

Epidemiología basada en aguas residuales en la provincia de Córdoba:

Monitoreo ambiental de SARS-CoV-2 en aguas cloacales de la ciudad de Córdoba y Valle de Punilla, Argentina.

Datos actualizados a Junio 2021.

El objetivo del presente documento es dar conocimiento público sobre resultados preliminares de la presencia de genoma del virus SARS-CoV-2 y variantes de preocupación (VOC) en aguas residuales, como reflejo de la tendencia de la circulación poblacional del virus en la Ciudad de Córdoba Capital y Valle de Punilla (Carlos Paz, La Falda, Villa Giardino, Huerta Grande y Valle Hermoso).

La información de este documento forma parte de los resultados obtenidos por el trabajo conjunto entre el Instituto de Virología “Dr. JM. Vanella” (InViV) de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad Nacional de Córdoba, el Ministerio de Salud de la Provincia de Córdoba, el Laboratorio Central de la Provincia de Córdoba, la Universidad Nacional de la Defensa-Instituto Nacional de Medicina Aeronáutica y Espacial, la Planta Municipal de tratamientos de efluentes cloacales Bajo Grande y la Cooperativa Integral Regional de Provisión de Servicios Públicos, Vivienda y Consumo Limitada (COOPI).

Grupo de trabajo

Facultad de Ciencias Médicas, UNC: Decano Dr. Rogelio Pizzi.

Instituto de Virología “Dr. JM. Vanella” Facultad de Ciencias Médicas, UNC: Dra. Gisela Masachessi, Bioq. Matías Liendo, Dra. María Belén Pisano, Dra. Viviana Elisabeth Ré, Dra. Silvia Viviana Nates.

Ministerio de Salud de la Provincia Córdoba: Ministro de Salud Dr. Diego Cardozo; Secretaria de Prevención y Promoción de la Salud Bioq. Esp. Virol. María Gabriela Barbás. Mg. Laura López

Laboratorio Central Ministerio de Salud: Bioq. Esp. Virol. Gonzalo Castro, Bioq. Esp. Virol. Paola E Sicilia.

Universidad Nacional de la Defensa-Instituto Nacional de Medicina Aeronáutica y Espacial: Dra. Ariana Mariela Cachi. Dra. María de los Ángeles Marinzalda

Municipalidad de Córdoba, Secretaría de Infraestructura: Arquitecto Daniel Rey

Planta Municipal de tratamiento de efluente cloacales Bajo Grande-Laboratorio de análisis fisicoquímicos, bacteriológicos EDAR Bajo Grande, Córdoba Capital: Lic. Qca. Far. Gustavo Ibarra

Cooperativa Integral Regional de Provisión de Servicios Públicos, Vivienda y Consumo Limitada (COOPI). Biol. Ricardo Manuel Rojas

Marco teórico

Trabajos de investigación llevados a cabo en diferentes países del mundo, reportan que entre el 2 y 10% de los pacientes con COVID-19 presentan síntomas gastrointestinales, entre los que se incluye la diarrea (Chen et al., 2020a, 2020b; Gao et al., 2020; Wang et al., 2020a, 2020b, 2020c). Estudios recientes han demostrado que las células epiteliales glandulares gastrointestinales son blanco para la infección por SARS-CoV-2, debido a que expresan abundantemente el receptor celular para el virus (ACE2) (Xiao et al., 2020, Hamming et al., 2004; Xu et al., 2020b), lo que permitiría la replicación viral en el tracto gastrointestinal. Así, diferentes estudios reportan que el 35% de los pacientes infectados con SARS-CoV-2 excretan el virus por materia fecal (estimado 10^7 copias genómicas/ml, hasta aproximadamente tres semanas de iniciados los síntomas), tomando como valor medio de excreción 17 días, independientemente a la presencia o no de diarrea (Tian y col., 2020; Tang et al., 2020a; Jiehao et al., 2020; Y. Wu et al., 2020a; Xiao et al., 2020, Lescure et al., 2020; Pan et al., 2020; Wölfel et al., 2020). De esta manera, el estudio de aguas residuales, es una matriz que resumiría la excreción poblacional de virus (suma de la excreción viral de personas sintomáticas y asintomáticas), dependiendo su sensibilidad de la cobertura de red cloacal de la comunidad en estudio y de la metodología utilizada para la detección del genoma viral (Carducci et al., 2006; La Rosa y Muscillo, 2013).

La epidemiología basada en aguas residuales es una herramienta importante para estudiar la tendencia de circulación de virus en una comunidad (Sinclair et al., 2008; Xagorarakis y O'Brien, 2020). Con este enfoque, también es posible monitorear la circulación de variantes virales en la población, con particular atención a las variantes de preocupación del virus SARS-CoV-2, dado su impacto en salud humana.

Metodología de estudio

Muestreo de aguas residuales

Desde el mes de mayo del año 2020 y al momento del presente informe se recolectaron, aguas residuales crudas del conducto de la red central que ingresa a:

- 1) la planta depuradora de aguas cloacales “Bajo Grande” de la ciudad de Córdoba (50% de cobertura de red cloacal). Frecuencia de recolección: Una muestra por semana.
- 2) la planta depuradora de aguas cloacales de Carlos Paz, Costa Azul (37% de cobertura de red cloacal). Frecuencia de recolección: Desde Mayo 2020 a Octubre 2020, una muestra cada quince días y a partir de Noviembre 2020, una muestra por semana.

3) la Planta depuradora de aguas cloacales de la Falda que procesa aguas residuales de La Falda, Huerta Grande y Villa Giardino (50% de cobertura de red cloacal). Frecuencia de recolección: Desde Mayo 2020 a Octubre 2020, una muestra cada quince días y a partir de Noviembre 2020, una muestra por semana.

