

RESSALVA

Atendendo solicitação do autor, o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 26/05/2024.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Câmpus de São José do Rio Preto

Renan Moura Martins

**Deteccção e vigilância do vírus SARS- CoV- 2 em Estação de
Tratamento de Esgoto (ETE) de São José do Rio Preto.**

São José do Rio Preto

2022

Rena Moura Martins

Deteccção e vigilância do vírus SARS- CoV- 2 em Estação de Tratamento de Esgoto (ETE) de São José do Rio Preto.

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Microbiologia, junto ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de São José do Rio Preto.

Financiadora: CAPES 88887.487494/2020-00

Orientador: Prof^ª. Dr^ª. Marília de Freitas Calmon

Coorientador: Prof^ª. Dr^ª. Paula Rahal

São José do Rio Preto

2022

M386d	Martins, Renan Moura Detecção e vigilância do vírus SARS- CoV- 2 em Estação de Tratamento de Esgoto (ETE) de São José do Rio Preto. / Renan Moura Martins. -- São José do Rio Preto, 2022 62 p. : il., tabs. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto Orientadora: Marília de Freitas Calmon Coorientadora: Paula Rahal 1. SARS-CoV-2. 2. Vigilância epidemiológica. 3. Águas residuais. 4. Quantificação temporal da carga viral. I. Título.
-------	---

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

Renan Moura Martins

Detecção e vigilância do vírus SARS- CoV- 2 em Estação de Tratamento de Esgoto (ETE) de São José do Rio Preto.

Qualificação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Microbiologia, junto ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de São José do Rio Preto.

Financiadora: CAPES 88887.487494/2020-00

Comissão Examinadora

Prof^a. Dr^a. Marília de Freitas Calmon

UNESP – Câmpus de São José do Rio Preto

Orientadora

Dr^a. José Geraldo Nery

UNESP – Câmpus de São José do Rio Preto

Prof. Dr. Adriano Mondini

UNESP – Câmpus de Araraquara

São José do Rio Preto

26 de maio de 2022

Àqueles que apesar de todas as adversidades sempre acreditaram que eu seria capaz de atingir meus objetivos.

AGRADECIMENTOS

Aos professores, alunos e funcionários do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Unesp de São José do Rio Preto, que contribuíram de alguma forma para o meu sucesso acadêmico, e que de alguma forma tenham apoiado meu aprendizado.

Em especial minha Orientadora, Marília de Freitas Calmon, pelo suporte e condução das ideias, pela paciência, compreensão e atenção em todo o tempo da construção deste estudo, além de ser uma mão amiga que sempre estava ao meu lado em diversos momentos, tanto bons como ruins.

Minha coorientadora Profa. Dra. Paula Rahal, que desde o início me encorajou e proporcionou a oportunidade da pesquisa, além de ceder a infraestrutura necessária para os experimentos; além de sempre ser uma ótima companhia para uma boa xícara de café.

À Rafael Nava Micelli, técnico do SEMAE, e a toda equipe técnica, por todo apoio e cooperação, e pela ajuda com os materiais, coleta e processamento das águas; a colaboração com este projeto foi vital para a sua idealização e realização.

Agraço ao Professor Raghuvir Krishnaswamy Arni, e ao Doutor Ricardo Barros Mariutti, que me orientaram nos meus primeiros passos da carreira científica.

À Monika Aparecida Coronado, que sempre viu um enorme potencial em mim e que me ajudou a ser mais focado e objetivo nos meus propósitos.

A toda minha família, em especial minha amada mãe Edilene, que sempre acreditou e me incentivou, e que acreditou em mim quando eu disse que queria ser um Cientista.

À toda equipe atual, e de egressos, do Laboratório de Estudo genômicos: Lenira, Gabi, Ágata, Diego, Cíntia, Dayane, Nicolas, Maria Letícia, Gabriela, Tamara, Nícolas, Paola, Pâmela, Barbara, Nayara, Diego e Guilherme.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelos recursos e equipamentos utilizados nesta investigação.

Para todas as vítimas da pandemia de COVID-19, causada pelo SARS-CoV-2, que pereceram e estão em nossas memórias.

