



Análisis y vigilancia de SARS-CoV-2 en el ciclo urbano del agua

Tras la aparición del virus SARS-CoV-2, Suez inició un estudio para evaluar la presencia del material genético del virus en el ciclo urbano del agua, al conocerse su excreción en las heces de personas infectadas. Para ello, se ha desarrollado una metodología de muestreo, así como de extracción y cuantificación del ARN del SARS-CoV-2 mediante RT-q-PCR. Se ha realizado una intensa campaña de muestreo: 250 muestras en la red de colectores en alta, depuradoras y potabilizadoras -fase líquida y fangos- en 5 ciudades españolas, con distinta incidencia de la epidemia. Los resultados han permitido demostrar la ausencia de material genético del virus en las captaciones de plantas potabilizadoras y detectarlo en el influente de las estaciones depuradoras de aguas residuales (EDAR) que trataban aguas de zonas afectadas por la COVID-19. El sistema de tratamiento fue capaz de retener este material genético, de forma que, excepto en momentos puntuales, no se detecta ARN en los efluentes, aunque está admitido por los expertos que la probabilidad de que dichos positivos correspondan a virus en estado infectivo es prácticamente nula.

Palabras clave

SARS-CoV-2, COVID-19, EDAR, vigilancia.

ANALYSIS AND SURVEILLANCE OF SARS-COV-2 IN THE URBAN WATER CYCLE

After the SARS-CoV-2 outbreak, Suez started a study to determine the occurrence of the virus genetic material in the urban water cycle, as it has been demonstrated the presence of virus genetic material in the faeces of infected people. To do so, a methodology has been developed including sampling, sample extraction and SARS-CoV-2 RNA quantification through RT-q-PCR. An extensive sampling campaign has been performed: 250 samples from the drainage network, wastewater treatment plants (WWTP) and drinking water treatment plants (DWTP) - liquid and sludge - in Spanish cities representing different degree of pandemic incidence. The results allowed to determine the absence of virus genetic material in the potabilization catchment sites, as well as, the occurrence of viral RNA in the influent of WWTP in those plants covering areas with high pandemic incidence. Wastewater treatment processes removed the virus genetic material in most cases, so, despite few punctual exceptions, the viral RNA was not detected in WWTP effluents. Furthermore, the virus infectivity capacity in those samples is practically non-existent according to previously reported studies.

Keywords

SARS-CoV-2, COVID-19, WWTP, surveillance.

Albert Serra Compte

project manager de Cetaqua, Centro Tecnológico del Agua

Susana González Blanco

responsable técnico de Cetaqua, Centro Tecnológico del Agua

Marina Arnaldos Orts

responsable de I+D+i de Cetaqua, Centro Tecnológico del Agua

Belén Galofré Porcar

responsable de Microbiología de Aigües de Barcelona, Empresa Metropolitana de Gestió del Cicle Integral de l'Aigua, S.A.

Miquel Paraira Faus

director de Calidad del Agua de Aigües de Barcelona, Empresa Metropolitana de Gestió del Cicle Integral de l'Aigua, S.A.

Elena Soria Soria

responsable de Microbiología de Labaqua

Adela Yañez Amoros

directora de Innovación de Labaqua

Albert Bosch Navarro

catedrático del Departamento de Microbiología de la Facultat de Biologia de la Universitat de Barcelona

Rosa M. Pintó Solé

catedrática del Departamento de Microbiología de la Facultat de Biologia de la Universitat de Barcelona

Juan M. Lema Rodicio

profesor emérito de Ingeniería Química Instituto Cretus, Departamento de Ingeniería Química de la Universidade de Santiago de Compostela

Ignacio Casals Del Busto

responsable de I+D+i de Aguas de Alicante

Eva Mena Gil

responsable Innovación de Aguas de Murcia

Jordi Vinyoles Cartanyà

director del Área de Saneamiento de Companyia d'Aigües de Sabadell, S.A.



