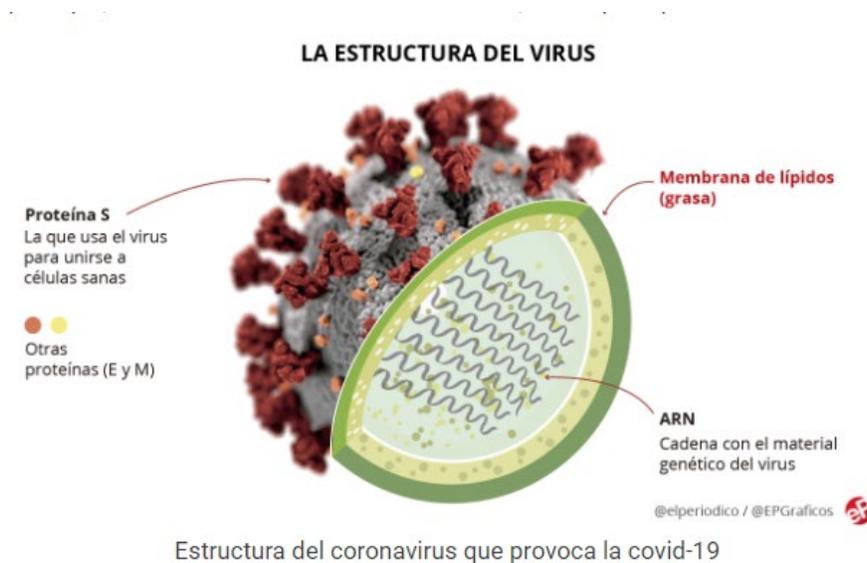




Instituto Costarricense de Acueductos y Alcantarillados

Laboratorio Nacional de Aguas



Actualización de los avances en la detección de Material Genético del SARS-CoV-2 en Aguas Residuales en Costa Rica

Elaborado por: Andrei Badilla Aguilar
Pablo Rivera Navarro
Ernesto Alfaro Arrieta
Ilena Vega Guzmán
Jimena Orozco Gutiérrez
Darner Mora Alvarado

Noviembre, 2020



Instituto Costarricense de Acueductos y Alcantarillados
Centro de Documentación e Información
UEN Investigación y Desarrollo



**AUTORIZACIÓN INSTITUCIONAL PARA PUBLICAR TESIS, ESTUDIOS,
ARTÍCULOS Y/O INFORMES PROPIEDAD INTELECTUAL DE AyA EN EL
REPOSITORIO DIGITAL DEL CEDI**

Yo, Eric Alonso Bogantes Cabezas

N° Cédula: 5-251-0327

Dependencia: Gerencia General

Autorizo como Gerente General y representante legal del Instituto Costarricense de Acueductos y Alcantarillados (AyA) cédula jurídica 4-000-042138 al Centro de Documentación e Información (CEDI) de la UEN Investigación y Desarrollo la inclusión, publicación y difusión en su Repositorio Digital y Catálogo en línea (OPAC).

Se trata de estudios y documentos cuyos derechos intelectuales y de uso son exclusivos de nuestra institución.

E-mail: gerenciageneral@aya.go.cr N° Teléfono: 2242-5090



Firmado digitalmente
por ERIC ALONSO
BOGANTES CABEZAS
(FIRMA)
Fecha: 2021.06.16
17:21:24 -06'00'

Firma: _____

Tabla de contenidos

1. Introducción.....	3
2. Objetivos.....	4
3. Metodología.....	4
3.1. Monitoreos.....	4
3.2. Contactos con otros países.....	7
4. Resultados.....	7
4.1. Campañas de recolección de muestras y matrices analizadas.....	7
4.2. Monitoreo de SARS-CoV-2 en aguas residuales.....	8
4.3. Principales hallazgos.....	9
5. Conclusiones y recomendaciones.....	16
6. Bibliografía Consultada.....	18

Avances en la detección de Material Genético del SARS-CoV-2 en Aguas Residuales en Costa Rica: 2020

1. Introducción

En la búsqueda de la mejora continua, durante el 2016, la dirección del Laboratorio Nacional de Aguas (LNA), en favor de la Vigilancia y Control de Calidad del Agua en sus diferentes usos, estableció una Unidad de Investigación en Agua, Ambiente y Salud. En el 2018 y 2019, a través de dicha unidad de investigación, se logró firmar un convenio de cooperación entre la Universidad del Sur de la Florida de los EUA y el Instituto Costarricense de Acueductos y Alcantarillados (AyA), para que, mediante el LNA realizara diferentes estudios de identificación de microorganismos indicadores de contaminación fecal en las aguas marinas de playa Jacó y en Puntarenas, además de estudios epidemiológicos respectivos. En este contexto, algunos profesionales del LNA, se adiestraron en la detección de virus entéricos en aguas de mar. Luego, a partir de marzo de 2020 y con base en los reportes iniciales que indicaban la excreción de partículas virales a través de las heces, el LNA inició la revisión de literatura y el diseño de posibles protocolos para la detección del SARS-CoV-2 en las aguas residuales. Estos esfuerzos iniciaron a mostrar resultados positivos cuando en el mes de mayo, se logró realizar la primera detección de partículas de SARS-CoV-2 en aguas residuales del Centro de Aprehensión Temporal para Extranjeros en Condición Irregular (CATECI), el cual en ese momento albergaba a 12 personas enfermas de COVID-19. Este hallazgo fue comunicado al país en la conferencia de prensa habitual que se realiza todos los días en la Casa Presidencial.

