

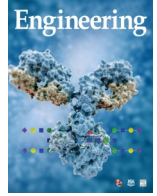


ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

Engineering

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/eng](http://www.elsevier.com/locate/eng)



Research  
Coronavirus Disease 2019—Article

## 城市社区污水排水系统中新型冠状病毒的分布和削减

董骞<sup>a,#</sup>, 蔡俊雄<sup>b,#</sup>, 刘艳臣<sup>a,\*</sup>, 凌海波<sup>b</sup>, 王琪<sup>b</sup>, 向罗京<sup>b</sup>, 杨少林<sup>a</sup>, 鲁正胜<sup>a</sup>, 刘毅<sup>a</sup>, 黄霞<sup>a,\*</sup>, 曲久辉<sup>a,c</sup>

<sup>a</sup> State Key Joint Laboratory of Environment Simulation and Pollution Control, School of Environment, Tsinghua University, Beijing 100084, China

<sup>b</sup> Hubei Provincial Academy of Eco-Environmental Sciences, Wuhan 430072, China

<sup>c</sup> Key Laboratory of Drinking Water Science and Technology, Research Center for Eco-Environmental Sciences, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100085, China

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 2 August 2021

Revised 24 February 2022

Accepted 15 March 2022

Available online 20 April 2022

#### 关键词

SARS-CoV-2

传输风险

排水系统

污水

城市社区

### 摘要

新型冠状病毒肺炎 (COVID-19) 在 200 多个国家迅速传播, 对人类健康构成重大威胁。引起 COVID-19 的新型冠状病毒可随粪便排入排水系统。然而, 人们对 SARS-CoV-2 在社区下水道中的分布、存留和传播仍缺乏全面的了解。本研究在疫情暴发期间, 调查了我国武汉某社区的通风立管、化粪池和主要下水道出口的病毒核酸分布情况。结果表明, 在确诊患者住院后, SARS-CoV-2 通过建筑物的通风立管向环境中长期排放的风险较低。相较于气溶胶, SARS-CoV-2 主要在液相样品中检出, 并且在确诊患者住院 4 天后才能在化粪池污水中检测到病毒核糖核酸 (RNA)。病毒浓度在排入下水道后可被稀释 10 倍以上 [根据大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 测试结果], 污水中 SARS-CoV-2 的检出可能指示了社区存在潜在无症状患者。对社区污水排水系统中 SARS-CoV-2 的全面调查, 有助于了解其通过粪便排入污水后的分布和传播特征, 以及污水监测对 COVID-19 大流行监测的可行性。

© 2022 THE AUTHORS. Published by Elsevier LTD on behalf of Chinese Academy of Engineering and Higher Education Press Limited Company. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

## 1. 引言

新型冠状病毒肺炎 (COVID-19) 的暴发是由新型冠状病毒 (SARS-CoV-2) [1–2] 引起的。COVID-19 已迅速蔓延到全球 202 个国家。截至 2021 年 10 月 5 日, 全球确诊病例已达 236 599 025 人, 死亡病例为 4 831 486 人, 而且这一数字仍在迅速增长。有证据表明 SARS-CoV-2 可在人与人之间传播 [3–6]。除了直接接触和呼吸途径外 [2,7], 粪便传播可能是另一种途径, 患者粪便中 SARS-CoV-2 的产生和存活支持了这一发现 [8–11]。即使感染患者的呼吸

道症状已得到缓解, 其粪便中仍可以持续排出病毒 [12]。虽然在实验室对不同基质中 SARS-CoV-2 或 SARS-CoV-2 核糖核酸 (RNA) 的削减和持续性开展研究 [13–15], 但对于具有零星确诊病例的社区, 实际污水系统中病毒的赋存却很少被研究。虽然该病毒可以在人类粪便和尿液中被检测到, 但对 SARS-CoV-2 在排水系统中的持久性和传播情况尚不清楚。通过生物气溶胶感染 SARS-CoV-2 对人类健康构成潜在威胁。因此, 有必要对 SARS-CoV-2 在排水系统中的衰减、传播和潜在传染性开展研究。

建筑物的污水管道系统是 SARS-CoV-2 等病原微生物的聚集地, 可能是病毒在住宅楼内传播的潜在来源。在医

\* Corresponding authors.