1. INTRODUCCIÓN

En diciembre de 2019, se detectaron, en la ciudad china de Wuhan (Hubei), diversos casos de personas con una neumonía de etiología desconocida hasta el momento. El análisis de la secuencia del virus determinó que el causante era un nuevo coronavirus, SARS-CoV-2. La enfermedad provocada por este virus, la COVID-19, afecta principalmente al sistema respiratorio, aunque también puede ocasionar daños al tracto digestivo y otros órganos. La presencia del virus en el tracto digestivo conlleva la excreción de este y, por tanto, el ARN viral se puede encontrar en las heces de algunas personas infectadas, así como también en el agua residual.

Diferentes estudios han reportado la presencia de ARN de SARS-CoV-2 en las aguas residuales en diversos países, como por ejemplo Holanda, Italia o Australia (Ahmed *et al.*, 2020; La Rosa, *et al.*, 2020; Medema *et al.*, 2020). Si bien la presencia de este material genético en el agua residual no es considerada un factor de riesgo para la transmisión del virus (Centers for Disease Control and Prevention, 2020) se ha postulado su presencia en agua residual como una

herramienta de vigilancia ambiental rápida y masiva para los estudios epidemiológicos, permitiendo detectar cambios en la circulación del virus en la población, e incluso pudiendo llegar a constituir un sistema de alerta temprana en caso de rebrotes de COVID-19 (Balboa, 2020; Daughton, 2020; Mallapaty, 2020; Medema, 2020; Randazzo, 2020).

El objetivo principal del presente estudio ha sido determinar la presencia de ARN de SARS-CoV-2 en diferentes puntos del ciclo urbano del agua, con el fin de evaluar su presencia y eliminación a través de los procesos de tratamiento y desinfección, así como su correlación con la evolución de casos de infectados. Para ello se han llevado a cabo campañas extensivas de muestreo en 5 ciudades españolas (Barcelona, Sabadell, Alicante, Murcia y Ourense), cubriendo 7 millones de habitantes equivalentes (he). El estudio ha incluido el análisis de diferentes puntos tales como la red de colectores en alta, estaciones depuradoras de agua residual (EDAR) (entrada, salida, puntos intermedios del tratamiento y fangos), así como también puntos de captación de estaciones de tratamiento de aguas potables (ETAP).

Este estudio representa el primer trabajo de gran alcance en la geografía española para la detección del SARS-CoV-2 en el ciclo urbano del agua en el que han participado diversas entidades, como laboratorios de análisis (Labaqua y Complejo Hospitalario Universitario de Vigo), operadoras de agua (Aguas de Barcelona, Aguas de Alicante, Aguas de Murcia, Aguas de Sabadell y Viaqua) y centros de investigación (Laboratorio de Virología de la Universidad de Barcelona, Instituto Cretus-USC y Cetaqua). Adicionalmente, el estudio se está complementando con campañas en Francia, en colaboración con Suez y el Centre International de Recherche Sur l'Eau et l'Environnement (CIRSEE), y se prevé su extensión a otros países y poblaciones.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. PUNTOS DE MUESTREO

Se recogieron muestras para el análisis de ARN de SARS-CoV-2 en 8 EDAR, 3 ETAP y 2 redes de colectores en alta en poblaciones con impacto diverso en relación con la COVID-19, desde puntos con alta afectación como Barcelona, hasta zonas con una afectación significativamente menor, como el caso de Murcia (**Figura 1**). Las muestras se tomaron en los puntos indicados, con una frecuencia como mínimo semanal, desde mediados de marzo hasta finales de mayo, suponiendo un total de más de 250 muestras.

En las ETAP se muestrearon las entradas de planta, mientras que para las EDAR se muestrearon tanto entrada como la salida, así como diferentes puntos intermedios del tratamiento, tanto de la línea de agua como de la línea de fangos, para recoger una amplia casuística

FIGURA 1. Localización de los sitios de muestreo.

