



Association de la surveillance épidémiologique basée sur les eaux usées et de la modélisation du SRAS-CoV-2/COVID-19 : applications pratiques à l'Agence de santé publique du Canada – Matériel supplémentaire

Meong Jin Joung, Chand S Mangat, Edgard M Mejia, Audra Nagasawa, Anil Nichani, Carol Perez-Iratxeta, Shelley W Peterson, David Champredon

Liste des figures et textes supplémentaires

Figure S1 : Incidence « déclarable » présumée dans cinq villes canadiennes

Figure S2 : Nombre de reproductions effectif à partir des eaux usées dans cinq villes canadiennes

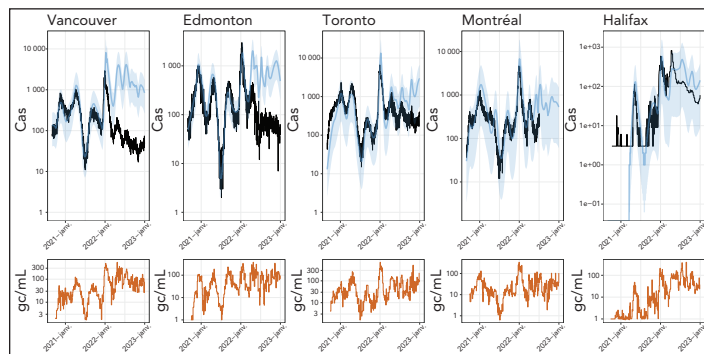
Analyse en laboratoire de la concentration de SRAS-CoV-2

Tableau S1 : Paramètres des eaux usées conventionnelles

Traitement en laboratoire d'un échantillon d'eau usée pour la détection de l'acide ribonucléique du SRAS-CoV-2

Figure S3 : Traitement en laboratoire d'un échantillon d'eau usée pour l'identification du SRAS-CoV-2

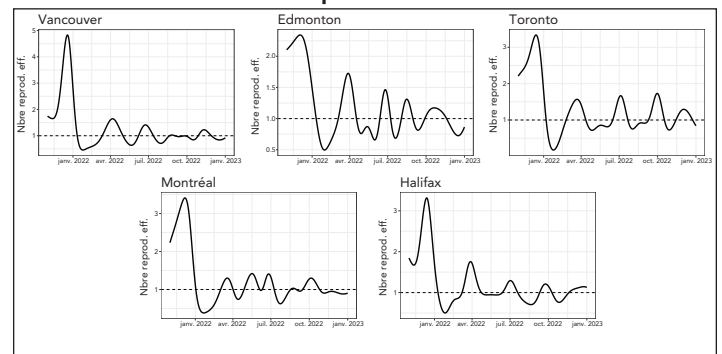
Figure S1 : Incidence « déclarable » présumée dans cinq villes canadiennes^a



Abbréviations : LNM, Laboratoire national de microbiologie; PCR, réaction en chaîne de la polymérase

^a Pour chaque ville, le panneau supérieur montre les cas cliniques de COVID-19 déclarés par la municipalité (courbe noire) et l'incidence « déclarable » déduite à l'aide du modèle épidémique des eaux usées (MEEU) (la courbe bleue représente l'estimation moyenne, et l'ombre bleue son IC à 95 %) calibré sur la concentration virale dans les eaux usées mesurée dans cette ville (panneau inférieur, courbe brune). Il convient de noter que l'incidence basée sur les eaux usées est qualifiée de « déclarable » parce que nous utilisons un rapport constant entre les cas déclarés et la concentration virale. Nous ne tentons pas d'estimer l'incidence « réelle » (et non observée) car nous ne disposons pas de données permettant d'estimer le rapport entre les infections réelles dans la communauté et la concentration virale mesurée. Dans les cinq villes, le signal des eaux usées et la surveillance clinique ont concordé jusqu'en décembre 2021, date à laquelle le variant Omicron est apparu (panneaux supérieurs, les courbes noires et bleues sont similaires). Après Omicron, nous observons une divergence entre l'incidence clinique et l'incidence basée sur les eaux usées : la surveillance clinique signale systématiquement moins de cas que ce qu'implique le signal des eaux usées (panneaux supérieurs, courbe noire en dessous de la courbe bleue).