4) la Planta depuradora de aguas cloacales de Valle Hermoso (20% de cobertura de red cloacal). Frecuencia de recolección: Desde Mayo 2020 a Octubre 2020, una muestra cada quince días y a partir de Noviembre 2020, una muestra por semana.

Concentración de SARS-CoV-2 en aguas residuales de la ciudad de Córdoba

Metodología estandarizada para la concentración de virus entéricos a partir de matrices acuosas, puesta a punto para la concentración de SARS-CoV-2. Brevemente, 0,5 litros de agua residual son sometidas a un proceso de centrifugación y precipitación con PEG6000 y NaCl logrando una concentración final de 100X. Eficiencia de recuperación: 20%.

Extracción del ARN genómico de los concentrados virales

Extracción automatizada de ácidos nucleicos mediante GenePure Pro Nucleic Acid Purification System NPA-32P - BIOER o sistema MAGNA Pure 96 - Roche.

Detección del genoma de SARS-CoV-2

Desde el inicio del estudio de SARS-CoV-2 en aguas residuales, la detección del genoma del virus se realiza a través del DisCoVery SARS-CoV-2RT-PCR Detection Kit que identifica los genes N (nucleocápside) y Orf1ab (fragmento de lectura abierto 1ab). En este estudio se analizaron solo los resultados derivados de la detección del gen N debido a que tiene mayor sensibilidad respecto al gen Orf1ab.

A partir del mes de Octubre del año 2020 se acopló a la detección del gen N, la detección del Gen E (envoltura), mediante la utilización del LightMix® Modular SARS and Wuhan CoV E-gene kit, para aumentar la sensibilidad de la detección.

La detección del genoma de SARS-CoV-2 se expresa en valores de Ct. A mayor valor de Ct indica una menor carga viral.

Detección de variantes de preocupación de SARS-CoV-2 mediante PCR en tiempo real

A partir de las muestras de aguas residual concentradas, con resultado SARS-CoV-2 positivo, se realizó una nueva PCR en tiempo real utilizando el reactivo TaqMan™ SARS-CoV-2 Mutation Panel (Applied Biosystems), capaz de detectar mutaciones puntuales características de las variantes de preocupación. El reactivo incluye cebadores directos e inversos específicos de secuencia que amplifican una región del genoma de SARS-CoV-2 que codifica para la proteína "Spike". Cada ensayo incluye dos sondas TaqMan (MGB) con quencher no fluorescente (NFQ):

- Una sonda marcada con colorante VIC para detectar la secuencia de referencia.
- Una sonda marcada con colorante FAM para detectar la secuencia mutada.

Esta metodología permite identificar las mutaciones N501Y y E484K, delH69V70, K417T y L242_244L marcadoras de las variantes Reino Unido, Manaus o Sudáfrica, respectivamente (Figura 1).

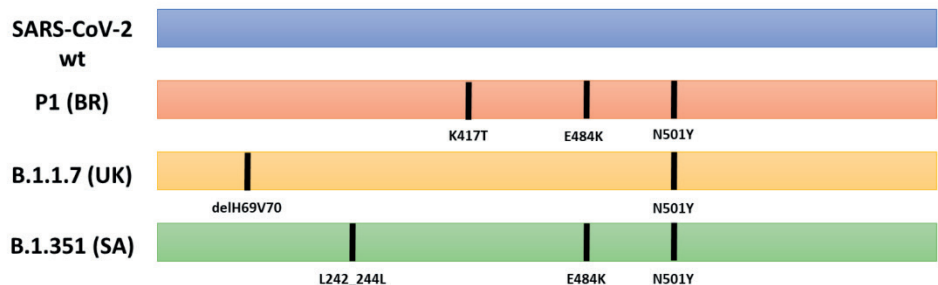


Figura 1. Ensayos para identificar mutaciones conservadas y específicas de SARS-CoV-2

Estimación de excretores sintomáticos de SARS-CoV-2 en cloacas

Estimando que el 35% de los individuos infectados con SARS-CoV-2 excretan el virus por materia fecal, en promedio, durante 17 días y teniendo en cuenta la cobertura de red cloacal de las comunidades estudiadas, se realiza una estimación de individuos excretores del virus al momento de la toma de la muestra de agua residual. La misma será una relación de la suma de los casos diarios de COVID-19 a 17 días hacia atrás en el tiempo (Tian y col., 2020), por los porcentajes previamente mencionados (porcentaje de individuos conectados a la red cloacal en la comunidad estudiada y el 35% estimado de excretores) (Figura 2).

