

VII-001 - RT-qPCR para detecção e quantificação do BRSV em águas residuárias: sensibilidade analítica dos ensaio associado aos métodos de concentração baseado em floculação orgânica.

André Vinicius Costa Ribeiro⁽¹⁾

Graduação em Ciências Biológicas, mestre em Tecnologia em Imunobiológicos - MPTI Bio-Mangunhos / Fiocruz e doutorando em Biologia Celular e Molecular do Instituto Oswaldo Cruz / Fiocruz. Tecnologista em Saúde Pública do Departamento de Saneamento e Saúde Ambiental da Escola Nacional de Saúde Pública Sérgio Arouca / Fiocruz.

Camille Ferreira Mannarino⁽²⁾

Graduação em Engenharia Civil, mestrado em Engenharia Ambiental pela Universidade do Estado do Rio de Janeiro, doutorado em Saúde Pública e Meio Ambiente / Fiocruz e pós-doutorado na École Polytechnique Fédérale de Lausanne. Pesquisadora em Saúde Pública do Laboratório de Virologia Comparada e Ambiental do Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz.

Tatiana Prado⁽²⁾

Graduação em Ciências Biológicas pela Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP/SP), doutora em Ciências pelo Instituto Oswaldo Cruz / FIOCRUZ e pós-doutoranda do Laboratório de Vírus Respiratórios, Exantemáticos, Enterovírus e Emergências Virais (LVRE) do Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz/RJ.

Tulio Machado Fumian⁽²⁾

Graduação em Farmácia e Bioquímica pela Universidade Federal Fluminense, mestrado e doutorado em Biologia Celular e Molecular / Fiocruz. Pós-Doutorado na School of Biotechnology and Biomolecular Sciences, University of New South Wales, Sydney, Austrália. Tecnologista em Saúde Pública em Saúde Pública do Laboratório de Virologia Comparada e Ambiental do Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz.

Marize Pereira Miagostovich⁽²⁾

Graduação em Genética pela Universidade Federal do Rio de Janeiro, mestrado e doutorado em Biologia Parasitária / Fiocruz e pós-doutorado pela Universidade de Barcelona. Pesquisadora em Saúde Pública do Laboratório de Virologia Comparada e Ambiental do Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz.

Endereço⁽¹⁾: Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca, Fundação Oswaldo Cruz. Av. Brasil, 4365, Manguinhos, Rio de Janeiro, CEP 21040-360, Brazil. ribeiro.avc75@gmail.com

(2): Laboratório de Virologia Comparada e Ambiental, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz. Av. Brasil, 4365, Manguinhos, Rio de Janeiro, CEP 21040-360, Brazil.

RESUMO

A epidemiologia baseada em águas residuais tornou-se uma importante ferramenta para monitorar a disseminação do vírus causador da síndrome respiratória aguda grave o SARS-CoV-2 em uma comunidade. Todavia, ainda não existe concordância sobre a melhor metodologia de concentração viral para permitir a detecção confiável de SARS-CoV-2, considerando diferentes instalações laboratoriais. Este estudo se propôs a avaliar a metodologia de concentração viral baseada na floculação orgânica por leite desnatado (SMF) frente ao método de ultracentrifugação (ULT). A sensibilidade analítica (limites de detecção e quantificação [LoD/LoQ]) de ambos os métodos foi avaliada usando um vírus sincicial respiratório bovino (BRSV) como substituto. Três abordagens diferentes foram conduzidas para estabelecer o LoD com resultados semelhantes observados para o ensaio LoD baseado na curva padrão e no controle interno; LoQ, valores menores que 5 logs foram observados para o método ULT comparado ao SMF. Posteriormente, analisamos a detecção do SARS-CoV-2 em amostras de águas residuais. A detecção de SARS-CoV-2 em águas residuais naturalmente contaminadas revelou 100% (12/12) e 25% (3/12) de detecção usando SMF e ULT com quantificação

variando de 5,06 a 5,46 log₁₀ cópia do genoma/litro (GC/L) e 5,2 a 7,2 log₁₀ GC/L, respectivamente. O resultado obtido por nossa pesquisa evidencia a importância da avaliação dos métodos utilizados; no entanto, análises adicionais devem ser realizadas para melhorar as metodologias de concentração de baixo custo, essenciais para uso em países de baixa renda e em desenvolvimento.

