



21. september 2021

Overvågning af SARS-CoV-2 i spildevand i Danmark, evalueringsprojekt, juli 2021

Baggrund

Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2), der forårsager Coronavirus Disease 2019 (COVID-19), er ifølge et systematisk review og metaanalyse fra juni 2020 påvist i fæces hos 43,7% af patienter med COVID-19¹. Varigheden af påvist udskillelse af SARS-CoV-2 i fæces varierer fra ingen udskillelse til 1-30 dage¹. Via fæces findes virus i afløbsvand fra toiletsystemer og kan påvises i spildevand fra kloaksystemer eller rensningsanlæg ved anvendelse af kvantitativ real-time revers-transkriptase PCR (RT-qPCR), der måler koncentrationen af SARS-CoV-2²⁻⁵. Flere lande har i overvågningsøjemed eller på forsøgsplan anvendt test af spildevand for SARS-CoV-2. Visse studier, der løbende over en tidsperiode har analyseret spildevandsprøver fra et specifikt område for kvantitativ tilstedeværelse af SARS-CoV-2, har vist en korrelation mellem fund i henholdsvis spildevand og patientprøver^{2,5}. Ligeledes er det beskrevet, at en stigning i antallet af COVID-19-tilfælde i en befolkningsgruppe var forudgået af en stigning i koncentrationen af SARS-CoV-2 i spildevandsprøver fra det pågældende område^{2,4}. Overvågning af spildevand kan derfor potentielt anvendes som et tidligt varslingsystem ved stigende forekomst af virus i et samfund. Den tidsmæssige gevinst af spildevandsovervågningen er dog afhængig af den gældende teststrategi i samfundet. Den tidsmæssige gevinst er størst ved en teststrategi, hvor der primært fokuseres på at teste mennesker med symptomer på COVID-19. I den situation vil færre med COVID-19 diagnosticeres tidligt i forløbet, og asymptomatiske tilfælde vil ikke blive fanget ved hjælp af de humane tests. Følsomheden af SARS-CoV-2 PCR analyser på spildevand vurderes at være høj i forhold til



evnen til at påvise selv få sygdomstilfælde i større befolkningsgrupper. I to byer i Japan havde man et positivt signal i spildevandsprøver ved en incidens i oplandet til rensningsanlæggene på under ét covid-19 tilfælde pr 100.000 indbyggere⁵. I undersøgelsen var der dog ikke taget højde for den gældende teststrategi, og det må antages, at ikke alle tilfælde af fx. asymptomatisk SARS-CoV-2 infektion blev diagnosticeret. Den "sande" incidens har derfor formentligt været højere. Der er således empirisk belæg for anvendeligheden, men også en række uafklarede spørgsmål med hensyn til metodens sensitivitet og specificitet. I Danmark er der gennemført et indledende forsøgsprojekt på Bornholm⁶. Det blev udført i marts og april med gode resultater. Dertil kører flere kommuner deres egne projekter, hvoraf de to mest omfangsrige foregår i Ishøj og Københavns Kommune (SSI følger med i det første og er en aktiv deltager i det sidste), resultater herfra foreligger endnu ikke. Herudover udgår adskillige forskningsprojekter i forskellige former for spildevandsanalyser fra grupper på danske universiteter, herunder på DTU. Samlet set er der dog ikke bred erfaring med anvendelse af metoden i Danmark, herunder dens praktiske begrænsninger og den konkrete nytte til brug for epidemibekæmpelsen.

Formål

Formålet med dette indledende evalueringsprojekt var:

- at opsætte og afprøve et system til SARS-CoV-2 overvågning via spildevand fra rensningsanlæg i Danmark.
- at opnå erfaring med SARS-CoV-2 overvågning for derved at kunne tage stilling til rationel spildevandsovervågning af SARS-CoV-2 fremadrettet i forhold til praktiske forhold som fx prøvetagningshyppighed, antal rensningsanlæg, der bør inkluderes, logistik med mere.
- at opsætte en metode til løbende overvågning af specifikke SARS-CoV-2 varianter ud fra spildevandsprøver.