Figure S2 : Nombre de reproductions effectif à partir des eaux usées dans cinq villes canadiennes^a



Abbréviation : Nbre de reprod. eff., nombre de reproductions effectives

^a Chaque panneau montre la moyenne du nombre de reproduction effectif basé sur les eaux usées, estimé à l'aide du modèle épidémique des eaux usées (MEEU)



Analyse en laboratoire de la concentration de SRAS-CoV-2

Fréquence d'échantillonnage

La plupart des activités de surveillance des eaux usées étant limitées, il n'est souvent pas possible de procéder à un échantillonnage quotidien. De manière générale, les laboratoires collectent 2 à 3 échantillons par semaine, qui sont souvent envoyés par lots à un laboratoire d'analyse. Pour décrire avec le plus de précision possible les tendances de la concentration du coronavirus 2 du syndrome respiratoire aigu sévère (SRAS-CoV-2) dans les eaux usées, ces échantillons doivent être prélevés à intervalles bien espacés tout au long de la semaine.

Manipulation, transport, entreposage et contrôle de la qualité des échantillons

Par nature, les échantillons d'eaux usées sont très « actifs », i.e. qu'ils présentent un degré élevé d'activité biologique qui entraîne une modification assez rapide de la nature de l'échantillon. Après le prélèvement, les échantillons doivent être refroidis à 4 °C le plus rapidement possible, puis expédiés à froid à l'aide de glace naturelle ou de blocs réfrigérants par le moyen de transport le plus rapide possible. Dès leur arrivée au laboratoire, ils doivent être extraits le plus rapidement possible, en conservant les échantillons au réfrigérateur jusqu'à l'extraction. Les méthodes standard (1) recommandent l'extraction dans les sept jours suivant la collecte lors de l'analyse de contaminants à l'état de traces tels que les composés organiques semi-volatils. Les échantillons d'eaux usées contiennent également des solides en suspension, qui font partie intégrante de la matrice. C'est pourquoi les échantillons doivent être secoués fréquemment et soigneusement lors de tout sous-échantillonnage sur le terrain ou en laboratoire.

L'échantillonnage composite et l'échantillonnage instantané comprennent l'utilisation de consommables (tubes, bouteilles) et de conteneurs et équipements réutilisables. Ces récipients et équipements doivent être testés pour s'assurer que le système d'échantillonnage n'introduit pas de contaminants dans les échantillons. De l'eau de qualité laboratoire peut être utilisée pour créer des blancs de lavage en simulant un échantillonnage composite ou instantané comprenant des tubes d'échantillonnage, des tubes de pompage, des récipients de collecte et des récipients de sous-échantillonnage.

Métadonnées et contexte du plan de traitement des eaux usées

Comme indiqué ci-dessus, une étude sur les eaux usées doit être conçue dans le contexte des réalités et des détails du système de collecte et de traitement. Les échantillons d'eau usée doivent toujours être caractérisés par des paramètres conventionnels afin de mesurer la force de l'eau usée et de l'efficacité du processus de traitement. Ces paramètres sont énumérés dans le **tableau S1**.

Tableau S1 : Paramètres des eaux usées conventionnelles

Paramètre	Commentaires
Température—processus	Indicateur des conditions microbiennes pour le traitement
Température—échantillon	Confirmation de la température d'échantillonnage cible
pH	Indicateur pour la chimie générale et la microbiologie
Alcalinité	Indicateur du pouvoir tampon et de la nitrification
Total des solides en suspension	Le test gravimétrique empirique, indicateur de la force des eaux usées et de l'efficacité du traitement, peut être corrélé avec certains constituants chimiques et microbiologiques
Demande chimique en oxygène	Mesure de la matière susceptible d'être oxydée dans des conditions chimiques fortes, indicateur de la force des eaux usées et de l'efficacité du traitement
Demande biochimique en oxygène	Mesure de la matière susceptible d'être oxydée dans des conditions biologiques précises, indicateur de la force des eaux usées et de l'efficacité du traitement
Carbone organique total	Mesure du carbone organique total (réduit), indicateur de la force des eaux usées et de l'efficacité du traitement
Azote Kjeldahl total	Mesure de l'azote organique total (réduit)
Azote ammoniacal	Mesure de l'azote disponible pour la nitrification
Nitrate + nitrite	Mesure de l'azote oxydé, indicateur de la nitrification ou de la dénitrification
Débit journalier moyen mesuré	Disponible auprès des stations d'épuration, indique la taille du système et confirme les conditions de temps sec ou l'influence des orages et des tempêtes

