

Disminución del RNA de SARS-CoV-2 en matrices acuáticas ambientales

SARS-CoV-2 RNA decay on raw environmental aquatic matrices

Lira-Morales, J. D.¹ , Medrano-Félix, J. A.^{2*} , Martínez-Rodríguez, C. I.¹,
Castro-del Campo, N.¹ , Chaidez Quiroz, C.¹ 

¹ Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C., Carretera a Eldorado Km. 5.5, Campo El Diez, 80110, Culiacán, Sinaloa, México.

² Investigadoras e Investigadores por México-Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A. C. Carretera a Eldorado Km. 5.5, Campo El Diez, 80110, Culiacán, Sinaloa, México.



Please cite this article as/Como citar este artículo: Lira-Morales, J. D., Medrano-Félix, J. A., Martínez-Rodríguez, C. I., Castro-del Campo N., Chaidez-Quiroz, C. (2023). SARS-CoV-2 RNA decay on raw environmental aquatic matrices. *Revista Bio Ciencias*, 10, e1529. <https://doi.org/10.15741/revbio.10.e1529>

Article Info/Información del artículo

Received/Recibido: June 08th 2023.

Accepted/Aceptado: October 21th 2023.

Available on line/Publicado: November 14th 2023.

RESUMEN

SARS-CoV-2 está presente en fluidos corporales de individuos con infecciones sintomáticas y asintomáticas, estos fluidos se depositan frecuentemente en aguas residuales, por lo tanto, la vigilancia del RNA de SARS-CoV-2 presente en estas matrices acuáticas es una herramienta prometedora como una señal de alerta temprana para detectar futuras pandemias. En la actualidad se sabe que el material genético del virus puede sobrevivir por varios días en agua residual, sin embargo, se necesita generar más información para entender mejor la cinética de la carga viral en matrices acuáticas a través del tiempo. El objetivo de este trabajo fue determinar la cinética de detección de RNA de SARS-CoV-2 a través del tiempo en diferentes matrices acuáticas. Cada una de las matrices acuáticas (Marina, influente, efluente y potable) fue inoculada y evaluada por 62 días para determinar la cinética de decaimiento en la detección de RNA viral por RT-PCR en tiempo real. El RNA de SARS-CoV-2 fue detectado durante la duración del experimento en todas las matrices. El agua de efluente, influente y marina dificultaron la detección de SARS-CoV-2 conforme avanzaba el tiempo con una vida media de 15.24, 43.24, y 32.38 días y T90 de 50.63, 143.64 y 107.54 días, respectivamente. Por otra parte, en el agua potable, la detección fue constante a lo largo del experimento. Este estudio demuestra el impacto de la matriz acuática en la detección de la carga viral probablemente afectada por los parámetros fisicoquímicos, de igual forma, es interesante entender que el SARS-CoV-2 puede detectarse por un largo periodo de tiempo en aguas recreativas y residuales, lo que lo vuelve una herramienta relevante para realizar epidemiología basada en agua como un indicador de la salud de la comunidad.

PALABRAS CLAVE: SARS-CoV-2, agua residual, carga viral, vigilancia genómica, ambiente

*Corresponding Author:

Cristóbal Chaidez. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C., Carretera a Eldorado Km. 5.5, Campo El Diez, 80110, Culiacán, Sinaloa, México. Telefono: (667)4806950. E-mail: chaqui@ciad.mx

ABSTRACT

SARS-CoV-2 is present in corporal fluids of individuals with symptomatic or asymptomatic infections, these fluids are deposited on different water matrices, including drainage water; therefore, wastewater surveillance of RNA of SARS-CoV-2 has emerged as a promising tool as an early warning of potential outbreaks. It is known that the viral genetic material is present in wastewater for several days. However, more data on SARS-CoV-2 is needed to better understand the viral load kinetics in raw water matrices. This work aimed to assess the viral load decay of SARS-CoV-2 RNA in different raw aquatic matrices to evaluate the RNA stability through time. Each water matrix (seawater, influent wastewater, effluent wastewater, and tap water) was inoculated and evaluated for 62 days to determine the viral load kinetic decay by RT-PCR in real-time. SARS-CoV-2 RNA was detected in all water matrices during the experiment. Effluent, influent, and seawater water matrices harsh conditions constraint SARS-CoV-2 RNA detection, with a half-life of 15.24, 43.24, and 32.38 days, and T_{90} values of 50.63, 143.64, and 107.54 days respectively. Meanwhile, in tap water, the viral genetic material remained for the longest time without significant changes. This study successfully demonstrates that the viral load is affected by the physicochemical characteristics of the water matrix yet confirms that the surveillance of recreational waters and wastewater for SARS-CoV-2 can be a valuable tool for WBE (Wastewater-based epidemiology) as a leading indicator of changes in COVID-19 burden in a community.

KEY WORDS : SARS-CoV-2, water, viral load kinetics, genomic surveillance, environment.

Introducción

El SARS-CoV-2 es un virus clasificado en la subfamilia de los coronavirus, llamado así por sus características y se encuentra estrechamente relacionado con otros virus de importancia clínica como el SARS-CoV y el MERS-CoV (Li *et al.*, 2020). El coronavirus es un virus de RNA monocatenario envuelto con proteínas en forma de corona en su superficie y un tamaño que varía de 60 a 220 nm. El SARS-CoV-2 se detectó por primera vez en la ciudad de Wuhan, en la provincia de Hubei en China, y se propagó rápidamente a otros países (WHO, 2020a), produciendo una enfermedad clínica conocida más tarde como enfermedad por coronavirus 2019 (COVID-19) (WHO, 2020b). Una amplia gama de síntomas (síntomas similares a la neumonía y gastrointestinales) y secuelas amenazan la vida de los infectados (Grant *et al.*, 2020). Hasta el año la 2022, la COVID-19 ha cobrado más de 6,9 millones de vidas en todo el mundo, además, el SARS-CoV-2 ha infectado a aproximadamente 768 millones de personas, y muchas más permanecen sin ser diagnosticadas debido a estrategias de rastreo deficientes, especialmente en los países en desarrollo (WHO, 2022). A principios de 2021, la variante de

preocupación Delta (B.1.617.2) representaba una amenaza global al sustituir las otras variantes en muchas regiones del mundo. El 26 de noviembre de 2021, la variante Omicron (B.1.1.529) fue declarada variante de preocupación por la Organización Mundial de la Salud debido a las mutaciones en esta variante que representan un riesgo más significativo de reinfección (WHO, 2021).

En este escenario, muchas investigaciones se centraron en identificar marcadores de presencia de SARS-CoV-2 en muestras ambientales; por ejemplo, SARS-CoV-2 en superficies (Kumar *et al.*, 2020; Pasquarella *et al.*, 2020; Razzini *et al.*, 2020; Zhou *et al.*, 2020), muestras de aire (Chia *et al.*, 2020; Lednicky *et al.*, 2020; Razzini *et al.*, 2020), y el agua (Bivins *et al.*, 2020; Haramoto *et al.*, 2020) siendo este último de gran relevancia. Sin embargo, aún deben realizarse estudios a largo plazo sobre la detección del RNA del SARS-CoV-2 en diferentes matrices de agua. En este sentido, Basavaraju *et al.* (2021) sugieren el estudio epidemiológico del coronavirus en aguas residuales con dos propósitos: detección temprana de brotes y estimación del número de personas infectadas para ayudar a mitigar su impacto en la comunidad. Por lo tanto, la epidemiología basada en aguas residuales (WBE por sus siglas en inglés) se convierte en una valiosa herramienta de alerta temprana para dirigir acciones de salud pública, donde las aguas residuales y otras matrices acuáticas son útiles para la vigilancia de patógenos. La presencia de SARS-CoV-2 en la orina y las heces de pacientes infectados se ha confirmado mediante qPCR en varios países (Kim *et al.*, 2020). Sin embargo, detectar el genoma viral o fragmentos de material genético en fluidos corporales no garantiza necesariamente la presencia de una partícula de virus infecciosa. Además, los virus excretados a través de la materia fecal tienden a permanecer agregados en la matriz de agua debido al movimiento browniano o la nucleación de partículas acuáticas (Mitic *et al.*, 2021); debido a lo anterior es posible encontrar SARS-CoV-2 en matrices acuáticas. El objetivo de este estudio fue evaluar la tasa de recuperación del RNA del SARS-CoV-2 en diferentes matrices acuáticas crudas: aguas residuales (no tratadas y tratadas), agua de mar y agua del grifo, para determinar la tasa de descomposición del RNA del SARS-CoV-2 en condiciones controladas.