Estimación de excretores de SARS-CoV-2 en cloacas

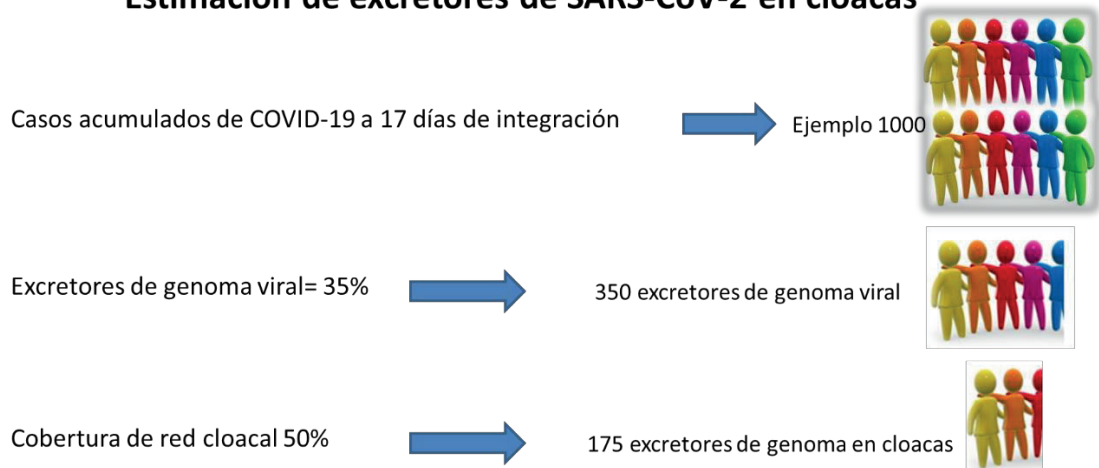


Figura 2. Estimación de excretores sintomáticos de SARS-CoV-2 en aguas cloacales. Ejemplo: 1000 casos acumulados de COVID-19 a 17 días, 35% de excretores del virus y 50% de cobertura de red cloacal.

Resultados

Córdoba Capital

El muestreo de las aguas residuales del conducto principal que llega a la planta depuradora de Bajo Grande se inició el día 11 de mayo del 2020 cuando los casos clínicos en la ciudad de Córdoba empezaban a aumentar paulatinamente (Figura 3). La primera muestra de agua residual en la que se detectó el genoma del virus (Valor Ct: 28) correspondió al día 24 de agosto del 2020 (Figura 4). El número de casos acumulados a 17 días, en el período comprendido entre el 8 y el 24 de Agosto, era de 1331 casos de COVID-19. Teniendo en cuenta la estimación de excretores de SARS-CoV-2 por materia fecal, el porcentaje de individuos conectados a cloacas y la cantidad de excretores acumulados al día 24 de Agosto, resulta un total de 233 excretores sintomáticos en cloacas. A partir de ese momento se detectó genoma viral en las muestras colectadas en las semanas siguientes (Figura 4).

A partir de este momento, la detección de SARS-CoV-2 en aguas residuales acompañó la curva epidémica definida por casos clínicos de COVID-19. Así, la detección de genoma viral en aguas residuales se puede dividir en tres momentos: el primero de ellos comprende el período 24 de Agosto-12 de Diciembre 2020 y reflejó la primera ola epidémica en la ciudad de Córdoba. La primera detección de genoma viral en cloacas fue predictiva del aumento posterior de casos clínicos de COVID-19 en la Ciudad de Córdoba. Un segundo momento es en el mes de Enero del 2021, en el que se evidencia un brote epidémico. La detección del genoma al inicio del mes de Enero fue predictivo del brote de verano. El tercer momento se registra a partir de mediados del mes de Marzo 2021 (15 de Marzo del 2021), teniendo valor predictivo, dos semanas antes, del inicio de la segunda ola epidémica en la ciudad de Córdoba. En esta segunda ola epidémica el genoma del virus se detectó ininterrumpidamente en las semanas siguientes, acompañado de un aumento en el registro de casos clínicos.

Cabe destacar que la muestra colectada el día 11/01/21 correspondió a un día de lluvia intensa. Por lo tanto, se podría inferir que el resultado negativo en esta muestra estaría ligado a una alta dilución de las aguas residuales por aguas de alcantarillas de la ciudad, que son colectadas por troncales comunes a las residuales y vertidas finalmente en Bajo Grande.

Del análisis de mutaciones, se desprende que durante todo el período estudiado estaría circulando la cepa wild type, aunque es de destacar que las secuencias denominadas wild type corresponden a variantes que no poseen las mutaciones N501Y y E484K por lo que podríamos descartar la presencia de la variante de interés (VOI) Rio de Janeiro (linajeP2) en las muestras analizadas. Sin embargo, no se descarta la presencia de las VOI CAL.20C (linaje B.1.427) California y Andina (linaje C37 derivado del linaje B.1.1.1). En la segunda ola epidémica, a partir del mes de Abril 2021, se identifica la introducción de las variantes UK y Manaos (P1), en co-circulación con la cepa WT (Figura 4).