Résumé

Toute étude des constituants des eaux usées nécessite une compréhension approfondie du système de collecte et de traitement, afin de concevoir un processus de collecte d'échantillons qui répondra aux questions de l'étude. Les sites d'échantillonnage doivent être confirmés en consultation avec les exploitants des stations d'épuration des eaux usées et décrits en détail dans tous les rapports et publications (e.g. collecte de l'influent brut ou après l'examen environnemental préalable). De même, les techniques d'échantillonnage (composite ou instantané) doivent être décrites de manière suffisamment détaillée. Les échantillons d'eaux usées doivent être entreposés, transportés et manipulés de manière appropriée afin de préserver leur intégrité.

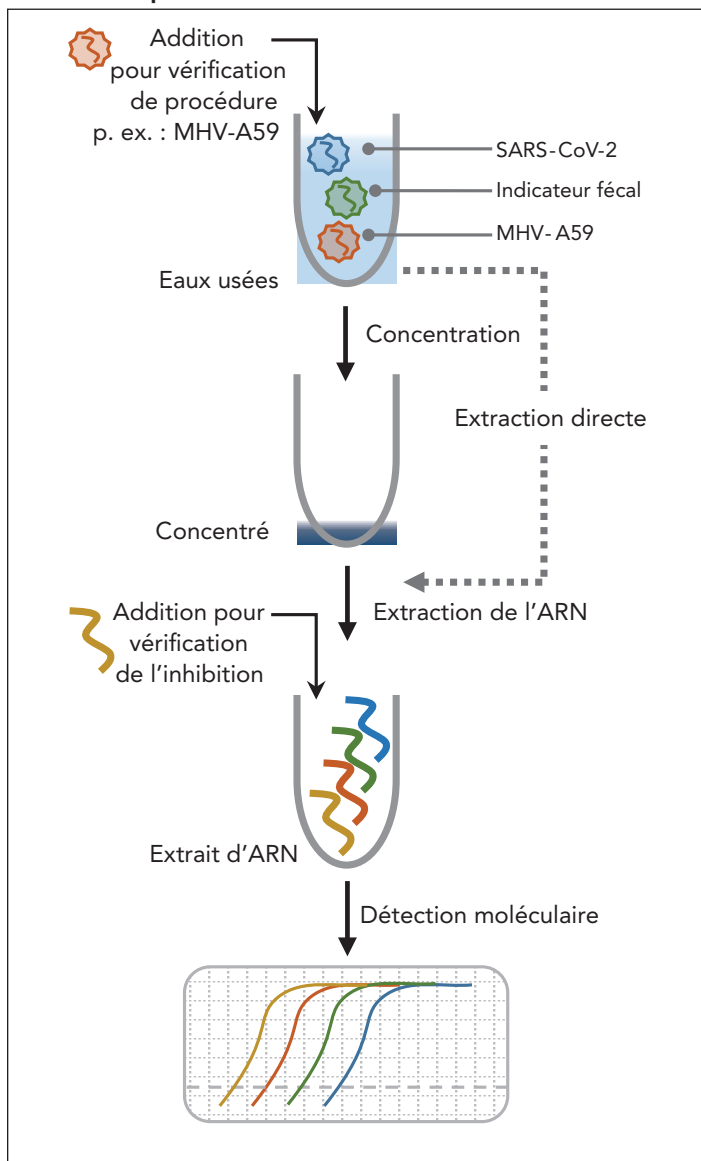
Traitement en laboratoire d'un échantillon d'eau usée pour la détection de l'acide ribonucléique du SRAS-CoV-2

Une fois les échantillons reçus par le laboratoire, la température doit être prise et enregistrée pour référence ultérieure. Les



échantillons doivent être traités dans les 24 heures suivant leur réception au laboratoire. Une surveillance efficace des eaux usées visant à détecter l'émergence d'une infection repose sur une collecte de données et des tests rapides. Pour une utilisation ultérieure, conserver les portions/aliquotes inutilisées des échantillons collectés à -70 °C. L'intensité du signal de l'acide ribonucléique (ARN) viral diminuant après la congélation, il convient d'éviter plus d'un cycle de congélation-décongélation. La **figure S3** décrit les étapes du traitement en laboratoire utilisées pour détecter un signal ARN SRAS-CoV-2 à partir d'un échantillon d'eau usée.