PALAVRAS-CHAVE: SARS-CoV-2, floculação orgânica por leite desnatado, ultracentrifugação, eficiência de recuperação e limite de detecção.

INTRODUÇÃO

Em janeiro de 2020, o mundo foi surpreendido pela declaração da Organização Mundial da Saúde de um surto de uma síndrome respiratória aguda grave causada por um novo beta-coronavírus, o coronavírus-2 (SARS-CoV-2), anunciando assim o início da pandemia global da doença de coronavírus 2019 (COVID-19). Embora a transmissão do SARS-CoV-2 seja principalmente por gotículas respiratórias^{1,2}, sabe-se que pacientes infectados pelo SARS-CoV-2 eliminam partículas virais nas fezes antes, durante e após o surgimento dos sintomas da COVID-19, permanecendo por alguns dias a várias semanas³⁻⁵.

Com base nesse conhecimento, estudos demonstraram a utilidade da epidemiologia baseada em águas residuárias (WBE – wastewater based epidemiology) como uma ferramenta complementar aos testes clínicos, fornecendo dados ambientais para alertar precocemente o aumento na transmissão do vírus em uma determinada comunidade⁶⁻¹². Apesar da diversidade de protocolos disponíveis realizados nesses estudos, ainda não há consenso sobre qual metodologia deve ser utilizada para concentrar e detectar SARS-CoV-2 de amostras de águas residuárias. A alta complexidade da matriz associada à sensibilidade analítica que envolve uma sequência de etapas que podem interferir diretamente na detecção e quantificação viral¹³. Neste cenário, em 2021, a Organização Pan-Americana da Saúde publicou um guia técnico recomendando diferentes métodos de concentração para laboratórios da América Latina¹⁴. Apresentado como método alternativo, de baixo custo, a floculação orgânica por leite desnatado (SMF – skimmed milk flocculation) é uma metodologia utilizada com sucesso na recuperação de vírus entéricos em diferentes matrizes ambientais, incluindo águas residuárias^{12,15-20}. No entanto, a detecção de vírus envelopados, como o SARS-CoV-2, que pode ser mais facilmente degradado, é uma questão a ser observada. Neste contexto, o vírus sincicial respiratório bovino (BRSV) tem sido utilizado como modelo, uma vez que seu genoma consiste em uma molécula de RNA de fita simples, com um envelope em sua estrutura^{11,13}.

Este estudo teve como objetivo comparar os resultados de detecção viral obtidos pela metodologia de SMF com os resultados de ULT, determinando os limites de detecção (LoD), por meio de três abordagens diferentes^{13,21}, bem como o limite de quantificação (LoQ) e a eficiência de recuperação de ambos os métodos usando BRSV como um vírus substituto e controle interno^{7,13,21-23}. Adicionalmente, buscamos avaliar a detecção de SARS-CoV-2 de amostras de águas residuais naturalmente contaminadas.

MATERIAIS E MÉTODOS

Amostras de águas residuárias brutas foram coletadas em 12 pontos de esgotamento sanitário da cidade de Niterói. A coleta foi realizada de forma composta, com volume total de um litro (100 mL h-1), no período de janeiro de 2021. Um pool de três litros de esgoto contendo 250 ml de cada ponto de coleta foi preparado para ensaios experimentais de LoD/LoQ.

As amostras foram inoculadas com suspensão de BRSV preparada a partir da vacinal INFORCE 3 para bovinos (Zoetis - Parsippany, NJ, EUA), seguindo recomendação do fabricante. Cada amostra recebeu um inóculo de 500 µL de suspensão BRSV contendo 10⁷ genômicas/microlitros (GC/µL). Após preparo, a solução foi quantificada e alíquotas de 1 mL foram armazenadas (-20) °C até o uso.