Material y Métodos

Matrices de agua

Se seleccionaron cuatro tipos de agua para probar la identificación y cuantificación de RNA a través del tiempo en diferentes matrices de agua: agua de mar (M), dos aguas de plantas de tratamiento: una del efluente (E) y otra del influente (I) y agua del grifo (T). La ausencia de SARS-CoV-2 en cada matriz de agua antes de la inoculación se determinó mediante RT-PCR en tiempo real como se describe en este trabajo.

Sitios de muestreo

Se tomaron 500 mL de cada muestra de agua de los sitios para este experimento. a) Agua de mar de Navolato, Sinaloa, México, "Nuevo Altata" 24°38'42"N 107°59'23"O; b) Agua

del grifo de Campo El Diez Culiacán, Sinaloa, México 24°44'02"N 107°27'17"O; y c) Las muestras de aguas residuales correspondieron a influentes y efluentes de una planta de tratamiento de aguas residuales, Culiacán, Sinaloa, México 24°42'31"N 107°25'00"W. Los parámetros fisicoquímicos *in situ* (pH, potencial de oxidación-reducción, sólidos disueltos totales, oxígeno disuelto, conductividad, resistividad, salinidad, sigma del agua de mar, turbidez y temperatura) de cada tipo de agua se midieron con el medidor multiparamétrico Hanna HI9829 (Hanna, USA), para determinar las condiciones iniciales para cada tipo de agua (Tabla 1).

Configuración de microcosmos

Se colocaron 35 mL de agua en tubos cónicos de 50 mL y se agregó una alícuota de 2 mL de la muestra previamente confirmada como positiva mediante RT-PCR para un volumen final de 37 mL. El tubo inoculado se agitó suavemente y se incubó a temperatura ambiente (24 °C) durante 62 días. Las concentraciones iniciales de RNA del SARS-CoV-2 en las muestras se determinaron con una curva estándar utilizando RNA sintético cuantitativo SARS-CoV-2: ORF, E, N (ATCC) en diluciones seriadas 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 , 10^1 copias μL^{-1} .

Extracción de RNA

La extracción de RNA para la detección del SARS-CoV-2 en los diferentes microcosmos se realizó en diferentes intervalos de tiempo durante 62 días; El RNA fue extraído por TACO™ Nucleic Acid Automatic Extraction System (GeneReach, Taiwán), utilizando alícuotas de 200 μL de cada microcosmos. La integridad del RNA después de la extracción se determinó mediante electroforesis en gel de agarosa en condiciones de desnaturalización (Figura suplementaria 1).

Detección de SARS-CoV-2 en muestras de agua

La detección del SARS-CoV-2 se realizó mediante RT-PCR en tiempo real, la retrotranscripción del RNA viral y la PCR se realizaron mediante RT-qPCR de 1 paso de GoTaq® utilizando el kit de detección 2019-nCoV CDC (ID Technologies, EUA) con los cebadores y sondas de la siguiente manera: 2019-nCoV_N1-F 5'-GAC CCC AAA ATC AGC GAA AT-3', 2019-nCoV_N1-R 5'-TCT GGT TAC TGC CAG TTG AAT CTG-3', 2019-nCoV_N1-P 5'-FAM-ACC CCG CAT TAC GTT TGG TGG ACC-BHQ1-3', 2019-nCoV_N2-F 5'-TTA CAA ACA TTG GCC GCA AA-3', 2019-nCoV_N2-R 5'-GCG CGA CAT TCC GAA GAA-3' y 2019-nCoV_N2-P 5'-FAM-ACA ATT TGC CCC CAG CGC TTC AG-BHQ1-3' para detectar dos regiones del gen de nucleocápside del SARS-CoV-2. Las muestras se consideraron positivas cuando se detectaron amplicones N1 y N2. El protocolo de termociclado se realizó en un instrumento CFX 96 (Bio Rad, EUA) con una mezcla de reacción de la siguiente manera: agua libre de nucleasas (3.1 μL), mezcla de Primer/Sonda (1.5 μL), GoTaq Probe qPCR Master Mix con dUTP (10 μL) y Go Script RT Mix para RT-qPCR de 1 paso (0.4 μL).

Se empleó el amplicón N1 del gen N del SARS-CoV-2 para cuantificar la carga viral en cada microcosmos siguiendo la fórmula propuesta por Liotti *et al.* (2021), utilizando RNA sintético cuantitativo SARS-CoV-2: ORF, E, N (ATCC) en diluciones seriadas 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 , 10^1 copias μL^{-1} , cada muestra se analizó por triplicado ($n = 3$) mediante RT-qPCR (CFX 96, Bio-Rad). Los valores de la curva estándar se utilizaron para determinar el número de copias en muestras

desconocidas. Para calcular la carga viral, se utilizó la siguiente fórmula: Número de copias virales (copias/ mL) = (1000/Ve) (Ev/Ea) donde, Ve: volumen de muestra para extracción; Ev: muestra eluida de extracción y Ea: volumen extraído utilizado para la amplificación.

Análisis estadísticos

Los resultados obtenidos se sometieron a un ANOVA de dos vías, comparación de medias de Tukey (matriz de factores de agua y días) y los gráficos de efectos principales se realizaron con GraphPad 8.0.1 (Prism). El mismo software se utilizó para realizar los análisis de One-phase decay para determinar los valores de vida media, r^2 , RSME y k para cada matriz de agua. Se utilizaron valores K para calcular el T_{90} , el tiempo requerido para lograr una reducción del 90 % (un logaritmo) como se describe en (Ahmed *et al.*, 2020).

Resultados y discusión

La cinética *in vitro* del RNA del SARS-CoV-2 se determinó en diferentes matrices de agua: agua de mar, dos aguas residuales (influyente y efluente) y una matriz de uso doméstico (agua del grifo). Todas las muestras de agua tenían un pH similar ~ 7. El agua de influente tuvo el porcentaje más bajo de oxígeno disuelto, seguido por el agua del grifo (0 y 0.2 ppt TDS, respectivamente), y el influente también fue el agua más turbia. El agua de mar presentó mayor conductividad que cualquier otra, así como el valor de salinidad más alto (Tabla 1). Después de inocular el SARS-CoV-2 en cada microcosmos de tipo de agua, cada uno se analizó durante los siguientes 62 días periódicamente para determinar el tiempo máximo que se podía detectar el RNA del SARS-CoV-2 (Tabla suplementaria 1).