Figure S3 : Traitement en laboratoire d'un échantillon d'eau usée pour l'identification du SRAS-CoV-2



Abréviations : ARN, acide ribonucléique; MHV-A59, virus de l'hépatite murine A59; SRAS-CoV-2, coronavirus 2 du syndrome respiratoire aigu sévère

Un test de dépistage du SRAS-CoV-2 dans les eaux usées se compose de trois étapes principales (figure S3) :

- Concentration virale
- Extraction de l'ARN
- Détection moléculaire

Actuellement, l'Agence de la santé publique du Canada (l'Agence)/le Laboratoire national de microbiologie (LNM) utilise une variante d'une méthode de concentration virale basée sur l'ultrafiltration décrite précédemment par le groupe de Wigginton (2) en plus d'un essai portant sur la fraction « solide » ou insoluble des eaux usées, suivi d'une détection moléculaire du SRAS-CoV-2 par réaction en chaîne de la polymérase en temps réel (RT-qPCR) portant sur les cibles N1 et N2, telle que mise au point par les Centres pour le contrôle et la prévention des maladies (CDC) des États-Unis. Des études antérieures ont montré que le SRAS-CoV-2 se répartit à peu près également entre la phase solide et la phase liquide des eaux usées. D'un point de vue volumétrique, la fraction solide est le principal composant des eaux usées qui contient le virus (3–6). La fraction solide peut être facilement collectée et extraite pour obtenir du matériel génétique pouvant être testé.

Il n'existe pas de consensus ou de test de référence pour la détection du SRAS-CoV-2 dans les eaux usées et les comparaisons inter-laboratoires des méthodes ont montré que la plupart d'entre elles ont des performances comparables. En collaboration avec le Réseau canadien de l'eau, l'Agence/le LNM a participé à une étude inter-laboratoire sur les méthodes de détection du SAR-CoV-2 dans les eaux usées (7). L'échantillon a été prélevé dans la plus grande des trois stations d'épuration de Winnipeg et 85 cas cliniques ont été recensés dans la ville au moment du prélèvement. Les concentrations de SRAS-CoV-2 de la plupart des laboratoires se situaient dans une bande de 1 logarithme. La Water Research Foundation (8) a effectué une comparaison interlaboratoire similaire entre les laboratoires américains. Des échantillons prélevés dans deux stations d'épuration du comté de Los Angeles (~30 000 cas signalés au cours des 14 jours précédents) ont été distribués à 36 laboratoires pour analyse. Malgré les différences méthodologiques, l'éventail des résultats rapportés par la plupart des laboratoires se situait dans une fourchette de 2 logarithmes. Il est important de noter que les études précitées montrent qu'il n'y a pas eu de consensus entre les laboratoires participants, ce qui suggère que la plupart des méthodes ont donné des résultats comparables.

La structure de l'étude canadienne a révélé des considérations importantes pour les méthodes de laboratoire. Huit laboratoires ont reçu trois types d'échantillons : des échantillons enrichis avec du SRAS-CoV-2 inactivé à une concentration élevée et faible (1 800 cp/mL contre 20 cp/mL), et un échantillon non enrichi. Tout d'abord, seuls les laboratoires qui traitaient la fraction insoluble ou « solide » des eaux usées étaient en mesure



d'obtenir un signal à partir de l'échantillon non enrichi. En raison du faible nombre de cas cliniques au moment de la collecte, cela suggère que la fraction insoluble des eaux usées est plus efficace pour fournir des indicateurs d'alerte précoce dans le cadre de la surveillance des eaux usées. Des études sur les boues primaires et le fractionnement de l'influent des eaux usées ont confirmé que la majorité du signal viral du SRAS-CoV-2 réside dans la fraction insoluble. Deuxièmement, le SRAS-CoV-2 introduit dans les eaux usées ne s'est pas sensiblement réparti dans la fraction insoluble ou «solide» des eaux usées. Cela suggère que l'utilisation de contrôles de virus de substitution pour surveiller l'efficacité globale des méthodes de laboratoire peut ne pas rendre compte du signal viral naturel (voir Contrôles, ci-dessous).