Luego de esto, el equipo conformado por de la Unidad de Biología Molecular y el Departamento de Aguas Residuales, perfeccionó la técnica y estableció programas de muestreo y análisis, en conjunto con el Ministerio de Salud y la Caja Costarricense del Seguro Social (CCSS), con criterios epidemiológicos para detectar la circulación del virus, en las aguas residuales de diferentes zonas y comunidades del país

En razón de que ya nuestro laboratorio ha establecido la “Plataforma” para este tipo de análisis para ser utilizado como alerta temprana de la posible propagación del virus

en comunidades, así como en la vigilancia ambiental, detección del mismo en lugares con vigilancia clínica limitada y en posibles rebrotes, a continuación, se presentan los avances en la detección del SARS-CoV-2 en aguas residuales en Costa Rica.

2. Objetivos

Actualizar los avances en la detección del material genético del virus SARS-CoV-2 en aguas residuales de Costa Rica a través de la técnica qPCR, con el propósito de su utilización como herramienta epidemiológica complementaria de la circulación del virus y como alerta temprana de brotes y rebrotes en las diferentes comunidades del país.

3. Metodología

3.1. Monitoreos

Se indica el número de campañas de monitoreo realizados desde mayo a noviembre del 2020, los resultados positivos en la detección del virus, el número de contagios por comunidades en las diferentes líneas de tiempo y en lugares específicos.

A partir de mayo de 2020, de la mano con una coordinación continua en los equipos de epidemiología de la Caja Costarricense de Seguro Social y el Ministerio de Salud, el LNA inició en forma sistemática el programa de muestreo a nivel nacional con la intención de emitir alertas tempranas sobre la aparición de nuevos brotes de COVID-19.

Fotos de muestreos realizados



Muestreo realizado en colectores de aguas residuales de la GAM. Junio, 2020.
Fuente: Laboratorio Nacional de Aguas, 2020.



Muestreo realizado en colectores de aguas residuales de la GAM.
Fuente: Laboratorio Nacional de Aguas, Junio, 2020.



Muestreo realizado en plantas de tratamiento convencionales de aguas residuales.
Fuente: Laboratorio Nacional de Aguas, Junio, 2020.



Muestreo realizado en aguas residuales provenientes de aviones comerciales.
Fuente: Laboratorio Nacional de Aguas, AyA.

3.2. Contactos con otros países

Se indican los contactos de intercambio realizados por otras entidades, para abordar el tema, en otros países del mundo.

4. Resultados

4.1. Campañas de recolección de muestras y matrices analizadas

Se han recolectado muestras de aguas residuales en: sistemas de tratamiento de aguas residuales, alcantarillas, ríos o quebradas, cajas de registro, canales de aguas pluviales, colectores, descargas en cuerpos de agua, tanques sépticos y tanques de aguas azules de aviones, entre otros.

