



Derleme

Covid-19 (SARS-CoV-2)'un Atıksularda İzlenmesi ile Erken Uyarı Sistemlerinin Oluşturulması

Establishing early warning systems by monitoring Covid-19 (SARS-CoV-2) in wastewater

Aslı Atasoy, Evsen Yavuz Guzel, Nebile Daglioglu*

Öz: **Amaç:** Atıksu epidemiyolojisi çalışmaları, klinik test kapasitesi sınırlı olduğunda bulaşıcı hastalıkların varlığını ve hatta yaygınlığını ölçmek ve izlemek için tamamlayıcı bir yaklaşımdır. Bu epidemiyoloji koronavirüslerin atık sularda tespiti ile toplumda nasıl bir yayılım gösterdiği hakkında da yardımcı olabilmektedir. COVID-19 pandemisinde, SARS-CoV-2 enfekte kişilerin dışkılarıyla birlikte atılmakta ve atık sulara karışmaktadır. Enterik olarak bulaşan virüslerle enfekte olan çoğu kişi, semptomlar başlamadan önce ve başladıktan sonra, günler veya haftalar boyunca dışkıları ile virüsü hem yaymakta ve kanalizasyon sistemlerine atmaktadırlar. Atıksularda COVID-19'un tespiti ile hastalık belirtisi göstermeyen ancak taşıyıcı olan asemptomatik kişilerin sayısı da belirlenerek o toplumda enfekte olan toplam kişi sayısı belirlenebilmektedir. Bu sayede erken uyarı sistemi oluşturularak ikinci veya üçüncü dalga gerçekleşmeden, gerekli önlemlerin alınması sağlanabilecektir.

Anahtar kelimeler: Atıksu; SARS-CoV-2; COVID-19; Pandemi; Atıksu epidemiyolojisi

Abstract: **Objective:** Wastewater based epidemiology studies are a complementary approach used to measure and monitor the presence and prevalence of infectious diseases when clinical testing capacity is limited. It can also help with the detection of coronaviruses in wastewater and how they spread in the society. In the COVID-19 pandemic, SARS-Coronavirus-2 (SARS-CoV-2) is excreted with the feces of infected people and mixed with wastewater. Most people infected with viruses that infect enterically spread their feces and virus into their sewage systems both for the days or weeks before and after symptoms begin to appear. Through the detection of Covid-19 in wastewater, the number of asymptomatic people who do not represent any indication related to diseases but are carriers can be determined, and the total number of people infected in that society can be estimated. Therefore, an early warning system can be created, and it will be possible to take the necessary precautions before the second or third wave occurs.

Keywords: Wastewater; SARS-CoV-2; Covid-19; Pandemic; Wastewater based epidemiology

DOI: 10.17986/blm.2020.v25i.1402

Doç. Dr. Nebile Dağlıoğlu: Adli Bilimler PhD
Çukurova Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Adli Tıp
Anabilim Dalı, 01330, Adana, Türkiye
E-mail: nebled@hotmail.com
ORCID ID: 0000-0003-3415-8159

Evsen Yavuz Guzel: Çukurova Üniversitesi,
Su Ürünleri Fakültesi, Temel Bilimler Bölümü,
01330, Adana, Türkiye.
E-mail: evsen_yavuz_112@hotmail.com
ORCID ID: 0000-0002-8029-9254

Aslı Atasoy: Çukurova Üniversitesi, Bağımlılık ve
Adli Bilimler Enstitüsü, 01330, Adana, Türkiye.
E-mail: asliatsy@gmail.com
ORCID ID: 0000-0001-6901-7511

Bildirimler

* Sorumlu Yazar

Finansal Destek

Yazarlar bu makale ile ilgili herhangi bir mali destek kullanımı bildirmemişlerdir.

Çıkar Çatışması

Yazarlar bu makale ile ilgili herhangi bir çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

Etik Beyan

Çalışmamız Helsinki Bildirgesi'ne uygun olarak yazılmış olup, mevcut literatür taranarak yapıldığı için etik kurul onayı alınmamıştır.

p-ISSN: 1300-865X

e-ISSN: 2149-4533

Giriş

Koronavirüsler (CoV), solunum ve gastro-intestinal enfeksiyonlarla ilişkili insanlar ve hayvanlar için patojenik bir virüs ailesidir. CoV'ler, bağışıklık sistemi yetersiz kişilerde soğuk algınlığı veya hafif solunum yolu enfeksiyonlarından sorumlu oldukları için insanlar için küçük patojen olarak kabul edilmektedirler. Bununla birlikte, CoV'lerin neden olduğu Şiddetli Akut Solunum Sendromu (SARS), Orta Doğu Solunum Sendromu (MERS) ve en son koronavirüs 2 (SARS-CoV-2) gibi yeni ve oldukça patojenik ve zoonotik hastalıkların ortaya çıkması, halk sağlığı tepkisini yönlendirmek için ele alınması gereken sorunları da ortaya çıkarmaktadır (1).