E-mail addresses: liuyc@mail.tsinghua.edu.cn (Y.-C. Liu), xhuang@mail.tsinghua.edu.cn (X. Huang).

# These authors contributed equally to this work.

院和住宅建筑等室内环境中,管道系统消毒不彻底和管道缺陷可能会增加病毒飞沫感染人的机会。在2003年严重急性呼吸综合征(SARS)暴发期间,中国香港一处建筑内发生的一起超级传播事件(共有342名确诊病例)引发了人们的关注[16]。建筑内的通风立管可能是潜在的传播途径[17]。在COVID-19期间,一些研究提出,排水系统可能是导致SARS-CoV-2感染和全球传播的一个来源[18-19]。因此,应该同时考虑病毒的持久性和它们在环境中的传染性。SARS-CoV-2在管道系统中的检出和存留特征对于研究其在建筑中的潜在传播和传染性具有重要意义。

社区排水系统位于下水道的末端, SARS-CoV-2可能会在污水中持续存在相对较长的时间。如果病毒能在社区的化粪池中存活,下游排水系统就有被污染的风险。温度和基质类型都会影响未经处理的污水中病毒的微生物降解和持久性。Ahmed等[15]观察到,温度对废水中SARS-CoV-2 RNA的一级衰减率影响很大,而SARS-CoV-2 RNA在自来水中的持续时间(9.40~58.60天)比在未经处理的废水(8.04~27.80天)和处理后的废水(5.71~43.20天)中的持续时间更长。然而,最近的一项研究显示,未经处理的废水和自来水中的SARS-CoV-2在室温下1.5~1.7天将失去活性[14]。SARS-CoV-2 RNA的检出时间比SARS-CoV-2的存活时间更久[13-14]。在确诊病例排出SARS-CoV-2后,社区污水系统中仍存在传播风险。由于实验室内的试验可能会改变微生物群落,从而影响废水中病毒的衰减,因此,现场的调查和试验将提供更多更全面的信息。

下水道是一个半封闭的系统,研究人员已经证明,污水中含有微生物的气溶胶(这些微生物给人类健康带来高风险,包括病原体、真菌和病毒)可以从该系统中逃逸[20-23]。致病性传播可能通过吸入来自污水管道的小飞沫而发生。这些病原微生物可通过吸入、直接接触和口服等方式感染污水处理系统的操作者和居住在排水系统附近的居民。因此,有必要调查SARS-CoV-2在化粪池以及确诊病例所在社区相关排水系统中的分布和持久性。

对中国武汉地区COVID-19早期某社区污水排水系统中SARS-CoV-2的分布、存留和潜在传播情况进行了全面调查,评估了确诊患者住院后SARS-CoV-2通过污水排水系统的传播风险。本研究为进一步了解粪便排泄后污水中SARS-CoV-2的分布特征,以及通过污水监测进行COVID-19大流行监测的可行性提供了有价值的现场数据。

## 2. 材料和方法

### 2.1. 样品采集

选择武汉当地已确诊患者所在社区的污水管道系统作为研究对象。本研究共选择5个社区(FG、WD、CF、FD和DZ),其中1~3例确诊患者已登记并住院。从建筑物的化粪池中收集气溶胶、污水和沉积物样本,以及从确诊病例住宅建筑的通风立管中收集气溶胶样本。此外,还采集了社区主要排水出口的污水、沉积物和气溶胶样品。所有污水、沉积物和气溶胶样本的采样时间均在患者住院后的第4~52天期间。

气溶胶样品的采集采用气溶胶采集装置(WA-15,北京丁兰科技有限公司),流速为 $14.0 \text{ L} \cdot \text{min}^{-1}$ ,持续30 min。这个采样器可以将气溶胶颗粒直接富集至液体中。分别于2020年2月26日、3月1日和3月10日从确诊患者所居住建筑的化粪池中收集污水样本。使用分层有机玻璃取样器采集化粪池样品,并分别标记为顶层(0~50 cm)和底层(50~100 cm)。采集的所有样品在 $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 下保存,并立即转移到实验室进行RNA提取。