Méthodes de laboratoire

Concentration virale

Comme le SRAS-CoV-2 est présent à de faibles niveaux dans les eaux usées, une concentration est nécessaire pour une analyse précise, en particulier pendant les phases initiales de l'éclosion, lorsque la charge virale est faible (figure S1). La concentration et l'extraction sont largement considérées comme les étapes les plus influentes dans l'orientation du rendement global de l'essai. Ahmed *et al.* ont élaboré une comparaison des différentes méthodes (9). Il existe plusieurs méthodes de concentration, chacune ayant ses propres avantages et inconvénients, comme le décrit le tableau S2.

Certains chercheurs utilisent des schémas d'extraction directe sur les eaux usées entières qui sautent complètement l'étape de concentration (figure S1). Généralement, il s'agit de traiter environ 1 ml d'influent entier, ce qui est à la fois pratique et adapté au haut débit. L'extraction directe évite les pertes d'échantillons liées à la concentration et pourrait améliorer le rendement global. Toutefois, l'Agence/le LNM met en garde contre l'utilisation de schémas d'extraction directe en raison de leur rendement inconnu pendant les périodes de faible charge virale, en particulier lors de l'analyse de faibles volumes d'eaux usées.

Comme nous l'avons indiqué ci-dessus, la majeure partie du signal viral est associée à la fraction insoluble des eaux usées. Ainsi, la collecte et le traitement des solides des eaux usées pourraient améliorer considérablement la récupération. L'Agence/le LNM a constaté que le niveau viral dans les solides des eaux usées est égal ou supérieur à la fraction liquide.

Extraction de l'ARN

Il existe une variété de trousse commerciales d'extraction d'ARN et chacun d'entre eux doit être choisi en fonction du type de matériel d'entrée. Les échantillons à forte teneur en matières solides nécessitent une désintégration mécanique et des étapes de lavage approfondies pour éliminer les composés inhibiteurs; les trousse d'extraction de «sol» ou de

Tableau S2 : Trois méthodes de concentration courantes

Méthode	Avantages	Inconvénients
Ultrafiltration Les particules virales sont concentrées à l'aide d'un filtre centrifuge	Facile à utiliser Délai d'exécution court Débit plus élevé que la plupart des méthodes N'accède pas au composant solide	Co-concentrations des composés inhibiteurs Coût du matériel de laboratoire (~30 \$ par appareil) L'approvisionnement en réactifs peut varier Nécessite une centrifugeuse (jusqu'à 4K x g) Les filtres peuvent se boucher lorsque la turbidité de l'échantillon est élevée
Filtration électro-négative Les particules virales sont capturées sur une membrane chargée par filtration sous vide	Faible coût Faible transfert de composés inhibiteurs Peu de frais de laboratoire pour l'installation du test	Faible débit Temps d'intervention élevé Nécessite une extraction/un nettoyage approfondi de l'ARN
Précipitation du PEG Un agent précipitant est ajouté aux échantillons et les particules virales sont récupérées par centrifugation	Faible coût Offre importante de réactifs	Faible débit, certaines méthodes nécessitent une incubation d'une nuit Nécessite une centrifugation (à 10K x g) Nécessite une extraction/un nettoyage approfondi de l'ARN

Abréviations : ARN, acide ribonucléique; PEG, polyéthylène glycol

«microbiome» sont bien adaptées à cet objectif. Les trousse générales d'extraction d'ARN peuvent être utilisées lorsque le matériel d'entrée est clarifié par centrifugation. Les trousse de nettoyage commerciales peuvent améliorer la détection dans les échantillons inhibés. L'ARN est instable une fois extrait, c'est pourquoi la détection moléculaire doit être effectuée le jour de l'extraction.

Détection moléculaire

La détection du signal viral du SRAS-CoV-2 se fait par RT-qPCR comme indiqué dans la figure S3. Des amorces précises amplifient le génome du SRAS-CoV-2 et une sonde fluorescente intermédiaire est consommée simultanément au cours de ce processus. Le signal viral est contrôlé par l'augmentation de la fluorescence associée à la consommation de cette sonde. La quantification est réalisée en mesurant le nombre de cycles (seuil de cycle ou Ct) requis pour la détection de la fluorescence de la sonde consommée par rapport à une valeur de base «seuil», qui est comparée à une courbe standard de quantités d'entrées connues. Une valeur «seuil» cohérente doit être utilisée pour tous les échantillons et la fonction «auto-seuil» de l'instrument RT-qPCR doit être désactivée. Le seuil est propre à l'instrument RT-qPCR et les amorces/sondes choisies pour l'analyse doivent être optimisées pour réduire le bruit entre les répliquats.