Desuden ønskedes det i en dansk kontekst at få undersøgt nedenstående:

- Betydningen af at undersøge prøver fra forskellige typer af rensningsanlæg, herunder deres størrelse (om de dækker store eller små byområder) og betydningen af lokal industri, regnvandstilførsel, turisme og andre særlige faktorer, samt sammenligneligheden mellem prøver fra henholdsvis rensningsanlæg og decentrale pumpestationer.
- Korrelation mellem koncentrationen af SARS-CoV-2 i spildevand og forekomsten i humane prøver i et område og over en tidsperiode, hvor mennesker testes intensivt.
- Den tidsmæssige sammenhæng mellem stigning og fald i koncentrationer af SARS-CoV-2 i spildevand og antallet af patientprøver, der testes positive for SARS-CoV-2.

Projektets udførelse

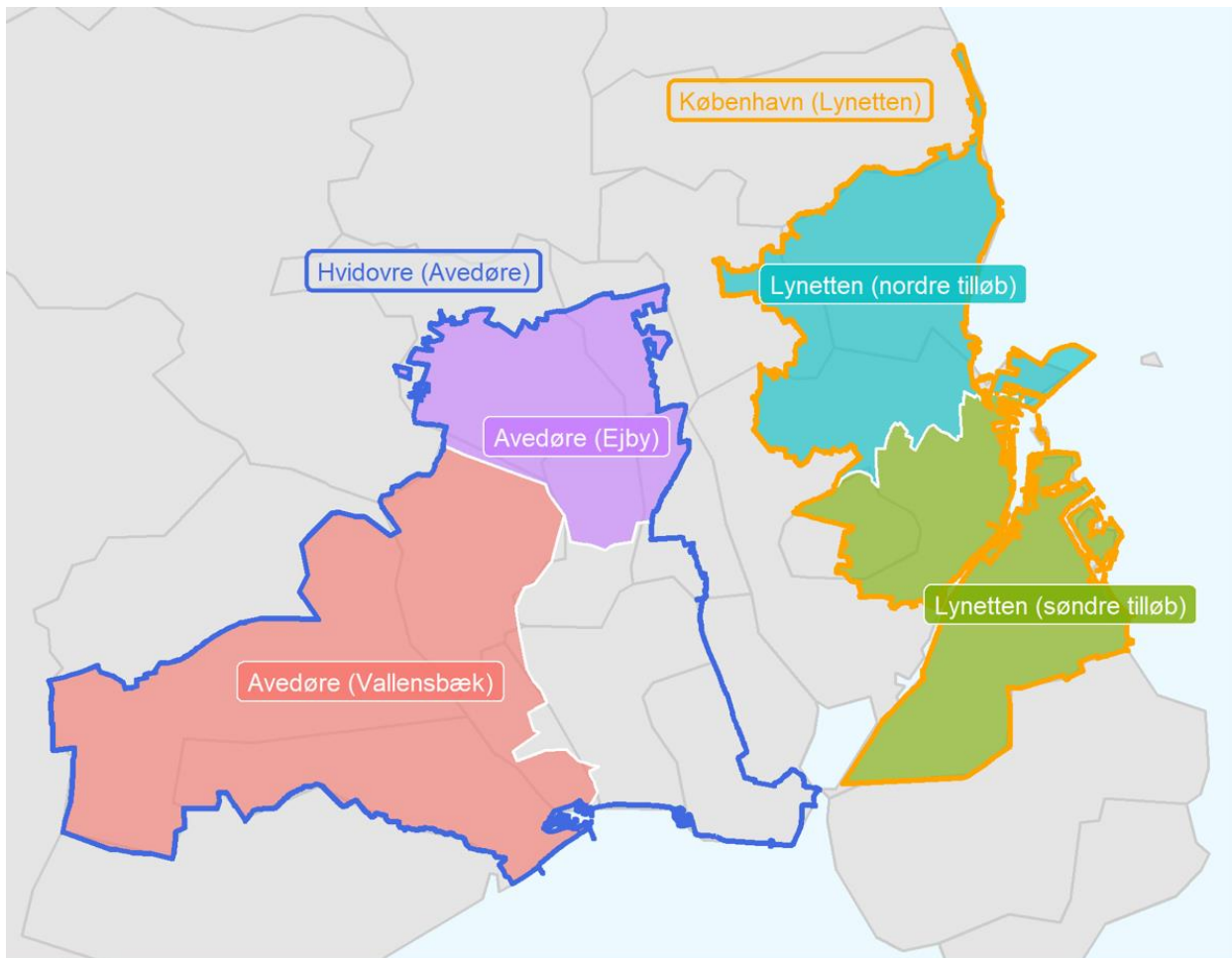
Valg af renselanlæg

Der blev i den 30 dage lange overvågningsperiode udtaget daglige spildevandsprøver, der var opsamlet over 24 timer, fra 16 rensningsanlæg fordelt over hele landet (Figur 1). Fra to af rensningsanlæggene suppleredes endvidere med i alt fire opstrøms målinger i udvalgte pumpestationer (Figur 2). Rensningsanlæggene var udvalgt, så de så vidt muligt var repræsentative for rensningsanlæg i Danmark, og der blev sikret diversitet i relation til:

