

Detección molecular de SARS-CoV-2 en aguas residuales como componente de vigilancia ambiental de COVID-19

Delgado- Salgado Patricio
<https://orcid.org/0000-0002-6920-3020>

Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, Quito, Ecuador.

Champutiz-Ortiz Eliana
<https://orcid.org/0000-0002-3705-9116>

Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Central del Ecuador, Quito, Ecuador.

Muñoz-Vera Cintia
<https://orcid.org/0009-0006-3455-6834>

Empresa Pública Municipal de Agua Potable y Alcantarillado, Ibarra, Ecuador.

Asimbaya-Alvarado Danny
<https://orcid.org/0000-0001-5936-9273>

Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Central del Ecuador, Quito, Ecuador.

Correspondencia:

Danny Asimbaya,
dxasimbaya@uce.edu.ec

Recibido: 28 de febrero de 2023

Aceptado: 3 de abril de 2023

Resumen:

Introducción: La detección molecular de material genético de SARS-CoV-2 en aguas residuales representa una herramienta innovadora y complementaria en la vigilancia ambiental de COVID-19. Dado que estas aguas contienen fragmentos genéticos del virus procedente de las heces fecales de personas infectadas o portadoras, lo que ofrece una valiosa información para la toma de decisiones en salud pública.

Objetivo: Determinar cuantitativamente la carga viral de SARS-CoV-2 en aguas residuales de la ciudad de Ibarra, con el fin de proporcionar datos que apoyen estrategias de vigilancia ambiental.

Material y Métodos: Estudio descriptivo observacional, se recolectaron muestras de aguas residuales en diferentes colectores de la ciudad de Ibarra, para la identificación y cuantificación molecular del virus SARS-CoV-2 con la técnica RT-q-PCR y correlacionar los resultados con el comportamiento epidemiológico de la enfermedad COVID-19.

Resultados: El estudio comparó la concentración viral y los casos confirmados de COVID-19 reportados, utilizando promedios de concentraciones virales obtenidos de muestras de aguas residuales y los datos oficiales del Ministerio de Salud Pública. Se observó un aumento del 12% en los casos de COVID-19 y una reducción del 35% en los valores de Ct, indicando un incremento en la carga viral. Estos hallazgos sugieren una correlación directa entre la concentración de SARS-CoV-2 y la incidencia de casos de COVID-19.

Conclusión: La monitorización de aguas residuales mediante técnicas moleculares emerge como una herramienta eficaz para la vigilancia ambiental del comportamiento epidemiológico de COVID-19.

Palabras clave: Aguas residuales, COVID-19, Técnicas de Diagnóstico Molecular, Vigilancia Sanitaria Ambiental.

Molecular detection of SARS-CoV-2 in wastewater as a component of environmental surveillance of the COVID-19

Abstract

Introduction: Molecular detection of SARS-CoV-2 genetic material in wastewater presents a novel and complementary tool in the environmental surveillance of COVID-19. This is due to the presence of genetic fragments of the virus in the fecal matter of infected or carrier individuals found in wastewater, providing valuable information for public health decision-making.

Objective: To quantitatively determine the viral load of SARS-CoV-2 in the wastewater of Ibarra city, aiming to provide data that supports environmental surveillance strategies.

Materials and Methods: This observational descriptive study involved collecting wastewater samples from Ibarra city's collectors. The identification and molecular quantification of the SARS-CoV-2 virus were conducted using the RT-q-PCR technique. The results were then correlated with the epidemiological behavior of COVID-19.

Results: The study compared viral concentration with the confirmed COVID-19 cases, using average viral concentrations from wastewater samples and official data from the Ministry of Public Health. A 12% increase in COVID-19 cases and a 35% decrease in Ct values were observed, indicating an increase in viral load. These findings suggest a direct correlation between the concentration of SARS-CoV-2 and the incidence of COVID-19 cases.

