. M.; Real-time PCR in virology. *Nucleic Acids Research* **2002**, *30*, 1292. [[Crossref](#)]
68. Hamouda, M.; Mustafa, F.; Maraqa, M.; Rizvi, T.; Hassan, A. A.; Wastewater surveillance for SARS-CoV-2: Lessons learnt from recent studies to define future applications. *Science of The Total Environment* **2021**, *759*, 143493. [[Crossref](#)]
69. Azhdar, Z.; Ghaderi, M.; Mousavi-Nasab, S. D.; Optimization of RT-qPCR for Detection of Aichi Virus in Sewage and River Water Samples in Karaj, Iran. *Archives of Iranian Medicine* **2019**, *22*, 242. [[PubMed](#)]
70. Beyer, S.; Szewzyk, R.; Gnirss, R.; Johne, R.; Selinka, H.-C.; Detection and Characterization of Hepatitis E Virus Genotype 3 in Wastewater and Urban Surface Waters in Germany. *Food and Environmental Virology* **2020**, *12*, 137. [[Crossref](#)]
71. Haramoto, E.; Kitajima, M.; Hata, A.; Torrey, J. R.; Masago, Y.; Sano, D.; Katayama, H.; A review on recent progress in the detection methods and prevalence of human enteric viruses in water. *Water Research* **2018**, *135*, 168. [[Crossref](#)]
72. McCall, C.; Wu, H.; Miyani, B.; Xagorarakis, I.; Identification of multiple potential viral diseases in a large urban center using wastewater surveillance. *Water Research* **2020**, *184*, 116160. [[Crossref](#)]
73. Muirhead, A.; Zhu, K.; Brown, J.; Basu, M.; Brinton, M. A.; Costa, F.; Hayat, M. J.; Stauber, C. E.; Zika Virus RNA Persistence in Sewage. *Environmental Science & Technology Letters* **2020**, *7*, 659. [[Crossref](#)]
74. Nakamura, T.; Hamasaki, M.; Yoshitomi, H.; Ishibashi, T.; Yoshiyama, C.; Maeda, E.; Sera, N.; Yoshida, H.; Environmental Surveillance of Poliovirus in Sewage Water around the Introduction Period for Inactivated Polio Vaccine in Japan. *Applied and Environmental Microbiology* **2015**, *81*, 1859. [[Crossref](#)]
75. Ahmed, W.; Bivins, A.; Bertsch, P. M.; Bibby, K.; Choi, P. M.; Farkas, K.; Gyawali, P.; Hamilton, K. A.; Haramoto, E.; Kitajima, M.; Simpson, S. L.; Tandukar, S.; Thomas, K. V.; Mueller, J. F.; Surveillance of SARS-CoV-2 RNA in wastewater: Methods optimization and quality control are crucial for generating reliable public health information. *Current Opinion in Environmental Science & Health* **2020**, *17*, 82. [[Crossref](#)]
76. Medema, G.; Been, F.; Heijnen, L.; Pettersen, S.; Implementation of environmental surveillance for SARS-CoV-2 virus to support public health decisions: Opportunities and challenges. *Current Opinion in Environmental Science & Health* **2020**, *17*, 49. [[Crossref](#)]
77. Pecson, B. M.; Darby, E.; Haas, C. N.; Amha, Y.; Bartolo, M.; Danielson, R.; Dearborn, Y.; Di Giovanni, G.; Ferguson, C.; Fevig, S.; Gaddis, E.; Gray, D.; Lukasik, G.; Mull, B.; Olivas, L.; Olivieri, A.; Qu, Y.; SARS-CoV-2 Interlaboratory Consortium; Reproducibility and Sensitivity of 36 Methods to Quantify the SARS-CoV-2 Genetic Signal in Raw Wastewater: Findings from an Interlaboratory Methods Evaluation in the U.S. *medRxiv* **2020**. [[Crossref](#)]
78. Foladori, P.; Cutrupi, F.; Segata, N.; Manara, S.; Pinto, F.; Malpei, F.; Bruni, L.; La Rosa, G.; SARS-CoV-2 from faeces to wastewater treatment: What do we know? A review. *Science of The Total Environment* **2020**, *743*, 140444. [[Crossref](#)]
79. Dolfing, J.; The Importance of Sewage Archiving in Coronavirus Epidemiology and Beyond. *Environmental Science & Technology* **2020**, *54*, 7740. [[Crossref](#)]