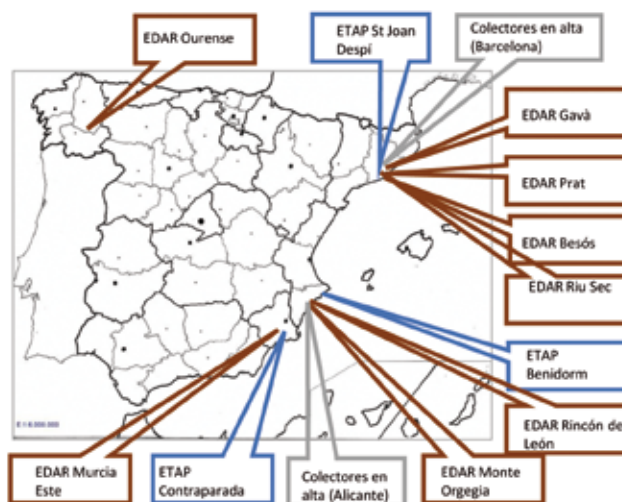


TABLA 1

PRINCIPALES CARACTERÍSTICAS DE LAS EDAR DEL ESTUDIO Y PUNTOS DE TOMA DE MUESTRA. TODAS LAS EDAR CUENTAN CON UN TRATAMIENTO PRIMARIO CONSISTENTE EN UN DESARENADOR Y DESGRASADOR SEGUIDO DE UN DECANTADOR PRIMARIO.

EDAR	Ciudad	Habiantes equivalentes	Tratamiento secundario	Tratamiento terciario	Tratamiento fangos	Puntos toma muestra
Besós	Barcelona	2.800.000	Fango activado + decantador		Espesado + deshidratación	Entrada, salida, fango espesado
El Prat	Barcelona	2.000.000	Fango activado + eliminación nutrientes + decantador	UV + Cloración	Espesado + digestión anaeróbica + deshidratación	Entrada, salida, fango espesado, fango digerido
Gavà	Barcelona	300.000	Reactor de membranas	Ultrafiltración	Espesado + digestión anaeróbica + deshidratación	Salida, salida terciario
Rius Sec	Sabadell	200.000	Reactor de membranas	Cloración	Espesado + digestión anaeróbica + deshidratación	Entrada, salida, salida terciario, fango espesado, fango digerido
Rincón de León	Alicante	306.592	Fango activado + decantador	Microfiltración/ Ultrafiltración	Espesado + digestión anaeróbica + deshidratación	Salida, salida terciario
Monte Orgegía	Alicante	186.562	Fango activado + eliminación nutrientes + decantador	Filtración + UV	Espesado + digestión anaeróbica + deshidratación	Entrada, salida, salida terciario, fango secundario, fango digerido
Murcia Este	Murcia	833.000	Fango activado + eliminación nutrientes + decantador	Cloración	Espesado + digestión anaeróbica + deshidratación	Entrada, salida, fango secundario
Ourense	Ourense	350.000	Fango activado (SBR) + eliminación nutrientes + Decantador	Microfiltración	Espesado + digestión anaeróbica + deshidratación + hidrólisis térmica	Entrada, salida primario, salida secundario, fango primario, fango secundario, fango espesado, fango digerido, fango hidrolizado

de procesos de tratamiento secundarios, terciarios y de tratamiento de fangos. Los puntos muestreados de cada EDAR, así como sus principales características de tratamiento, se muestran en la **Tabla 1**. Asimismo, se muestrearon diferentes puntos representativos de la red de colectores en alta de las ciudades de Alicante y Barcelona.

Para realizar la toma de muestra, se ha utilizado siempre que ha sido posible un equipo tomamuestras automático para minimizar el contacto con la muestra y poder tomar muestras integradas, y contando el personal que realiza la toma de muestra

con todos los equipos de protección individual necesarios como guantes, mascarilla y gafas o pantalla facial.

En los puntos de captación de agua potable y en los de salida de terciario se han tomado muestras de 20 L. En cambio, para las entradas y salidas (sin terciario) de EDAR y colectores se muestreó 1 L de agua, siempre que se pudo con muestra integrada de 24 h. Además, se han tomado muestras de 400 mL de fangos frescos y 100 g de fangos tratados. En todos los casos las muestras se conservaron en frío a $5 \pm 3^\circ\text{C}$ durante su transporte y conservación, previo a su análisis.