Çin'in Wuhan şehrinde, şiddetli akut solunum sendromu SARS-CoV-2'nin ortaya çıkması, 23 Nisan 2020 itibarıyla küresel olarak tüm dünyada 2.6 milyondan fazla COVID-19 pozitif teyit edilen vakayla hızla pandemik bir senaryoya yol açmıştır. COVID-19 semptomları ateş, öksürük ve ishal de dahil olmak üzere çeşitlidir ve çoğu zaman spesifik değildir. Enfekte kişilerin ihmal edilemez bir yüzdesinde ciddi solunum sıkıntısına yol açabilen pnömoni gelişmekte ve daha sonra mekanik ventilasyon, organ yetmezliği, viral sepsis ve ölüm gerçekleşmektedir. Pandemilerin yaygın doğası ve semptomlara dayalı kolay tanı, tedavi veya aşı eksikliği, dünya çapında sınırlamalar dahil olmak üzere sert ve son derece maliyetli epidemiyolojik kontrol önlemleri uygulanmaya başlanmıştır. Birçok ülkelerde virüsün gerçek prevalansını değerlendirmek için RT-qPCR test kampanyaları uygulanırken, bu durum uzun vadede genel nüfus için uygulanabilir bir gözetim stratejisi değildir.

SARS-CoV-2 esas olarak solunum yoluyla taşınan bir virüs olmasına rağmen, ilgili SARS-CoV-1 (2003 SARS salgınının etken maddesi) ile yapılan önceki çalışmalar hastaların dışkılarında RT-qPCR ile viral RNA saptanmasına dayalı fekal-oral bulaşma olasılığını göstermiştir. Son çalışmalar SARS-CoV-2'nin asemptomatik taşıyıcılarda ve yakın zamanda iyileşmiş hastaların da dışkıları ile atılabileceğini göstermektedir (2-5). Spesifik olarak, viral RNA hastalık şiddetine bakılmaksızın solunum yolundan viral temizlendikten sonra bile 10 güne kadar dışkıda tespit edildiğini göstermektedir (6). Bu durum atık suların viral partiküller veya viral RNA içerebileceği anlamına gelmektedir ve bir epidemiyolojik gözetim aracı olarak kullanılabilirliğini göstermektedir. Atık sular ayrıca ağız boşluğundan ve kişisel hijyen sırasında dökülen üst solunum yollarında bulunan virüsleri de toplayabilmektedir. Bireylerin sistematik olarak test edilmesine kıyasla, atık su analizi açıkça daha az invaziv, daha basit ve daha ucuzdur. Ancak, bu yöntemin hassasiyeti ve güvenilirliği ilgili çalışmalar devam etmektedir.

Her birey günde yaklaşık 100 g dışkı maddesi atmaktadır (7). Enfekte olmuş bir bireyin her bir gram dışkısı içerisinde 10^5 ila 10^9 enterik virüs partikülü bulunmaktadır (8). Yüksek RNA kopyalarına sahip dışkı örneklerinde, canlı SARS-CoV-2 tespit edilmiştir. Yakın tarihli bir çalışma, enfekte olmuş insanların dışkı ve idrarından canlı SARS-CoV-2'nin izole edildiğini göstermiştir (3). Bu durum SARS-CoV-2'nin daha sonra atık su arıtma sistemine gireceğini göstermektedir. Bir başka çalışma, bu virüsün insan vücudundan çıktıktan sonra uygun bir ortamda birkaç güne kadar hayatta kalabileceğini göstermiştir (8). Atıksularda virüslerin kalma süreleri, Dünya Sağlık Örgütü tarafından, 4°C'de 20 gün ve 20°C'de 24 saat olarak bildirilmiştir (9). Atık sular SARS-CoV-2 gibi koronavirüsler için önemli bir olası bulaş olmamasına rağmen, virüsün popülasyonda dolaşımının artması, şehirlerimizin kanalizasyon sistemlerinde virüs yükünü arttıracaktır (9). Şu ana kadar koronavirüs enfeksiyonunun çevre yoluyla bulaşma potansiyeli hakkında sınırlı bilgi vardır (10).