Les séquences des amorces, des sondes et des contrôles du SRAS-CoV-2, ainsi que les séquences nécessaires à la quantification ci-dessus, sont indiquées aux points (3–6). Il existe plusieurs séries d'amorces et de sondes utilisées pour détecter le SRAS-CoV-2 dans les eaux usées et il n'y a pas de consensus sur les meilleures cibles moléculaires. En effet, des chercheurs ont rapporté des rendements contradictoires pour les mêmes combinaisons amorce/sonde. L'Agence/le LNM a évalué les cibles E_Sarbeco (10) et US-CDC N1/N2 et a estimé que N1/N2 était la cible la plus sensible et la plus cohérente. Le LNM recommande d'utiliser deux cibles pour réduire le risque de mutation.

Contrôles

La nature complexe et variable des eaux usées exige que trois contrôles soient effectués parallèlement à la détection moléculaire du SRAS-CoV-2 afin de tenir compte des variations dans la composition des eaux usées et d'évaluer l'efficacité globale du processus.

Contrôle des processus

Pour tenir compte de l'efficacité variable de l'extraction de l'ARN à partir des eaux usées, un contrôle par dopage du matériel viral entier est ajouté aux eaux usées avant la concentration, comme décrit dans l'article principal (figure 3). Une concentration/extraction parallèle est effectuée dans la solution saline dans un tampon phosphate (PBS) et l'efficacité globale de la concentration et de l'extraction est déduite en comparant la récupération relative. Le contrôle du processus ou le substitut est idéalement un coronavirus du même genre que le SRAS-CoV-2 et donc physiquement structuré de la même manière que le SRAS-CoV-2 afin de rendre compte au mieux de sa récupération. Les contrôles de processus courants sont le virus de l'hépatite murine (virus de l'hépatite murine A59, MHV-A59), le coronavirus bovin ou l'un des coronavirus humains saisonniers. L'Agence/le LNM ajoute actuellement le MHV-A59 comme contrôle de processus dans ses essais. L'Agence/le LNM a constaté que le MHV-A59 cultivé ne se répartit pas de manière appréciable dans la phase solide des eaux usées et qu'il ne reflète donc pas l'état naturel du virus (comme indiqué ci-dessus). Une absence similaire de partitionnement de la phase solide a été observée dans le cas du SRAS-CoV-2 produit en culture cellulaire. Par conséquent, l'utilité des substituts est probablement plus adaptée aux méthodes qui traitent uniquement la fraction liquide des eaux usées.

Contrôle fécal

La charge fécale des eaux usées peut varier d'un système de collecte des eaux usées à l'autre. Les eaux de surface, les eaux souterraines et les différents apports industriels et institutionnels peuvent diluer les eaux usées et introduire une variance dans le signal du SRAS-CoV-2. Un test propre à la charge fécale est appliqué pour tenir compte de la composition variable des eaux usées. L'Agence/le LNM dirige actuellement une réaction RT-qPCR

contre le virus de la marbrure douce du poivron (PMMoV), un virus naturel que l'on trouve en abondance dans les poivrons comestibles et qui rend compte de la charge fécale (11). D'autres indicateurs fécaux intéressants sont HF183 et crAssphage (12,13).

Contrôle de l'inhibition

Les eaux usées contiennent des contaminants connus pour inhiber les tests PCR. Pour détecter la présence d'inhibiteurs, de l'ARN purifié provenant d'une source qui n'est pas présente dans les eaux usées est ajouté aux extraits d'ARN des eaux usées ou aux concentrés d'eaux usées. L'intensité du signal de cette réaction est comparée à celle du matériau indicateur d'inhibition testé seul. L'étude interlaboratoire de la Water Research Foundation suggère qu'un décalage de ≥ 1 Ct indique l'absence d'inhibition de la PCR (8). Une autre approche possible lorsqu'on ne dispose pas d'ARN purifié consiste à diluer une réaction RT-qPCR d'eaux usées et à comparer la valeur Ct obtenue à la valeur attendue (14). Lorsque l'inhibition se situe en dehors d'un Ct de la fourchette attendue, il est suggéré de diluer les eaux usées avant l'extraction et/ou de marquer les résultats avant de les communiquer.