Conclusion: Wastewater monitoring through molecular techniques emerges as an effective tool for the environmental surveillance of the epidemiological behavior of COVID-19, enhancing public health response capabilities.

Keywords: Wastewater; COVID-19; Molecular Diagnostic Techniques; Environmental Health Surveillance.

Cómo citar este artículo: Delgado P, Champutiz E, Muñoz C, Asimbaya D. Detección molecular de SARS-CoV-2 en aguas residuales como componente de vigilancia ambiental de COVID-19. Rev Fac Cien Med [Internet]. 2023 [citado]; 48(2): 9-15. Disponible en: <https://doi.org/10.29166/rfcmq.v48i2.5778>



Este artículo está bajo una licencia de Creative Commons de tipo Reconocimiento - No Comercial - Sin obras derivadas 4.0 International License

Introducción

La humanidad se ha enfrentado a una de las crisis sanitarias más radicales en este siglo, posiblemente derivadas del cambio climático, la contaminación antropogénica y la diversidad viral, que ha acelerado el ritmo evolutivo de los virus principalmente. El 60% de las infecciones en seres humanos son de origen zoonótico, así como el 75% de las enfermedades emergentes y reemergentes¹, sumado a los episodios ambientales y sociales drásticos hacen prever nuevas situaciones críticas en los próximos años^{2,3}. Investigaciones aplicadas previas predijeron una posible pandemia por la familia de los Coronavirus, al analizar la diversidad viral, vías de diseminación y, sobre todo, la redistribución geográfica de uno de los principales reservorios y vectores de los géneros Alphacoronaviridae y Betacoronaviridae, que se ha comprobado su eventual contagio al ser humano^{4,5}.

Las medidas drásticas como el aislamiento físico, confinamiento, restricciones de transporte, comercio y educación, que se implementaron en respuesta a la pandemia por COVID-19, han derivado en una crisis evidente a nivel global con posibles graves consecuencias a largo plazo⁶. Los estudios de las aguas residuales, sobre todo para casos donde los agentes etiológicos pueden ser eliminados en materia fecal de portadores, así como el uso de herramientas ómicas, pueden ser considerados dentro de los planes de vigilancia ambiental como predictores epidemiológicos⁷.

Investigaciones a nivel mundial han demostrado que hay presencia de ARN del SARS-CoV-2 en las aguas residuales debido a la eliminación de carga viral en las heces de pacientes infectados, ya sea sintomáticos o asintomáticos. Esta presencia puede persistir durante 14 a 21 días y varía entre 102 y 108 copias de ARN por mililitro⁸.

En Ecuador, aún no se han implementado técnicas de vigilancia ambiental específicas para el COVID-19. Sin embargo, existen estudios que utilizan la cuantificación viral del Adenovirus Humano para evaluar el impacto microbiano en las aguas residuales⁹.

Además, Guerrero et al. encontraron genes específicos del SARS-CoV-2 (N1 y N2 del gen específico N de la región conservada del virus) en las aguas residuales de la ciudad de Quito, con con-

centraciones relacionadas a los casos reportados y su epidemiología¹⁰.

En estas circunstancias actuales, la vigilancia ambiental puede ser una herramienta eficaz para implementarla junto con los planes de vigilancia epidemiológica y coordinar estrategias sectoriales para monitorear posibles rebrotes o áreas donde aún no se haya detectado la infección debido a falta de diagnóstico o presencia asintomática en los pacientes¹¹.

El objetivo de este estudio fue determinar la presencia y cantidad de virus (secuencias genéticas conservadas del gen N, gen RdRP y gen E) en muestras de aguas residuales de recolectores seleccionados y determinar la variabilidad de la carga viral con la ayuda de la tecnología RT-q-PCR, así como la presencia y concentración de SARS-CoV-2 en diferentes sitios de muestreo (recolectores de aguas residuales) para complementar datos de salud pública.