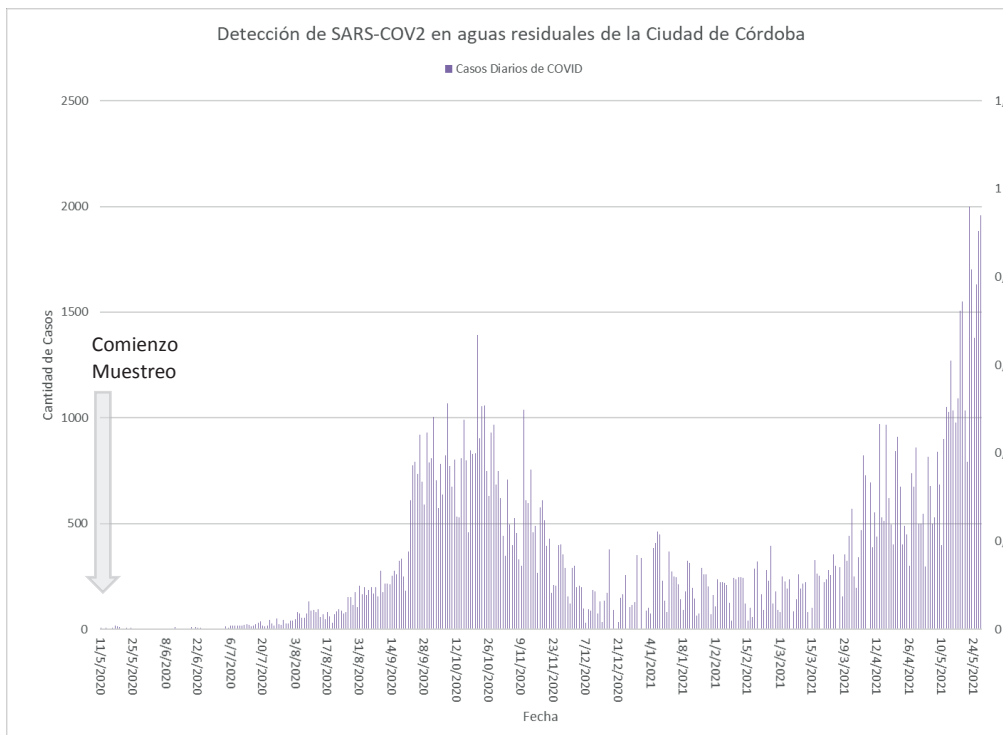


Figura 3. Inicio del muestreo en aguas residuales y número de casos diarios de COVID-19 en la ciudad de Córdoba

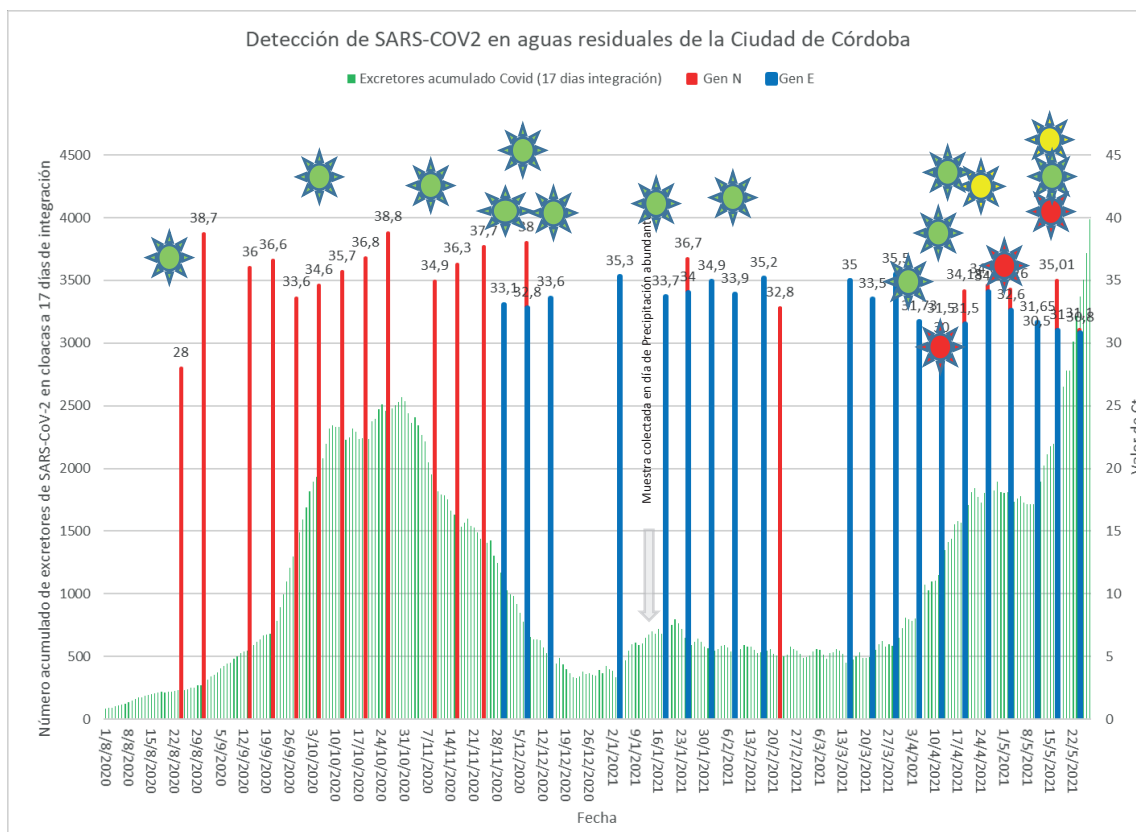


Figura 4. Detección de Sars-CoV-2 en las aguas residuales de la ciudad de Córdoba y dinámica de circulación de variantes de preocupación. ★ Wild Type; ★ United Kingdom (UK); ★ Manaos

Resultados Valle de Punilla

Los resultados de las localidades estudiadas en Valle de Punilla, Carlos Paz, Valle Hermoso, La Falda, Huerta Grande y Villa Giardino (Figura 5, 6 y 7) reflejaron un patrón común de detección de SARS-CoV-2 en aguas residuales, con algunas particularidades respecto a Córdoba Capital. El patrón común, definido en base al estudio de la epidemiología basada en aguas residuales, acompañó la curva epidémica de casos clínicos en las localidades estudiadas y se puede dividir, al igual que en la ciudad de Córdoba, en tres momentos. El primero de ellos comprende el período desde la primera semana de Octubre a fines de Noviembre 2020 y definió la primera ola epidémica en todas las localidades estudiadas. La detección de genoma de SARS-CoV-2 en aguas residuales a principios de Octubre fue predictiva de la primera ola epidémica de COVID-19. Un segundo momento es en el período entre la primera semana de Enero y mediados de Marzo 2021, en el que se evidencia un brote epidémico, que podría estar ligado a una marcada afluencia de turismo en los meses de verano. La detección del genoma al inicio del mes de Enero fue predictivo del brote de verano en las localidades de Valle Hermoso y Carlos Paz. En las localidades de La Falda, Huerta Grande y Villa Giardino, la detección predictiva de genoma viral en aguas residuales fue a fines de Diciembre.