As concentrações das amostras foram realizadas segundo o método baseado na adsorção orgânica da partícula viral utilizando leite desnatado ¹⁶ e na sedimentação das partículas por ultracentrifugação ²⁴, descritas anteriormente.

O ácido nucleico viral foi extraído utilizando o kit QI-Aamp®Viral RNA Mini (QIAGEN, CA, EUA) em sistema automático QIAcube® (QIAGEN), conforme indicação do fabricante.

Os iniciadores e sonda utilizados para detecção e quantificação do BRSV e SARS-CoV-2 foram baseados protocolo descrito anteriormente ^{25,26}, utilizando a região conservada do gene N e N2 como alvo de amplificação, respectivamente. A reação de RT-qPCR foi realizada no equipamento 7500 Real-Time PCR System. Informações das reações de RT-pPCR estão contidas na Tabela 1.

Tabela 1. Iniciadores, sondas e parâmetros de ciclagem para ensaio RT-qPCR utilizados no estudo.

Alvo	Iniciador / sonda (5'→3')	Referência	Concentração final (nM)	Parâmetro de ciclagem RT-qPCR
SARS-CoV-2 N2	Forward primer (TTACAAACATTGGCCGCAAA)	Lu e colaboradores ²⁶ (protocolo CDC)	500	30' 50 °C;
	Reverse primer (GCGCGACATTCCGAAGAA)		500	10' 95 °C;
	Probe (FAM-ACAATTTGCCCCAGCGCTTCAG-Black Hole Quencher 1)		125	45 ciclos: 15'' 95 °C 30'' 55 °C
BRSV N	Forward primer (BRSV-F) (GCAATGCTGCAGGACTAGGTATAAT)	Boxus e colaboradores ²⁵	400	30' 50 °C;
	Reverse primer (BRSV-R) (ACACTGTAATTGATGACCCCATCT)		400	10' 95 °C;
	Probe (BRSV-P) (FAM- ACCAAGACTTGTATGATGCTGCCAAAGCA- TAMRA)		200	40 ciclos: 15'' 95 °C 30'' 60 °C

As quantificações dos RNAs do BRSV e SARS-Cov-2 foram estimadas por meio de curva padrão, na qual foram utilizadas diluições seriadas de 10 vezes, com cópias variando de 10⁰ a 10⁶ GC/µL e 10¹ a 10⁵ GC/µL, respectivamente, de um fragmento de DNA de fita dupla (gBlock Gene Fragment, Integrated DNA

Technologies) contendo a sequência da região de amplificação alvo específica. As amostras foram consideradas positivas quando pelo menos dois dos quatro poços (diluídos e não diluídos) apresentaram valor de limiar de ciclo (Ct – cycle threshold) inferior a 40.

O LoD foi definido como o menor número de cópias genômicas (GC) de um determinado alvo capaz de gerar um resultado positivo na reação RT-qPCR em pelo menos 95% réplicas enquanto LoQ foi estabelecido como a menor quantidade de detecção e quantificação com precisão e exatidão, com variabilidade e coeficiente de variação (CV) pré-definidos < 25%^{22,27}.

Para estabelecer a LoD foram realizadas três abordagens diferentes, sendo: i) ensaio determinado pela curva padrão (ALoDcp) - com base na diluição seriada de 10 vezes da curva padrão utilizada ($1,6 \times 10^2$ a 10^6 GC/ μ L); ii) ensaio pela diluição seriada do controle interno (ALoDci) – com concentrações de 10^0 a 10^7 GC/ μ L e; iii) ensaio baseado após todo processamento da amostra (PLoD)^{13,21}.