Material Y Métodos

En este estudio descriptivo observacional, por medio de técnicas de biología molecular para detección de ácidos nucleicos de SARS-CoV-2, se analizaron muestras de aguas residuales de seis colectores estratégicamente ubicados según la densidad poblacional y de la Planta de Tratamiento de Aguas Residuales PTAR (cinco parroquias con un área total de aprox. de 242,09 kilómetros cuadrados y 170.548,69 personas), de una red de alcantarillado que fluye en una zona urbana de Ibarra-Imbabura, Ecuador; además, los resultados fueron relacionados con el comportamiento epidemiológico de la enfermedad usando como indicador los casos activos representados como tasa, que se calcula a partir del número de casos confirmados por 100 mil habitantes; esta información fue tomada a partir de las publicaciones de la página oficial de la Dirección de Nacional de Vigilancia Epidemiológica.

Muestreo

Teniendo en cuenta caudales y precipitaciones, con la ayuda de herramientas de información geográfica, se habilitaron seis puntos de recogida en función del área global de aporte de aguas residuales de la población, incluyendo también una muestra de la PTAR.

Se tomaron en promedio 120 mL por colector, usando recipientes plásticos estériles tratados con solución de HCl para eliminación previa de restos virales. El protocolo de toma de muestras fue VIARAL-CSIC12, en horarios de mayor concentración de excreción fecal, de 7h00 a 10h00, realizando un muestreo en febrero (M1) y uno en marzo (M2) de 2021.

Para el análisis ambiental de rutina, se contó con la colaboración del laboratorio de la Empresa Municipal de Agua Potable y Alcantarillado de Ibarra (EMAP-I); el estudio molecular se llevó a cabo en el laboratorio Clínico SALUDLAB de la ciudad de Quito.

Las muestras fueron transportadas a 4°C hasta la llegada al laboratorio de EMAP-I en menos de dos horas para ser procesadas inmediatamente. Una alícuota sirvió para el análisis ambiental y con otra (aprox. 80 mL), se procedió a realizar la concentración de aguas residuales para análisis molecular, con un concentrado final de 500 μ L que se lo conservó a -20°C para su conservación y transporte.

Concentración de agua y extracción de ARN

La concentración de aguas residuales para análisis molecular en el laboratorio de EMAP-I, se hizo inmediatamente a su llegada, por precipitación con polietilenglicol (PEG 8000) de acuerdo con el protocolo propuesto por IDEXX WATER 13. Para el testeo a ciegas, los concentrados fueron codificados por un técnico sin compromiso con el estudio y estos se transportaron a -20°C para su análisis en el laboratorio de Biología Molecular SALUDLAB, en menos de 24 horas de las recolecciones para su correcta conservación hasta su procesamiento.

Para la extracción del ARN viral, se utilizó el kit Virus DNA/RNA Extraction kit (Spin Column) de BIOCOMMA, con membranas de sílica para la adsorción en columnas, apto para extracción de DNA/RNA en sangre, tejidos, órganos y muestras ambientales, cuyo producto puede ser directamente usado para PCR, RT-PCR y qPCR. Todos los concentrados congelados fueron testeados por un solo operador el mismo día de la llegada de las muestras M2, siguiendo las instrucciones del fabricante, con reactivos del mismo lote y

condiciones ambientales sin variación, reduciendo errores analíticos. Se obtuvo 40 μ L de eluido a partir de 500 μ L de concentrado.