RESUMO

A Organização Mundial de Saúde declarou os casos de Síndrome Respiratória Aguda Grave causada pelo vírus SARS-CoV-2, como uma Emergência de Saúde Pública de Interesse Internacional e o status de pandemia foi oficialmente reconhecido pela OMS em 11 de março de 2020. A Epidemiologia Baseada em Águas Residuais ganhou grande notoriedade uma vez detectada a presença do novo agente ao redor do globo em diversas amostras ambientais, tal técnica já fora anteriormente descrita em trabalhos monitorando outros vírus a nível comunitário, como: Poliovírus, Enterovírus, Adenovírus Rotavírus e Vírus da Hepatite A. Através da detecção de material genético nas águas residuais a técnica atua como uma ferramenta complementar importante de alerta precoce. Nosso objetivo com este trabalho foi avaliar a presença do RNA do SARS-CoV-2 nos efluentes domésticos de São José do Rio Preto- SP/ Brasil, e sua dinâmica durante o período de um ano, e investigar a relação com outros parâmetros ambientais. De 15 de julho de 2020 a 16 de julho de 2021 foram coletadas amostras de esgoto primário provenientes da Estação de Tratamento de Esgoto de São José do Rio Preto. As amostras passaram por uma etapa de concentração viral por ultracentrifugação, seguida por extração do RNA viral e posterior transcrição reversa para a quantificação através de Reação em Cadeia pela Polimerase em tempo real (RT-qPCR). No método de análise (one-step) o RNA de SARS-CoV-2 foi detectado nas 150 amostras em pelo menos um dos alvos, sendo a proporção de 100% para o alvo N1 e de 96,6% para o alvo N2. A quantificação variava de 1×10^3 até 1.3×10^5 cópias de RNA viral por litro de esgoto para o alvo N1, e 0 até 8.6×10^4 cópias de RNA viral por litro de esgoto para o alvo N2. Os dados a carga viral no esgoto doméstico são capazes de prever uma variação do número de infectados na população com um atraso médio de cinco dias. Observamos ainda uma correlação negativa entre a temperatura do esgoto e o sinal viral no esgoto, e o número de casos notificados de infecções por SARS-CoV-2. Observamos uma correlação negativa entre a temperatura do ar e o título viral de SARS-CoV-2. Uma correlação estatística também foi encontrada entre o fluxo médio de esgoto na estação com os títulos virais do alvo N1 do SARS-CoV-2. Também foi observado um número maior de cópias virais, para o alvo N1, nas águas residuais coletadas em dias não chuvosos. Com base nos dados obtidos, propomos que o monitoramento amplo dos efluentes domésticos permite uma visão mais ampla e comunitária da doença, e em combinação com a investigação clínica contribui para um melhor entendimento da dinâmica de circulação do vírus na população, sendo uma estratégia importante para a tomada de decisão das autoridades sanitárias em países pobres ou com renda média, servindo como um sistema de alerta rápido e barato capaz de antecipar futuros surtos de COVID-19, além de poder ser usada em cenários de falta de testes diagnósticos individuais.

Palavras-Chave: SARS-CoV-2. Vigilância epidemiológica. Águas residuais. Quantificação temporal da carga viral.