### 2.2. 细菌学分析

采用平板计数法对大肠杆菌(*E.coli*)(粪便指示剂)进行细菌学检测。将收集到的污水浓缩后,弃去上清液。然后,用生理盐水对样品进行连续10倍稀释。分别取1 mL稀释得到的系列样品并转移到9支含Durham发酵管和双强度MacConkey肉汤的试管中。轻轻摇动试管,在 $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 下孵育24~48 h,直到产气和乳糖发酵显示阳性反应。最后,用最大或然数(MPN)法估算大肠杆菌的浓度,并以 $\text{CFU} \cdot \text{mL}^{-1}$ 计。

### 2.3. RNA提取及RT-PCR分析

取500 mL污水样品和2~3 mL气溶胶样品,3000g下离心0.5 h,将悬浮液转移到灭菌后的试剂瓶中。然后,加入氯化钠和聚乙二醇(PEG)-6000,调整最终浓度分别为 $0.3 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 和10% [24],沉淀过夜,10 000g离心0.5 h。离心后收集沉淀物以备RNA提取。将化粪池样品以10 000g离心0.5 h,收集沉淀物以备RNA提取。根据制造商的说明,使用EZ1病毒提取试剂盒(Qiagen,德国)提取样品总RNA。

参考《新型冠状病毒肺炎防控方案(第五版)》(中国疾病预防控制中心),采用逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)同时检测编码核衣壳蛋白(CCDC-N)和开放阅读框lab(CCDC-ORF1)的两个靶基因[25]。这两对引物和

探针的序列如表1所示。所有 RT-PCR 扩增使用 AgPath-ID™ One-Step RT-PCR 试剂盒 (Life Technologies, 美国), 在 25  $\mu$ L 反应系统中进行。所有 RT-PCR 混合物均包含 12.5  $\mu$ L 2 $\times$  RT-PCR 缓冲液、1  $\mu$ L 正向和反向 PCR 引物、1  $\mu$ L TaqMan 探针、1  $\mu$ L 25 $\times$  RT-PCR 酶混合物、4  $\mu$ L 无核酸酶水、4.5  $\mu$ L RNA 模板。PCR 扩增方法见表1。

采用 Light Cycler 480 实时 PCR 平台 (Roche, 美国) 进行 RT-PCR 扩增, 每个样品重复测定三次。每次扩增分别设置三次阴性和阳性对照, 以验证结果。根据循环阈值 (Ct)  $\leq 37$ 、 $\geq 40$  和 37~40 将样本判断为阳性、阴性和疑似样本。

### 3. 结果

#### 3.1. 污水管道系统传播导致 SARS-CoV-2 的交叉传播

SARS-CoV-2 通过气溶胶传播的事实已得到证明, 粪-口途径正在成为社区传播的一个重要途径。为了评估确诊病例所居住建筑物内气溶胶的传播风险, 选择了5个有确诊病例的典型社区, 从排水系统的通风立管中检测气溶胶中的 SARS-CoV-2 核酸。具体来说, 在确诊患者住院后的第4、30、32、42 和 52 天, 在建筑物的通风竖管中检测到 SARS-CoV-2 核酸。采用 *CCDC-ORF1* 和 *CCDC-N* 引物对所有样品进行检测, 结果均具有良好的一致性。在确诊患者离开住所后的4天内, 从通风立管中收集的气溶胶样本中未检测到 SARS-CoV-2 核酸阳性 (表2)。结果显示病毒核酸在通风立管中存留或排出时间不超过4天。在确诊患