Ayrıca, toplum sağlığının korunması için alınan mevcut sınırlama önlemlerinin kaçınılmaz olarak gevşetilmesi, yerel salgınların tekrarlanmasına veya diğer bölgelerden vaka ithalatına yol açabilir. Bu nedenle, gelecekte oluşabilecek viral acil durumlarda hazırlıklı olmamızı sağlayabilecek uygulanabilir ve güvenilir epidemiyolojik izleme stratejileri oluşturmak son derece önemlidir. Ayrıca bu epidemiyoloji mevcut koşullar altında, yetkililerin koronavirüse karşı alınan tedbirleri yavaş yavaş kaldırmaya başladıklarında, virüs izleme stratejilerini koordine etmelerine yardımcı olmak üzere tasarlanmış bir araç olarak kullanılabilir.

Atıksu Epidemiyolojisi ile SARS-Cov-2'nin İzlenmesi

İnsan enterik virüsleri, kanalizasyon sistemine boşaltım yoluyla (dışkı-idrar) girmektedirler. Virüsler, enfekte bireylerin dışkısında son derece yüksek miktarlarda bulunurlar (11). İnsanların veya hayvanların dışkı ve idrarları kanalizasyon sistemine atılmaktadır. Bu yüzden atıksular toplumdaki hastalığın taşıyıcısından, enfekte kişilerden ve hastanelerdeki hastalardan girebilen birçok biyobelirteç ve patojeni içermektedir. Atıksulardaki bakteri, virüs ve parazitler gibi bu patojenler insanlar için tehlikelidirler çünkü popülasyonda salgınlara neden olabilirler. Bununla birlikte, eğer bu patojenler toplumda erken bir aşamada izlenebiliyorsa, tehlikeler en aza indirilebilir. Bazı virüsler içme suyu ve kanalizasyon arıtımı için yaygın olarak kullanılan dekontaminasyon işlemlerine rağmen atık su arıtma tesislerinin çıkış sularından tamamen uzaklaştırılmamaktadır (8).

Bu sebeple, atıksu arıtma tesislerinden örneklerin toplanıp, düşük seviyelerde bulunan bu biyobelirteçleri/patojenleri doğru ve hızlı bir şekilde izleyebilen yeni analitik araçların geliştirilmesi gerekmektedir. RT-qPCR teknolojisi kanalizasyondaki biyobelirteçlerin ve patojenlerin yerinde kantitatif analizinde önemli bir rol oynamaktadır. Atıksularda hastalıkların biyobelirteçlerini tespit etmek, toplum sağlığının değerlendirilmesi için gerçek zamanlı veriler sağlama konusunda destek sağlayabilmektedir. Ayrıca bu veriler, erken uyarı sistemlerini sağlama konusunda açık bir potansiyele sahiptir (12).

Atık su epidemiyolojisi (WBE), yasadışı uyuşturucu tüketimi, ilaç kullanımı/kötüye kullanımı, su kirliliği ve antimikrobiyal direnç genlerinin oluşumu dahil olmak üzere insan aktivitesinin kimyasal ve biyolojik belirteçlerini izlemek için birçok ülkede kullanılan, başarılı bir strateji olmuştur (8,13,14). Ayrıca son yıllarda WBE ile yasadışı uyuşturucu (13,15), alkol (16), tütün kullanımı ve F2-izoprostanlar gibi oksidatif stres biyobelirteçlerinin izlenmesi sağlanarak, yenilikçi ve umut verici bir araç olduğu gösterilmiştir (17,18). Bu yaklaşım, bir topluluğun yaşam tarzı, sağlığı ve kirlenici maruziyeti hakkında kanalizasyon biyobelirteçlerinin analizi ile elde edilebilen ek bilgileride içermektedir (12).