ABSTRACT

The World Health Organization declared the cases of Severe Acute Respiratory Syndrome caused by the SARS-CoV-2 virus as a Public Health Emergency of International Concern and the pandemic status was officially recognized by the WHO on March 11th, 2020. Epidemiology Based on Wastewater, it gained great notoriety once the presence of the new agent around the globe was detected in several environmental samples, this technique had been previously described in works monitoring other viruses at the community level, such as: Poliovirus, Enterovirus, Adenovirus Rotavirus and Hepatitis A. Through the detection of genetic material in wastewater, the technique acts as an important complementary tool for early warning. Our objective with this work was to evaluate the presence of SARS-CoV-2 RNA in domestic effluents from São José do Rio Preto-SP/ Brazil, and its dynamics during a period of one year, and to investigate the relationship with others environmental parameters. From July 15th, 2020 to July 16th, 2021, samples of primary sewage were collected from the São José do Rio Preto Sewage Treatment Station. The samples underwent a viral concentration step by ultracentrifugation, followed by viral RNA extraction and subsequent reverse transcription for quantification by real-time Polymerase Chain Reaction (RT-qPCR). In the analysis method (one-step) the RNA of SARS-CoV-2 was detected in the 150 samples in at least one of the targets, the proportion being 100% for the N1 target and 96.6% for the N2 target. The quantification ranged from 1×10^3 to 1.3×10^5 copies of viral RNA per liter of sewage for the N1 target, and 0 to 8.6×10^4 copies of viral RNA per liter of sewage for the N2 target. Data on viral load in domestic sewage are able to predict a variation in the number of infected people in the population with an average delay of five days. We also observed a negative correlation between sewer temperature and viral signal in sewer, and the number of reported cases of SARS-CoV-2 infections. We observed a negative correlation between air temperature and SARS-CoV-2 viral titer. A statistical correlation was also found between the mean sewage flow at the station and the viral titers of the SARS-CoV-2 N1 target. A higher number of viral copies for the N1 target was also observed in wastewater collected on non-rainy days. Based on the data obtained, we propose that the broad monitoring of domestic effluents allows a broader and more community-based view of the disease, and in combination with clinical investigation contributes to a better understanding of the dynamics of virus circulation in the population, being an important strategy for decision-making by health authorities in poor or middle-income countries, serving as a quick and inexpensive warning system, capable of anticipating future outbreaks of COVID-19, as well as being able to be used in scenarios where individual diagnostic tests are lacking.

Key words: SARS-CoV-2. Epidemic surveillance. Wastewater. Temporal viral quantification.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema das principais proteínas estruturais dos <i>Coronavirus</i>	13
Figura 2. Estrutura do genoma e replissoma de SARS- CoV- 2.....	14
Figura 3. Estrutura da glicoproteína Spike do SARS- CoV- 2.....	16
Figura 4. Esquema representativo do ciclo replicativo dos <i>Coronavirus</i>	19

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACE2	Angiotensin-converting enzyme 2
CDC	Centers for Disease Control and Prevention
cDNA	Complementary DNA
COVID-19	<i>Coronavirus</i> disease 2019
DEPEC	Dietilpirocarbonato
DNA	Desoxirribonucleic Acid
DQO	Demanda Química de Oxigênio
dsRNA	Double-Stranded RNA
ETE	Estação de Tratamento de Esgoto
HCoV-229E	Human coronavirus 229E
IBV	Infectious bronchitis virus
ICTV	International Committee on Taxonomy of Viruses
MERS	Middle East respiratory syndrome
MERS-CoV	Middle East respiratory syndrome–related coronavirus
mRNA	Messenger RNA
OMS	Organização Mundial da Saúde
PCR	Polymerase Chain Reaction
RBD	Receptor-binding domain
RNA	Ribonucleic Acid
RT-qPCR	Quantitative reverse transcription PCR
SARS	Severe acute respiratory syndrome
SARS-CoV-1	Severe acute respiratory syndrome coronavirus 1
SARS-CoV-2	Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2
ssRNA	Single-stranded RNA
UASB	Upflow Anaerobic Sludge Blanket
WHO	World Health Organization
WWBE	Wastewater Based Epidemiology

LISTA DE SÍMBOLOS

M³	Metro cúbico
kg	Quilograma
s	Segundo
L	Litros
mg	Miligramas
mol	Mol
h	Horas
pH	Potencial Hidrogeniônico
g	Força da Gravidade
°C	Graus Célsius
ml	Mililitros
µm	Micrômetros
µl	Microlitros
nM	Nano Mol
mM	Mili Mol
min	Minutos
CG	Cópias de genoma viral