者康复后并从医院返回住所的第4、19 和 31 天从通风立管中采集了样本, 样本的所有核酸检测结果均显示阴性。

#### 3.2. SARS-CoV-2 在社区排水系统化粪池中的归趋

对确诊患者住宅建筑的化粪池中的 SARS-CoV-2 进行了调查。在确诊患者住院后的第4~52 天, 从化粪池中采集污水、沉积物和气溶胶样本。RT-PCR 检测结果见表3。化粪池中的气溶胶和沉积物样品均为阴性。在确诊患者住院后的第4天, 在从 FG 社区化粪池收集的一个污水样本中检测出 SARS-CoV-2 (基于 *CCDC-ORF1* 检测), 其 Ct 值为  $34.41 \pm 0.45$ , 而基于 *CCDC-N* 检测未能在该样本中检出 SARS-CoV-2。这表明, 在确诊患者离开住宅建筑4天后, 化粪池的污水中可检出 SARS-CoV-2 RNA。确诊患者住院23天后, 各样品 SARS-CoV-2 RNA 检测均为阴性。由于现场条件限制, 在第4天至第23天之间没有采集到有效样品。

#### 3.3. 社区排水系统出口 SARS-CoV-2 的监测

如表4所示, 患者住院后第4天, 虽然该患者住宅建筑的污水中 SARS-CoV-2 RNA 检测呈阳性, 但在社区排水系统出口未检测到核酸阳性。此外, 沉积物和气溶胶的核酸检测结果均显示阴性或未检出。在 WD 小区, 所有确诊病例住院23天后, 其住宅建筑的化粪池中未发现阳性样本。然而, 在确诊患者住院后第23天 (*CCDC-ORF1* 和 *CCDC-N*) 和住院后第30天 (*CCDC-ORF1*), 社区排水系统出口样品的核酸检测呈阳性。在 CF 小区, 患者住院后第31天在社区排水系统出口检出 SARS-CoV-2 RNA

表1 本研究中使用的引物和探针

Target gene	Sequence (5'-3')	Cycling parameters
<i>CCDC-N</i>	Forwards primer: GGGAACTTCTCCTGCTAGAAT Reverse primer: CAGACATTTTGCTCTCAAGCTG Probe: FAM-TTGCTGCTGCTTGACAGATT-TAMRA	45 °C for 10 min, 95 °C for 3 min, 45 cycles of 95 °C for 15 s, and 60 °C for 45 s
<i>CCDC-ORF1</i>	Forwards primer: CCCTGTGGGTTTACACTAA Reverse primer: ACGATTGTGCATCAGCTGA Probe: FAM-CCGTCTGCGGTATGTGAAAGGTTATGG-BHQ1	

FAM: carboxyfluorescein.

表2 在建筑物通风口检测的 SARS-CoV-2 情况(2020年)

Sampling location	Sampling date	Admission date / discharge date	Number of confirmed patients	Days after the confirmed patients left	Ct values	
					<i>CCDC-ORF1</i>	<i>CCDC-N</i>
FG	March 20	March 16/April 5	1	4	Negative	Negative
WD	March 4	February 2/February 28	2	30	Negative	Negative
CF	March 4	February 1/March 25	3	31	Negative	Negative
FD	March 20	February 6/March 1, April 7	2	42	Negative	Negative
DZ	March 25	February 1/February 22, April 1	3	52	Negative	Negative





表5 社区排水系统内大肠杆菌的凋亡(2020年)

Sampling location	Sampling date	Septic tanks/nearest manhole (CFU·mL <sup>-1</sup> )	Main outlet of community (CFU·mL <sup>-1</sup> )	Attenuation of <i>E.coli</i> (%)
CF	March 4	$1.7 \times 10^8/1.7 \times 10^8$	$1.7 \times 10^7$	90
FD	March 20	$3.5 \times 10^8$	$7.9 \times 10^7$	77
FG	March 20	$3.5 \times 10^9$	$1.1 \times 10^8$	97
DZ	March 25	$2.2 \times 10^9$	$3.3 \times 10^8$	85

显差异[24]。本研究中 SARS-CoV-2 两个靶向片段的扩增结果不完全一致,这可能是由两对引物在扩增过程中的敏感性差异所致。最近的一项研究证明,在病毒浓度较低的情况下[37], *CCDC-ORF1* 引物的敏感性高于 *CCDC-N* 引物,这可能导致 *CCDC-N* 引物扩增失败。因此,需要对 SARS-CoV-2 多靶点片段进行验证,以提高 RT-PCR 检测水平。