La cuantificación cualitativa de carga viral fue por qRT-PCR, (Reacción en Cadena de la Polimerasa por retrotranscripción en tiempo real)¹⁴, el kit de GeneProof® (Brno, Czech Republic) fue usado para la amplificación/detección (el máster mix listo está listo para el uso lo que reduce errores de preparación e incrementa la sensibilidad). Esta técnica identifica regiones conservadas del virus del gen N (específico de SARS-CoV-2), gen RdRp (específico de SARS) y gen E (específico de Coronavirus), con una sensibilidad de 66,19 copias/mL. Adicionalmente, se incluyó en cada ensayo controles positivos, negativos y el control interno disponibles para validar la técnica de extracción¹⁵. Las curvas de amplificación de estos controles validan la tecnología y brindan confiabilidad a la RT-qPCR, mostrando la alta sensibilidad del proceso (95%). La lectura de la fluorescencia se hizo en el Equipo eQ164 Real-Time PCR. El Sistema eQ164CP Real-Time PCR está configurado para evaluar la corrida de la PCR y obtener los resultados, al mismo tiempo, calcula el ciclo del umbral (Ct), que es el valor interpolado en la ecuación de la recta obtenida con las curvas del calibrado. Se utilizó un análisis descriptivo para evaluar los datos recogidos en el estudio, lo que proporcionó una visión del comportamiento de los valores de Ct, permitiendo identificar variaciones a lo largo del tiempo y entre los diferentes colectores.

Resultados

Entre febrero y marzo de 2021, se testearon muestras de aguas residuales de colectores de una red de alcantarillado de la zona urbana de Ibarra, para identificación de ácidos nucleicos de SARS-CoV-2 y carga viral usando técnica de PCR, las que resultaron positivas; siendo posible analizar la cuantificación de su carga viral, además de una comparación con los datos epidemiológicos del comportamiento de la enfermedad COVID-19 en la zona de la población analizada.

La Figura 1 muestra la presencia de SARS-CoV-2 en aguas residuales en diferentes colectores y cuantificación determinados por umbrales de ciclo (Ct), representados en el sistema eQ164CP Real-Time V1.0.0.1.