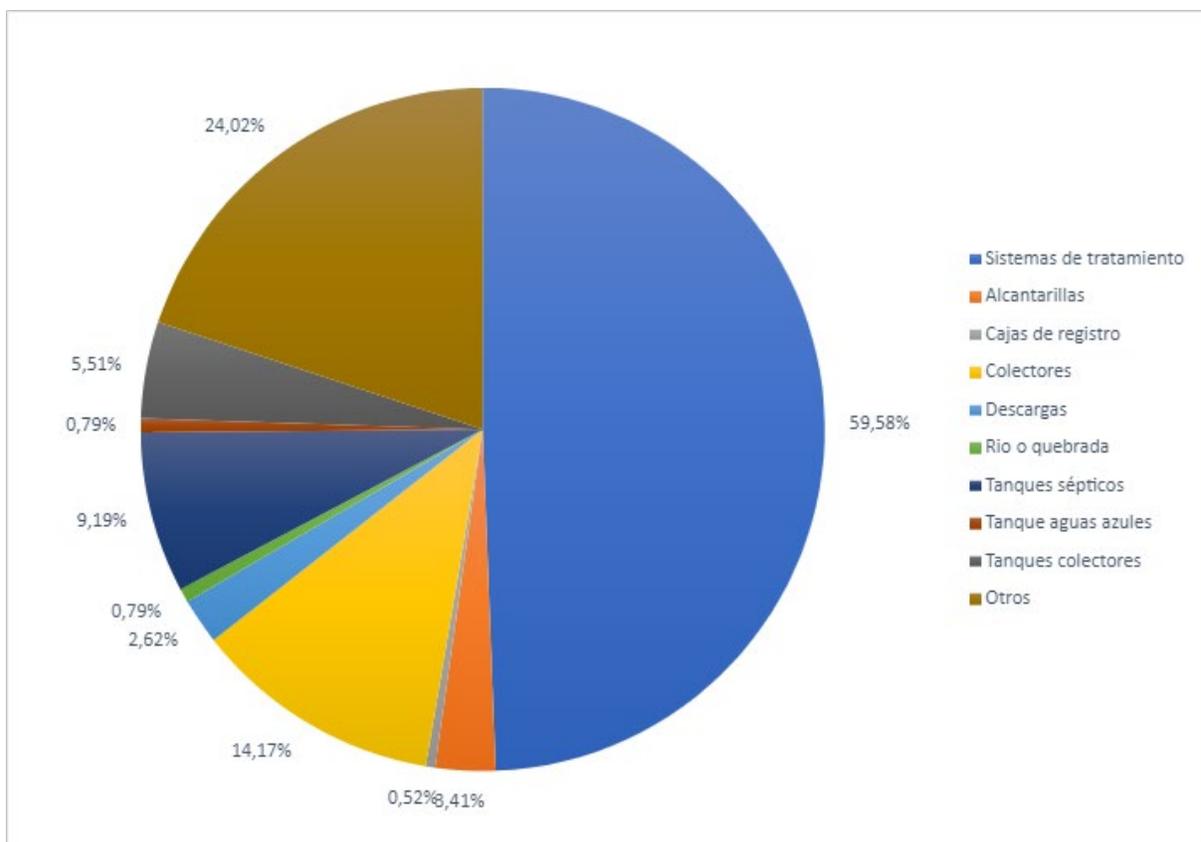


Figura 1. Distribución de los puntos de muestreo de aguas residuales para la vigilancia epidemiológica de SARS-CoV-2 a noviembre 2020. Fuente: Laboratorio Nacional de Aguas, 2020.

Un resumen de las muestras recolectadas (totales del proyecto) se muestra a continuación:

Cuadro 1. Resumen del total de muestras recolectadas para la vigilancia de SARS-CoV-2 en aguas residuales de Costa Rica. Fuente Laboratorio Nacional de Aguas, 2020

Solicitud de muestras	Número	Recolección de muestras	Número
AyA	329	AyA	393
CCSS	99	CCSS	36
Total de muestras	429		

4.2. Monitoreo de SARS-CoV-2 en aguas residuales

El análisis de las muestras ha tenido un énfasis epidemiológico, como alerta temprana de la aparición de nuevos y casos y como monitoreo de la prevalencia del virus en poblaciones específicas. A raíz de esto, el LNA se ha enfocado en el análisis de muestras de aguas crudas de entradas a los sistemas de tratamiento, por lo que las muestras de las aguas tratadas se analizarán en un futuro cercano.

Del total de 429 muestras recolectadas, 232 se han analizado, mientras que 150 se encuentran preservadas (por medio de congelación) para su análisis posterior. Un resumen de las muestras analizadas se muestra a continuación:

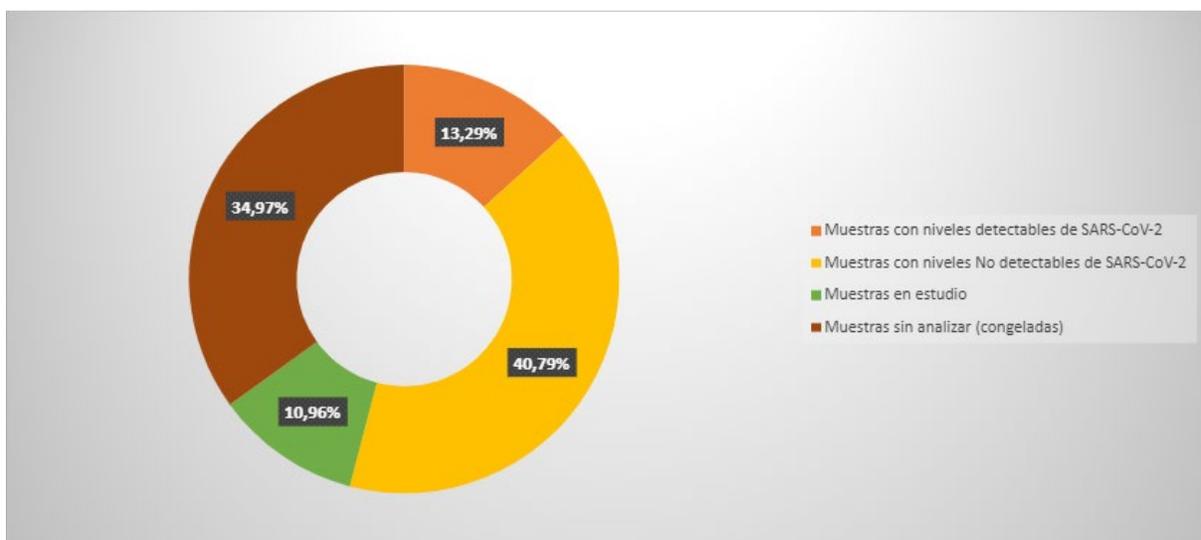


Figura 2. Resumen de los resultados del monitoreo de SARS-CoV-2 en aguas residuales de Costa Rica a noviembre 2020. Fuente: Laboratorio Nacional de Aguas, 2020.

Se ha logrado determinar la presencia de partículas virales de SARS-CoV-2 en 57 muestras recolectadas en plantas de tratamiento de aguas residuales, lagunas de estabilización, alcantarillas, colectores, descargas, así como en tanques sépticos. Los resultados detectables se han obtenido en muestras de todas las provincias, excepto de Cartago y Alajuela. Por otro lado, 175 muestras analizadas han mostrado resultados no detectables del virus.

Los resultados obtenidos han demostrado la aplicabilidad de la herramienta de epidemiología basada en aguas residuales para diferentes sistemas y no solo en sistemas de tratamiento como plantas o lagunas. Con base en los resultados, se puede deducir que la técnica utilizada muestra una gran versatilidad de acuerdo con los sistemas que se deseen monitorear y su naturaleza.

4.3. Principales hallazgos

4.3.1 Primer hallazgo del SARS-CoV-2 en aguas residuales

La primera detección de SARS-CoV-2 se realizó en una muestra recolectada el 7 de mayo en el punto de reunión de las aguas residuales del Centro de Atención Integral de Migrantes en Estado Irregular (CATECI) de la Dirección Nacional de Migración y Extranjería, ubicado en los Lagos, Heredia (La Nación, 2020).

Posteriormente, se siguieron colectando muestras mensualmente en el CATECI, en las cuales se realizó la detección y cuantificación del virus. En la figura 3, se puede observar que, conforme aumentó el número de casos activos por COVID-19 en el CATECI, fue aumentando la concentración del virus en las aguas residuales, lo cual, permitió evaluar indirectamente la técnica como un valioso apoyo al seguimiento epidemiológico de los casos en una comunidad dada.