WBE ile atık sulardaki spesifik hastalık biyobelirteçlerinin seviyelerinin değerlendirilmesi, bulaşıcı ve bulaşıcı olmayan hastalıkların izlenmesi için büyük umut vaat etmektedir (19). Geçmişten günümüze yapılan çalışmalar WBE ile atık sularda HIV, tüberkloz, poliovirus, echovirus, hepatit A, rotavirus, adenovirus ve koronavirüsler gibi patojen/enfeksiyon varlığının izlendiğini göstermektedir (11,12,17,18). Son haberler (20–22) ve devam eden çalışmalar (23–26), kanalizasyonda COVID-19 saptamasına yönelik çalışmaların yapıldığını göstermektedir. Çin, Avustralya, Hollanda, Fransa ve ABD gibi ülkelerdeki çalışmalarda sınırlı sayıda örnekten elde edilen ön sonuçlar, COVID-19'un atık sulardan tespitinin teknik olarak mümkün olduğunu göstermektedir. İsviçre Federal Su Bilim ve Teknoloji Enstitüsü'nden (*Swiss Federal Institute of Aquatic Science and Technology*) ekip lideri Christoph Ort, "Atık sular yalan söylemiyor, birkaç saat içinde halk tarafından atılanları yansıtıyor." şeklindeki açıklaması ile önemini vurgulamıştır. Ayrıca çalışma analiz sonuçları son örneklerde çok yüksek bulunurken daha önce aldıkları şubat ayı örneklerinde virüsü saptayamadıklarını belirtmişlerdir (27).

Medema ve ark.nın (23), Hollanda'da yaptığı çalışmada atıksularda SARS-CoV-2 tespit edilip, enfekte kişi sayısı belirlenmiştir. Ayrıca, bu çalışma Hollanda'da ilk vakalar bildirilmeden önce alınan atıksularda da SARS-CoV-2'ye rastlanmıştır. Böylece erken uyarı sisteminin

oluşturulmasına katkı sağlamıştır. Wu ve ark.nın (24) Amerika'da yaptığı bir çalışmada ise atık sularda SARS-CoV-2 tespit edilmiş ve klinik olarak tespit edilen rakamlardan daha yüksek olduğu görülmüştür. Bu çalışmaların asemptomatik kişilerin de belirlenmesi sağlayarak, ülke politikalarının şekillenmesine katkı sağladığı görülmektedir.

Atıksularda SARS-Cov-2'nin İzlenmesinde Kullanılan Yöntem ve Hesaplamalar

SARS-Cov-2 Viral Genomlarının qPCR Yöntemi Tespiti

SARS-CoV-2'nin saptanması için en doğrudan yöntem, nükleik asit bazlı polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) analizidir. Bu yöntemle, şüpheli vakaları doğrulamak ve merkezi laboratuvarlar olmadan asemptomatik enfekte vakaları taramak için WBE aracılığıyla düşük seviyeli SARS-CoV-2 kaynaklarını doğru ve hızlı bir şekilde izlemek için verimli ve sağlam analitik araçlar geliştirmek mümkündür (28).

qPCR ile farklı virüsler için saptama limiti, EcoRV bölgesine klonlanan tüm hedeflenmiş bölgeler ile bilinen bir miktarda pUC57cl plazmidinin seyreltme serisine dayanarak 6 ila 10 viral genom / 50-µL reaksiyon karışımıdır.

Atıksulardan SARS-CoV-2 enfeksiyon prevalansı, denklemde de görüldüğü üzere günlük RT-qPCR ile atık sulardan ölçülen toplam viral RNA kopya sayısı ile günlük enfekte olmuş bir kişi tarafından dışkıdan dökülen SARS-CoV-2 RNA kopya sayılarının kütle dengesi kullanılarak hesaplanmaktadır (26). Denklem aşağıda gösterilmiştir:

$$Persons\ infected = \frac{\left(\frac{RNA\ copies}{liter\ Wastewater}\right) * \left(\frac{liters\ Wastewater}{day}\right)}{\left(\frac{g\ feces}{person - day}\right) * \left(\frac{RNA\ copies}{g\ feces}\right)}$$

Atık Sulardan Elde Edilen Veriler İle SARS-Cov-2 Bulaşmış Hasta Sayısının Hesaplanması

qPCR'deki atık su numuneleri için elde edilen CT değerleri, plazmidin seyreltmelerine göre pUC57cl seri dilüsyonlarından elde edilen CT değerlerinin lineer regresyonu gerçekleştirilerek viral genomların (Ci) sayısını hesaplamak için kullanılır.