Tabla 1. Parámetros fisicoquímicos del agua

Parámetro	Unidad	Matriz acuática			
		Marina	Influente	Efluente	Potable
pH	pH	7.97	7.28	7.30	7.09
ORP ¹	mV	155.5	-118.4	164.7	323.5
Oxígeno disuelto	%	7.5	0.0	6.7	0.2
Conductividad	mS/cm ²	54.80	1.046	0.955	0.287
Resistividad	MΩ·cm	0.0	0.0010	0.0010	0.0035
TDS ²	ppt Tds	27.32	492	477	144
Salinidad	PSU	36.14	0.48	0.47	0.14
Sigma de agua marina	σ _t	23.9	-	0.0	0.0
Turbidez	FNU	12.3	262	7.9	0.0
Temperatura	°C	26.03	28.31	28.54	24.25

¹ Potencial de oxido-reducción, ² Solidos solubles totales

Las muestras de RNA positivas detectadas en diferentes momentos se utilizaron para determinar la carga viral utilizando RNA sintético cuantitativo de SARS-CoV-2: ORF, E, N (ATCC) en diluciones seriadas 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 , 10^1 copias μL^{-1} ($n = 3$). la carga viral de cada muestra de agua en cada tiempo ($n = 3$) se determinó siguiendo a Liotti *et al.* (2021) con el fin de determinar la concentración total por mL en cada muestra. Las muestras se analizaron en dos lotes cada uno con una curva estándar respectiva con valores de $E = 92.1 \%$, $R^2 = 0.994$, Pendiente = -3.526 y $E = 88.2 \%$, $R^2 = 0.999$, Pendiente = -3.641 (Figuras suplementarias 2 y 3).

ANOVA y análisis de efectos principales

Como era de esperar debido a la naturaleza de las moléculas de RNA, el ANOVA de dos vías (Tabla 2: Tabla suplementaria 2) indica significancia estadística no sólo de ambos factores: días ($p = 0,0001$) y matriz de agua ($p = 0,0001$) considerando la carga viral detectada, sino también la importancia de la interacción de ambos factores ($p = 0,0001$).

Tabla 2. Fuentes de variación y significancia de cada factor e interacción

Fuente de variación	% total de variación	Valor P
Interacción	22.48	<0.0001
Días	55.58	<0.0001
Matriz acuática	20.77	<0.0001
Sujeto	0.5095	0.0003

El factor días (Figura 2) tuvo una relación inversa entre la carga viral y el tiempo transcurrido. Cuanto más tiempo permaneció la partícula viral del SARS-CoV-2 en el agua; menos RNA detectado por RT-PCR en tiempo real. Curiosamente, incluso durante todo el tiempo de este experimento (62 días), todavía se detectó RNA del SARS-CoV-2, esto tiene implicaciones en el uso del RNA como biomarcador para la vigilancia genómica del SARS-CoV-2. Los resultados de las comparaciones de Tukey del factor principal días y matriz de agua se presentan en las tablas suplementarias 3 y 4.

Por otro lado, la matriz de agua tuvo un impacto significativo en la recuperación del RNA viral a través del tiempo (Figura 2), destacando la matriz de agua del grifo donde la detección de la carga viral fue constante durante el tiempo del experimento. Además, los valores medios después de 62 días para las aguas residuales de efluentes y el agua de mar no mostraron diferencias hasta el final del experimento.

Matriz de agua y carga viral

La concentración de RNA viral detectada mostró el mayor decaimiento entre los 9 y 20 días en matrices de efluentes y aguas residuales influentes, pero no para el agua de mar, donde el decaimiento fue constante en el experimento post-inoculación (Figura 2).

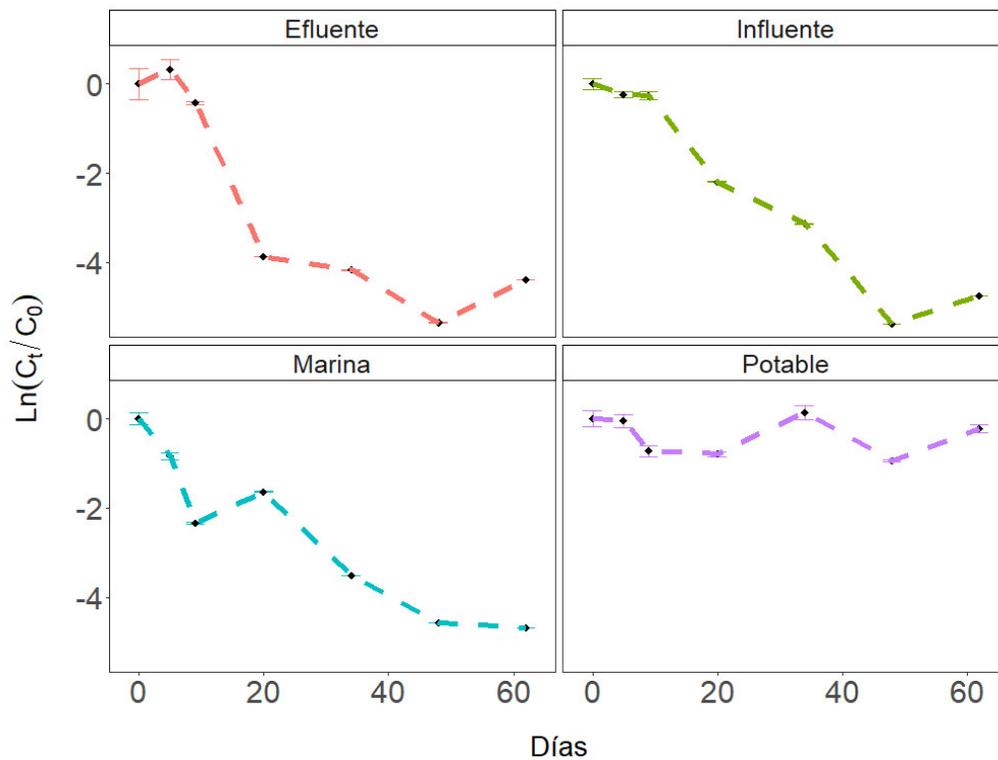


Figura 1. Carga viral de SARS-CoV-2 en diferentes matrices acuáticas. Ln (Ct/C0) de la carga viral vs tiempo en días posteriores a la inoculación del microcosmos (n=3).

Las barras superiores e inferiores representan la desviación estándar

Se detectó RNA viral de agua de mar hasta el final del experimento de 62 días. El agua de mar es una matriz recreativa donde las personas se reúnen en grandes cantidades, a veces en extrema proximidad, lo cual es un argumento razonable para considerar que el monitoreo del SARS-CoV-2 puede ser útil para los estudios WBE. Mordecai y Hewson (2020) sugieren que

los miembros del grupo Nidovirales, que incluye coronavirus humanos, pueden distribuirse en diversos entornos, como el agua de mar; otros estudios han evaluado el riesgo de la presencia de SARS-CoV-2 en esta matriz ambiental. Hasta la fecha, Sala-Comorera *et al.* (2021) sugiere que las partículas virales muestran una rápida pérdida de la infectividad en el agua de mar, también, De Rijcke *et al.* (2021) detectaron una rápida descomposición de las partículas virales en el agua de mar, perdiendo hasta el 99 % de la carga viral en 2 días de exposición bajo este escenario. En nuestro estudio en la matriz de agua de mar, el RNA del SARS-CoV-2 todavía fue detectable durante 62 días a 24 °C en condiciones de laboratorio controladas, Ahmed *et al.* (2020) comenta sobre la importancia de la temperatura en la detección del SARS-CoV-2, encontrando que las temperaturas cercanas a 4 °C están relacionadas con una menor descomposición en la carga viral del SARS-CoV-2 en comparación con 15, 25 y 37 °C. Además, la temperatura y los parámetros fisicoquímicos como la salinidad (Tabla 1) representan un obstáculo en la detección del SARS-CoV-2 para la generación de datos para los estudios WBE.