Os valores calculados para PLoD e LoQ foram obtidos avaliando os resultados realizados em triplicata (A, B e C). Para cada réplica, alíquotas foram inoculadas com 500 μ L do inóculo de BRSV, sendo então realizada a diluição seriada de 10 vezes. ALoDsc, ALoDic e PLoD foram estimados usando um modelo de regressão logística (Equação p). Foi possível identificar a concentração em que a probabilidade de resposta positiva era de pelo menos 95%.

$$p = \frac{L}{L + e^{-k \cdot (\log GC/\mu L)}}$$

O LoQ foi determinado seguindo um modelo previamente proposto²⁸. Para os dados gerados foi considerada a distribuição de probabilidade do tipo log-normal, onde o coeficiente de variação (CV) (geométrico) foi baseado no desvio padrão (DP) das concentrações em base logarítmica, conforme equação CV.

$$CV = \sqrt{e^{(SD(\ln(CG/\mu L)))^2} - 1}$$

Onde: p = probabilidade de respostas positivas; L = constante de proporcionalidade; e = número de Euler; K = taxa de inflexão do modelo; ($\log GC/\mu L$) = concentração (número de cópias genômicas/ microlitro); DP = desvio padrão; $\ln (CG/\mu L)$ = logaritmo natural de concentrações.

A eficiência de recuperação (%) foi calculada de acordo com a equação E.

$$E (\%) = \frac{\text{number of } \frac{GC}{mL} \text{ of BRSV after concentration}}{\text{number of } \frac{GC}{mL} \text{ of spiked BRSV}} \times 100$$

Por meio do software Microsoft Excel (2013) estabelecemos os modelos matemáticos para determinar os valores de ALoDcp, ALoDci, PLoD e LoQ. No entanto, para análise estatística descritiva, teste Mann Whitney e elaboração das figuras utilizamos o software GraphPad Prism v 9.3.0 206 (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA). O nível de significância utilizado para os testes estatísticos foi $\alpha = 0,05$.

RESULTADOS

Determinação LoD/LoQ

Alíquotas das amostras foram avaliadas quanto a ocorrência de contaminação natural por BRSV. Não foi detectado nenhum sinal de RNA do BRSV, demonstrando a ausência do vírus nas amostras ambientais coletadas.

A seguir, a sensibilidade analítica do ensaio RT-qPCR foi avaliada pelos valores estabelecidos para ALoDsc e ALoDic com ambos os resultados apresentando a mesma ordem de magnitude (10^2 GC/ μ L) com valores médios de $6,6 \times 10^2$ GC/ μ L e $1,7 \times 10^2$ GC/ μ L, respectivamente. Os resultados obtidos para PLoD revelaram ULT com valores médios quatro logs menores quando comparados ao método SMF. A determinação ULT LoQ mostrou uma média de $1,86 \times 10^3$ GC/ μ L, enquanto os resultados do SMF mostraram um valor médio de $3,56 \times 10^8$ GC/ μ L. Dados contidos na Tabela 2.

Tabela 2. Avaliação da sensibilidade analítica pela obtenção do limite de detecção (LoD) e quantificação (LoQ) de acordo com os métodos de concentração de floculação de leite desnatado (SMF) e ultracentrifugação (ULT).

	ALoDsc ¹ (GC/ μ L)	ALoDic ² (GC/ μ L)	PLoD ³ (GC/ μ L)		LoQ ⁴ (GC/ μ L)	
			SMF	ULT	SMF	ULT
A		4.47×10^1	2.14×10^7	1.26×10^3	9.40×10^8	6.06×10^4
B	6.61×10^2	4.27×10^2	7.76×10^6	3.09×10^3	1.05×10^8	1.24×10^4
C		3.72×10^1	8.71×10^6	1.23×10^3	2.44×10^7	3.91×10^5
Mean	6.61×10^2	1.69×10^2	1.26×10^7	1.86×10^3	3.56×10^8	1.55×10^5

Recuperação de controle de processo interno

O BRSV foi detectado em 92% (11/12) das amostras quando concentradas pelo método SMF e 100% (12/12) pelo método ULT. As taxas de recuperação variaram de 0,1 a 5%, média de 2%, para SMF e 12 a 38%, média de 19%, para ULT.

As amostras concentradas por SMF apresentou valores menores variando de 0,9 a 6,6 log₁₀ GC/ μ L $\pm$ 1,6. Por outro lado, a quantificação viral das amostras concentradas por ULT apresentaram concentrações virais variando de 7,4 a 7,9 log₁₀ cópia do genoma/microlitro (GC/ μ L) $\pm$ 0,17 (Figura 1A).