Contrôles négatifs

La bonne pratique pour les expériences basées sur la RT-qPCR consiste à effectuer une réaction de RT-qPCR sans ajouter de matrice. Tout signal observé dans ce contrôle indiquerait la présence de contaminants dans les réactifs RT-qPCR. Des concentrations/extractions fictives utilisant un tampon ou de l'eau seule doivent être effectuées périodiquement afin d'identifier le matériel de laboratoire ou les réactifs contaminés.

Techniques de normalisation

Après quantification, le signal SRAS-CoV-2 et les contrôles associés sont exprimés en copies par volume d'eau usée traitée (e.g. cp/mL). Des ajustements doivent être effectués pour tenir compte des pertes d'eaux usées dues à la concentration (e.g. volume mort non récupérable dans les dispositifs de filtration centrifuge) et/ou de la dilution des échantillons avant l'extraction (e.g. pour atténuer l'inhibition si elle est observée). Le volume mort peut être estimé en déterminant la différence de poids du dispositif de filtration centrifuge avant l'application de l'échantillon et après la récupération de l'échantillon, en supposant une densité de 1 g/mL.

Les cibles virales quantifiées sont normalisées par rapport à l'indicateur fécal quantifié et cette valeur ainsi que les données non normalisées doivent être considérées comme minimales pour la déclaration dans l'équation 1.

**Équation 1 :**

$$\frac{\text{Cibles virales } \left(\frac{\text{copies}}{\text{mL}}\right)}{\text{Indicateur fécal } \left(\frac{\text{copies}}{\text{mL}}\right)} = \text{Normalisées fecal (copies/mL)}$$

D'autres ajustements de la valeur rapportée peuvent être effectués en incorporant le rendement du contrôle du processus au rendement global. Tout d'abord, le rendement global est calculé dans l'équation 2.

Équation 2 :

$$\frac{\text{Copies récupérées de contrôle du processus}}{\text{Copies du contrôle du processus dans}} = \text{Contrôle du processus de rendement}$$

Pour ajuster la récupération du processus de rendement, appliquer la formule suivante pour calculer la charge virale ajustée au rendement dans l'équation 3.

Équation 3 :

$$\frac{1}{\text{Contrôle du processus de rendement}} * \text{Normalisées fecal } \left(\frac{\text{copies}}{\text{mL}}\right) = \text{La charge virale ajustée au rendement}$$

Comme décrit ci-dessus, le contrôle du processus peut ne pas rendre compte avec précision du rendement global du SRAS-CoV-2, en particulier lorsque la fraction solide est la cible principale de l'extraction. Dans la mesure du possible, la normalisation basée sur le débit est la méthode préférée pour tenir compte des effets de dilution, qui peuvent contribuer de manière importante à la perte de signal — en particulier lors d'événements pluvieux.