En aguas residuales no tratadas (influentes) y tratadas (efluentes), el análisis mostró que el SARS-CoV-2 es detectable de 0 a 62 días (1,488 h). El monitoreo de las plantas de tratamiento de aguas residuales se ha utilizado como una ventana para conocer el estado de salud de la comunidad a través de la epidemiología basada en aguas residuales de patógenos virales, incluido el SARS-CoV-2 (Aguiar-Oliveira *et al.*, 2020). Considerando ambas fuentes de aguas residuales de una planta de tratamiento: influente y efluente, la carga viral en la muestra de influente mostró una disminución constante durante el experimento; mientras tanto, en el agua efluente, se puede observar una reducción más rápida de la detección del SARS-CoV-2, en los primeros 20 días (Figura 2). Ahmed *et al.* (2020) demostraron el decaimiento del RNA del SARS-CoV-2 en aguas residuales no tratadas a 25 °C oscila entre 10.5 y 15.5 días según sea necesario para reducir 1 Log₁₀. Nuestros resultados muestran una disminución similar para las etapas iniciales de las aguas residuales tanto de influentes (aguas residuales municipales no tratadas) como de efluentes; sin embargo, es importante considerar que las aguas influentes (no tratadas) y efluentes (tratadas) pueden variar dependiendo de la ubicación de la planta de tratamiento de agua, esto se debe a que la composición del agua de influente depende completamente de las actividades humanas circundantes.

Finalmente, en el agua del grifo, el RNA del SARS-CoV-2 se pudo detectar a lo largo del estudio, desde el tiempo 0 hasta el día 62 (1.488 h), con una variación mínima. Estos resultados sugieren la estabilidad del material genético viral en este tipo de agua, que no mostró una reducción logarítmica notable entre intervalos de tiempo, convirtiéndose así en un riesgo potencial para la salud de la comunidad. La falta de condiciones duras en esta matriz (Tabla 1) podría haber ayudado a la detección más prolongada de toda el agua analizada. Estos resultados sugieren la idoneidad del agua del grifo como reservorio para partículas virales de SARS-CoV-2 durante tiempos prolongados. A pesar de la baja probabilidad de ocurrencia, este resultado no solo destaca que el efecto de decaimiento depende de la matriz de agua, sino que también puede ser una fuente para identificar los riesgos potenciales asociados con el tratamiento subóptimo del agua del grifo.

La estabilidad a largo plazo del RNA del SARS-CoV-2 en este estudio refleja el uso potencial de las aguas residuales como indicador de la presencia de este virus en el medio ambiente, lo que lo convierte en una herramienta valiosa para la vigilancia epidemiológica en etapas tempranas y avanzadas de emergencias sanitarias en países en desarrollo y desarrollados (Gerrity *et al.*, 2021; Giraud-Billoud *et al.*, 2021). El uso de la epidemiología basada en aguas residuales es relevante para estimar la prevalencia de COVID-19 en las comunidades debido a la posibilidad de detectar el virus en las aguas residuales antes del estallido de los casos clínicos; Sin embargo, es necesario implementar una estrategia adecuada para el muestreo y las pruebas clínicas. La inclusión de parámetros ambientales para estudios correlacionales y la evaluación o perfeccionamiento de metodologías para mejorar las posibilidades y la sensibilidad para la detección de RNA del SARS-CoV-2 en aguas residuales (Kumar *et al.*, 2020; Randazzo *et al.*, 2020; Sherchan *et al.*, 2020; Thompson *et al.*, 2020). Polo *et al.* (2020) también destacó la importancia de la epidemiología basada en las aguas residuales, considerando varios factores como el muestreo, la recuperación viral y la identificación del RNA viral como clave para informar el efecto indirecto sobre los niveles de RNA en las aguas residuales. En este sentido, es crucial considerar la implementación de QMRA para evaluar el riesgo potencial de SARS-CoV-2 para comprender mejor y prevenir su carga sobre la salud humana (Kitajima *et al.*, 2020).

Carga viral de RNA de SARS-CoV-2 en diferentes matrices ambientales

Se utilizó GraphPad 8.0.1 (Prism) para determinar los valores de vida media (días necesarios para el decaimiento del RNA total), r^2 (ajuste del modelo), RSME (error cuadrático medio de la raíz) y k (constante de la tasa de decaimiento) para cada matriz de agua. Se utilizaron valores k para calcular el T_{90} [tiempo requerido para lograr una reducción del 90 % (un logaritmo)]. El comportamiento del agua del grifo durante los 62 días del experimento no tuvo un ajuste apropiado (0.1297) para el modelo One-phase decay. Sin embargo, este modelo era adecuado para las otras tres matrices de agua con r^2 de 0.8930 a 0.9240 (Tabla suplementaria 5); el tiempo más rápido para la vida media del RNA del SARS-CoV-2 fue en las aguas residuales del efluente con un promedio de 15 días. Dado que el agua efluente de las plantas de tratamiento tiene tratamientos físicos y químicos antes de ser liberada a la naturaleza, este entorno representa un lugar inhóspito para la detección de RNA viral. La vida media más prolongada de todas las matrices de agua fueron las aguas residuales de influentes con 43 días; esta agua podría considerarse un ambiente difícil para la supervivencia del SARS-CoV-2 y por tanto la detección de RNA viral. Sin embargo, sus características fisicoquímicas dependen enteramente de la población cercana y de las actividades desarrolladas en la comunidad. Debido a eso, la detección del RNA viral del SARS-CoV-2 podría variar de una comunidad a otra. Curiosamente, hasta la finalización del experimento (62 días), el agua efluente requirió alrededor de 50 días para la reducción de un logaritmo; Mientras tanto, el agua influente requiere 143 días en promedio para la misma reducción. El agua de mar tiene parámetros fisicoquímicos diferentes a las otras matrices de agua; sin embargo, tiene una tasa de decaimiento similar a la del agua de influente con una vida media de 32, 23 días y una T_{90} de 107 días.

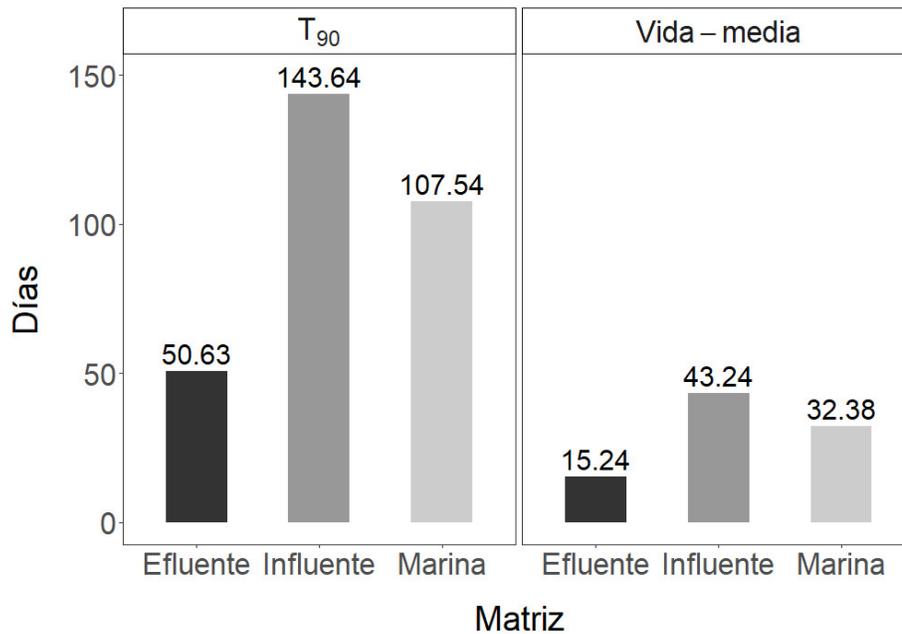


Figura 2. Decaimiento de la carga viral de RNA de SARS-CoV-2 en matrices acuáticas ambientales, se presentan valores de vida media y T_{90} para cada una de las matrices. r^2 para el análisis de decaimiento de una fase del efluente, influente y agua de mar fue de 0.89, 0.92 y 0.89 respectivamente.