Uma vez estabelecidos os valores de LoD, calculamos a eficiência de recuperação aplicando os limites obtidos por ALoDsc, ALoDic, PLoD (Figuras 1B, 1C e 1D).

Após a aplicação dos valores de corte, o método SMF apresentou diferenças significativas na eficiência de recuperação, variando entre 17% e 33% após o corte feito para os limites obtidos por ALoDsc e ALoDic, respectivamente. No entanto, o método de concentração ULT apresentou o mesmo sucesso de detecção (100%) em todas as avaliações comparativas.

Nenhuma das amostras concentradas por SMF apresentou valores superiores ao limite estabelecido para PLoD. A discrepância dos resultados obtidos entre os métodos de concentração foi confirmada estatisticamente pelo

teste de Mann-Whitney, sendo a significância estatística determinada pelo p-valor, onde: $p < 0,0001$ nos resultados brutos; $p = 0,0011$ obtido após corte por ALoDsc; $p = 0,0220$ para ALoDsc.

Quanto à avaliação da quantificação, 100% (12/12) das amostras concentradas por ULT apresentaram valores superiores ao LoQ, enquanto nenhuma das amostras concentradas por SMF apresentou valores superiores ou iguais ao LoQ.

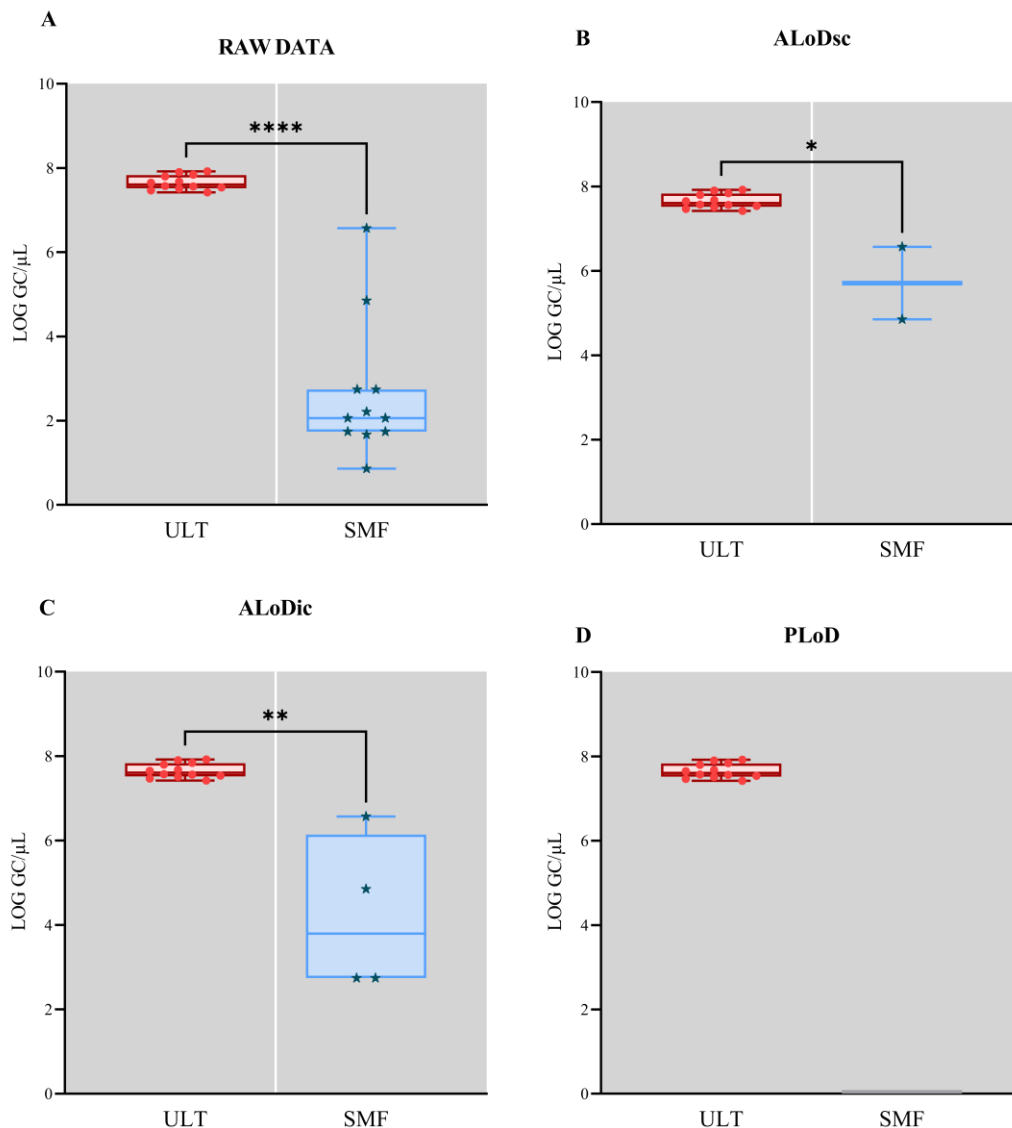


Fig. 1. Box Plot dos resultados da detecção e recuperação do vírus sincicial respiratório bovino para avaliação entre os métodos de concentração viral. Os dados brutos são mostrados na figura A. Os demais resultados estão apresentados nas figuras B, C e D, respectivamente para ALoDsc, ALoDic, PLoD.

Detecção e quantificação de SARS-CoV-2

O SARS-CoV-2 foi detectado em 25% (3/12) quando as amostras foram concentradas usando o SMF e a concentração viral foi de 5,06, 5,08 e 5,46 log₁₀ GC/L $\pm$ 0,2. Todavia, 100% (12/12) das amostras

concentradas por ULT foram positivas, com carga viral variando de 5,2 a 7,2 log₁₀ GC/L $\pm$ 0,6. As amostras detectadas por SMF não correspondem às amostras que apresentaram os maiores valores de quantificação quando concentradas por ULT (6,54, 7,22 e 7,15 log₁₀ GC/L, respectivamente) (Figura 2).

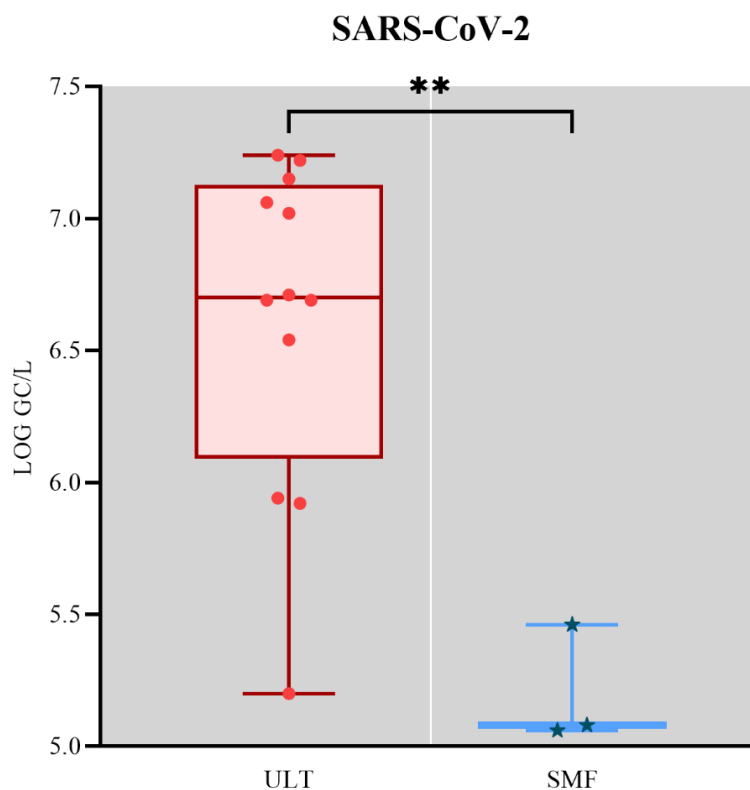


Figura 2. Box Plot dos resultados de detecção e quantificação de SARS-CoV-2 para análise comparativa, demonstrando diferença estatisticamente significativa entre os métodos de concentração ($p = 0,0088$).