#### 4.2. SARS-CoV-2 在社区排水系统中的潜在交叉传播风险

SARS-CoV-2 交叉传播风险受到许多因素的影响,如感染患者的数量、建筑物排水系统构造和病毒载量等[38]。所选定建筑物通风立管出口的 SARS-CoV-2 RNA 检测结果为阴性,表明当确诊病例住院后病毒从建筑物通风立管排放的风险很低。这是因为在选定的仅发现少数确诊病例( $\leq 3$ )且为老式通风立管的建筑物中,病毒载量较低。此外,较高的空气流动性也加速了确诊患者住院后通风立管中核酸残留物的去除。本研究中通风立管出口阳性检出率较低,说明确诊病例住院后经通风立管向环境中持续排放的 SARS-CoV-2 载量较低。然而,前期的一些研究报道发现,在 SARS 流行期间病毒可以通过建筑物内的通风系统发生传播,如 2003 年在香港和 2020 年在广东发生的事件[16,39]。因此,仍有必要在疫情早期加强防控工作,以消除潜在的传播风险,特别是对带有老式通风立管的建筑物。当新冠疫情大流行时,建筑物内的气溶胶传播仍然是一个值得关注的问题[40]。及时隔离已确诊感染的患者并保持建筑物通风系统的完整,对于防止病毒在建筑物内发生广泛传播是非常必要的。

患者住院后第 4 天至第 52 天,化粪池中所有沉积物或气溶胶样品中 SARS-CoV-2 RNA 检出均为阴性,只有少数污水样本检出阳性。然而,有研究发现,包膜病毒在污水的悬浮物中占据较高的比例[29]。最近的一项研究也发现, SARS-CoV-2 在污水厂初沉池悬浮颗粒物上赋存的比例较高,并具有较高的检测灵敏性[41]。另一项研究表明,90% 的 SARS-CoV-2 RNA 可能存在于污水的液相中,而非悬浮颗粒物中[42]。这一发现与小鼠肝炎病毒(MHV)的相关研究相似,其中大约 70% 的包膜病毒存在于污水液相中[43]。本研究结果可能是由于在污水输送过

程中,吸附在悬浮物上的病毒核酸被释放并进入污水液相。对于不同污水相间病毒分布的研究可为社区排水系统中 SARS-CoV-2 的潜在传播风险评估提供参考。

#### 4.3. 污水中 SARS-CoV-2 监测的意义

本研究在 COVID-19 大流行早期,针对已发现确诊病例社区中污水处理系统内病毒传播风险开展了一系列研究,为 SARS-CoV-2 污水监测提供了最早期的研究经验。在确诊病例住院 31 天后且没有其他确诊病例登记的情况下,社区排水系统出口检测的 SARS-CoV-2 仍呈阳性[44]。SARS-CoV-2 RNA 在确诊病例康复后仍可随粪便排出几天到三个月不等[45–47]。然而,污水中阳性检测的时间都早于确诊病例出院的时间,因此排除了确诊患者康复后 SARS-CoV-2 RNA 排出的可能性。结果显示,在研究期间,社区中可能存在潜在的无症状患者。最近的一项研究还表明, COVID-19 病例数量的下降可能先于 SARS-CoV-2 RNA 检出量的下降[42]。因此,可以采用污水监测作为预测和评估 COVID-19 大流行的有效工具,这对追踪 SARS-CoV-2 的来源非常有意义。此外,污水采样位置也是污水监测的一个重要因素。根据大肠杆菌的检测结果,病毒的浓度从建筑物的化粪池到社区排水系统出口可能会衰减或被稀释一个数量级,因此,污水采样需要锁定可疑传播区域、快速采样并进行深度筛选。