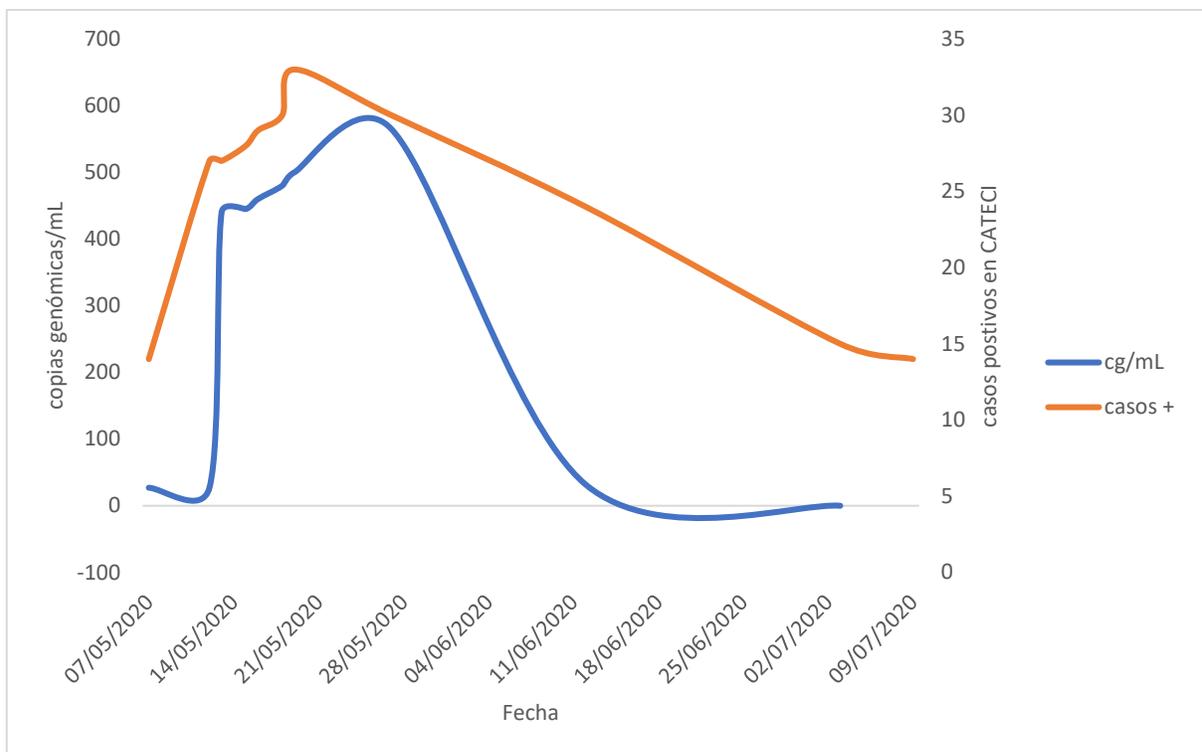


Figura 3. Concentración de SARS-CoV-2 en aguas residuales respecto al número de casos positivos activos detectados en el CATECI. CG/mL: concentración del virus dada en copias genómicas por mililitro. Casos+: casos positivos activos por COVID-19. Fuente: Laboratorio Nacional de Aguas y Ministerio de Justicia, 2020.

4.3.2. Detección de SARS-CoV-2 en aguas residuales de Pavas

En junio anterior, se reportó el hallazgo de partículas de SARS-CoV-2 en el distrito de Pavas, San José. Los resultados obtenidos dieron pie a que la CCSS realizará análisis dirigidos en la población de la zona. Pocos días después de reportados los resultados de aguas residuales y de realizado el testeo dirigido, se declaró transmisión comunitaria en la GAM. Estos resultados demuestran la coordinación existente entre instituciones e ilustran en mayor detalle la utilidad de la epidemiología basada en aguas residuales.

Cuadro 2. Resultado del monitoreo de SARS-CoV-2 en las aguas residuales en la zona de Pavas.

Fecha de muestreo	Lugar	Resultado final SARS-CoV-2	Casos activos en el distrito de Pavas, San José.		
			Una semana después del muestreo (24/6/20)	Dos semanas después del muestreo (1/7/20)	Tres semanas después del muestreo (8/7/20)
16/06/20	Los Laureles, Pavas	Detectado	42	132	295

Se observa que los resultados obtenidos en aguas residuales alertaron a las autoridades de salud acerca de un riesgo incrementado de transmisión en la zona de Pavas. Dicho riesgo se materializó en las semanas siguientes, donde quedó evidenciado mediante vigilancia epidemiológica un aumento progresivo de los casos activos.

4.3.3. Detección de SARS-CoV-2 en aguas residuales de la provincia de Limón.

Se realizaron muestreos mensuales durante mayo, junio y julio en la estación de pre-acondicionamiento del emisario submarino en Limón. Los resultados obtenidos se muestran a continuación:

Cuadro 3. Resumen de las determinaciones de SARS-CoV-2 realizadas en las aguas residuales del cantón central de Limón.

Fecha de muestreo	Resultado SARS-CoV-2	Activos por COVID-19 en el cantón central de Limón
22/05/2020	No detectado	1
18/06/2020	Detectado	14
13/07/2020	Detectado	15

Fuente: Laboratorio Nacional de Aguas, AyA.

Según se evidencia, los resultados obtenidos concuerdan con la tendencia de incremento de casos en la región. Se continuará con el monitoreo con el fin de verificar el avance del virus dentro de la población limonense y evidenciar el efecto de las medidas que se apliquen en dicha zona.

4.2.4. Detección de SARS-CoV-2 en aguas residuales en Golfito (Distrito Golfito)

Muestreos realizados en el mes de junio en diferentes puntos de descarga de aguas residuales en el mar de Golfito, mostraron resultados no detectables de SARS-CoV-2. Sin embargo, un mes después, se lograron detectar partículas virales del patógeno en los mismos puntos:

Cuadro 4. Resumen de las determinaciones de SARS-CoV-2 realizadas en las aguas residuales del cantón central de Golfito.

Fecha de muestreo	Resultado SARS-CoV-2	Activos por COVID-19 en el cantón central de Golfito
25/06/2020	No detectado	1
25/07/2020	Detectado	7

Fuente: Laboratorio Nacional de Aguas, AyA.

Estos resultados sugieren que las aguas residuales pueden ser un indicativo de eventos temporales de aumentos de casos o aparición de rebrotes. Esta información es esencial para los tomadores de decisiones en salud.