Sumário

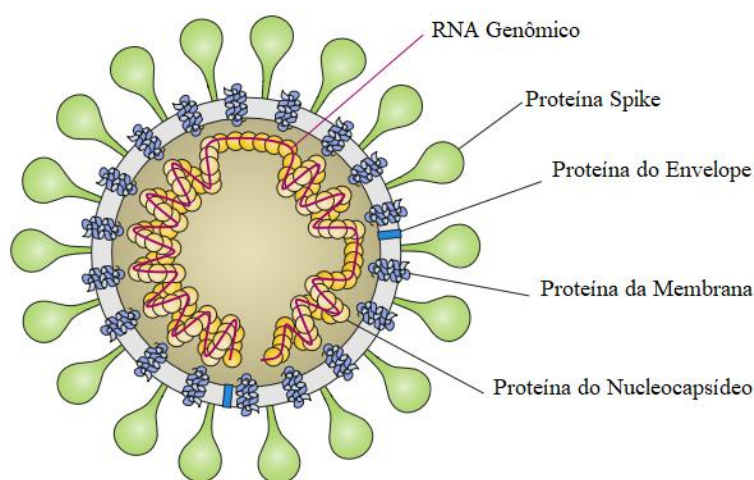
1- CAPÍTULO I CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	13
1.1. Introdução.....	13
1.2. SARS- CoV- 2.....	15
1.3. Aspectos biológicos, epidemiológicos e clínicos.....	18
1.4. Epidemiologia baseada em águas residuais - uma estratégia de vigilância epidemiológica com amplas aplicações.....	20
1.5. Justificativa.....	24
1.6. Objetivos.....	25
1.6.1. Objetivo geral	25
1.6.2. Objetivos específicos.....	26
REFERÊNCIAS.....	27
2 CAPÍTULO II – ARTIGO CIENTÍFICO.....	34
LONG-TERM WASTEWATER SURVEILLANCE FOR SARS-COV-2: ONE YEAR STUDY IN BRAZIL.	35
2.1 Abstract	35
2.2. Graphical abstract	36
2.3. Introduction.....	36
2.3 Methodology.....	37
2.3.1 Sampling	37
2.3.2 RNA extraction and quantitative PCR.....	38
2.3.4 Detection limit and qPCR inhibition control	39
2.4 Data analysis.....	39
2.5 Results and Discussion	40
2.6 Conclusions	43
REFERENCES	44
3 CAPÍTULO III – CONCLUSÃO	50
3.1. Considerações Finais	51
ANEXO A- DADOS PRIMÁRIOS COLETADOS AO LONGO DA PESQUISA.....	55

1- CAPÍTULO I – CONSIDERAÇÕES GERAIS

1.1. Introdução

Os *Coronavírus* compreendem um grupo altamente diverso de vírus envelopados, com material genético de RNA de fita simples, de polaridade positiva e com genoma que varia de 26,4 a 31,7 kilobases; algo pouco comum em um vírus de RNA(WOO et al., 2010). Seu genoma se organiza em genes replicantes e acessórios (FEHR; PERLMAN, 2015), que codificam diferentes tipos de proteínas estruturais do vírion entre as principais temos: a glicoproteína Spike (S) que na forma tetramérica se encontra em toda superfície do vírion (que forma uma estrutura muito semelhante a uma coroa, que em latim se escreve corona, que originou o nome do grupo), a Nucleoproteína (N) que está associada ao RNA genômico, a proteína constituinte da Membrana vira (M) e a proteína pentamérica que constitui o Envelope (E) viral (GORBALENYA et al., 2020a; HOLSHUE et al., 2020; KIM et al., 2020; NEUMAN et al., 2011) conforme pode ser visto na **figura 1**.