## 5. 结论

本研究对 COVID-19 早期大流行期间,社区污水排水系统中 SARS-CoV-2 的存留和潜在传播情况进行了全面调查。数据表明,对于具有完整通风结构的新型建筑,确诊患者离开建筑物(少于 4 天)后,病毒传播风险可以被很快消除。确诊患者住院 23 天后,化粪池内 SARS-CoV-2 核酸的检测结果均为阴性。社区排水系统内, SARS-CoV-2 RNA 在污水中比在的沉积物或气溶胶中更容易被检测到。根据大肠杆菌检测结果,从建筑物化粪池到社区排水系统的出口,病毒浓度可以衰减或被稀释降低一个数量级左右。该研究提供了 SARS-CoV-2 污水监测的最早期经验,污水监测可作为预测和评估潜在 COVID-19 大流行的有效

工具，这对于从社区层面追溯 SARS-CoV-2 来源具有重要意义。

## Acknowledgements

This research was funded by the projects of the Major Program of National Natural Science Foundation of China (52091543), Tsinghua University Spring Breeze Fund (20213080026), and the Chinese Academy of Engineering (2020-ZD-15).

## Compliance with ethical guidelines

Qian Dong, Jun-Xiong Cai, Yan-Chen Liu, Hai-Bo Ling, Qi Wang, Luo-Jing Xiang, Shao-Lin Yang, Zheng-Sheng Lu, Yi Liu, Xia Huang, and Jiu-Hui Qu declare that they have no conflict of interest or financial conflicts to disclose.