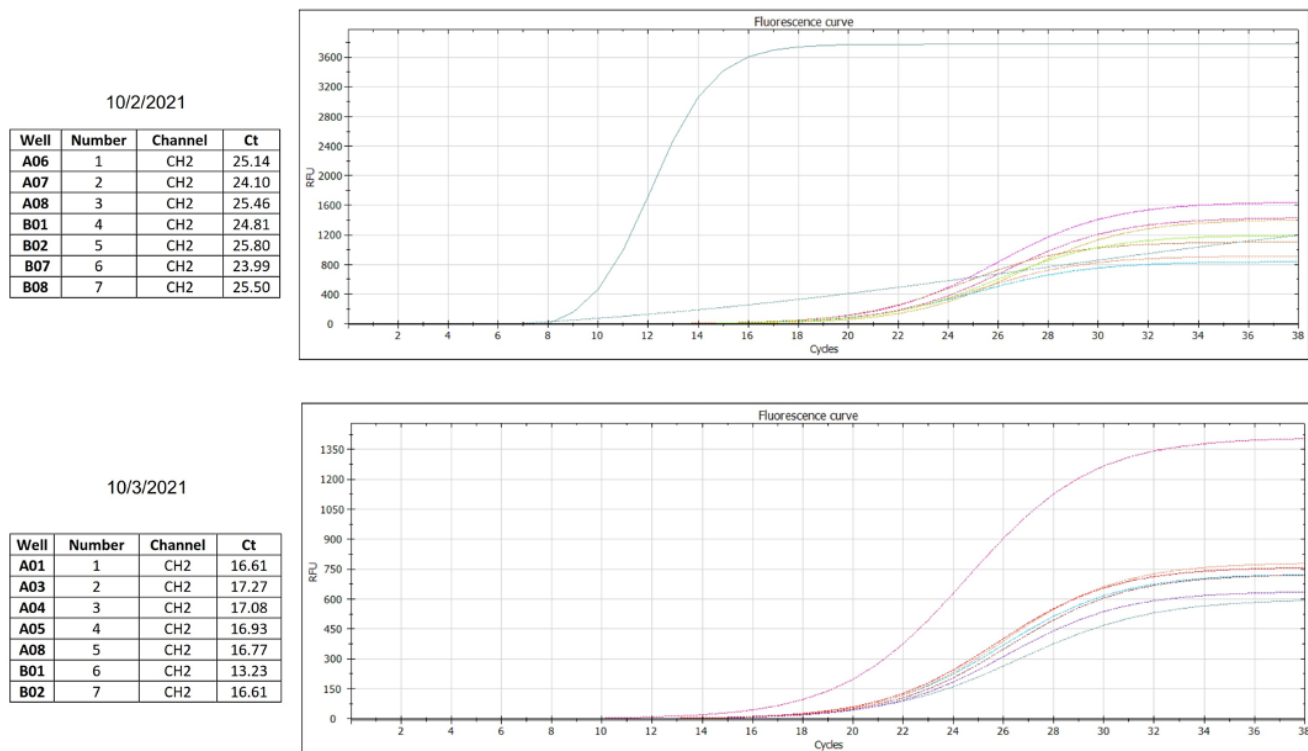


Figura 1: Amplificación de cargas virales del SARS-CoV-2 en muestras de aguas residuales.

A05 (control interno) muestra validación de la tecnología. A06 a B08 muestran curvas de amplificación, confirmando la presencia de ácidos nucleicos para SARS-CoV-2 y su cuantificación en copias expresadas en carga viral. Tomado de eQ164CP Real-Time System V1.0.0.1, plataforma de SALUDLAB.

Las curvas de amplificación demuestran la presencia del agente viral en la RT- qPCR en las catorce muestras de aguas residuales analizadas, tanto de M1 como de M2.

En la Tabla 1 se muestran los resultados del análisis molecular de cargas virales a partir de colectores y cuantificación de Ct para los dos períodos M1 y M2, confirmando la presencia de SARS-CoV-2 en las aguas residuales urbanas de la ciudad de Ibarra. Se puede apreciar que la carga viral en M2 sube considerablemente (a menor Ct, mayor cantidad de copias virales), referencia importante para posterior comparación con datos epidemiológicos reportados.

A partir de información de la tasa de infección por COVID-19 en la población de la zona testada, se hizo un análisis comparativo. La Figura 2 muestra el aumento de casos y con respecto a la carga viral estimada (Ct) de febrero y marzo de

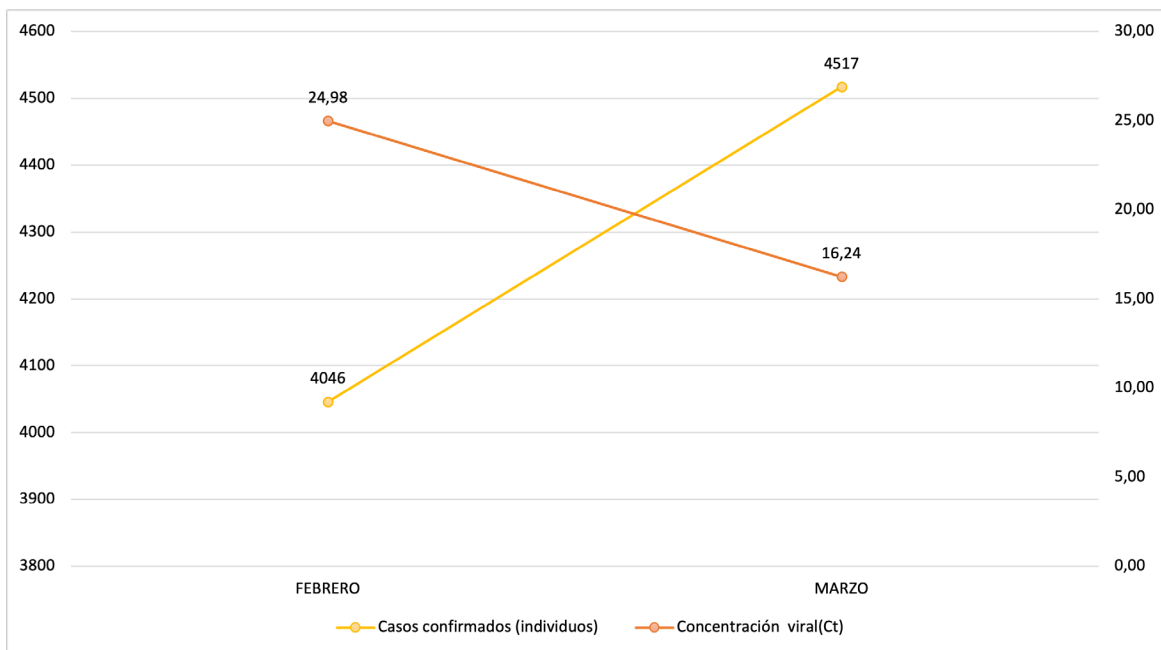
2021, lo que indica la relación existente entre el comportamiento epidemiológico de COVID-19 y la cuantificación de carga viral. El análisis estadístico demostró que, durante el período de estudio, se observó un aumento del 12% en los casos de COVID-19 y una reducción del 35% en los valores de Ct, indicando un incremento en la carga viral. Estos hallazgos sugieren una correlación directa entre la concentración de SARS-CoV-2 en las aguas residuales y la incidencia de casos de COVID-19 en la región.