Enfekte bir bireyin günde 10⁷ ila 10¹¹ norovirüs, HAV, enterovirüs ve adenovirüs partikülleri salgıladığı varsayılmaktadır. Günlük olarak atılan virüs partiküllerinin

sayısı, bildiğimiz kadarıyla, araştırılan diğer virüsler için bilinmemektedir. Bu nedenle enfekte olmuş bir kişinin hab, araştırılan tüm virüslerin benzer miktarlarını salgıladığı varsayılmıştır. Bu çalışmada virüs bulaşan enfekte kişilerin sayısının hesaplanması, yeni enfekte olmuş bir kişi tarafından günde vücuttan atılan maksimum virüs miktarına (10^{11} virüs partikülü/gün) dayanmaktadır, böylece virüsü atık suya karışan en az sayıda kişi sayısı tahmin edilmektedir. Enfekte bir kişinin atılımından (C_{exp}) günlük olarak atık suda bulunması beklenen virüs partiküllerinin sayısı, aşağıdaki denkleme göre hesaplanır:

$$C_{exp} = 10^{11} / \{[\Sigma(\text{ilgili günlük akış})] / 7\}$$

$$C_{exp} = 10^{11} / \text{ortalama günlük akış}$$

Atık sudaki ilgili virüsün varlığına bağlı olarak potansiyel olarak enfekte olmuş bireylerin ($N_{infected}$) sayısı;

$$N_{infected} = C_i / C_{exp}$$

$N_{infected}$: enfekte olmuş birey sayısı

CT : qPCR'daki atık su numuneleri için elde edilen değerler

C_i : CT değerlerinin lineer regresyonu

C_{exp} : atık suda bulunması beklenen günlük virüs partikülü sayısı

Atıksulardan SARS-CoV-2'nin Tespiti ve Halk Sağlığı Açısından Önemi

SARS-CoV-2 taşıyıcılarının bir kısmının asemptomatik, bir kısmının ateşsiz veya sadece hafif enfeksiyon semptomları gösterdiği klinik çalışmalarda bildirilmiştir. İzlanda'da yapılan bir çalışmada ise COVID-19 pozitif olan hastaların % 50'sinde herhangi bir semptom gözlenmediği belirtilmiştir (29). Asemptomatik hastaları hızlı ve etkili bir şekilde tarama imkânı olmadığından, çoğunlukla bu kişiler hasta sayısına yansımamaktadır. Bu nedenle, potansiyel virüs taşıyıcılarının hızlı ve doğru bir şekilde taranması ve asemptomatik hastaların teşhisi, erken aşamada müdahale ve önleme stratejilerinin oluşturulabilmesi için önemlidir.

Sağlık çalışanları, COVID-19 vakalarını pratik ve etkili bir şekilde taramak için oldukça zorlu bir süreçte devam etmektedirler. COVID-19 test teknolojilerinin ve kitlerinin mevcudiyeti sınırlıdır. Bununla birlikte, WBE alternatif bir yöntem olarak, atık sulardaki bulaşıcı ajanları test ederek enfeksiyonun potansiyel yayılımı hakkında bilgi verebilme potansiyeline sahiptir.

WBE kullanılarak COVID-19'un atıksularda erken aşamada tespiti ile nüfus hareketliliği kısıtlanarak virüsün yayılımını önenebilecektir.

Sonuç

Atıksu epidemiyolojisi ile elde edilen veriler ile mevcut klinik vakalar hem halkın eğitim ve önleme mesajlarını daha iyi anlamasına yardımcı olurken hem de asemptomatik kişilerinde içinde bulunduğu ek bir veri tabanının oluşmasını sağlayacaktır. Atıksu arıtma tesislerinden toplanan sulardan RT-qPCR tekniği ile COVID-19'un tespiti ile hesaplanan kişi sayısı ve klinik olarak saptanan virüs taşıyan kişi sayısı arasındaki korelasyon ile bölgesel ve yerel boyutta virüsün yayılımı hakkında bilgi sunacaktır. Hem mekânsal hem de mevsimsel olarak virüsün yayılımını izlenerek Türkiye'de bir yol haritası çıkarılarak ikinci veya üçüncü dalga gelmeden önce önlemler alınabilecektir. Atıksu arıtma tesislerinin çıkış sularında SARS-CoV-2 takibi, arıtma tesislerinden yüzey sularına gönderilen sularda virüsün yok edilmesi için gerekli prosedürlere de katkı sağlayacaktır.