## References

- [1] Ralph R, Lew J, Zeng T, Francis M, Xue B, Roux M, et al. 2019-nCoV, a novel coronavirus: human-to-human transmission, travel-related cases, and vaccine readiness. *J Infect Dev Ctries* 2020;14(01):3–17.
- [2] Suthar TR, Gaikwad ST, Suthar AD. Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) and coronavirus disease-2019 (COVID-19): a review. *Int J Curr Microbiol Appl Sci* 2020;9(4):3201–8.
- [3] Chan JW, Yuan S, Kok KH, To KW, Chu H, Yang J, et al. A familial cluster of pneumonia associated with the 2019 novel coronavirus indicating person-to-person transmission: a study of a family cluster. *Lancet* 2020;395(10223):514–23.
- [4] Poon LLM, Peiris M. Emergence of a novel human coronavirus threatening human health. *Nat Med* 2020;26(3):317–9.
- [5] Chang D, Lin M, Wei L, Xie L, Zhu G, Dela Cruz CS, et al. Epidemiologic and clinical characteristics of novel coronavirus infections involving 13 patients outside Wuhan, China. *JAMA* 2020;323(11):1092.
- [6] Li Q, Guan X, Wu P, Wang X, Zhou L, Tong Y, et al. Early transmission dynamics in Wuhan, China, of novel coronavirus-infected pneumonia. *N Engl J Med* 2020;382(13):1199–207.
- [7] Carlos WG, Dela Cruz CS, Cao B, Pansnick S, Jamil S. Novel coronavirus (2019-nCoV). *Am J Respir Crit Care Med* 2020;201(4):P7–8.
- [8] Holshue ML, DeBolt C, Lindquist S, Lofy KH, Wiesman J, Bruce H, et al. First case of 2019 novel coronavirus in the United States. *N Engl J Med* 2020;382(10):929–36.
- [9] Tian Y, Rong L, Nian W, He Y. Review article: gastrointestinal features in COVID-19 and the possibility of faecal transmission. *Aliment Pharmacol Ther* 2020;51(9):843–51.
- [10] Xing Y, Ni W, Wu Q, Li W, Li G, Tong J, et al. Prolonged presence of SARS-CoV-2 in feces of pediatric patients during the convalescent phase. 2020 medRxiv.2020.03.11.20033159.
- [11] Ling Y, Xu SB, Lin YX, Tian D, Zhu ZQ, Dai FH, et al. Persistence and clearance of viral RNA in 2019 novel coronavirus disease rehabilitation patients. *Chin Med J* 2020;133(9):1039–43.
- [12] 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.
- [13] Baldovin T, Amoruso I, Fonzo M, Buja A, Baldo V, Cocchio S, et al. SARS-CoV-2 RNA detection and persistence in wastewater samples: an experimental network for COVID-19 environmental surveillance in Padua, Veneto Region (NE Italy). *Sci Total Environ* 2021;760:143329.
- [14] Bivins A, Greaves J, Fischer R, Yinda KC, Ahmed W, Kitajima M, et al. Persistence of SARS-CoV-2 in water and wastewater. *Environ Sci Technol Lett* 2020;7(12):937–42.
- [15] Ahmed W, Bertsch PM, Bibby K, Haramoto E, Hewitt J, Huygens F, et al. Decay of SARS-CoV-2 and surrogate murine hepatitis virus RNA in untreated wastewater to inform application in wastewater-based epidemiology. *Environ Res* 2020;191:110092.
- [16] Peiris JSM, Chu CM, Cheng VCC, Chan KS, Hung IFN, Poon LLM, et al. Clinical progression and viral load in a community outbreak of coronavirus-associated SARS pneumonia: a prospective study. *Lancet* 2003;361(9371):1767–72.
- [17] Bartram J, Hunter P. Bradley classification of disease transmission routes for water-related hazards. In: Bartram J, Hunter P. *Routledge handbook of water and health*. London: Taylor & Francis Group; 2015. p. 20–37.
- [18] 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* 2020;323(18):1843–4.
- [19] Chen L, Lou J, Bai Y, Wang M. COVID-19 disease with positive fecal and negative pharyngeal and sputum viral tests. *Am J Gastroenterol* 2020;115(5):790.
- [20] Han Y, Yang T, Yan Xu, Li L, Liu J. Effect of aeration mode on aerosol characteristics from the same wastewater treatment plant. *Water Res* 2020;170:115324.
- [21] Carducci A, Tozzi E, Rubulotta E, Casini B, Cantiani L, Rovini E, et al. Assessing airborne biological hazard from urban wastewater treatment. *Water Res* 2000;34(4):1173–8.
- [22] Haas CN, Rycroft T, Bibby K, Casson L. Risks from ebolavirus discharge from hospitals to sewer workers. *Water Environ Res* 2017;89(4):357–68.
- [23] Qu G, Li X, Hu L, Jiang G. An imperative need for research on the role of environmental factors in transmission of novel coronavirus (COVID-19). *Environ Sci Technol* 2020;54(7):3730–2.
- [24] Zhang D, Ling H, Huang X, Li J, Li W, Yi C, et al. Potential spreading risks and disinfection challenges of medical wastewater by the presence of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) viral RNA in septic tanks of Fangcang Hospital. *Sci Total Environ* 2020;741:140445.
- [25] National Institute for Viral Disease Control and Prevention. Specific primers and probes for detection of 2019 novel coronavirus 2020 [Internet]. Beijing: National Institute for Viral Disease Control and Prevention, China CDC; 2020 Jan 21 [cited 2021 Jul 30]. Available from: [http://ivdc.chinacdc.cn/kyjz/202001/t20200121\\_211337.html](http://ivdc.chinacdc.cn/kyjz/202001/t20200121_211337.html).
- [26] Zeki S, Aslan A, Burak S, Rose JB. Occurrence of a human-associated microbial source tracking marker and its relationship with faecal indicator bacteria in an urban estuary. *Lett Appl Microbiol* 2021;72(2):167–77.
- [27] Pitt R; Center for Watershed Protection. Illicit discharge detection and elimination, a guidance manual for program development and technical assessments. Washington, DC: United States Environmental Protection Agency Place; 2004.
- [28] Czajkowska D, Boszczyk-Maleszak H, Sikorska IR, Sochaj A. Studies on the survival of enterohemorrhagic and environmental *Escherichia coli* strains in wastewater and in activated sludges from dairy sewage treatment plants. *Pol J Microbiol* 2008;57(2):165–71.
- [29] Chakraborty P, Pasupuleti M, Jai Shankar MR, Bharat GK, Krishnasamy S, Dasgupta SC, et al. First surveillance of SARS-CoV-2 and organic tracers in community wastewater during post lockdown in Chennai, South India: methods, occurrence and concurrence. *Sci Total Environ* 2021;778:146252.
- [30] Li WJ, Wang XW, Rui QY, Song N, Zhang FG, Ou YC, et al. A new and simple method for concentration of enteric viruses from water. *J Virol Methods* 1998;74(1):99–108.
- [31] 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;728:138764.
- [32] Falman JC, Fagnant-Sperati CS, Kossik AL, Boyle DS, Meschke JSJ. Evaluation of secondary concentration methods for poliovirus detection in wastewater. *Food Environ Virol* 2019;11(1):20–31.
- [33] Medema G, Heijnen L, Elsinga G, Italiaander R, Brouwer A. Presence of SARS-coronavirus-2 RNA in sewage and correlation with reported COVID-19 prevalence in the early stage of the epidemic in the Netherlands. *Environ Sci Technol* 2020;7(7):511–6.
- [34] Wu F, Zhang J, Xiao A, Gu X, Lee WL, Armas F, et al. SARS-CoV-2 titers in