2.2. PROCESADO Y ANÁLISIS DE LAS MUESTRAS

El procesado de las muestras se adaptó en función del volumen recogido, así como también de las características de cada matriz como se describe brevemente a continuación.

Las muestras de agua de entrada de ETAP y salida del terciario se concentraron con cartuchos de diálisis (Aquavalens Report, 2016). La fracción eluida se concentró por centrifugación y el pellet final se resuspendió en el mínimo volumen posible para conservarlo congelado hasta su análisis.



Las muestras de las EDAR fueron sometidas a un tratamiento para la liberación del material genético del virus en suspensión, seguido de una centrifugación. El sobrenadante se sometió a precipitación con polietilenglicol (PEG), y a una segunda centrifugación, tras la cual se resuspendió el pellet en el mínimo volumen posible, igual que en el caso anterior (Hjelmsø, 2017).

La extracción y el análisis de ARN viral se realizó usando soluciones comerciales en tres laboratorios, dependiendo del origen de las muestras (**Figura 2**). Las muestras obtenidas en el área de Barcelona se analizaron en el laboratorio de Virus Entéricos de la Universidad de Barcelona. Las muestras de la EDAR de Ourense se analizaron en el Complejo Hospitalario Universitario de Vigo, mientras que las muestras del resto de localidades se analizaron en el laboratorio central de Labaqua en Alicante. Todos los protocolos y kits empleados están incluidos en el listado de recomendaciones del Centro para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC) de Atlanta.

Para la detección específica del SARS-CoV-2 por RT-q-PCR y para mayor robustez se emplearon diferentes dianas genéticas del virus de entre todas las recomendadas por instituciones internacionales como el Instituto Pasteur de París, el Instituto de Virología Charité de la Universidad Berlín y el CDC. Cada laboratorio analizó como mínimo dos dianas genéticas específicas del SARS-CoV-2, con la posibilidad de cuantificar la concentración de material genético del virus en las muestras positivas. En cada tanda analítica se incluyeron controles de calidad, tanto positivos como negativos. Tanto la metodología empleada, como las dianas genéticas y los

FIGURA 2. Procesado de muestras en laboratorio.



controles de calidad, validados por los expertos en virología, permiten obtener un resultado específico sin falsos positivos por otros virus distintos del SARS-CoV-2 y con una buena recuperación.

3. RESULTADOS

3.1. CAPTACIÓN PARA AGUA POTABLE

Se muestrearon tres captaciones, correspondientes a las ETAP de Sant Joan Despí (Barcelona), Contraparada (Murcia) y Benidorm (Alicante), representando diferentes masas de agua ambiental: río Llobregat para la ETAP de Sant Joan Despí; trasvase Tajo-Segura para la ETAP Contraparada; y ríos Guadalquivir, Amadorio y Canal Bajo del Algar para la ETAP de Benidorm. Las primeras muestras se recogieron a mediados de marzo de 2020 en la ETAP de Sant Joan Despí, mientras que en las ETAP Contraparada y Benidorm se muestrearon desde mediados de abril 2020. Estas muestras se tomaron con una frecuencia quincenal hasta finales de mayo de 2020.

En ninguna de las muestras analizadas procedentes de la captación para agua se detectó material genético de SARS-CoV-2. Estos resultados resultan más significativos en el caso del río Llobregat, que recibe un importante impacto antropogénico y que no presentó ARN de SARS-CoV-2 en ninguna de las muestras tomadas.

3.2. RED DE COLECTORES EN ALTA

Las muestras de agua de la red de colectores en alta se tomaron en dos ciudades, Barcelona y Alicante. Estas ciudades son representativas de diferente impacto de la COVID-19, siendo Barcelona más afectada que Alicante. Las muestras se tomaron a partir de mediados de mayo de 2020.