En este estudio, demostramos con éxito las diferentes cinéticas de detección de RNA del SARS-CoV-2 en diferentes matrices de agua donde se demostró que la dinámica del SARS-CoV-2 tiene el potencial de ser utilizada como una herramienta de monitoreo. Sin embargo, nuestro estudio se limita a las condiciones controladas en el entorno del laboratorio. Por lo tanto, se necesita más información sobre las otras variables ambientales que podrían afectar la detección del RNA del SARS-CoV-2. A este respecto, Ahmed *et al.* (2020) evaluó la desintegración del SARS-CoV-2 bajo diferentes temperaturas (4, 15, 25 y 37 °C); sus resultados sugieren que la temperatura es un factor esencial para la estabilidad y descomposición del SARS-CoV-2 en muestras de agua como aguas residuales no tratadas, aguas residuales esterilizadas en autoclave y agua del grifo. A pesar de las limitaciones de nuestro estudio, los resultados nos permiten dar a entender que las aguas residuales son una matriz esencial para la vigilancia del material genético viral para WBE, ampliamente estudiada en los últimos años como producto de la emergencia sanitaria de COVID-19 por SARS-CoV-2 (Ahmed *et al.*, 2020; Gerrity *et al.*, 2021). Sin embargo, la detección del RNA viral del SARS-CoV-2 no puede relacionarse con la integridad estructural del virus, más aún, algunos estudios demuestran la ausencia de efectos citopáticos en cultivo celular cuando se expone al SARS-CoV-2 aislado de aguas residuales y ríos (Rimoldi *et al.*, 2020), en algunos casos detectando la descomposición en la infectividad después de solo 4 h, también se ha encontrado

que esta velocidad de proceso depende de la matriz de agua en la que está presente el SARS-CoV-2 (Sala-Comorera *et al.*, 2021). Sin embargo, en una matriz de agua menos dura, como el agua del grifo, es posible encontrar partículas virales infecciosas del SARS-CoV-2 durante 35 días (Fukuta *et al.*, 2021); Se necesitan más estudios para aplicar el cultivo celular y la microscopía para determinar su potencial infectivo de las partículas virales aisladas en este estudio.

Conclusiones

En este estudio, demostramos la estabilidad y cinética de la detección de RNA del SARS-CoV-2 en diferentes matrices de agua. El efecto de los factores ambientales en la capacidad de supervivencia del SARS-CoV-2 en ambientes acuáticos puede ayudar en el análisis de riesgos y la planificación de la infraestructura de saneamiento. Las duras condiciones del agua de mar y las aguas residuales limitan la recuperación del RNA del SARS-CoV-2, mientras que, en el agua del grifo, el material genético viral permaneció durante más tiempo. La vigilancia del agua de mar y las aguas residuales para el SARS-CoV-2 puede ser un indicador principal de la dinámica de la carga de COVID-19 o su posible reaparición en una comunidad y servir como una herramienta para la epidemiología basada en el agua, especialmente donde los recursos son limitados. La alta estabilidad del RNA del SARS-CoV-2 en varias matrices de agua es valiosa como herramienta para la vigilancia viral, pero también para estudios de QMRA ya que los datos implican estas aguas como rutas viables de diseminación y posiblemente transmisión del SARS-CoV-2.

Contribución de los autores

Lira-Morales Juan Daniel: Conceptualización experimental, metodología, análisis de datos, redacción del manuscrito. Medrano-Félix José Andrés: Conceptualización experimental, metodología, análisis de datos, redacción del manuscrito. Nohelia Castro-del Campo: Conceptualización experimental, revisión de manuscritos, formato. Chaidez-Quiroz Cristóbal: Administrador del proyecto, revisión de manuscritos, formato. Todos los autores de este manuscrito han leído y aprobado el manuscrito.

Financiamiento

Los autores quieren agradecer al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo económico a este estudio, Beca número 313522

Agradecimientos

Los autores quieren reconocer la colaboración de Vianey Araceli Verdugo Arredondo, Irvin González López y Jean Pierre González Gómez en el trabajo experimental.

Conflicto de interés

Los autores no declaran ningún conflicto de intereses.

Tablas y Figuras Complementarias

Tabla suplementaria 1. Detección del RNA de SARS-CoV-2 por RT-PCR en tiempo real en diferentes matrices acuáticas

Tiempo (h)	Días (d)	Matriz acuática			
		Marina	Influyente	Efluente	Potable
0	0	+	+	+	+
120	5	+	+	+	+
216	9	+	+	+	+
480	20	+	+	+	+
816	34	+	+	+	+
1,152	48	+	+	+	+
1,488	62	+	+	+	+

(-): Sin detección de ARN de SARS-CoV-2, (+): Detección de ARN de SARS-CoV-2.

Tabla suplementaria 2. Valores P del ANOVA (Análisis de varianza) de dos vías del Ln(Ct/C0) con comparación de medias de Tukey (n=3)

Tabla ANOVA	SS	DF	MS	F (DFn, DFd)	Valor P
Interacción	74.7	18	4.15	F (18, 48) = 91.02	P<0.0001
Días	184.7	6	30.78	F (4,449, 35.59) = 675.1	P<0.0001
Matriz acuática	69.02	3	23.01	F (3, 8) = 108.7	P<0.0001
Sujeto	1.693	8	0.2116	F (8, 48) = 4.642	P=0.0003
Residuos	2.188	48	0.04559		

Tabla suplementaria 3. Comparaciones de Tukey del factor principal días.

Comparaciones múltiples de Tukey	Dif. medias	95.00% IC de dif.	¿Significancia?	Resumen	Valor P ajustado
0 vs. 5	0.1892	-0.3069 a 0.6853	No	ns	0.813
0 vs. 9	0.9394	-0.01485 a 1.894	No	ns	0.0546
0 vs. 20	2.11	0.8951 a 3.325	Si	***	0.001
0 vs. 34	2.677	0.8702 a 4.484	Si	**	0.0035
0 vs. 48	4.063	2.078 a 6.049	Si	***	0.0002
0 vs. 62	3.515	1.443 a 5.587	Si	**	0.0012
5 vs. 9	0.7502	0.1394 a 1.361	Si	*	0.0139
5 vs. 20	1.921	0.4134 a 3.428	Si	*	0.0108
5 vs. 34	2.488	0.6354 a 4.341	Si	**	0.0074
5 vs. 48	3.874	1.855 a 5.894	Si	***	0.0004
5 vs. 62	3.326	1.323 a 5.328	Si	**	0.0014
9 vs. 20	1.171	-0.5908 a 2.932	No	ns	0.2969
9 vs. 34	1.738	-0.2044 a 3.680	No	ns	0.0899
9 vs. 48	3.124	0.9043 a 5.344	Si	**	0.0052
9 vs. 62	2.576	0.4522 a 4.699	Si	*	0.0151
20 vs. 34	0.5671	-0.5540 a 1.688	No	ns	0.5738
20 vs. 48	1.953	0.6091 a 3.298	Si	**	0.0041
20 vs. 62	1.405	-0.2135 a 3.023	No	ns	0.104
34 vs. 48	1.386	0.7506 a 2.022	Si	***	0.0001
34 vs. 62	0.8377	0.1055 a 1.570	Si	*	0.0222
48 vs. 62	-0.5485	-1.102 a 0.005280	No	ns	0.0527

Tabla suplementaria 4. Comparaciones de Tukey del factor principal matiz acuática.