Entre mediados de Marzo y los primeros días de Abril se registra una disminución en el informe de casos clínicos en las cinco localidades estudiadas, sin detección de genoma viral en aguas residuales. La no detección del genoma en aguas residuales ocurrió a pesar de que el registro de excretores de SARS-CoV-2 acumulados a diecisiete días fue mayor al registrado en períodos en los que hubo detección viral en aguas residuales. El mismo patrón de descenso de casos con no detección de genoma viral en aguas residuales se observa en todas las localidades estudiadas a fines del verano, entre la primera semana de Febrero y primera semana de Marzo en Carlos Paz, La Falda, Villa Giardino y Huerta Grande; y en Valle Hermoso un poco más tardíamente, entre la última semana Febrero y la primera semana de Marzo. La interpretación a lo arriba descrito podría estar ligado a la movilidad turística. Es probable que los individuos registrados como casos no hayan permanecido en las áreas turísticas. Esto se traduciría en un acumulado de excretores a 17 días que en realidad no estuvieran presente en las áreas estudiadas. El tercer momento se registra a partir de la primera semana de Abril en las localidades de la Falda, Huerta Grande y Villa Giardino y en la segunda semana de este mes, en las localidades de Carlos Paz y Valle Hermoso, siendo la detección del genoma de SARS-CoV-2 en aguas residuales predictiva de la segunda ola epidémica en las localidades estudiadas. En esta segunda ola epidémica el genoma del virus se detectó ininterrumpidamente en todas las localidades en las semanas siguientes, acompañado de un aumento en el registro de casos clínicos.

Los resultados preliminares en Valle de Punilla, indican la circulación de la cepa wild type en el período estudiado y la introducción de las variantes manaos (P1) y Reino Unido (UK).

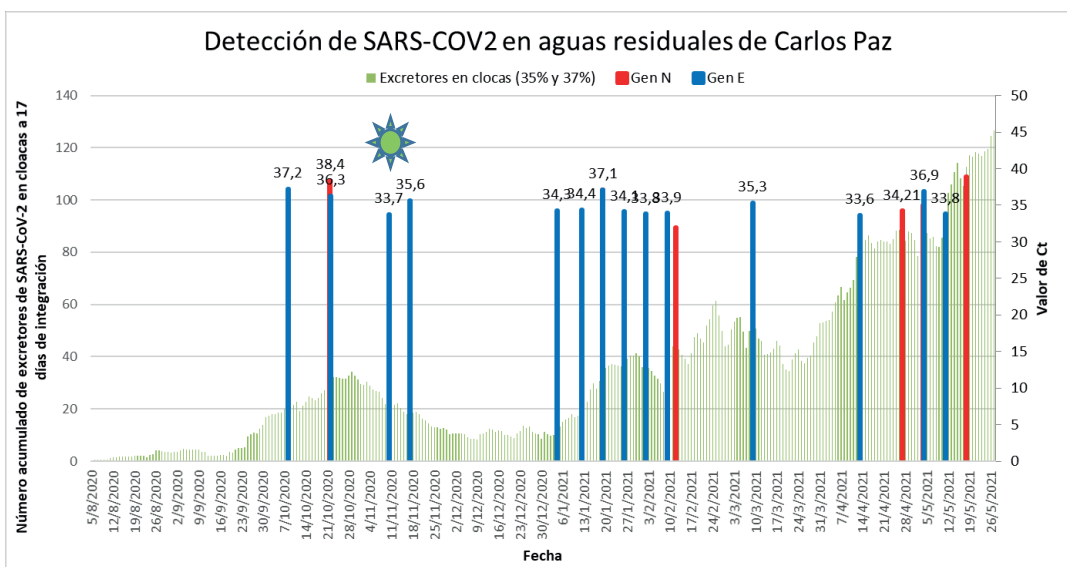


Figura 5. Detección de Sars-CoV-2 en las aguas residuales de la ciudad de Carlos Paz. 🌟 Wild Type; 🌟 United Kingdom (UK); 🌟 Manaus