Atıksularda bu yeni virüsü izlemek, atıksu arıtma tesisi personeli için koruyucu önlemlerin alınması ve atık sularla sulama yapılan tarım alanları ya da yüzey suları için herhangi bir risk oluşturup oluşturmadığının belirlenmesi içinde önemlidir. Bu çalışma, En ciddi semptomları olan COVID-19 hastaları ile sınırlı olan mevcut klinik bilgileri tamamlayabilen alternatif çalışma olarak kullanılmalıdır.

Kaynaklar

1. Randazzo W, Truchado P, Ferrando EC, Simon P, Allende A, Sanchez G. SARS-CoV-2 RNA titers in wastewater anticipated COVID-19 occurrence in a low prevalence area. medRxiv. 2020. doi: <https://doi.org/10.1101/2020.04.22.20075200>.
2. Xing YH, Ni W, Wu Q, Li WJ, Li GJ, Wang W Di, et al. Prolonged viral shedding in feces of pediatric patients with coronavirus disease 2019. J Microbiol Immunol Infect. 2020. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jmii.2020.03.021>.
3. Wu Y, Guo C, Tang L, Hong Z, Zhou J, Dong X, et al. Prolonged presence of SARS-CoV-2 viral RNA in faecal samples. Lancet Gastroenterol Hepatol. 2020;5(5):434-5. doi: [https://doi.org/10.1016/S2468-1253\(20\)30083-2](https://doi.org/10.1016/S2468-1253(20)30083-2).
4. Cheung KS, Hung IF, Chan PP, Lung KC, Tso E, Liu R, et al. Gastrointestinal Manifestations of SARS-CoV-2 Infection and Virus Load in Fecal Samples from the Hong Kong Cohort and Systematic Review and Meta-analysis. Gastroenterology. 2020. doi: <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2020.03.065>.
5. Wang W, Xu Y, Gao R, Lu R, Han K, Wu G, et al. Detection of SARS-CoV-2 in Different Types of Clinical Specimens.