Discusión

Los resultados de los análisis moleculares han mostrado la presencia de material genético del virus SARS-CoV-2 en aguas residuales provenientes de áreas de actividad epidemiológica (casos confirmados de COVID-19), siendo posible también estimar la carga viral. Esto ha permitido establecer una relación directa altamente significativa entre la concentración de carga viral y la tasa de infección en la población. Se ha visto que, al incrementar la cuantificación de copias de ácidos nucleicos virales, los casos activos en esa población también se han incrementado; esta tendencia directamente relacionada, hace sospechar una interrelación entre el aumento de casos y la carga viral en aguas residua-

Tabla 1. Carga viral por Ct en aguas residuales analizadas de los diferentes colectores.

Fecha	Área de aporte (m ²)	Origen de la muestra (colector)	Detección viral (gen N, gen RdRP y gen E)	Umbral de ciclos (Ct)
10/2/2021	134000,00	Alpargate	+	23,99
	1550133,91	La Victoria	+	24,10
	9758093,43	Av. Carchi	+	25,84
	M1 9529464,50	Ajaví 1	+	25,46
	19473398,52	Ajaví 2	+	25,14
	2886676,69	Piedra Chapetona	+	25,50
	43331767,04	Entrada PTAR	+	24,81
10/3/2021	134000,00	Alpargate	+	13,23
	1550133,91	La Victoria	+	17,27
	9758093,43	Av. Carchi	+	16,13
	9529464,50	Ajaví 1	+	17,08
	M2 19473398,52	Ajaví 2	+	16,61
	2886676,69	Piedra Chapetona	+	16,61
	43331767,04	Entrada PTAR	+	16,77

**Figura 2.** Casos confirmados de COVID-19 y carga viral estimada. Se observa la relación directa entre casos COVID-19 y la concentración viral estimada.

les. Aunque no está claramente respaldado, estudios en otras regiones aseguran que esta estrecha relación se debe a la mayor excreción de material genético en heces por un mayor número de pacientes infectados, sean portadores o sintomáticos, más no por un riesgo de contagio en fuentes de aguas residuales, tomando en cuenta que la inactivación viral en este ambiente se presenta a causa de factores como la inestabilidad relativa en virus envueltos, dilución de copias virales (carga viral escasamente infecciosa) y por la baja conservación de partículas víricas infecciosas, resultando un riesgo que si no es inexistente, sí es extremadamente bajo¹⁶.

Carducci y sus colaboradores en 2020, comparan diferentes técnicas de biología celular y molecular, concluyendo que el método más sensible para detectar coronavirus en muestras de aguas residuales es la RT-qPCR¹⁷, un método que ha sido replicado en esta investigación mostrando un buen desempeño.