80. Rusiñol, M.; Martínez-Puchol, S.; Forés, E.; Itarte, M.; Girones, R.; Bofill-Mas, S.; Concentration methods for the quantification of coronavirus and other potentially pandemic enveloped virus from wastewater. *Current Opinion in Environmental Science & Health* **2020**, *17*, 21. [[Crossref](#)]
81. Michael-Kordatou, I.; Karaolia, P.; Fatta-Kassinos, D.; Sewage analysis as a tool for the COVID-19 pandemic response and management: the urgent need for optimised protocols for SARS-CoV-2 detection and quantification. *Journal of Environmental Chemical Engineering* **2020**, *8*, 104306. [[Crossref](#)]
82. Lu, D.; Huang, Z.; Luo, J.; Zhang, X.; Sha, S.; Primary concentration – The critical step in implementing the wastewater based epidemiology for the COVID-19 pandemic: A mini-review. *Science of The Total Environment* **2020**, *747*, 141245. [[Crossref](#)]
83. Whitney, O. N.; Kennedy, L. C.; Fan, V.; Hinkle, A.; Kantor, R.; Greenwald, H.; Crits-Christoph, A.; Al-Shayeb, B.; Chaplin, M.; Maurer, A. C.; Tjian, R.; Nelson, K. L.; Sewage, Salt, Silica and SARS-CoV-2 (4S): An economical kit-free method for direct capture of SARS-CoV-2 RNA from wastewater. *medRxiv* **2020**. [[Crossref](#)]
84. Ye, Y.; Ellenberg, R. M.; Graham, K. E.; Wigginton, K. R.; Survivability, Partitioning, and Recovery of Enveloped Viruses in Untreated Municipal Wastewater. *Environmental Science & Technology* **2016**, *50*, 5077. [[Crossref](#)]
85. Graham, K. E.; Loeb, S. K.; Wolfe, M. K.; Catoe, D.; Sinnott-Armstrong, N.; Kim, S.; Yamahara, K. M.; Sassoubre, L. M.; Mendoza, L. M.; Roldan-Hernandez, L.; Li, L.; Wigginton, K. R.; Boehm, A. B.; SARS-CoV-2 in wastewater settled solids is

- associated with COVID-19 cases in a large urban sewershed. *medRxiv* **2020**. [[Crossref](#)]
86. Hjelmsø, M. H.; Hellmér, M.; Fernandez-Cassi, X.; Timoneda, N.; Lukjancenko, O.; Seidel, M.; Elsässer, D.; Aarestrup, F. M.; Löfström, C.; Bofill-Mas, S.; Abril, J. F.; Girones, R.; Schultz, A. C.; Evaluation of Methods for the Concentration and Extraction of Viruses from Sewage in the Context of Metagenomic Sequencing. *PLoS One* **2017**, *12*, e0170199. [[Crossref](#)]
 87. Gracia-Lor, E.; Castiglioni, S.; Bade, R.; Been, F.; Castrignano, E.; Covaci, A.; González-Mariño, I.; Hapeshi, E.; Kasprzyk-Hordern, B.; Kinyua, J.; Lai, F. Y.; Letzel, T.; Lopardo, L.; Meyer, M. R.; O'Brien, J.; Ramin, P.; Rousis, N. I.; Rydevik, A.; Ryu, Y.; Santos, M. M.; Senta, I.; Thomaidis, N. S.; Veloutsou, S.; Yang, Z.; Zuccato, E.; Bijlsma, L.; Measuring biomarkers in wastewater as a new source of epidemiological information: Current state and future perspectives. *Environment International* **2017**, *99*, 131. [[Crossref](#)]
 88. D'Aoust, P. M.; Mercier, E.; Montpetit, D.; Jia, J.-J.; Alexandrov, I.; Neault, N.; Baig, A. T.; Mayne, J.; Zhang, X.; Alain, T.; Langlois, M.-A.; Servos, M. R.; MacKenzie, M.; Figeys, D.; MacKenzie, A. E.; Graber, T. E.; Delatolla, R.; Quantitative analysis of SARS-CoV-2 RNA from wastewater solids in communities with low COVID-19 incidence and prevalence. *Water Research* **2021**, *188*, 116560. [[Crossref](#)]
 89. Jafferli, M. H.; Khatami, K.; Atasoy, M.; Birgersson, M.; Williams, C.; Cetecioglu, Z.; Benchmarking virus concentration methods for quantification of SARS-CoV-2 in raw wastewater. *Science of The Total Environment* **2021**, *755*, 142939. [[Crossref](#)]
 90. Polo, D.; Quintela-Baluja, M.; Corbishley, A.; Jones, D. L.; Singer, A. C.; Graham, D. W.; Romalde, J. L.; Making waves: Wastewater-based epidemiology for COVID-19 – approaches and challenges for surveillance and prediction. *Water Research* **2020**, *186*, 116404. [[Crossref](#)]