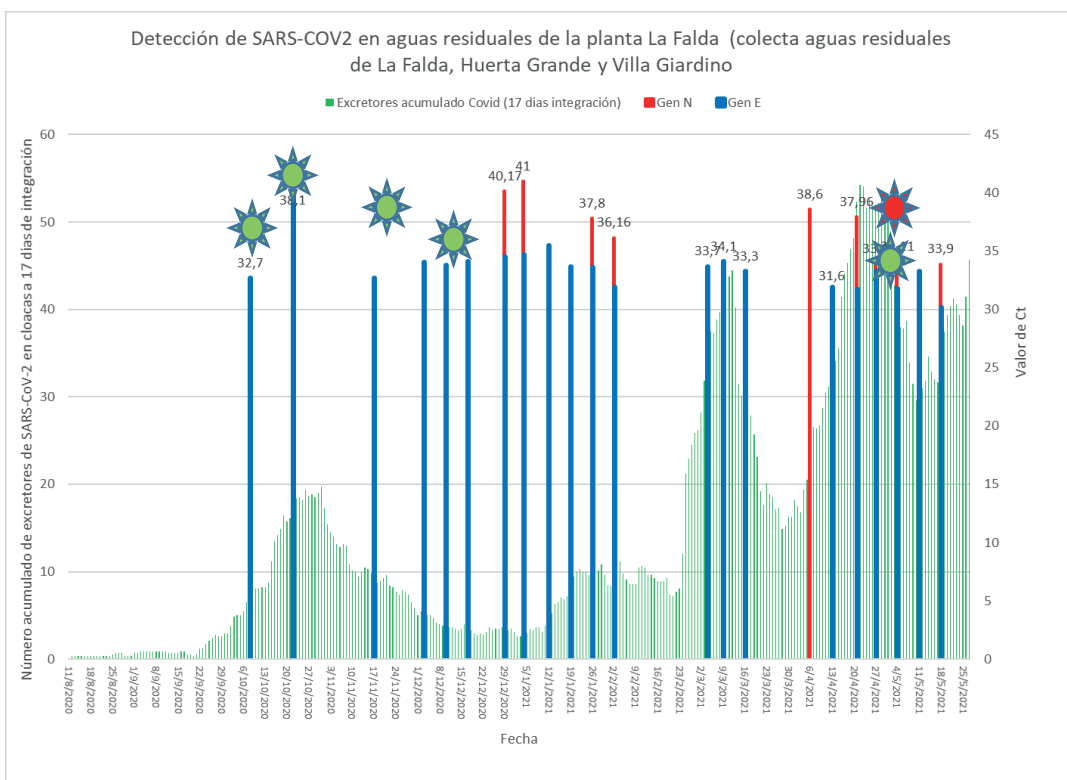


Figura 6. Detección de Sars-CoV-2 en las aguas residuales de las ciudades de La Falda, Villa Giardino y Huerta Grande.

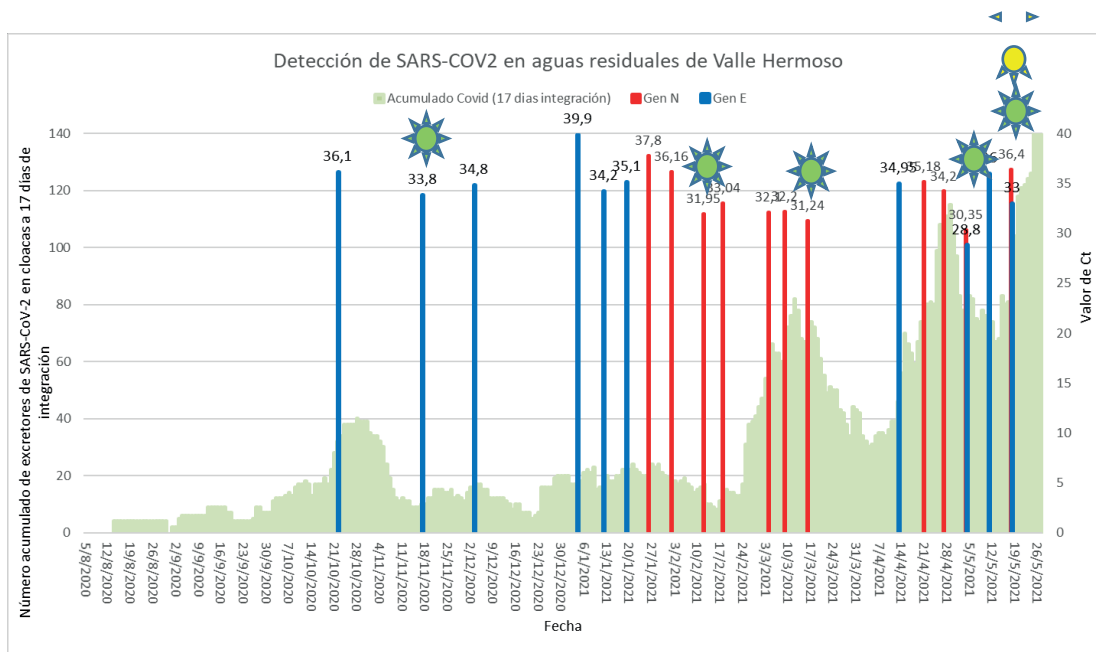


Figura 7. Detección de Sars-CoV-2 en las aguas residuales de la Localidad de Valle Hermoso.

★ Wild Type; ★ United Kingdom (UK); ★ Manaus

Discusión

La experiencia con otras enfermedades virales ha demostrado que la vigilancia basada en aguas residuales es un indicador sensible, reportando si el patógeno está presente en la población y si la circulación viral está aumentando o disminuyendo (La Rosa y col., 2020; Sinclair y col., 2008).

En el presente informe se aportan evidencias que las aguas residuales de la ciudad de Córdoba y Valle de Punilla, se constituyen en centinelas silenciosos de la tendencia de circulación viral en la población y la dinámica de circulación de la cepa wilde type y las variantes de preocupación (VOC). Así, el estudio de la epidemiología basada en aguas residuales de la ciudad de Córdoba y Valle de Punilla refleja la curva epidémica basada en casos clínicos, siendo la detección del genoma viral en cloacas predictivo de olas epidémicas y brotes aislados. El valor predictivo de la presencia de genoma de SARS-CoV-2 en las aguas residuales podría explicarse por un número significativo de excretorios asintomáticos y pre-sintomáticos.

Los resultados obtenidos sugieren que la epidemiología basada en aguas residuales, en base a la detección combinada de los genes N y E del virus SARS-CoV-2, es una herramienta valiosa y complementaria para la vigilancia de COVID-19, que agrega información sobre la circulación viral a lo largo de las distintas fases de la curva epidémica teniendo valor predictivo de aumento de casos de COVID-19. Es de resaltar que la epidemiología basada en aguas residuales es una herramienta de estudio de base poblacional; por lo tanto, en regiones en que la población no es estable, como ocurre en Valle de Punilla durante épocas de afluencia turística, se pueden observar patrones de

detección en los que la ausencia de detección del genoma en aguas residuales, no coincidiría con la cantidad de excretos acumulados a diecisiete días.