Comparaciones múltiples de Tukey	Dif. medias	95.00% IC de dif.	¿Significancia?	Resumen	Valor P ajustado
0					
5					
Efluente vs. Influyente	0.5922	-0.2612 a 1.446	No	ns	0.105
Efluente vs. Marina	1.201	0.2531 a 2.150	Si	*	0.0236
Efluente vs. Potable	0.4036	-0.3802 a 1.187	No	ns	0.2067
Influyente vs. Marina	0.6093	-0.5756 a 1.794	No	ns	0.1778
Influyente vs. Potable	-0.1886	-0.4457 a 0.06861	No	ns	0.1163
Marina vs. Potable	-0.7978	-1.915 a 0.3194	No	ns	0.1012
9					
Efluente vs. Influyente	-0.1226	-1.202 a 0.9569	No	ns	0.9533
Efluente vs. Marina	1.986	0.6146 a 3.357	Si	*	0.0148
Efluente vs. Potable	0.3444	-0.7645 a 1.453	No	ns	0.6192
Influyente vs. Marina	2.108	0.7092 a 3.507	Si	*	0.0163
Influyente vs. Potable	0.467	-0.4596 a 1.394	No	ns	0.2915
Marina vs. Potable	-1.641	-2.995 a -0.2873	Si	*	0.0278
20					
Efluente vs. Influyente	-1.632	-3.081 a -0.1817	Si	*	0.0388
Efluente vs. Marina	-2.199	-3.528 a -0.8687	Si	*	0.0143
Efluente vs. Potable	-3.046	-4.270 a -1.822	Si	**	0.0025
Influyente vs. Marina	-0.567	-1.065 a -0.06883	Si	*	0.034
Influyente vs. Potable	-1.414	-2.351 a -0.4775	Si	*	0.0184
Marina vs. Potable	-0.8471	-1.708 a 0.01334	No	ns	0.0522
34					
Efluente vs. Influyente	-1.086	-2.076 a -0.09517	Si	*	0.0418
Efluente vs. Marina	-0.7155	-1.502 a 0.07083	No	ns	0.0669
Efluente vs. Potable	-4.367	-5.213 a -3.521	Si	***	0.0001
Influyente vs. Marina	0.3701	-0.4515 a 1.192	No	ns	0.2181
Influyente vs. Potable	-3.281	-4.286 a -2.276	Si	**	0.0046
Marina vs. Potable	-3.651	-4.446 a -2.857	Si	***	0.0002

Continuación

Tabla suplementaria 4. Comparaciones de Tukey del factor principal matiz acuática.

Comparaciones múltiples de Tukey	Dif. medias	95.00% IC de dif.	¿Significancia?	Resumen	Valor P ajustado
48					
Efluente vs. Influyente	0.09641	-1.989 a 2.182	No	ns	0.9872
Efluente vs. Marina	-0.7748	-1.296 a -0.2541	Si	*	0.0182
Efluente vs. Potable	-4.394	-5.084 a -3.704	Si	***	0.0001
Influyente vs. Marina	-0.8712	-2.767 a 1.024	No	ns	0.2387
Influyente vs. Potable	-4.491	-6.296 a -2.685	Si	**	0.0054
Marina vs. Potable	-3.619	-4.239 a -3.000	Si	***	0.0001
62					
Efluente vs. Influyente	0.4389	-0.9070 a 1.785	No	ns	0.5942
Efluente vs. Marina	0.3439	-0.9178 a 1.605	No	ns	0.6856
Efluente vs. Potable	-4.136	-5.390 a -2.882	Si	**	0.001
Influyente vs. Marina	-0.09508	-1.318 a 1.127	No	ns	0.9864
Influyente vs. Potable	-4.575	-5.784 a -3.367	Si	***	0.0006
Marina vs. Potable	-4.48	-5.471 a -3.490	Si	***	0.0002

Tabla suplementaria 5. Decaimiento de la carga viral de SARS-CoV-2 en matrices acuáticas crudas

	Efluente	Influyente	Marina
K [95%IC]	0.0461 [0.025 a 0.071]	0.0196 [0.003 a 0.0372]	0.0215 [0.0004 a 0.0473]
Vida media [95%IC]	15.01 [9.724 a 27.53]	35.36 [18.62 a 180.5]	32.23 [14.64 a 1403]
r²	0.8930	0.9240	0.8959
RSME	0.7806	0.6386	0.5637
Días T₉₀	49.85	117.47	107.09

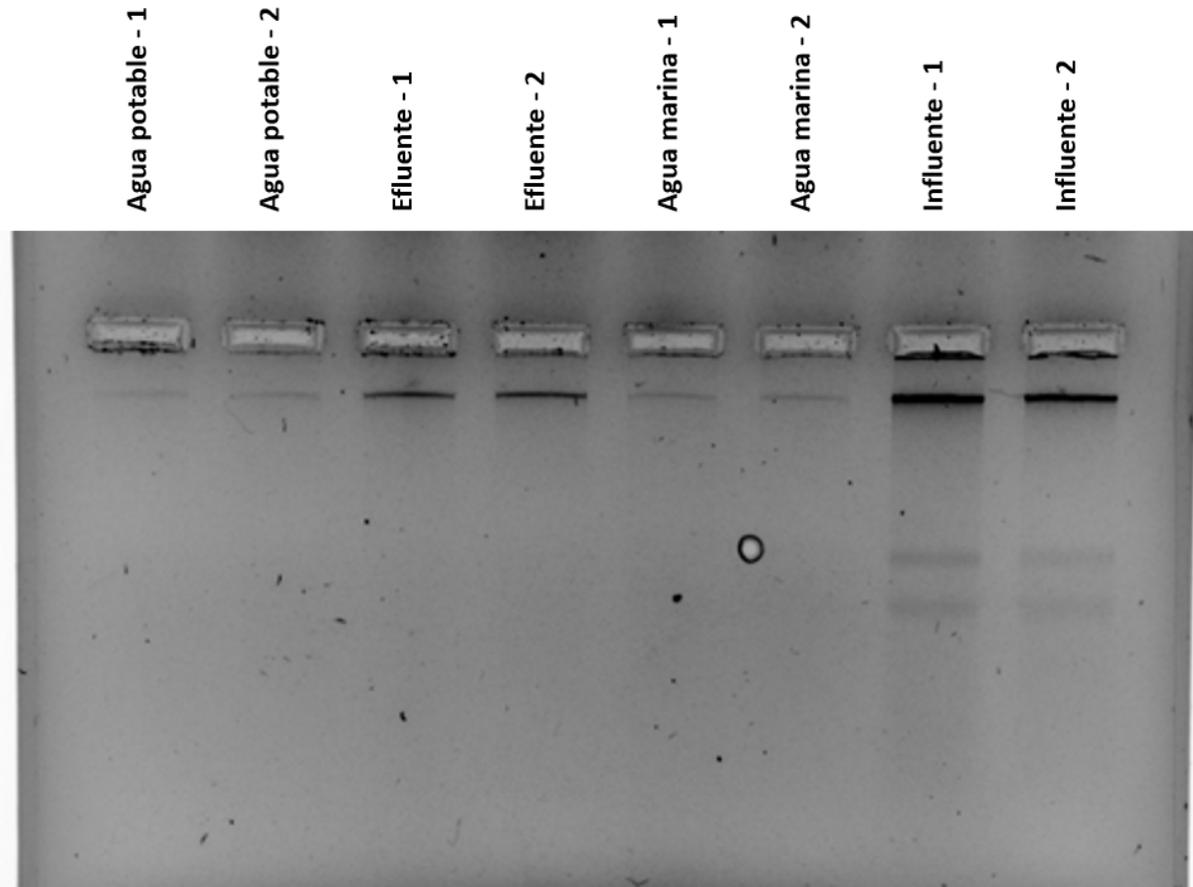


Figura suplementaria 1. Gel de integridad en condiciones desnaturalizantes del RNA extraído por el sistema TACO™ Nucleic Acid Automatic Extraction. Gel de agarosa al 2%, 50 V por 60 min