 91. Ahmed, W.; Bertsch, P. M.; Bivins, A.; Bibby, K.; Farkas, K.; Gathercole, A.; Haramoto, E.; Gyawali, P.; Korajkic, A.; McMinn, B. R.; Mueller, J. F.; Simpson, S. L.; Smith, W. J. M.; Symonds, E. M.; Thomas, K. V.; Verhagen, R.; Kitajima, M.; Comparison of virus concentration methods for the RT-qPCR-based recovery of murine hepatitis virus, a surrogate for SARS-CoV-2 from untreated wastewater. *Science of The Total Environment* **2020**, *739*, 139960. [[Crossref](#)]
 92. Alygizakis, N.; Markou, A. N.; Rousis, N. I.; Galani, A.; Avgeris, M.; Adamopoulos, P. G.; Scorilas, A.; Lianidou, E. S.; Paraskevis, D.; Tsiodras, S.; Tsakris, A.; Dimopoulos, M.-A.; Thomaidis, N. S.; Analytical methodologies for the detection of SARS-CoV-2 in wastewater: Protocols and future perspectives. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **2021**, *134*, 116125. [[Crossref](#)]
 93. Gonzalez, R.; Curtis, K.; Bivins, A.; Bibby, K.; Weir, M. H.; Yetka, K.; Thompson, H.; Keeling, D.; Mitchell, J.; Gonzalez, D.; COVID-19 surveillance in Southeastern Virginia using wastewater-based epidemiology. *Water Research* **2020**, *186*, 116296. [[Crossref](#)]
 94. LaTurner, Z. W.; Zong, D. M.; Kalvapalle, P.; Gamas, K. R.; Terwilliger, A.; Crosby, T.; Ali, P.; Avadhanula, V.; Santos, H. H.; Weesner, K.; Hopkins, L.; Piedra, P. A.; Maresso, A. W.; Stadler, L. B.; Evaluating recovery, cost, and throughput of different concentration methods for SARS-CoV-2 wastewater-based epidemiology. *medRxiv* **2020**. [[Crossref](#)]
 95. Torii, S.; Furumai, H.; Katayama, H.; Applicability of polyethylene glycol precipitation followed by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction for the detection of SARS-CoV-2 RNA from municipal wastewater. *Science of The Total Environment* **2021**, *756*, 143067. [[Crossref](#)]
 96. Maal-Bared, R.; Brisolará, K.; Munakata, N.; Bibby, K.; Gerba, C.; Sobsey, M.; Schaefer, S.; Swift, J.; Gary, L.; Sherchan, S.; Babatola, A.; Bastian, R.; Olabode, L.; Reimers, R.; Rubin, A.; Implications of SARS-CoV-2 on current and future operation and management of wastewater systems. *Water Environment Research* **2021**, *93*, 502. [[Crossref](#)]
 97. Rimoldi, S. G.; Stefani, F.; Gigantiello, A.; Polesello, S.; Comandatore, F.; Mileto, D.; Maresca, M.; Longobardi, C.; Mancon, A.; Romeri, F.; Pagani, C.; Moja, L.; Gismondo, M. R.; Salerno, F.; Presence and vitality of SARS-CoV-2 virus in wastewaters and rivers. *medRxiv* **2020**. [[Crossref](#)]
 98. Wigginton, K. R.; Ye, Y.; Ellenberg, R. M.; Emerging investigators series: the source and fate of pandemic viruses in the urban water cycle. *Environmental Science: Water Research & Technology* **2015**, *1*, 735. [[Crossref](#)]
 99. Huggett, J. F.; Benes, V.; Bustin, S. A.; Garson, J. A.; Harris, K.; Kammel, M.; Kubista, M.; McHugh, T. D.; Moran-Gilad, J.; Nolan, T.; Pfaffl, M. W.; Salit, M.; Shipley, G.; Vallone, P. M.; Vandesompele, J.; Wittwer, C.; Zeichhardt, H.; Cautionary Note on Contamination of Reagents Used for Molecular Detection of SARS-CoV-2. *Clinical Chemistry* **2020**, *66*, 1369. [[Crossref](#)]