La técnica de RT-qPCR ofrece una ventaja de gran importancia al permitir cuantificar por estimación del umbral de corte (Ct) la carga viral a detectarse, factor de alta relevancia si se requiere comparar con datos epidemiológicos del comportamiento de la enfermedad estudiada; no solo limitándose a COVID-19, sino a varias patologías donde las heces fecales son una fuente rica en material genético antigénico, que abre las puertas en la investigación epidemiológica y vigilancia ambiental.

Estimar el grado de la prevalencia de la enfermedad es posible a través de la detección de partículas virales en colectores de aguas residuales de una población, su cuantificación se ajusta a tendencias de la evolución de la enfermedad en los distintos sectores analizados, de esta forma, este método puede ser validado como una herramienta de vigilancia epidemiológica de la infección. Esta metodología de vigilancia ambiental, ya ha sido aplicada para investigar el comportamiento y evolución de otros virus como poliovirus, enterovirus, Hepatitis A, entre otros, ofreciendo un conocimiento que genere estrategias para el control de estas enfermedades, así como colaborar en la detección precoz de posibles rebrotes en ciertas épocas del año o con otras variables determinantes, complementando planes estratégicos de control sanitario.

La conclusión más relevante que surge a partir de este estudio es que el uso de esta tecnología representa una alternativa accesible, económica, no invasiva, de alta cobertura poblacional y que ofrece la oportunidad de conocer específicamente la tendencia de la circulación viral en zonas a investigar. Es clave en zonas de difícil acceso sanitario, lo que facilita obtener información en dichas zonas y población vulnerable. Esta herramienta, junto con un adecuado plan de vigilancia epidemiológica, se constituye como una certera vigilancia centinela, incluso podremos conocer anticipadamente nuevas variantes que surgirían en brotes y su comportamiento.

Concluimos entonces que el uso de esta metodología de análisis en aguas residuales como vigilancia ambiental es una necesidad sanitaria de la comunidad que puede ser no sólo aplicada para SARS-CoV-2, sino para varios patógenos pueden ser monitoreados (poliovirus, influenza, enterovirus, virus respiratorios, vibrio cólera, etc)¹⁸.

Agradecimientos

Los autores agradecen al Laboratorio de la Empresa Municipal de Agua Potable Ibarra y al Laboratorio SALUDLAB por las facilidades prestadas y su colaboración.

Contribución de autoría

Patricio Delgado Diseño de la investigación, recolección y preparación de muestras, y redacción del manuscrito.

Eliana Champutiz Preparación de muestras, ejecución de la técnica RT-q-PCR, análisis de datos y redacción del manuscrito.

Cintia Muñoz Recolección y preparación de muestras, análisis fisicoquímicos.

Danny X Asimbaya Alvarado Interpretación de resultados, revisión bibliográfica y contribución en la redacción.

Conflicto de interés

Los autores confirmamos que no existe conflicto de interés

Financiamiento

La investigación fue realizada con recursos propios.