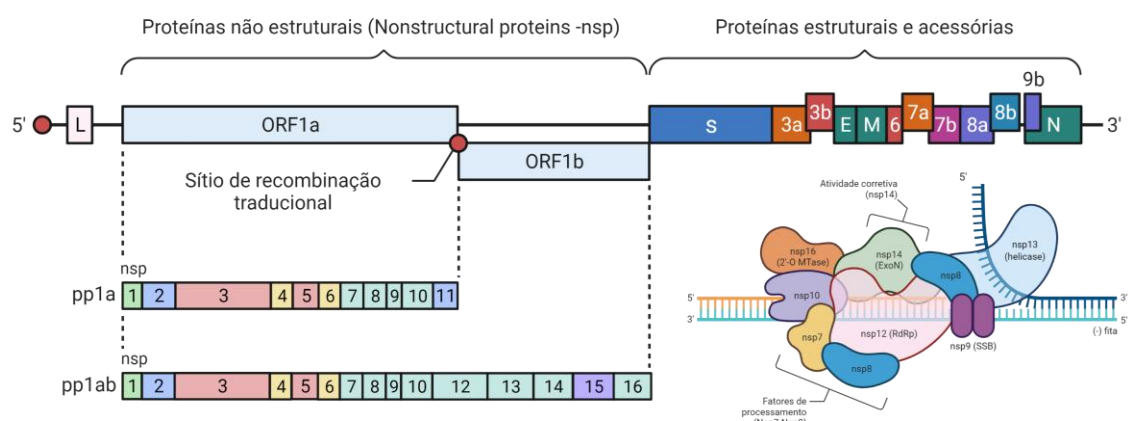
Figura1. Esquema das principais proteínas estruturais dos *Coronavirus*.



Fonte: Adaptado de Kim e colaboradores(2020).

Uma característica notável na família *Coronaviridae* é o tamanho do seu genoma; se comparada a grande maioria das famílias de vírus de RNA este é cerca de três vezes maior; como exemplo o genoma dos vírus da família *Flaviviridae* que possuem por volta de 11 kilobases (HARTENIAN et al., 2020; LINDENBACH et al., 2013). Uma possível hipótese que se levanta para a manutenção de um genoma deste tamanho nesta família em especial seria a capacidade de correção contra erros (proofreading) em decorrência da replicação do material genético durante o ciclo reprodutivo do vírus. Durante a replicação, o vírus SARS-CoV-2 utiliza um complexo multiprotéico denominado replissomo, composto pela RNA polimerase dependente de RNA (nsp12), fatores de processamento (nsp7 e nsp8), uma helicase (nsp13), uma proteína de ligação de fita-simples (nsp9) e uma exonuclease de ação de revisão e correção (nsp14), além de outros co-fatores (como nsp10) e enzimas auxiliares (nsp16) intrínsecas ao processo de replicação (HARTENIAN et al., 2020). Tal replissomo pode ser remanescente de organismos com genomas baseados em DNA, algo que pode explicar essa característica distintiva nos *Coronavirus* (HARTENIAN et al., 2020; KIM et al., 2020). Uma representação esquemática do complexo pode ser vista na **figura 2**.

Figura 2. Estrutura do genoma e replissoma de SARS- CoV- 2.



Fonte: Adaptado de Hartenian e colaboradores (2020) e Kim e colaboradores (2020).

2.6 Conclusions

In conclusion, the SARS-CoV-2 RNA concentrations in primary sewage sludge were tracked throughout a COVID-19 epidemic during one year and compared with environmental and populational parameters. Monitoring primary sludge is a broadly applicable strategy and can contribute to solve the pressing problem of insufficient diagnostic testing and provide a cheap and early warning method for future COVID-19 outbreaks mainly in lower- and middle-income countries. Besides, Wastewater based epidemiology can also be used as a tool for the decision of the post-isolation phase (restarting activities and finishing the isolation if the population), reinstatement of isolation facing a rebound or seasonal re-emergence, as earlier alert-tool without random-diagnostic testing.