4.2.5. Detección de SARS-CoV-2 en aguas residuales de la PTAR Los Tajos

La planta de aguas residuales de Los Tajos trata las aguas de 200.000 personas de la GAM. Este sistema permite monitorear de un modo macro y poblacional, el avance del virus en la población de San José. Tal y como se ha observado con los datos de vigilancia epidemiológica tradicional, la cantidad de enfermos activos en el cantón ha venido en un aumento sostenido desde junio anterior. Estos datos concuerdan con lo observado en los análisis de aguas residuales, donde se han obtenido resultados positivos en varios muestreos realizados tanto en junio como en julio:

Cuadro 5. Resumen de las determinaciones de SARS-CoV-2 en la PTAR Los Tajos durante junio y julio de 2020.

Fecha de muestreo	Estación	Resultado final SARS-CoV-2	Número de casos activos reportados en el cantón central de San José*
10/06/2020	PTAR Los Tajos	Detectado	70
17/06/2020	PTAR Los Tajos	Detectado	72
26/06/2020	PTAR Los Tajos	Detectado	193
08/07/2020	PTAR Los Tajos	Detectado	866
15/07/2020	PTAR Los Tajos	Detectado	1716
29/07/2020	PTAR Los Tajos	Detectado	3501
05/08/2020	PTAR Los Tajos	Detectado	3663

Fuente: Laboratorio Nacional de Aguas, AyA.

*Se hace la salvedad que la PTAR Los Tajos únicamente recolecta las aguas de 200.000 personas de la GAM, por lo que las posibles relaciones que se deriven del análisis de estos datos no son extrapolables a todo el cantón de San José ni mucho menos a la provincia entera.

4.2.6. Detección de SARS-CoV-2 en aguas residuales de Santa Cecilia de Puriscal.

El 28 de julio, se realizó un muestreo en la entrada de la Planta de Tratamiento de Aguas Residuales de Santa Cecilia, ubicada en Santiago de Puriscal, en el cual, se detectó el material genético del SARS-CoV-2 en la entrada de la planta, la cual colecta las aguas residuales de 130 personas aproximadamente. Para este momento, en Santiago de Puriscal se tenía registro de 13 casos activos de COVID-19, fecha a partir de la cual se ha mantenido el aumento constante a la fecha, superando ya los 45 casos activos.

4.2.7. Detección de SARS-CoV-2 en aguas residuales de Aeropuerto Internacional Juan Santamaría.

Cuadro 6. Resumen de las determinaciones de SARS-CoV-2 en la PTAR del Aeropuerto Internacional Juan Santamaría.

Fecha de muestreo	Lugar	Resultado gen N (copias genómicas SARS-CoV-2 / 100 mL)
24/06/2020	Entrada PTAR Aeropuerto Internacional Juan Santamaría	No detectado
29/06/2020	Hisopo en entrada PTAR Aeropuerto Internacional Juan Santamaría	Detectado*
29/06/2020	Entrada PTAR Aeropuerto Internacional Juan Santamaría	No detectado
06/08/2020	Entrada PTAR Aeropuerto Internacional Juan Santamaría	No detectado
06/08/2020	Salida PTAR Aeropuerto Internacional Juan Santamaría	En estudio
25/09/2020	Entrada PTAR Aeropuerto Internacional Juan Santamaría	2 000
25/09/2020	Salida PTAR Aeropuerto Internacional Juan Santamaría	En estudio

Fuente: Laboratorio Nacional de Aguas, AyA.

*Se detectó la presencia del material genético del SARS-CoV-2 pero no la concentración no fue cuantificable.

La detección del SARS-CoV-2 en cantidades cuantificables señala circulación activa del virus entre la población que aportó materia fecal al sistema de tratamiento monitoreado. Las partículas virales cuantificadas, pudieron venir de diferentes poblaciones: la población que labora en el aeropuerto, la población que llega a tomar un vuelo y la población que llega al país.

Es importante considerar que la detección de partículas virales de SARS-CoV-2 en la PTAR del Aeropuerto Internacional Juan Santamaría se dio a finales de setiembre, cuando ya el país recibía una mayor cantidad de vuelos provenientes de países europeos y norteamericanos.

Para el mes de agosto, cuando los resultados de los análisis no mostraron señales detectables del material genético de SARS-CoV-2, el aeropuerto recién iniciaba sus operaciones con vuelos provenientes de Canadá y algunos países europeos.

Destaca la importancia de los aeropuertos como zonas de importancia epidemiológica, donde se dan introducciones de diferentes linajes de virus y donde, a través de un monitoreo sistemático, es posible conocer de manera práctica la circulación de diferentes patógenos de interés en salud pública, incluido el SARS-CoV-2.