 100. Bivins, A.; North, D.; Ahmad, A.; Ahmed, W.; Alm, E.; Been, F.; Bhattacharya, P.; Bijlsma, L.; Boehm, A. B.; Brown, J.; Buttiglieri, G.; Calabro, V.; Carducci, A.; Castiglioni, S.; Cetecioglu, Z.; Chakraborty, S.; Costa, F.; Curcio, S.; de los Reyes, F. L.; Vela, J. D.; Farkas, K.; Fernandez-Casi, X.; Gerba, C.; Gerrity, D.; Girones, R.; Gonzalez, R.; Haramoto, E.; Harris, A.; Holden, P. A.; Islam, Md. T.; Jones, D. L.; Kasprzyk-Hordern, B.; Kitajima, M.; Kotlarz, N.; Kumar, M.; Kuroda, K.; La Rosa, G.; Malpei, F.; Mautus, M.; McLellan, S. L.; Medema, G.; Meschke, J. S.; Mueller, J.; Newton, R. J.; Nilsson, D.; Noble, R. T.; van Nuijs, A.; Peccia, J.; Perkins, T. A.; Pickering, A. J.; Rose, J.; Sanchez, G.; Smith, A.; Stadler, L.; Stauber, C.; Thomas, K.; van der Voorn, T.; Wigginton, K.; Zhu, K.; Bibby, K.; Wastewater-Based Epidemiology: Global Collaborative to Maximize Contributions in the Fight Against COVID-19. *Environmental Science & Technology* **2020**, *54*, 7754. [[Crossref](#)]
 101. Collivignarelli, M. C.; Collivignarelli, C.; Miino, M. C.; Abbà, A.; Pedrazzani, R.; Bertanza, G.; SARS-CoV-2 in sewer systems and connected facilities. *Process Safety and Environmental Protection* **2020**, *143*, 196. [[Crossref](#)]
 102. Soares, A. F. S.; Nunes, B. C. R.; Costa, F. C. R.; Silva, L. F. M.; Souza, L. P. S.; Potencialidades da epidemiologia baseada em esgoto nas ações da Atenção Primária à Saúde em tempos de pandemia pela COVID-19. *Journal of Management & Primary Health Care* **2020**, *12*, 1. [[Crossref](#)]

103. Adelodun, B.; Ajibade, F. O.; Ibrahim, R. G.; Bakare, H. O.; Choi, K.-S.; Snowballing transmission of COVID-19 (SARS-CoV-2) through wastewater: Any sustainable preventive measures to curtail the scourge in low-income countries? *Science of The Total Environment* **2020**, *742*, 140680. [[Crossref](#)]
104. Ali, H. A.; Yaniv, K.; Bar-Zeev, E.; Chaudhury, S.; Shaga, M.; Lakkakula, S.; Ronen, Z.; Kushmaro, A.; Nir, O.; Tracking SARS-CoV-2 RNA through the wastewater treatment process. *medRxiv* **2020**. [[Crossref](#)]
105. Rollemberg, S.; de Barros, A. N.; de Lima, J. P. M.; Avaliação da contaminação, sobrevivência e remoção do coronavírus em sistemas de tratamento de esgoto sanitário. *Revista Tecnologia* **2020**, *41*, 1. [[Crossref](#)]
106. Ferreira, A. D. S.; Pimentel, C. P.; Moscon, A.; Curty, T. N.; de Oliveira, M. D.; SARS-CoV-2 no esgoto: métodos de detecção e tratamento. *Revista Ifes Ciência* **2020**, *6*, 15. [[Crossref](#)]
107. Ghernaout, D.; Ghernaout, B.; Controlling COVID-19 Pandemic through Wastewater Monitoring. *Open Access Library Journal* **2020**, *7*, e6411. [[Crossref](#)]
108. La Rosa, G.; Bonadonna, L.; Lucentini, L.; Kenmoe, S.; Suffredini, E.; Coronavirus in water environments: Occurrence, persistence and concentration methods - A scoping review. *Water Research* **2020**, *179*, 115899. [[Crossref](#)]
109. Corman, V. M.; Landt, O.; Kaiser, M.; Molenkamp, R.; Meijer, A.; Chu, D. K.; Bleicker, T.; Brünink, S.; Schneider, J.; Schmidt, M. L.; Mulders, D. G.; Haagmans, B. L.; van der Veer, B.; van den Brink, S.; Wijsman, L.; Goderski, G.; Romette, J.-L.; Ellis, J.; Zambon, M.; Peiris, M.; Goossens, H.; Reusken, C.; Koopmans, M. P.; Drosten, C.; Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR. *Eurosurveillance* **2020**, *25*, 23. [[Crossref](#)]
110. Centers for Disease Control and Prevention, Respiratory Viruses Branch, Division of Viral Diseases. 2019-novel coronavirus (2019-nCoV) real-time rRT-PCR panel primers and probes. 2020. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/lab/rt-pcr-panel-primer-probes.html>>. Acesso em: 19 março 2022.
111. Shirato, K.; Nao, N.; Katano, H.; Takayama, I.; Saito, S.; Kato, F.; Katoh, H.; Sakata, M.; Nakatsu, Y.; Mori, Y.; Kageyama, T.; Matsuyama, S.; Takeda, M.; Development of Genetic Diagnostic Methods for Detection for Novel Coronavirus 2019(nCoV-2019) in Japan. *Japanese Journal of Infectious Diseases* **2020**, *73*, 304. [[Crossref](#)]