- Forekomsten af industri i oplandet
- Incidens af SARS-CoV-2 i befolkningen
- Befolkningstæthed i oplandet
- Befolkningsstørrelse i oplandet
- Andel separat- og fælleskloakering, dvs. grad af adskillelse af nedbør og spildevand
- Andel af besøgende/turister i området fx i forbindelse med ferieperioder
- Geografi, således at såvel Jylland, Fyn og Sjælland var repræsenteret.



Figur 1. Kortet viser de 16 rensningsanlæg, hvorfra der blev udtaget spildevandsprøver, samt de geografiske områder, de dækker.



Figur 2. Kortet viser de 4 pumpestationer, hvorfra der blev udtaget spildevandsprøver, samt de geografiske områder, de dækker.

Spildevandsprøverne

I alt opsamledes 600 spildevandsprøver gennem 30 dage med start 1. juli 2021 og sidste prøveudtagningsdag d. 30. juli 2021. På 14 rensningsanlæg blev spildevandsprøverne indsamlet flowproportionalt (dvs. vandmængdeproportionalt), og på to rensningsanlæg og de fire pumpestationer blev prøverne indsamlet tidsproportionalt (dvs. en given vandmængde pr tidsenhed). For 14 af rensningsanlæggene anvendtes den prøvetager, der i forvejen var installeret og rutinemæssigt blev anvendt til udtagning af obligatoriske prøver til kontrol af spildevandet, hvorfor disse kunne udtage prøverne **flowproportionalt**. For to af rensningsanlæggene samt de fire pumpestationer blev der etableret en prøvetager som led i



projektet. Disse prøvetagere indsamlede spildevand **tidsproportionalt**. Prøvetagningsudstyret er automatiseret og etableret på anlæggene ved indløbet til renseanlægget. Alle steder er prøvetagningsudstyret installeret umiddelbart efter risten til rensningsanlæggene fraset i Marselisborg Renseanlæg, hvor dette ikke er muligt, og prøvetageren sidder før risten. Baseret på det forventede vandflow blev prøvetagerne hver morgen indstillet til at indsamle spildevand flow- eller tidsproportionalt løbende over 24 timer med henblik på et slutvolumen på ca. 5 liter spildevandsprøve. Formålet med at indsamle spildevand løbende over 24 timer var at opnå et repræsentativt udsnit af døgnets spildevand. Prøvetageren kølede løbende det opsamlede spildevand ned til 4-5° C.

Følgende blev noteret dagligt af det personale, der udtog prøverne:

- Spildevandstemperatur ved indløbet
- Total vandmængde (flow) til renseanlægget i prøveindsamlingsdøgnet
- Registreret nedbørsmængde i prøveindsamlingsdøgnet.

De indsamlede spildevandsprøver blev opbevaret på køl og transporteret under fortsat køl til det primære laboratorium (Eurofins A/S i Vejen). Den forventede tid fra indsamling af spildevandsprøven blev igangsat, til resultaterne af spildevandsanalyserne var rapporteret til SSI af primærlaboratoriet, var estimeret til ca. 57 timer:

- 24 timers døgnprøve, der igangsættes og udtages ca. kl 07.00 og er klar til afhentning kl. 10.00.
- Afhentning af spildevandsprøven på udtagningsdagen og levering hos det primære laboratorium inden kl 20.00.



- Analyser på primærlaboratoriet opstartes om aftenen umiddelbart efter modtagelse og rapporteres til SSI den følgende dag inden kl 16.00.