Références

- Baird R, Bridgewater L. Standard methods for the examination of water and wastewater. 23rd ed. Washington, D.C.: American Public Health Association; 2017.
- Ye Y, Ellenberg RM, Graham KE, Wigginton KR. Survivability, partitioning, and recovery of enveloped viruses in untreated municipal wastewater. *Environ Sci Technol* 2016;50(10): 5077–85. [DOI PubMed](#)
- Kitamura K, Sadamasu K, Muramatsu M, Yoshida H. Efficient detection of SARS-CoV-2 RNA in the solid fraction of wastewater. *Sci Total Environ* 2021;763:144587. [DOI PubMed](#)
- Westhaus S, Weber FA, Schiwy S, Linnemann V, Brinkmann M, Widera M, Greve C, Janke A, Hollert H, Wintgens T, Ciesek S. Detection of SARS-CoV-2 in raw and treated wastewater in Germany - Suitability for COVID-19 surveillance and potential transmission risks. *Sci Total Environ* 2021;751:141750. [DOI PubMed](#)
- Hokajärvi AM, Rytönen A, Tiwari A, Kauppinen A, Oikarinen S, Lehto KM, Kankaanpää A, Gunnar T, Al-Hello H, Blomqvist S, Miettinen IT, Savolainen-Kopra C, Pitkänen T. The detection and stability of the SARS-CoV-2 RNA biomarkers in wastewater influent in Helsinki, Finland. *Sci Total Environ* 2021;770:145274. [DOI PubMed](#)
- Graham KE, Loeb SK, Wolfe MK, Catoe D, Sinnott-Armstrong N, Kim S, Yamahara KM, Sassoubre LM, Mendoza Grijalva LM, Roldan-Hernandez L, Langenfeld K, Wigginton KR, Boehm AB. SARS-CoV-2 RNA in Wastewater Settled Solids Is Associated with COVID-19 Cases in a Large Urban Sewershed. *Environ Sci Technol* 2021;55(1):488–98. [DOI PubMed](#)
- Chik AH, Glier MB, Servos M, Mangat CS, Pang XL, Qiu Y, D'Aoust PM, Burnet JB, Delatolla R, Dorner S, Geng Q, Giesy JP Jr, McKay RM, Mulvey MR, Prystajecy N, Srikanthan N, Xie Y, Conant B, Hrudey SE; Canadian SARS-CoV-2 Inter-Laboratory Consortium. Comparison of approaches to quantify SARS-CoV-2 in wastewater using RT-qPCR: results and implications from a collaborative inter-laboratory study in Canada. *J Environ Sci (China)* 2021;107:218–29. [DOI PubMed](#)
- Pecson BM, Darby E, Haas CN, Amha YM, Bartolo M, Danielson R, Dearborn Y, Di Giovanni G, Ferguson C, Fevig S, Gaddis E, Gray D, Lukasik G, Mull B, Olivas L, Olivieri A, Qu Y; SARS-CoV-2 Interlaboratory Consortium. Reproducibility and sensitivity of 36 methods to quantify the SARS-CoV-2 genetic signal in raw wastewater: findings from an interlaboratory methods evaluation in the U.S. *Environ Sci (Camb)* 2021;7:504–20. [DOI PubMed](#)
- Ahmed W, Bertsch PM, Bivins A, Bibby K, Farkas K, Gathercole A, Haramoto E, Gyawali P, Korajkic A, McMinn BR, Mueller JF, Simpson SL, Smith WJ, Symonds EM, Thomas KV, Verhagen R, Kitajima M. Comparison of virus concentration methods for the RT-qPCR-based recovery of murine hepatitis virus, a surrogate for SARS-CoV-2 from untreated wastewater. *Sci Total Environ* 2020;739:139960. [DOI PubMed](#)



10. Corman VM, Landt O, Kaiser M, Molenkamp R, Meijer A, Chu DK, Bleicker T, Brünink S, Schneider J, Schmidt ML, Mulders DG, Haagmans BL, van der Veer B, van den Brink S, Wijsman L, Goderski G, Romette JL, Ellis J, Zambon M, Peiris M, Goossens H, Reusken C, Koopmans MP, Drosten C. Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR. *Euro Surveill* 2020;25(3):2000045. [DOI PubMed](#)
11. Haramoto E, Kitajima M, Kishida N, Konno Y, Katayama H, Asami M, Akiba M. Occurrence of pepper mild mottle virus in drinking water sources in Japan. *Appl Environ Microbiol* 2013;79(23):7413–8. [DOI PubMed](#)
12. Stachler E, Kelty C, Sivaganesan M, Li X, Bibby K, Shanks OC. Quantitative CrAssphage PCR Assays for Human Fecal Pollution Measurement. *Environ Sci Technol* 2017;51(16):9146–54. [DOI PubMed](#)
13. Green HC, Haugland RA, Varma M, Millen HT, Borchardt MA, Field KG, Walters WA, Knight R, Sivaganesan M, Kelty CA, Shanks OC. Improved HF183 quantitative real-time PCR assay for characterization of human fecal pollution in ambient surface water samples. *Appl Environ Microbiol* 2014;80(10):3086–94. [DOI PubMed](#)
14. King C, Debryne R, Kuch M, Schwarz C, Poinar H. A quantitative approach to detect and overcome PCR inhibition in ancient DNA extracts. *Biotechniques* 2009;47(5):941–9. [DOI PubMed](#)