El informe recientemente publicado por la Unión Europea (Diario Oficial de la Unión Europea 2021) destaca que las nuevas variantes del virus están evolucionando y propagándose por todo el mundo. La experiencia de los Estados miembros en este ámbito ha demostrado que la vigilancia del SARS-CoV-2 y sus variantes en las aguas residuales puede ser una fuente de información rentable, rápida y fiable sobre la propagación del SARS-CoV-2 entre la población y que puede constituir una parte valiosa de una vigilancia genómica y epidemiológica reforzada. La vigilancia del SARS-CoV-2 en las aguas residuales puede proporcionar información complementaria e independiente importante para el proceso de toma de decisiones en materia de salud pública en el contexto de la actual pandemia de COVID-19. En consecuencia, el seguimiento de las aguas residuales debería incluirse en las estrategias nacionales de detección del virus SARS-CoV-2.

En la provincia de Córdoba al igual que en algunos países del mundo como Australia, Nueva Zelanda, Países Bajos y partes de Brasil, se adoptó la vigilancia ambiental como una herramienta para rastrear la dinámica de circulación de SARS-CoV-2 y variantes de preocupación (VOC) en la comunidad.

Agradecimientos

Este trabajo de investigación recibe aportes financieros del Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación de la Nación Argentina a través del Programa de Articulación y Fortalecimiento Federal de las Capacidades en Ciencia y Tecnología COVID-19 (CORD 29), de la Agencia Nacional de Promoción de la Investigación, el Desarrollo Tecnológico y la Innovación - IP-COVID (IP 558), del Programa de Acreditación y Financiamiento de Proyectos de Investigación y Desarrollo de la Universidad de la Defensa Nacional, del Ministerio de Salud de Córdoba y de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad Nacional de Córdoba.

Referencias

Carducci, A., Verani, M., Battistini, R., Pizzi, F., Rovini, E., Andreoli, E., Casini, B., 2006. Epidemiological Surveillance of Human Enteric Viruses by Monitoring of Different Environmental Matrices, pp. 239–244. <https://doi.org/10.2166/wst.2006.475>.

Chen, C., Gao, G., Xu, Y., Pu, L., Wang, Q., Liming, Wang, Wang, W., Song, Y., Chen, M., Linghang, Wang, Yu, F., Yang, S., Tang, Y., Zhao, L., Wang, H., Wang, Y., Zeng, H., Zhang, F., 2020c. SARS-CoV-2–positive sputum and feces after conversion of pharyngeal samples in patients with COVID-19. *Ann. Intern. Med.* 170, 1–3. <https://doi.org/10.7326/AITC201903050>

Chen, N., Zhou, M., Dong, X., Qu, J., Gong, F., Han, Y., Qiu, Y., Wang, J., Liu, Y., Wei, Y., Xia, J., Yu, T., Zhang, X., Zhang, L., 2020b. Epidemiological and clinical characteristics of 99 cases of 2019

novel coronavirus pneumonia in Wuhan, China: a descriptive study. *Lancet* 395, 507–513. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30211-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30211-7).

Chen, Y., Qin, C., Wei, Q., Li, R., Gao, H., Zhu, H., Deng, W., Bao, L., Wei, T., 2020a. Protection of Rhesus Macaque from SARS-Coronavirus Challenge by Recombinant Adenovirus Vaccine. *bioRxiv* 2020.02.17.951939. <https://doi.org/10.1101/2020.02.17.951939>.

Diario Oficial de la Unión Europea: ECOMENDACIÓN (UE) 2021/472 DE LA COMISIÓN de 17 de marzo de 2021 sobre un enfoque común para establecer una vigilancia sistemática del SARS-CoV-2 y sus variantes en las aguas residuales de la UE. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/ES/TXT/HTML/?uri=CELEX:32021H0472&from=EN>

Gao, Q.-Y., Chen, Y.-X., Fang, J.-Y., 2020. 2019 novel coronavirus infection and gastrointestinal tract. *J. Dig. Dis.* 1 (2). <https://doi.org/10.1111/1751-2980.12851>. Gralinski, L.E., Menachery, V.D., 2020. Return of the coronavirus: 2019-nCoV. *Viruses* 12, 1–8. <https://doi.org/10.3390/v12020135>

Hamming, I., Timens, W., Bulthuis, M., Lely, A., Navis, G., van Goor, H., 2004. Tissue distribution of ACE2 protein, the functional receptor for SARS coronavirus. A first step in understanding SARS pathogenesis. *J. Pathol.* 203, 631–637

Jiehao, C., Jing, X., Daojiong, L., Lei, X., Zhenghai, Q., Yuehua, Z., Hua, Z., Xiangshi, W., Yanling, G., Aimei, X., He, T., Hailing, C., Chuning, W., Jingjing, L., Jianshe, W., Mei, Z., Children, N., Women, H., Central, S., Zeng, M., 2020. A case series of children with 2019 novel coronavirus infection: clinical and epidemiological features. *Clin. Infect. Dis.* <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa198>

La Rosa, G., Muscillo, M., 2013. Molecular detection of viruses in water and sewage. In: Cook, N. (Ed.), *Viruses in Food and Water: Risks, Surveillance and Control*. Woodhead Publishing Limited, Cambridge, UK, pp. 97–125. <https://doi.org/10.1533/9780857098870.2.97>

Lai, C.-C., Liu, Y.-H., Wang, C.-Y., Wang, Y.-H., Hsueh, S.-C., Yen, M.-Y., Ko, W.-C., Hsueh, P.-R., 2020. Asymptomatic carrier state, acute respiratory disease, and pneumonia due to severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2): facts and myths. *J. Microbiol. Immunol. Infect.* 2. <https://doi.org/10.1016/j.imii.2020.02.012>

Lescure, F.-X., Bouadma, L., Nguyen, D., Parisey, M., Wicky, P.-H., Behillil, S., Gaymard, A., Bouscambert-Duchamp, M., Donati, F., Le Hingrat, Q., Enouf, V., Houhou-Fidouh, N., Valette, M., Mailles, A., Lucet, J.-C., Mentre, F., Duval, X., Descamps, D., Malvy, D., Timsit, J.-F., Lina, B., van-der-Werf, S., Yazdanpanah, Y., 2020. Clinical and virological data of the first cases of COVID-19 in Europe: a case series. *Lancet Infect. Dis.* 2, 1–10. [https://doi.org/10.1016/s1473-3099\(20\)30200-0](https://doi.org/10.1016/s1473-3099(20)30200-0).