4.2.8. Contactos realizados con otros científicos del mundo.

A continuación, se presenta los contactos e intercambios realizados con otros científicos del mundo:

- a. Se coordinó la donación de un extractor automatizado de ácidos nucleicos por medio de la colaboración de la Oficina de Cooperación y Asuntos Internacionales del AyA y de Programa de Cooperación Triangular en materia agua y saneamiento entre Centroamérica (Costa Rica y El Salvador) y Euskadi (País Vasco).
- b. Bajo el Fondo Regional para la Cooperación Triangular en América Latina y el Caribe, se desarrollará entre Costa Rica y Bolivia, con colaboración de Alemania, el siguiente proyecto: Sistema de alerta temprana para la detección de SARS-COV2 en aguas residuales. Las consideraciones técnicas de este proyecto estarán a cargo del Laboratorio Nacional de Aguas.
- c. El LNA ha estado en comunicación constante con funcionarios de la Empresa de Acueducto Agua y Alcantarillado de Bogotá para discutir aspectos técnicos de la vigilancia ambiental del SARS-CoV-2.
- d. El LNA ha brindado asesoría técnica al Ministerio de Ambiente de Honduras en su iniciativa de empezar un sistema de monitoreo de SARS-CoV-2 en aguas residuales del país centroamericano. De igual manera, a las Autoridades del Canal de Panamá con el fin de que se inicie un monitoreo ambiental de este coronavirus en los cuerpos de agua por los que vela dicha institución.
- e. El LNA ha participado de lleno en las discusiones, reuniones y colaboraciones del grupo de colaboración mundial llamado “COVID-19 WBE

COLLABORATIVE”, el cual engloba investigadores y profesionales en aguas residuales y epidemiología de diferentes organizaciones y universidades alrededor del mundo.

- f. El LNA expuso sus logros junto con AySA (Buenos Aires, Argentina) a un grupo de expertos en aguas residuales de Latino América en un congreso en línea organizado por el Banco de Desarrollo de América Latina (CAF) en julio anterior.
- g. Se presentó la propuesta del proyecto de monitoreo de SARS-CoV-2 en aguas residuales en el concurso “Ideas en Acción 2020” en la categoría Excelencia Innovadora Empresarial, promocionado por el Banco Interamericano de Desarrollo. Se obtuvo un lugar en los 3 finalistas, siendo la evaluación final en diciembre 2020.
- h. Se obtuvo la aprobación de asignación de presupuesto de parte de Comisión Nacional de Emergencias para apoyar las gestiones de muestreo, procesamiento y análisis de resultados de detección de SARS-CoV-2.
- i. Se presentaron los avances del proyecto en “*SARS-CoV-2 Wastewater Surveillance NSF Research Coordination Network Kickoff Meeting*” en septiembre del 2020. Congreso coordinado por la Fundación Nacional de Ciencias de Estados Unidos.
- j. En octubre de 2020, se presentaron detalles del proyecto en el congreso de Agua y Salud de la Universidad de Carolina del Norte en Chapell Hill.

5. Conclusiones y recomendaciones

El análisis de los resultados obtenidos hasta la fecha nos permite realizar las siguientes conclusiones y recomendaciones:

5.1. Conclusiones

Es evidente que el desarrollo de las técnicas de biología molecular, en la detección de material genético del virus y otros microbios patógenos en aguas, ha abierto una ventana de oportunidades en el diagnóstico y epidemiología de las enfermedades entéricas y respiratorias.

En el caso de la detección mediante la técnica de PCR del material genético del SARS-CoV-2 en aguas residuales las conclusiones por el momento son:

- La técnica permitió servir como alerta temprana de la circulación del virus, en comunidades como: Limón, Pavas, Desamparados, San José, Golfito, entre otros.
- La línea de tiempo en la detección del virus en las aguas residuales de la Planta de Tratamiento de Aguas Residuales de Los Tajos (PTAR-Los Tajos), ha sido concordante con el crecimiento o circulación del SARS-CoV-2 en el cantón de San José.
- La detección continua en los muestreos realizados en las aguas residuales del Centro de Aprehensión temporal para extranjeros, además de comprobar la sensibilidad de la técnica de la PCR, ha sido concordante con el crecimiento del número de casos positivos en los migrantes.
- La detección del material genético del virus en las aguas residuales de los centros de reclusión como el de San Sebastián permite considerar la técnica como una herramienta útil en poblaciones definidas.
- El trabajo conjunto realizado entre los funcionarios de la CCSS, el Ministro de Salud y el Laboratorio Nacional de Aguas de AyA, ha demostrado la importancia de las fortalezas de la coordinación interinstitucional para afrontar situaciones de emergencia como la actual pandemia.
- Los contactos, alianzas y convenios generados a nivel internacional durante el estudio de SARS-CoV-2 en aguas residuales, permitirán al Laboratorio

Nacional de Aguas estar a la vanguardia en las técnicas, herramientas y enfoques que combinan epidemiología y biología molecular en estudios ambientales.

5.2. Recomendaciones

En el contexto y escenario de la prolongación de la actual pandemia, la herramienta de epidemiología basada en aguas residuales será muy importante para adelantarse a futuros rebrotes de la COVID-19, en diferentes regiones del país.