- wastewater are higher than expected from clinically confirmed cases. *mSystems* 2020;5(4):614–20.
- [35] Wurtzer S, Marechal V, Mouchel JM, Maday Y, Teyssou R, Richard E, et al. Evaluation of lockdown effect on SARS-CoV-2 dynamics through viral genome quantification in waste water, Greater Paris, France, 5 March to 23 April 2020. *Euro Surveill* 2020;25(50):1–7.
- [36] Lewis GD, Metcalf TG. Polyethylene glycol precipitation for recovery of pathogenic viruses, including hepatitis A virus and human rotavirus, oyster from water, and sampled sediment. *Appl Environ Microbiol* 1988;54(8):1983–8.
- [37] Vogels CBF, Brito AF, Wylie AL, Fauver JR, Ott IM, Kalinich CC, et al. Analytical sensitivity and efficiency comparisons of SARS-CoV-2 RT-qPCR primer-probe sets. *Nat Microbiol* 2020;5(10):1299–305.
- [38] Gormley M, Aspray TJ, Kelly DA. COVID-19: mitigating transmission via wastewater plumbing systems. *Lancet Glob Health* 2020;8(5):E643.
- [39] Kang M, Wei J, Yuan J, Guo J, Zhang Y, Hang J, et al. Probable evidence of fecal aerosol transmission of SARS-CoV-2 in a high-rise building. *Ann Intern Med* 2020;173(12):974–80.
- [40] Lancet T. Sustaining containment of COVID-19 in China. *Lancet* 2020;395(10232):1230.
- [41] D’Aoust PM, Mercier E, Montpetit D, Jia JJ, Alexandrov I, Neault N, et al. Quantitative analysis of SARS-CoV-2 RNA from wastewater solids in communities with low COVID-19 incidence and prevalence. *Water Res* 2021;188:116560.
- [42] Weidhaas J, Aanderud ZT, Roper DK, VanDerslice J, Gaddis EB, Ostermiller J, et al. Correlation of SARS-CoV-2 RNA in wastewater with COVID-19 disease burden in sewersheds. *Sci Total Environ* 2021;775:145790.
- [43] 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.
- [44] Huff HV, Singh A. Asymptomatic transmission during the COVID-19 pandemic and implications for public health strategies. *Clin Infect Dis* 2020;71(10):2752–6.
- [45] Zheng S, Fan J, Yu F, Feng B, Lou B, Zou Q, et al. Viral load dynamics and disease severity in patients infected with SARS-CoV-2 in Zhejiang province, China, January–March 2020: retrospective cohort study. *BMJ* 2020;369:m1443.
- [46] Gupta S, Parker J, Smits S, Underwood J, Dolwani S. Persistent viral shedding of SARS-CoV-2 in faeces—a rapid review. *Colorectal Dis* 2020;22(6):611–20.
- [47] Wang CY, Wang JS, Liu Y, Zhang L, Sun Y, Qu JH, et al. Less attention paid to waterborne SARS-CoV-2 spreading in Beijing urban communities. *Front Env Sci Eng* 2021;15:110.