En la red de Alicante, se muestrearon diferentes puntos representativos de efluentes de agua de dos hospitales de la zona. Una de las muestras, tomada a finales de mayo en un punto cercano a un hospital, reportó presencia de ARN viral. Sin embargo, la muestra tomada el mismo día en la entrada de la EDAR correspondiente (Rincón de León), dio resultado negativo, lo que sugiere una pérdida de

ARN viral en el transcurso de la red de colectores por efecto dilución o degradación del material genético. El resto de las muestras tomadas en el alcantarillado dio resultado negativo, probablemente debido a la fecha de muestreo, cuando el número de casos en la ciudad era reducido.

En el caso de Barcelona, en los colectores en alta muestreados se siguieron detectando concentraciones bajas de SARS-CoV-2 durante el mes de mayo, aun cuando en las entradas de las correspondientes EDAR ya no se detectaba la presencia del virus. Esto confirma la utilidad del muestreo selectivo en estas infraestructuras para monitorizar la evolución del grado de incidencia de la COVID-19, así como la detección precoz de posibles rebrotes. Serán necesarias nuevas investigaciones para determinar con precisión la estabilidad del virus a lo largo de su transporte por la red de alcantarillado, hasta la llegada a las EDAR, en las fases finales de la bajada de la curva de la epidemia.

3.3. PLANTAS DE TRATAMIENTO DE AGUA RESIDUAL

La presencia o no de carga genética en los influentes a las EDAR depende de la evolución de la epidemia en el momento de la toma de muestra. La **Figura 3** muestra la evolución de los casos por 100.000 habitantes, de la población servida de las distintas EDAR, durante el período de análisis de muestras en estas instalaciones (abril y mayo, 2020).

En las EDAR de Monte Orgegia, Rincón de León (Alicante) y Murcia Este (Murcia) no se detectó presencia del virus en la entrada de estas plantas, habiéndose tomado las muestras a partir de mediados de abril cuando la incidencia del virus ya era baja. Sin embargo, en la EDAR de Ourense se detectó carga genéti-

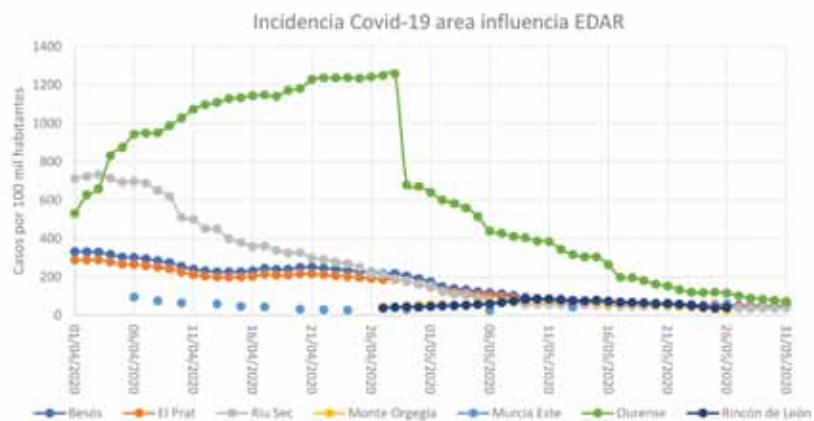
ca en todas las muestras, lo que resulta razonable dado que había una prevalencia significativa durante el tiempo de muestreo a principios de abril. Resulta de interés observar cómo en las EDAR de Barcelona (El Prat y Besòs) se detectó presencia del virus desde el inicio de las campañas de muestreo, en abril, hasta mediados de mayo de 2020, observándose una disminución progresiva a medida que va remitiendo el número de casos activos, no detectándose ya en las últimas muestras tomadas. En la planta de Riu Sec de Sabadell se observó un comportamiento similar, ya que las primeras muestras tomadas en esta planta (tercera semana de abril de 2020) resultaron positivas mientras que la carga genética desapareció en las últimas muestras, tras el importante descenso de la incidencia de la epidemia.