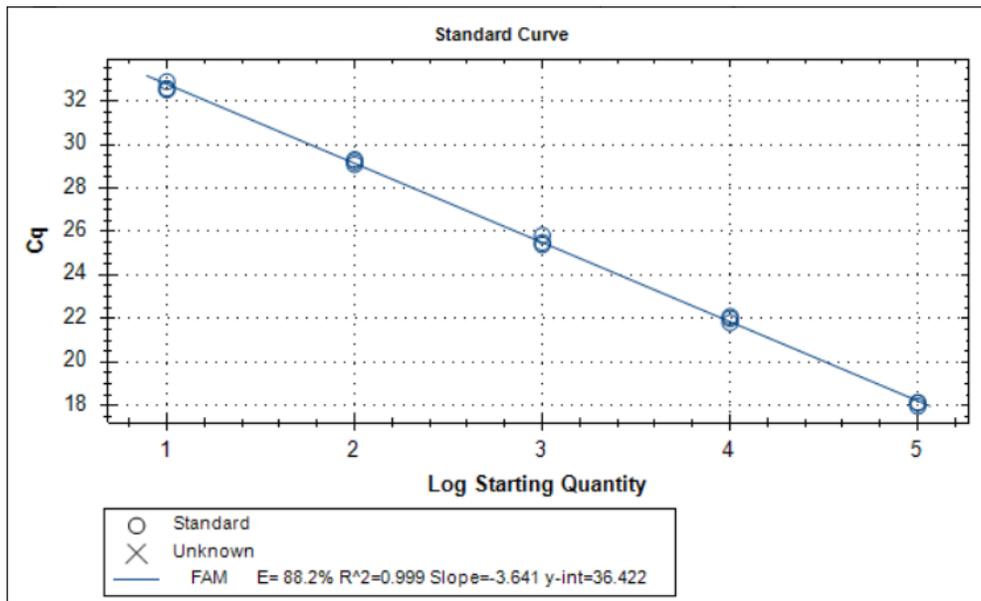


Figura suplementaria 2. Curva estándar empleada para la cuantificación de SARS-CoV-2 en diferentes matrices acuáticas

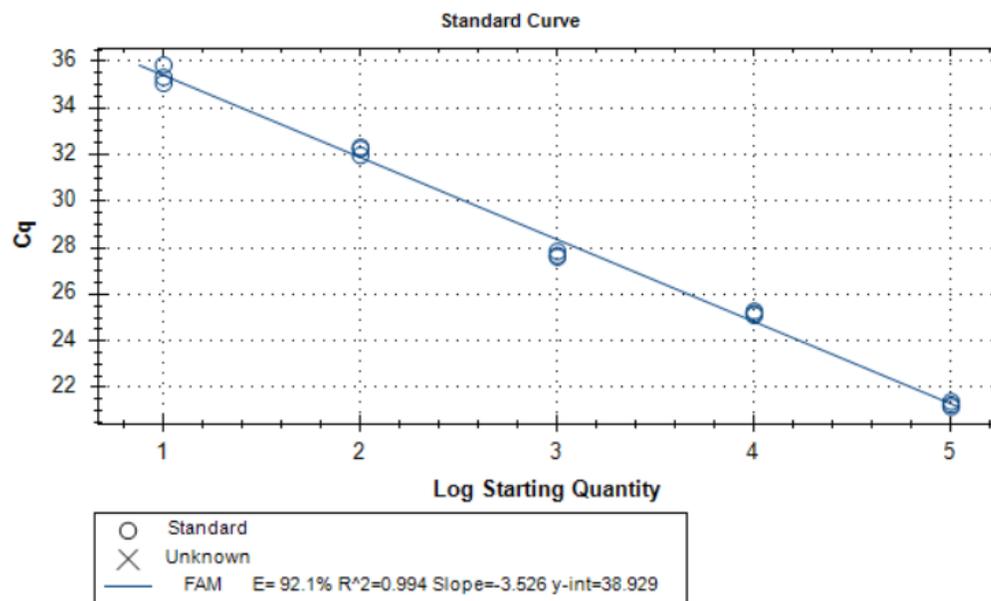


Figura suplementaria 3. Curva estándar empleada para la cuantificación de SARS-CoV-2 en diferentes matrices acuáticas