CONCLUSÕES

A realização de estudo comparativo da sensibilidade analítica (LoD/LoQ) de método de concentração viral revela a importância da quantificação desses limites usando diferentes abordagens (ALoDsc, ALoDic e PLoD) para avaliar a eficiência de recuperação de um vírus específico em cada matriz, como águas residuárias.

Nosso estudo comparando os protocolos de concentração viral previamente padronizados para vírus entéricos não envelopados ^{16,24} teve como objetivo avaliar seu desempenho na detecção e quantificação de vírus envelopados para que um único protocolo pudesse ser usado em estudos de vigilância ambiental usando águas residuárias como matriz de pesquisa.

Aqui, demonstramos a SMF apresentou menor sensibilidade analítica e eficiência de recuperação para detecção de BRSV em comparação ao ULT, bem como para detectar SARS-CoV-2 em amostras naturalmente contaminadas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Chia PY, Coleman KK, Tan YK, et al. Detection of air and surface contamination by SARS-CoV-2 in hospital rooms of infected patients. *Nat Commun.* 2020;11(1):2800. doi:10.1038/s41467-020-16670-2
2. Liu Y, Ning Z, Chen Y, et al. Aerodynamic analysis of SARS-CoV-2 in two Wuhan hospitals. *Nature.* 2020;582(7813):557-560. doi:10.1038/s41586-020-2271-3
3. Chen Y, Chen L, Deng Q, et al. The presence of SARS-CoV-2 RNA in the feces of COVID-19 patients. *Journal of Medical Virology.* 2020;92(7):833-840. doi:10.1002/jmv.25825
4. Cheung KS, Hung IFN, Chan PPY, et al. Gastrointestinal Manifestations of SARS-CoV-2 Infection and Virus Load in Fecal Samples From a Hong Kong Cohort: Systematic Review and Meta-analysis. *Gastroenterology.* 2020;159(1):81-95. doi:10.1053/j.gastro.2020.03.065
5. Xu Y, Li X, Zhu B, et al. Characteristics of pediatric SARS-CoV-2 infection and potential evidence for persistent fecal viral shedding. *Nat Med.* 2020;26(4):502-505. doi:10.1038/s41591-020-0817-4
6. Smyth DS, Trujillo M, Gregory DA, et al. Tracking cryptic SARS-CoV-2 lineages detected in NYC wastewater. *Nat Commun.* 2022;13(1):635. doi:10.1038/s41467-022-28246-3
7. Ahmed W, Bertsch PM, Bivins A, et al. 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.* 2020;739:139960. doi:10.1016/j.scitotenv.2020.139960
8. Ahmed W, Angel N, Edson J, 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. doi:10.1016/j.scitotenv.2020.138764
9. Daughton CG. Wastewater surveillance for population-wide Covid-19: The present and future. *Sci Total Environ.* 2020;736:139631. doi:10.1016/j.scitotenv.2020.139631
10. Farkas K, Hillary LS, Malham SK, McDonald JE, Jones DL. Wastewater and public health: the potential of wastewater surveillance for monitoring COVID-19. *Current Opinion in Environmental Science & Health.* 2020;17:14-20. doi:10.1016/j.coesh.2020.06.001
11. Prado T, Fumian TM, Mannarino CF, et al. Wastewater-based epidemiology as a useful tool to track SARS-CoV-2 and support public health policies at municipal level in Brazil. *Water Research.* 2021;191:116810. doi:10.1016/j.watres.2021.116810
12. Philo SE, Keim EK, Swanstrom R, et al. A comparison of SARS-CoV-2 wastewater concentration methods for environmental surveillance. *Science of The Total Environment.* 2021;760:144215. doi:10.1016/j.scitotenv.2020.144215
13. Kaya D, Niemeier D, Ahmed W, Kjellerup BV. Evaluation of multiple analytical methods for SARS-CoV-2 surveillance in wastewater samples. *Science of The Total Environment.* 2022;808:152033. doi:10.1016/j.scitotenv.2021.152033
14. Organización Panamericana de la Salud. *Guía Para El Análisis y La Cuantificación Del SARS-CoV-2 En Aguas Residuales.* Accessed December 4, 2021. <https://iris.paho.org/handle/10665.2/54698>
15. Barril PA, Pianciola LA, Mazzeo M, et al. Evaluation of viral concentration methods for SARS-CoV-2 recovery from wastewaters. *Science of The Total Environment.* 2021;756:144105. doi:10.1016/j.scitotenv.2020.144105