Las muestras de agua analizadas en la salida de las EDAR (sin terciario) presentaron una presencia de ARN de SARS-CoV-2 significativamente inferior al agua de entrada. Solo en dos muestras de salida se determinó la presencia de ARN viral. Además,

los resultados cuantificados de estas muestras reportaron una disminución significativa de ARN viral (comparando con las muestras de entrada del mismo día), igual o superior a 2 log, para la mayoría de los genes diana. Estos resultados indican la capacidad de las EDAR de reducir la concentración del ARN de SARS-CoV-2 de la línea de agua. En las EDAR que contaban con tratamiento terciario la eliminación de ARN viral fue completa.

Cabe destacar el caso de la EDAR de Ourense, donde se realizó un muestreo en un gran número de puntos de la planta y no se detectó el ARN del SARS-CoV-2 en el efluente, pero sí en la línea de fangos y mayoritariamente antes de la digestión anaeróbica. Todo esto parece indicar que la línea de fangos actúa como un concentrador de material genético SARS-CoV-2 y que, en concreto, el espesador de fangos parece el lugar más adecuado para detectar el material genético SARS-CoV-2 (Balboa, 2020). Esta planta, dotada además de un tratamiento de hidrólisis térmica, eliminó sistemáticamente todo ARN viral de los lodos.

FIGURA 3. Casos de COVID-19 por 100.000 habitantes, por área de influencia de las EDAR estudiada. Para aquellas regiones que reportan solo casos acumulados se ha estimado una excreción del virus por paciente de 15 días. El sistema de recuento de casos se modificó en Ourense el 29 de abril. Fuente datos: Besòs, El Prat y Riu Sec, <https://analisi.transparenciacatalunya.cat/>; Monte Orgegia y Rincón de León, <https://dadesobertes.gva.es/>; Murcia Este, <http://www.murciasalud.es/>; y Ourense, <https://www.sergas.es/Saude-publica/>.





Del mismo modo, se determinó la presencia de ARN viral en el fango digerido de las EDAR de El Prat (Barcelona) y Monte Orgegia (Alicante). Al igual que en el caso de Ourense, en la planta de El Prat (Barcelona) la presencia en los lodos se correlacionó con la detección en la corriente influente a la EDAR. Sin embargo, en el fango de la EDAR de Monte Orgegia se detectó ARN viral en concentraciones bajas, pero no se detectó en la entrada de la planta de ese día. La presencia de este ARN puede estar relacionada con el tiempo de retención del fango en el digestor. De esta manera, el ARN determinado podría corresponder a muestras de agua de los 15 días precedentes (tiempo de retención del fango). Es relevante señalar que esta diferencia de quince días hace corresponder las muestras con las fechas de máxima incidencia de la pandemia en la Comunidad Valenciana, pasadas las cuales se registró un acusado descenso.

4. CONCLUSIONES

El análisis de más de 250 muestras en distintos puntos del ciclo urbano del agua permite concluir que no se ha encontrado presencia de material genético de SARS-CoV-2 en la captación de ETAP, aunque sí en los colectores, la entrada las EDAR y fangos en los puntos de muestreo situados en zonas afectadas por la COVID-19, durante el pico de la epidemia. En los colectores esta detección ha llegado a realizarse en momentos de una incidencia baja de la epidemia. Además, en las zonas más afectadas, y durante el pico epidemiológico de la enfermedad, se han encontrado positivos también en salida de las depuradoras. Respecto a los fangos, se cree que podrían actuar como un punto donde se concentra el material genético del virus. Los expertos

descartan que los positivos detectados tengan capacidad infectiva.

Se ha demostrado que la detección del virus en colectores, aguas residuales y fangos permite determinar el grado de prevalencia de la enfermedad en una población y se ajusta a tendencias de la evolución de la epidemia en las distintas ciudades, por lo que se puede utilizar como herramienta de vigilancia epidemiológica de la infección.