REFERENCES

1. Cheung KS, Hung IFN, Chan PPY, Lung KC, Tso E, et al. (2020) Gastrointestinal Manifestations of SARS-CoV-2 Infection and Virus Load in Fecal Samples From a Hong Kong Cohort: Systematic Review and Meta-analysis. *Gastroenterology* 159: 81-95.
2. Wu Y, Guo C, Tang L, Hong Z, Zhou J, et al. (2020) Prolonged presence of SARS-CoV-2 viral RNA in faecal samples. *Lancet Gastroenterol Hepatol* 5: 434-435.
3. Xu Y, Li X, Zhu B, Liang H, Fang C, et al. (2020) Characteristics of pediatric SARS-CoV-2 infection and potential evidence for persistent fecal viral shedding. *Nat Med* 26: 502-505.
4. Westhaus S, Weber FA, Schiwy S, Linnemann V, Brinkmann M, et al. (2021) Detection of SARS-CoV-2 in raw and treated wastewater in Germany - Suitability for COVID-19 surveillance and potential transmission risks. *Sci Total Environ* 751: 141750.
5. Santiso-Bellon C, Randazzo W, Perez-Cataluna A, Vila-Vicent S, Gozalbo-Rovira R, et al. (2020) Epidemiological Surveillance of Norovirus and Rotavirus in Sewage (2016-2017) in Valencia (Spain). *Microorganisms* 8.
6. Cuevas-Ferrando E, Randazzo W, Perez-Cataluna A, Sanchez G (2019) HEV Occurrence in Waste and Drinking Water Treatment Plants. *Front Microbiol* 10: 2937.
7. Asghar H, Diop OM, Weldegebriel G, Malik F, Shetty S, et al. (2014) Environmental surveillance for polioviruses in the Global Polio Eradication Initiative. *J Infect Dis* 210 Suppl 1: S294-303.
8. Zahedi A, Monis P, Deere D, Ryan U (2021) Wastewater-based epidemiology-surveillance and early detection of waterborne pathogens with a focus on SARS-CoV-2, *Cryptosporidium* and *Giardia*. *Parasitol Res* 120: 4167-4188.
9. Ahmed W, Angel N, Edson J, Bibby K, Bivins A, et al. (2020) First confirmed detection of SARS-CoV-2 in untreated wastewater in Australia: A proof of concept for the wastewater surveillance of COVID-19 in the community. *Sci Total Environ* 728: 138764.
10. Kumar M, Patel AK, Shah AV, Raval J, Rajpara N, et al. (2020) First proof of the capability of wastewater surveillance for COVID-19 in India through detection of genetic material of SARS-CoV-2. *Sci Total Environ* 746: 141326.
11. CDC (2020) Research Use Only 2019-Novel Coronavirus (2019-nCoV) Real-time RT-PCR Primers and Probes
12. Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, et al. (2009) The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem* 55: 611-622.

13. Hamza IA, Jurzik L, Stang A, Sure K, Uberla K, et al. (2009) Detection of human viruses in rivers of a densely-populated area in Germany using a virus adsorption elution method optimized for PCR analyses. *Water Res* 43: 2657-2668.
14. Lazuka A, Arnal C, Soyeux E, Sampson M, Lepeuple AS, et al. (2021) COVID-19 wastewater based epidemiology: long-term monitoring of 10 WWTP in France reveals the importance of the sampling context. *Water Sci Technol* 84: 1997-2013.
15. Wu F, Xiao A, Zhang J, Moniz K, Endo N, et al. (2021) Wastewater surveillance of SARS-CoV-2 across 40 U.S. states from February to June 2020. *Water Res* 202: 117400.
16. Weidhaas J, Aanderud ZT, Roper DK, VanDerslice J, Gaddis EB, et al. (2021) Correlation of SARS-CoV-2 RNA in wastewater with COVID-19 disease burden in sewersheds. *Sci Total Environ* 775: 145790.
17. Melvin RG, Chaudhry N, Georgewill O, Freese R, Simmons GE (2021) Predictive power of SARS-CoV-2 wastewater surveillance for diverse populations across a large geographical range. *medRxiv*.
18. Johnson R, Muller CJF, Ghoor S, Louw J, Archer E, et al. (2021) Qualitative and quantitative detection of SARS-CoV-2 RNA in untreated wastewater in Western Cape Province, South Africa. *S Afr Med J* 111: 198-202.
19. Kopperi H, Tharak A, Hemalatha M, Kiran U, Gokulan CG, et al. (2021) Defining the methodological approach for wastewater-based epidemiological studies- Surveillance of SARS-CoV-2. *Environ Technol Innov* 23: 101696.
20. Haramoto E, Malla B, Thakali O, Kitajima M (2020) First environmental surveillance for the presence of SARS-CoV-2 RNA in wastewater and river water in Japan. *Sci Total Environ* 737: 140405.
21. Hasan SW, Ibrahim Y, Daou M, Kannout H, Jan N, et al. (2021) Detection and quantification of SARS-CoV-2 RNA in wastewater and treated effluents: Surveillance of COVID-19 epidemic in the United Arab Emirates. *Sci Total Environ* 764: 142929.
22. Balboa S, Mauricio-Iglesias M, Rodriguez S, Martinez-Lamas L, Vasallo FJ, et al. (2021) The fate of SARS-COV-2 in WWTPS points out the sludge line as a suitable spot for detection of COVID-19. *Sci Total Environ* 772: 145268.
23. Randazzo W, Truchado P, Cuevas-Ferrando E, Simon P, Allende A, et al. (2020) SARS-CoV-2 RNA in wastewater anticipated COVID-19 occurrence in a low prevalence area. *Water Res* 181: 115942.
24. Cavany S, , Bivins A, , Wu Z, et al. (2022) Inferring SARS-CoV-2 RNA shedding into wastewater relative to time of infection. *Epidemiology & Infection*.
25. D'Aoust PM, Mercier E, Montpetit D, Jia JJ, Alexandrov I, et al. (2021) Quantitative analysis of SARS-CoV-2 RNA from wastewater solids in