Referencias

1. UNEP. Emerging Issues of Environmental Concern. UNEP Frontiers 2016 Report [Internet]. 2016 [cited 2023 May 20]. Disponible en: https://web.unep.org/frontiers/sites/unep.org.frontiers/files/documents/unep_frontiers_2016.pdf.
2. Manzanedo RD, Manning P. COVID-19: Lessons for the climate change emergency. *Sci Total Environ*. 2020;742:140563.
3. Rodríguez-Verdugo A, Lozano-Huntelman N, Cruz-Loya M, Savage V, Yeh P. Compounding Effects of Climate Warming and Antibiotic Resistance. *IScience* [Internet]. 2020 [cited 2023 May 20]; Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.isci.2020.101024>.
4. Fan Y, Zhao K, Shi ZL, Zhou P. Bat coronaviruses in China. *Viruses*. 2019;11(3):27–32.
5. Woo PCY, Lau SKP, Lam CSF, et al. Discovery of Seven Novel Mammalian and Avian Coronaviruses in the Genus Deltacoronavirus Supports Bat Coronaviruses as the Gene Source of Alphacoronavirus and Betacoronavirus and Avian Coronaviruses as the Gene Source of Gammacoronavirus and Deltacoronavirus. *J Virol*. 2012;86(7):3995–4008.
6. Nicola M, Alsafi Z, Sohrabi C, et al. The socio-economic implications of the coronavirus pandemic (COVID-19): A review. *Int J Surg* [Internet]. 2020 [cited 2023 May 20]; Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.ijssu.2020.04.018>.
7. Velasteguí E, Lalaleo L, Calero W. ¿Se pueden prevenir las pandemias? *Epidemiología basada en aguas residuales*. *Rev Investig Desarrollo I+D*. 2020;12(1):88-90.
8. Usman M, Farooq M, Hanna J. Existence of SARS-CoV 2 in Wastewater: Implications for Its Environmental Transmission in Developing Communities. *Environ Sci Technol*. 2020;54(13):7758-7759.
9. Bonifaz E. Evaluación de la contaminación fecal de origen humano y animal en la cuenca alta del río Guayllabamba mediante indicadores virales [Internet]. Universidad de las Américas, Ecuador; 2018 [cited 2023 May 20]. Disponible en: <http://dspace.udla.edu.ec/bitstream/33000/9234/1/UDLA-EC-TIB-2018-16.pdf>.
10. Guerrero L, Ballesteros I, Villacrés I, et al. SARS-CoV-2 in river water: Implications in low sanitation countries, Ecuador. *Sci Total Environ* [Internet]. 2020 [cited 2023 May 20]; Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.140832>.
11. Municipal Water Leader. Wastewater Testing as a COVID-19 Early Warning System. Interview Water Research Foundation [Internet]. 2020 [cited 2023 May 20]. Disponible en: <https://municipalwaterleader.com/wastewater-testing-as-a-covid%e2%80%91early-warning-system/>.
12. Randazzo W, Truchado P, Allende A, Sánchez G. Protocolo para la detección de SARS-CoV-2 en aguas residuales. VIARAL-CSIC [Internet]. 2020 [cited 2023 May 20]. Disponible en: <https://www.miteco.gob.es/es/agua/temas/concesiones-y-autorizaciones/vertidos-deaguasresiduales/alerta-temprana-covid19/default.aspx>.
13. IDEXX WATER. Monitoreo de Aguas residuales [Internet]. México; 2020 [cited 2023 May 20]. Disponible en: <https://www.idexx.com.mx/waterSARS-CoV-2.RT-PCR-test/>.
14. CDC. 2019-Novel coronavirus (2019-nCoV) real-time RT-PCR diagnostic panel [Internet]. US Centers for Disease Control and Prevention; 2020 [cited 2023 May 20]. Disponible en: <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/lab/rt-pcr-panel-primer-probes.html>.
15. Konka A, Lejawa M, Gazdzica J. RT-PCR Detection of SARS-CoV-2 among individuals from the Upper Silesias Region-Analysis of 108,516 Tests. *Diagnostics J*. 2021;12(1):7.
16. Bosch A, Sánchez G, Pinto R. Vigilancia del SARS-CoV-2 en aguas residuales: una herramienta de alerta temprana. [Internet]. 2020 [cited 2023 May 20]. Disponible en: https://diposit.ub.edu/dspace/bitstream/2445/158578/1/Vigilancia%20del%20SARS-CoV-2%20en%20aguas%20residuales_%20una%20herramienta%20de%20alerta%20ra%cc%81pida.pdf.
17. Carducci A, Federigi I, Liu D, Thompson J, Verani M. Making Waves: Coronavirus detection, presence and persistence in the water environment: State of the art and knowledge needs for public health. *Water Res* [Internet]. 2020 [cited 2023 May 20]; Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.watres.2020.115899>.
18. Sánchez J. COVID-19 en aguas residuales y potables: análisis de la situación actual. Universidad Surcolombiana, Colombia; 2020. P: 2-4.