Estos estudios de vigilancia medioambiental, que ya se han empleado en otras ocasiones para estudiar la evolución de otros virus como poliovirus (incluido por la Organización Mundial de la Salud en la fase final del plan estratégico de erradicación global de la poliomielitis), podrían permitir el seguimiento del control de la pandemia durante los próximos meses y ayudar a detectar precozmente posibles rebrotes de cara a los meses de otoño e invierno, complementando el plan estratégico sanitario.

Este trabajo ha sido posible gracias a la colaboración de las Universidades de Barcelona y Santiago de Compostela, que aportan su conocimiento en virus y en ingeniería química, respectivamente, así como sus laboratorios especializados, junto con las capacidades analíticas de Labaqua, el conocimiento de redes y operación de las operadoras de agua de Agbar y su centro de investigación, Cetaqua. Además, se está colaborando con otras iniciativas europeas como el estudio internacional de Suez en Francia y España, la propuesta por la red Norman (www.norman-network.net/) para la estandarización de métodos de detección de material genético del SARS-CoV-2, así como de manera activa en la promovida por el Joint Research Center, el servicio científico interno de la Comisión

Europea, que lleva por título *Feasibility assessment for an EUwide Wastewater Monitoring System for SARS-CoV-2 Surveillance*.

5. AGRADECIMIENTOS

A Suez, por la financiación del estudio. Al Área Metropolitana de Barcelona (AMB), al Ayuntamiento de Sabadell, al Concello de Ourense, al Ayuntamiento de Alicante y a la Entidad de Saneamiento y Depuración de Aguas Residuales de la Región de Murcia (Esamur), entidades reguladoras de los lugares en que se ha realizado el estudio.

Bibliografía

- [1] Ahmed, W.; Edson, J.; Bibby, K.; Bivins, A.; O'Brien, J. W.; Choi, P. M.; Kitajima, M.; Simpson, S. L.; Li, J.; Tscharke, B.; Verhagen, R.; Smith, W. J. M.; Zaugg, J.; Dierens, L.; Hugenholtz, P.; Thomas, K. V.; 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*, núm. 728, 138764.
- [2] Aquavalens Report 10.2. (2016). Report on the selection of the newly developed tools and experimental plan. <http://aquavalens.org/>.
- [3] Balboa, S.; Mauricio-Iglesias, M.; Rodríguez, S.; Martínez-Lamas, L.; Vasallo, F.J.; Regueiro B.; Lema, J.M. (2020). The fate of SARS-COV-2 in WWTPS points out the sludge line as a suitable spot for monitoring. *MedRxiv*. doi: <https://doi.org/10.1101/2020.05.25.20112706>.
- [4] Centers for Disease Control and Prevention. (2020). Coronavirus Disease 2019 (COVID-19). <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/>
- [5] Daughton, C.G. (2020). Wastewater surveillance for population-wide COVID-19: The present and future. *Science of the Total Environment*, núm. 736, 139631.
- [6] 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. (2017). Evaluation of methods for the concentration and extraction of viruses from sewage in the context of metagenomic sequencing. *PLoS One*, núm. 12, págs. 1-17
- [7] La Rosa, G.; Iaconelli, M.; Mancini, P.; Bonanno-Ferraro, G.; Veneri, C.; Bonadonna, L.; Lucentini, L.; Suffredini, E. (2020). First detection of SARS-CoV-2 in untreated wastewaters in Italy. *Science of the Total Environment*, núm. 736, 139652.
- [8] Mallapaty, S. (2020). How sewage could reveal true scale of coronavirus outbreak. *Nature*, núm. 580, págs. 176-177.
- [9] Medema, G.; Heijnen, L.; E. Ronald; Italiaander, R.; 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. *Env. Science and Technology Letters*, <https://dx.doi.org/10.1021/acs.estlett.0c00357>.
- [10] Randazzo, W.; Truchado, P.; Cuevas-Ferrando E.; Simon P.; Allende A.; Sanchez, G. (2020). SARS-CoV-2 RNA in wastewater anticipated COVID-19 occurrence in a low prevalence area. *Water Research*, núm. 181, 115942.