16. Calgua B, Rodriguez-Manzano J, Hundesa A, et al. New methods for the concentration of viruses from urban sewage using quantitative PCR. *Journal of Virological Methods*. 2013;187(2):215-221. doi:10.1016/j.jviromet.2012.10.012
17. Calgua B, Mengeweine A, Grunert A, et al. Development and application of a one-step low cost procedure to concentrate viruses from seawater samples. *Journal of Virological Methods*. 2008;153(2):79-83. doi:10.1016/j.jviromet.2008.08.003
18. Monteiro S, Rente D, Cunha MV, et al. Recovery of SARS-CoV-2 from large volumes of raw wastewater is enhanced with the inuvai R180 system. *Journal of Environmental Management*. 2022;304:114296. doi:10.1016/j.jenvman.2021.114296
19. Philo SE, Ong AQW, Keim EK, et al. Development and Validation of the Skimmed Milk Pellet Extraction Protocol for SARS-CoV-2 Wastewater Surveillance. *Food Environ Virol*. Published online February 10, 2022. doi:10.1007/s12560-022-09512-5
20. Salvo M, Moller A, Alvareda E, Gamazo P, Colina R, Victoria M. Evaluation of low-cost viral concentration methods in wastewaters: Implications for SARS-CoV-2 pandemic surveillances. *Journal of Virological Methods*. 2021;297:114249. doi:10.1016/j.jviromet.2021.114249
21. Ahmed W, Bivins A, Metcalfe S, et al. Evaluation of process limit of detection and quantification variation of SARS-CoV-2 RT-qPCR and RT-dPCR assays for wastewater surveillance. *Water Res*. 2022;213:118132. doi:10.1016/j.watres.2022.118132
22. Forés E, Bofill-Mas S, Itarte M, et al. Evaluation of two rapid ultrafiltration-based methods for SARS-CoV-2 concentration from wastewater. *Sci Total Environ*. 2021;768:144786. doi:10.1016/j.scitotenv.2020.144786
23. LaTurner ZW, Zong DM, Kalvapalle P, et al. Evaluating recovery, cost, and throughput of different concentration methods for SARS-CoV-2 wastewater-based epidemiology. *Water Research*. 2021;197:117043. doi:10.1016/j.watres.2021.117043
24. Pina S, Puig M, Lucena F, Jofre J, Girones R. Viral Pollution in the Environment and in Shellfish: Human Adenovirus Detection by PCR as an Index of Human Viruses. *Appl Environ Microbiol*. 1998;64(9):3376-3382. doi:10.1128/AEM.64.9.3376-3382.1998
25. Boxus M, Letellier C, Kerkhofs P. Real Time RT-PCR for the detection and quantitation of bovine respiratory syncytial virus. *Journal of Virological Methods*. 2005;125(2):125-130. doi:10.1016/j.jviromet.2005.01.008
26. Lu X, Wang L, Sakthivel SK, et al. US CDC Real-Time Reverse Transcription PCR Panel for Detection of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2. *Emerg Infect Dis*. 2020;26(8):1654-1665. doi:10.3201/eid2608.201246
27. Burns M, Valdivia H. Modelling the limit of detection in real-time quantitative PCR. *Eur Food Res Technol*. 2008;226(6):1513-1524. doi:10.1007/s00217-007-0683-z
28. Forootan A, Sjöback R, Björkman J, Sjögreen B, Linz L, Kubista M. Methods to determine limit of detection and limit of quantification in quantitative real-time PCR (qPCR). *Biomolecular Detection and Quantification*. 2017;12:1-6. doi:10.1016/j.bdq.2017.04.001