Se recomienda la utilización de herramientas en biología molecular para la evaluación de sistemas de tratamientos de aguas residuales, relacionados con la remoción de virus y patógenos humanos en general.

6. Bibliografía Consultada

- Ahmed, W., Angel, N., Edson, J., Bibby, K., Bivins, A., O'Brien, J. W., ... Mueller, J. F. (2020). 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. *Science of the Total Environment*, 728, 138764. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.138764>
- Ahmed, W., Bertsch, P. M., Bivins, A., Bibby, K., Farkas, K., Gathercole, A., ... Kitajima, M. (2020). Comparison of virus concentration methods for the RT-qPCR-based recovery of murine hepatitis virus, a surrogate for SARS-CoV-2 from untreated wastewater. *Science of the Total Environment*, 739(June), 139960. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.139960>
- Bhoori, S., Rossi, E. R., Citterio, D., & Mazzaferro, V. (2020). SARS-CoV-2 in wastewater: potential health risk, but also data source, (January), 19–21.
- Bivins, A., North, D., Ahmad, A., Ahmed, W., Alm, E., Been, F., ... Bibby, K. (2020). Wastewater-Based Epidemiology: Global Collaborative to Maximize Contributions in the Fight against COVID-19. *Environmental Science and Technology*, (Figure 1), 7754–7757. <https://doi.org/10.1021/acs.est.0c02388>
- Haramoto, E., Malla, B., Thakali, O., & Kitajima, M. (2020). First environmental surveillance for the presence of SARS-CoV-2 RNA in wastewater and river water in Japan. *Science of the Total Environment*, 737, 140405. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.140405>
- Kitajima, M., Ahmed, W., Bibby, K., Carducci, A., Gerba, C. P., Hamilton, K. A., ... Rose, J. B. (2020). SARS-CoV-2 in wastewater: State of the knowledge and research needs. *Science of The Total Environment*, 139076. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2020.139076>
- La, G., Bonadonna, L., Lucentini, L., Kenmoe, S., & Suffredini, E. (2020). Coronavirus in water environments : Occurrence , persistence and concentration methods - A scoping review.

Water Research, 179, 115899. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2020.115899>

- La Nación. (2020). AyA detecta partículas del virus causante de covid-19 en aguas residuales de centro para inmigrantes en Heredia. Disponible en la dirección: <https://www.nacion.com/el-pais/salud/aya-detecta-virus-causante-de-covid-19-en-aguas/VJMS6T3TJVER5MJA7BFCQZMUNE/story/>
- La República. (2020). El acúmulo de casos de Covid-19 se ha desplazado al Gran Área Metropolitana. Disponible en la dirección: <https://www.larepublica.net/noticia/el-acumulo-de-casos-de-covid-19-se-ha-desplazado-al-gran-area-metropolitana-daniel-salas>
- Lai, C. C., Shih, T. P., Ko, W. C., Tang, H. J., & Hsueh, P. R. (2020). Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) and coronavirus disease-2019 (COVID-19): The epidemic and the challenges. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 55(3), 105924. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2020.105924>
- Major, T. (2002). Simultaneous Detection of. *Society*, 68(10), 5177–5180. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.10.5177>
- Medema, G., Heijnen, L., Elsinga, G., Italiaander, R., & Brouwer, A. (2020). 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. *Environmental Science & Technology Letters*. <https://doi.org/10.1021/acs.estlett.0c00357>
- Wölfel, R., Corman, V. M., Guggemos, W., Seilmaier, M., Zange, S., Müller, M. A., ... Wendtner, C. (2020). Virological assessment of hospitalized patients with COVID-2019. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2196-x>
- Wu, Y., Guo, C., Tang, L., Hong, Z., Zhou, J., Dong, X., ... Huang, X. (2020). Prolonged presence of SARS-CoV-2 viral RNA in faecal samples. *The Lancet Gastroenterology and Hepatology*, 5(5), 434–435. [https://doi.org/10.1016/S2468-1253\(20\)30083-2](https://doi.org/10.1016/S2468-1253(20)30083-2)
- Xagorarakis, I., O'Brien, E., & Engineers, P. F. (2020). Wastewater-Based Epidemiology for Early Detection of Viral Outbreaks. *Springer Nature*, 75–97. <https://doi.org/10.1007/978-3-030-17819-2>
- Xiao, F., Sun, J., Xu, Y., Li, F., Huang, X., Li, H., ... Zhao, J. (2020). Infectious SARS-CoV-2 in Feces of Patient with Severe COVID-19. *Emerging Infectious Diseases*, 26(8), 1920–1922. <https://doi.org/10.3201/eid2608.200681>
- Zhou, P., Yang, X. Lou, Wang, X. G., Hu, B., Zhang, L., Zhang, W., ... Shi, Z. L. (2020). A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature*, 579(7798), 270–273. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2012-7>