Mizumoto, K., Kagaya, K., Zarebski, A., Chowell, G., 2020. Estimating the asymptomatic proportion of coronavirus disease 2019 (COVID-19) cases on board the Diamond Princess cruise ship, Yokohama, Japan, 2020. *Eurosurveillance* 25, 1–5. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.es.2020.25.10.2000180>

Nishiura, H., Kobayashi, T., Suzuki, A., Jung, S.-M., Hayashi, K., Kinoshita, R., Yang, Y., Yuan, B., Akhmetzhanov, A.R., Linton, N.M., Miyama, T., 2020. Estimation of the asymptomatic ratio of novel coronavirus infections (COVID-19). *Int. J. Infect. Dis.* <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2020.03.020>

Pan, Y., Zhang, D., Yang, P., Poon, L.L.M., Wang, Q., 2020. Viral load of SARS-CoV-2 in clinical samples. *Lancet Infect. Dis.* 20, 411–412. [https://doi.org/10.1016/s1473-3099\(20\)30113-4](https://doi.org/10.1016/s1473-3099(20)30113-4)

Sinclair, R.G., Choi, C.Y., Riley, M.R., Gerba, C.P., 2008. Pathogen surveillance through monitoring of sewer systems. *Adv. Appl. Microbiol.* 65, 249–269. [https://doi.org/10.1016/S0065-2164\(08\)00609-6](https://doi.org/10.1016/S0065-2164(08)00609-6)

Tang, B., Wang, X., Li, Q., Bragazzi, N., Tang, S., Xiao, Y., Wu, J., 2020. Estimation of the transmission risk of the 2019-nCoV and its implication for public health interventions. *J. Clin. Med.* 9, 462. <https://doi.org/10.3390/jcm9020462>

Tian Y, Rong L, Nian W, He Y. 2020. Review article: gastrointestinal features in COVID-19 and the possibility of faecal transmission. *Aliment Pharmacol Ther.* 51(9):843-851. doi:10.1111/apt.15731

Wang, C., Horby, P.W., Hayden, F.G., Gao, G.F., 2020a. A novel coronavirus outbreak of global health concern. *Lancet* 395, 470–473. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30185-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30185-9)

Wang, D., Hu, B., Hu, C., Zhu, F., Liu, X., Zhang, J., Wang, B., Xiang, H., Cheng, Z., Xiong, Y., Zhao, Y., Li, Y., Wang, X., Peng, Z., 2020b. Clinical characteristics of 138 hospitalized patients with 2019 novel coronavirus-infected pneumonia in Wuhan, China. *J. Am. Med. Assoc.* 323, 1061–1069. <https://doi.org/10.1001/jama.2020.1585>

Wang, W., Xu, Y., Gao, R., Lu, R., Han, K., Wu, G., Tan, W., 2020c. Detection of SARS-CoV-2 in different types of clinical specimens. *J. Am. Med. Assoc.*, 3–4 <https://doi.org/10.1001/jama.2020.3786>

Wölfel, R., Corman, V.M., Guggemos, W., Seilmaier, M., Zange, S., Mueller, M.A., Niemeyer, D., Vollmar, P., Rothe, C., Hoelscher, M., Bleicker, T., Bruenink, S., Schneider, J., Ehmann, R., Zwirgmaier, K., Drosten, C., Wendtner, C., 2020. Virological assessment of hospitalized cases of coronavirus disease 2019. *Nature* <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2196-x>

Wu, Y., Guo, C., Tang, L., Hong, Z., Zhou, J., Dong, X., Yin, H., Xiao, Q., Tang, Y., Qu, X., Kuang, L., Fang, X., Mishra, N., Lu, J., Shan, H., Jiang, G., Huang, X., 2020a. Prolonged presence of SARS-CoV-2 viral ARN in faecal samples. *Lancet Gast.*

Xagorarakis, I., O'Brien, E., 2020. Wastewater-based epidemiology for early detection of viral outbreaks. In: O'Bannon, D. (Ed.), *Women in Water Quality*. Springer Nature Switzerland, pp. 75–97. <https://doi.org/10.1007/978-3-030-17819-2>

Xiao, F., Tang, M., Zheng, X., Li, C., He, J., 2020. Evidence for Gastrointestinal Infection of SARS-CoV-2. medRxiv. <https://doi.org/10.1101/2020.02.17.20023721>

Xu, H., Zhong, L., Deng, J., Peng, J., Dan, H., Zeng, X., Li, T., Chen, Q., 2020b. High expression of ACE2 receptor of 2019-nCoV on the epithelial cells of oral mucosa. *Int. J. Oral Sci.* 12, 1–5. <https://doi.org/10.1038/s41368-020-0074-x>

Zhang, Y., Chen, C., Zhu, S., Shu, C., Wang, D., Song, J., Song, Y., Zhen, W., Feng, Z., Wu, G., Xu, J., Xu, W., 2020a. Isolation of 2019-nCoV from a stool specimen of a laboratory confirmed case of the coronavirus disease 2019 (COVID-19). *China CDC Wkly* 2,123–124