- JAMA - J Am Med Assoc. 2020;3-4. doi: <https://doi.org/10.1001/jama.2020.3786>.
6. Chen Y, Chen L, Deng Q, Zhang G, Wu K, Ni L, et al. The Presence of SARS-CoV-2 RNA in Feces of COVID-19 Patients. *J Med Virol*. 2020;0-2. doi: <https://doi.org/10.1002/jmv.25825>.
 7. Timm DA, Thomas W, Boileau TW, Williamson-Hughes PS, Slavin JL. Polydextrose and Soluble Corn Fiber Increase Five-Day Fecal Wet Weight in Healthy Men and Women. *J Nutr*. 2013;143(4):473-8. doi: <https://doi.org/10.3945/jn.112.170118>.
 8. Hellmér M, Paxéus N, Magnius L, Enache L, Arnholm B, Johansson A, et al. Detection of pathogenic viruses in sewage provided early warnings of hepatitis A virus and norovirus outbreaks. *Appl Environ Microbiol*. 2014;80(21):6771-81. doi: <https://doi.org/10.1128/AEM.01981-14>.
 9. World Health Organization. Water, sanitation, hygiene and waste management for COVID-19. 2020;(March):1-9. doi: <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2001191.7>.
 10. Gundy PM, Gerba CP, Pepper IL. Survival of Coronaviruses in Water and Wastewater. *Food Environ Virol*. 2009;1(1):10-4. doi: <https://doi.org/10.1007/s12560-008-9001-6>.
 11. Bosch A. Human enteric viruses in the water environment: A minireview. *Int Microbiol*. 1998;1(3):191-6. doi: <https://doi.org/10.2436/im.v1i3.39>.
 12. Yang Z, Kasprzyk-Hordern B, Frost CG, Estrela P, Thomas K V. Community sewage sensors for monitoring public health. *Environ Sci Technol*. 2015;49(10):5845-6. doi: <https://doi.org/10.1021/acs.est.5b01434>.
 13. Ort C, van Nuijs ALN, Berset J-D, Bijlsma L, Castiglioni S, Covaci A, et al. Spatial differences and temporal changes in illicit drug use in Europe quantified by wastewater analysis. *Addiction*. 2014 Aug;109(8):1338-52. doi: <https://doi.org/10.1111/add.12570>.
 14. Heijnen L, Medema G. Surveillance of influenza A and the pandemic influenza A (H1N1) 2009 in sewage and surface water in the Netherlands. *J Water Health*. 2011;9(3):434-42. doi: <https://doi.org/10.2166/wh.2011.019>.
 15. Daglioglu N, Guzel EY, Kilercioglu S. Assessment of illicit drugs in wastewater and estimation of drugs of abuse in Adana Province, Turkey. *Forensic Sci Int*. 2019;294:132-9. doi: <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2018.11.012>.
 16. Reid MJ, Langford KH, Mørland J, Thomas K V. Analysis and Interpretation of Specific Ethanol Metabolites, Ethyl Sulfate, and Ethyl Glucuronide in Sewage Effluent for the Quantitative Measurement of Regional Alcohol Consumption. *Alcohol Clin Exp Res*. 2011 Jun;35(9). doi: <https://doi.org/10.1111/j.1530-0277.2011.01505.x>.
 17. Choi PM, Tschärke BJ, Donner E, O'Brien JW, Grant SC, Kaserzon SL, et al. Wastewater-based epidemiology biomarkers: Past, present and future. *TrAC - Trends Anal Chem*. 2018;105:453-69. doi: <https://doi.org/10.1016/j.trac.2018.06.004>.
 18. Gracia-Lor E, Castiglioni S, Bade R, Been F, Castrignanò E, Covaci A, et al. Measuring biomarkers in wastewater as a new source of epidemiological information: Current state and future perspectives. *Environ Int*. 2017;99:131-50. doi: <https://doi.org/10.1016/j.envint.2016.12.016>.
 19. Yang Z, Xu G, Reboud J, Kasprzyk-Hordern B, Cooper JM. Monitoring Genetic Population Biomarkers for Wastewater-Based Epidemiology. *Anal Chem*. 2017;89(18):9941-5. doi: <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.7b02257>.
 20. Noise S. How sewage could reveal true scale of coronavirus outbreak [Internet]. 2020; Available from: <https://www.nature.com/articles/d41586-020-00973-x>
 21. Daughton C. The international imperative to rapidly and inexpensively monitor community-wide Covid-19 infection status and trends. *Sci Total Environ*. 2020;726:138149. doi: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.138149>.
 22. Lodder W, de Roda Husman AM. SARS-CoV-2 in wastewater: potential health risk, but also data source. *Lancet Gastroenterol Hepatol*. 2020;1253(20):30087. doi: [https://doi.org/10.1016/s2468-1253\(20\)30087-x](https://doi.org/10.1016/s2468-1253(20)30087-x).
 23. Medema G, Heijnen L, Elsinga G, Italiaander R, Medema G. Presence of SARS-Coronavirus-2 in sewage. *Methods Sewage samples*. 2020;2-6. doi: <https://doi.org/10.1101/2020.03.29.20045880>.
 24. Wu FQ, Xiao A, Zhang JB, Gu XQ, Lee WL, Hanage WP, et al. SARS-CoV-2 titers in wastewater are higher than expected from clinically confirmed cases. *medRxiv*. 2020;1-13. doi: <https://doi.org/10.1101/2020.04.05.20051540>.
 25. Wurtzer S, Marechal V, Jm M, Moulin L, Université S, Metis UMR, et al. Time course quantitative detection of SARS-CoV-2 in Parisian wastewaters correlates with COVID-19 confirmed cases. *medRxiv*. 2020;(6):10-3. doi: <https://doi.org/10.1101/2020.04.12.20062679>.
 26. Ahmed W, Angel N, Edson J, Bibby K, Bivins A, O'Brien JW, et al. 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*. 2020;728(April):138764. doi: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.138764>.
 27. Ort C. Swiss researchers see sewage as early warning sign for COVID flares [Internet]. 2020. Available from: <https://www.reuters.com/article/us-health-coronavirus-sewage/swiss-researchers-see-sewage-as-early-warning-sign-for-covid-flares-idUSKBN22C1QD>
 28. Mao K, Zhang H, Yang Z. Can a Paper-Based Device Trace COVID-19 Sources with Wastewater-Based Epidemiology? *Environ Sci Technol*. 2020;0-2. doi: <https://doi.org/10.1021/acs.est.0c01174>.
 29. John, Tara C. Coronavirus Cases [Internet]. 2020. Available from: <https://edition.cnn.com/2020/04/01/europe/iceland-testing-coronavirus-intl/index.html>.