Referencias

- Aguiar-Oliveira, M.L., Campos, A., Matos, A.R., Rigotto, C., Sotero-Martins, A., Teixeira, P., & Siqueira, M.M. (2020). Wastewater-based epidemiology (WBE) and viral detection in polluted surface water: A valuable tool for COVID-19 surveillance-A brief review. *International Journal of Environmental Research Public Health* 2020, 17(24), 9251. <https://doi.org/10.3390/ijerph17249251>
- Ahmed, W., Bertsch, P.M., Bibby, K., Haramoto, E., Hewitt, J., Huygens, F., Gyawali, P., Korajkic, A., Ridell, S., Sherchan, S.P., Simpson, S.L., Sirikanachana, K., Symonds, E.M., Verhagen, R., Vasani, S.S., Kitajima, M., & Bivins, A. (2020). Decay of SARS-CoV-2 and surrogate murine hepatitis virus RNA in untreated wastewater to inform application in wastewater-based epidemiology. *Environmental Research*, 191, 110092. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2020.110092>
- Basavaraju, S., Aswathanarayan, J.B., Basavegowda, M., & Somanathan, B. (2021). Coronavirus: Occurrence, surveillance and persistence in wastewater. *Environmental Monitoring and Assessment*, 193, 508. <https://doi.org/10.1007/s10661-021-09303-8>
- Bivins, A., Greaves, J., Fischer, R., Yinda, K. C., Ahmed, W., Kitajima, M., Munster, V.J., & Bibby, K. (2020). Persistence of SARS-CoV-2 in Water and Wastewater. *Environmental Science & Technology Letters*, 7(12), 937-942. <https://doi.org/10.1021/acs.estlett.0c00730>
- Chia, P. Y., Coleman, K. K., Tan, Y. K., Ong, S. W. X., Gum, M., Lau, S. K., Lim X.F., Lim A.S., Sutjipto, S., Lee, P.H., Son, T.T., Young, B.E., Milton, D.K., Gray, G.C., Schuster, S., Barkham, T., De, P.P., Vasoo, S., Chan, M., Peng Ang, B.S., & Marimuthu, K. (2020). Detection of air and surface contamination by SARS-CoV-2 in hospital rooms of infected patients. *Nature Communications*, 11(1), 2800. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-16670-2>
- De Rijcke, M., Shaikh, H.M., Mees, J., Nauwynck, H., & Vandegehuchte, M.B. (2021). Environmental stability of porcine respiratory coronavirus in aquatic environments. *Plos One*, 16(7): e0254540. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0254540>
- Fukuta, M., Mao, Z. Q., Morita, K., & Moi, M. L. (2021). Stability and Infectivity of SARS-CoV-2 and Viral RNA in Water, Commercial Beverages, and Bodily Fluids. *Frontiers in Microbiology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.667956>
- Gerrity, D., Papp, K., Stoker, M., Sims, A., & Frehner, W. (2021). Early-pandemic wastewater surveillance of SARS-CoV-2 in Southern Nevada: Methodology, occurrence and incidence/prevalence considerations. *Water Research X*, 10, 100086. <https://doi.org/10.1016/j.wroa.2020.100086>
- Giraud-Billoud, M., Cuervo, P., Altamirano J.C., Pizarro, M., Aranibar, J.N., Catapano, A., Cuello, H., Masachessi G., & Vega, I.A. (2021). Monitoring SARS-CoV-2 RNA in wastewater as an epidemiological tool in Mendoza, Argentina. *Science of the Total Environment*, 796, 148887. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.148887>
- Grant, M. C., Geoghegan, L., Arbyn, M., Mohammed, Z., McGuinness, L., Clarke, E. L., & Wade, R. G. (2020). The prevalence of symptoms in 24,410 adults infected by the novel coronavirus (SARS-CoV-2; COVID-19): A systematic review and meta-analysis of 148 studies from 9 countries. *PLoS One*, 15(6), e0234765. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0234765>
- 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>
- Kim, J.M., Kim, H.M., Lee, E.J., Jo, H.J., Yoon, Y., Lee, N.J., Son, J., Lee, Y.J., Kim, M.S., Lee, Y.P., Chae, S.J., Park, K.R., Cho, S.R., Park, S., Kim, S.J., Wang, E., Woo, S., Lim, A., Park, S.J., & Jang, J. (2020). Detection and isolation of SARS-CoV-2 in serum, urine and stool specimens of COVID-19 patients from the republic of Korea. *Osong Public Health and Research Perspectives*, 11(3),112-117. <https://doi.org/10.24171/j.phrp.2020.11.3.02>
- Kitajima, M., Ahmed, W., Bibby K., Carducci, A., Gerba, C.P., Hamilton K.A., Haramoto, E., & Rose, J.B. (2020). SARS-CoV-2 in wastewater: State of the knowledge and research needs. *Science of the Total Environment*, 739, 139076. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.139076>
- Kumar, M., Kumar Patel, A., Shah, A.V., Raval, J., Rajpara, N., Joshi, M., & Joshi C. (2020). First proof of the capability of wastewater surveillance for COVID-19 in India through detection of genetic material of SARS-CoV-2. *Science of the Total Environment*, 746,141326. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.141326>
- Lednicky, J. A., Lauzardo, M., Fan, Z. H., Jutla, A., Tilly, T. B., Gangwar, M., Uzmani, M., Shankar, S., Mohamed, K., Eirguen-Fernandez, A., Stephenson, C.J., Alam., M., Elbadry, E., Loeb, J, Subramanian, K., Waltzek, T., Cherabuddi, Morris Jr, G., & Wu, C.-Y. (2020). Viable SARS-CoV-2 in the air of a hospital room with COVID-19 patients. *International Journal of Infectious Diseases*, 100, 476-482. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2020.09.025>
- Li, G., Fan, Y., Lai, Y., Han, T., Li, Z., Zhou, P., Wang, P.P, Hu, D., Liu, X., Zhang, Q., & Wu, J. (2020). Coronavirus infections and immune responses. *Journal of Medical Virology*, 92(4), 424-432. <https://doi.org/10.1002/jmv.25685>
- Liotti, F. M., Menchinelli, G., Marchetti, S., Morandotti, G. A., Sanguinetti, M., Posteraro, B., & Cattani, P. (2021). Evaluation of three commercial assays for SARS-CoV-2 molecular detection in upper respiratory tract samples. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 40(2), 269-277. <https://doi.org/10.1007/s10096-020-04025-0>
- Mitic, V., Lazovic, G., Milosevic, D., Ristanovic, E., Simeunovic, D., Tsay, C., Milosevic, M., & Vlahovic, C. (2021). Brownian fractal nature coronavirus motion. *Modern Physics Letters B*, 35 (4), 2150076. <https://doi.org/10.1142/S0217984921500767>
- Mordecai, G.J., & Hewson, I. (2020). Coronaviruses in the sea. *Frontiers in Microbiology*, 11,1975. <https://doi: 10.3389/fmicb.2020.01795>
- Pasquarella, C., Colucci, M. E., Bizzarro, A., Veronesi, L., Affanni, P., Meschi, T., Brianti,E., Vitali, P., & Albertini, R. (2020). Detection of SARS-CoV-2 on hospital surfaces. *Acta bio-medica: Atenei Parmensis*, 91(9-S), 76-78. <https://doi: 10.23750/abm.v91i9-S.10137>
- Polo, D., Quintela-Baluja, M., Corbishley, A., Jones, D.L., Singer, A.C., Graham, D.W., & Romalde, J.L. (2020). Making waves: Wastewater-based epidemiology for COVID-19-approaches and challenges for surveillance and prediction. *Water Research*, 186,116404. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2020.116404>
- Randazzo, W., Truchado, P., Cuevas-Ferrando, E., Simón, P., Allende, & Sánchez, A. (2020). SARS-CoV-2 RNA in wastewater anticipated COVID-19occurrence in a low prevalence area. *Water Research*, 181,115942. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2020.115942>
- Razzini, K., Castrica, M., Menchetti, L., Maggi, L., Negroni, L., Orfeo, N. V., Pizziccheri, A., Stocco, M., Muttini, S., & Balzaretto, C. M. (2020). SARS-CoV-2 RNA detection in the air and on surfaces in the COVID-19 ward of a hospital in Milan, Italy. *Science of The Total*

- Environment*, 742, 140540. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.140540>
- Rimoldi, S. G., Stefani, F., Gigantiello, A., Polesello, S., Comandatore, F., Mileto, D., Maresca, M., Longobardi, C., Mancon, A., Romeri, F., Pagani, C., Cappelli, F., Roscioli, C., Moja, L., Gismondo, M. R., & Salerno, F. (2020). Presence and infectivity of SARS-CoV-2 virus in wastewaters and rivers. *Science of The Total Environment*, 744, 140911. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.140911>
- Sala-Comorera, L., Reynolds, L.J., Martin, N.A., O'Sullivan, J.J., Meijer W.G., & Fletcher N.F. (2021). Decay of infectious SARS-CoV-2 and surrogates in aquatic environments. *Water Research*, 201, 117090. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2021.117090>
- Sherchan, S.P., Shahin, S., Ward, L.M., Tandukar, S., Aw, T.G., Schmitz, B., Ahmed, W., & Kitajima, M. (2020). First detection of SARS-CoV-2 RNA in wastewater in North America: A study in Louisiana, USA. *Science of the Total Environment*, 743, 140621. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.140621>
- Thompson, J.R., Nancharaiah, Y.V., Gu, X., Lin Lee, W., Rajal, V.B., Haines, M.B., Girones, R., Ching N. L., Alm, E.J., & Wuertz, S. (2020). Making waves: Wastewater surveillance of SARS-CoV-2 for population-based health management. *Water Research*, 184, 116181. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2020.116181>
- World Health Organization (2020a). Novel Coronavirus (2019-nCoV): situation report, 1. Geneva: World Health Organization.
- World Health Organization (2020b). Novel Coronavirus (2019-nCoV): situation report, 22. Geneva: World Health Organization.
- World Health Organization (2021). Classification of Omicron (B.1.1.529): SARS-CoV-2 Variant of Concern.
- World Health Organization (2022). WHO Coronavirus (COVID-19) dashboard. <https://covid19.who.int>. Accession date: January 25th 2023
- Zhou, J., Otter, J. A., Price, J. R., Cimpeanu, C., Meno, D., Kinross, J., Boshier, P.R., Mason, S., Bolt, F., Holmes, A.H., & Barclay, W. S. (2020). Investigating Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) Surface and Air Contamination in an Acute Healthcare Setting During the Peak of the Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) Pandemic in London. *Clinical Infectious Diseases*, 73(7), e1870-e1877. <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa905>