- communities with low COVID-19 incidence and prevalence. *Water Res* 188: 116560.
26. Nemudryi A, Nemudraia A, Wiegand T, Surya K, Buyukyoruk M, et al. (2020) Temporal Detection and Phylogenetic Assessment of SARS-CoV-2 in Municipal Wastewater. *Cell Rep Med* 1: 100098.
 27. Kumar M, Joshi M, Patel AK, Joshi CG (2021) Unravelling the early warning capability of wastewater surveillance for COVID-19: A temporal study on SARS-CoV-2 RNA detection and need for the escalation. *Environ Res* 196: 110946.
 28. Koureas M, Amoutzias GD, Vontas A, Kyritsi M, Pinaka O, et al. (2021) Wastewater monitoring as a supplementary surveillance tool for capturing SARS-COV-2 community spread. A case study in two Greek municipalities. *Environ Res* 200: 111749.
 29. Petala M, Kostoglou M, Karapantsios T, Dovas CI, Lytras T, et al. (2022) Relating SARS-CoV-2 shedding rate in wastewater to daily positive tests data: A consistent model based approach. *Sci Total Environ* 807: 150838.
 30. Hart OE, Halden RU (2020) Modeling wastewater temperature and attenuation of sewage-borne biomarkers globally. *Water Res* 172: 115473.
 31. Kevill JL, Pellett C, Farkas K, Brown MR, Bassano I, et al. (2022) A comparison of precipitation and filtration-based SARS-CoV-2 recovery methods and the influence of temperature, turbidity, and surfactant load in urban wastewater. *Sci Total Environ* 808: 151916.
 32. Aaron Bivins JG, #Robert Fischer, Kwe Claude Yinda, Warish Ahmed, Masaaki Kitajima,, Vincent J. Munster aKB (2020) Persistence of SARS-CoV-2 in Water and Wastewater. *Environ Sci Technol Lett* 7.
 33. Tran HN, Le GT, Nguyen DT, Juang RS, Rinklebe J, et al. (2021) SARS-CoV-2 coronavirus in water and wastewater: A critical review about presence and concern. *Environ Res* 193: 110265.
 34. Kampf G, Todt D, Pfaender S, Steinmann E (2020) Persistence of coronaviruses on inanimate surfaces and their inactivation with biocidal agents. *J Hosp Infect* 104: 246-251.
 35. Henwood AF (2020) Coronavirus disinfection in histopathology. *J Histotechnol* 43: 102-104.
 36. Ort C, Lawrence MG, Rieckermann J, Joss A (2010) Sampling for pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) and illicit drugs in wastewater systems: are your conclusions valid? A critical review. *Environ Sci Technol* 44: 6024-6035.
 37. Ort C, Lawrence MG, Reungoat J, Mueller JF (2010) Sampling for PPCPs in wastewater systems: comparison of different sampling modes and optimization strategies. *Environ Sci Technol* 44: 6289-6296.