Laboratorieanalyser; påvisning af virus og bestemmelse af viruskoncentration

Prøverne blev analyseret hos Eurofins A/S i Vejen. Prøverne blev i første omgang centrifugeret for at fjerne solidt materiale, herefter blev virus opkoncentreret fra den vandige fase ved hjælp af tilsættelse af en flokkulant. Denne "fanger" viruspartikler hvorefter der centrifugeres, og virus-RNA kan ekstraheres fra pellet. Efterfølgende blev virus-RNA indholdet analyseret med af RT-qPCR med VIRseek testkit fra Eurofins Technologies med henblik på påvisning af SARS-CoV-2-RNA. Bestemmelse af koncentrationen af SARS-CoV-2-RNA blev udført ved anvendelse af en standardrække bestående af prøver med kendt viruskoncentration. For at sikre den tekniske kvalitet af analyserne blev der ved hver analysekørsel også analyseret en række kontrolprøver. Såfremt en af kontrolprøverne ikke gav et tilfredsstillende resultat, blev analysen af den eller de relevante spildevandsprøver gentaget det følgende døgn. Såfremt analysens kvalitet fortsat ikke var teknisk tilfredsstillende, blev prøvesvaret registreret som "Non measurable".

Sekventering af spildevandsprøverne

RNA-ekstraktioner fra alle positive prøver blev to gange om ugen sendt til Afd. f. Virus

Overvågning og Forskning, SSI, der som en del af projektet arbejdede videre på optimering af en metode til sekventering af spikegenet med henblik på undersøgelse af, hvorvidt og med hvilken andel "variants of concern" (VOC) og "variants of interest" (VOI) var tilstede i spildevandsprøverne. Kort beskrevet blev det ekstraherede RNA omdannet til DNA og opformeret ved hjælp af en PCR-analyse. Derefter blev DNA fra hver enkelte prøve mærket (barcoding), hvorved DNA fra prøverne kunne sekventeres i pools á op til 48 prøver og efterfølgende adskilles igen ved hjælp af den unikke DNA-barcode. Der blev sekventeret et



fragment på 1049 nucleotider af genomet, der dækker den del af spike-genet, som indeholder de mutationer, der afgør hvilken variant, det drejer sig om. Sekventeringen blev foretaget med Oxford Nanopore teknikken, hvorved hele fragmentet kunne sekventeres som ét langt stykke. Dette er i modsætning til sekventering med Illumina teknikken (som anvendes til de humane prøver), hvor man får sekventeret små stykker af genomet, der efterfølgende skal sættes sammen til et helt stykke ud fra en referencesekvens. Da er et vist overlap af mutationer mellem forskellige virusvarianter, kombineret med at der i spildevandsprøver kan være virus fra mange mennesker og dermed potentielt flere forskellige virusvarianter betyder dette, at man ved sekventering af spike-genet i et helt stykke i stedet for flere mindre stykker har en øget sikkerhed for korrekt tolkning af hvilke varianter, der er tilstede i prøven. Efter sekventeringen blev alle de opnåede sekvenser (reads) fra hver prøve sammenholdt (mappet) op mod en række referencesekvenser, der indbefatter alle de virusvarianter, der aktuelt er klassificeret som VOC og VOI af ECDC og WHO. Derved kunne man med god sikkerhed angive hvilke varianter, der var til stede i hver enkelte spildevandsprøve, og hvor stor en andel de udgjorde af den samlede SARS-CoV-2 mængde i prøven.

[Epidemiologiske analyser: Normalisering af spildevandsanalyseresultater](#)

Sammensætningen af spildevandet afhænger af en lang række af faktorer, der er forskellige for hvert rensningsanlæg, og som kan variere fra dag til dag. Eksempler herpå er mængden og typen af industrispildevand, graden af separat kloakering i oplandet (dvs. adskilte kloakker for henholdsvis spildevand og nedbør) og ikke mindst mængden af regn. Resultaterne af laboratorieanalyserne af spildevandet fra hvert enkelt rensningsanlæg blev normaliseret for fortynding på grund af regnvand. Hvert forsyningselskab havde på forhånd oplyst det gennemsnitlige flow på prøveudtagningsstedet på en tørvejrdsdag, og det aktuelle flow for



hvert prøveudtagningssted blev indrapporteret dagligt. Normaliseringen blev foretaget ved, at den målte daglige mængde af spildevand, der løb ind i renseanlægget, blev sammenholdt med det gennemsnitlige indløb af spildevand på en tørvejrsgang (målte flow/tørvejrsgang). De dage, hvor mængden af indløbet af spildevand var højere end på en gennemsnitlig tørvejrsgang, opjusteredes antallet af SARS-CoV-2 kopier pr. liter svarende til det ekstra målte flow.

Forekomst og koncentration af SARS-CoV-2 i spildevandet

Der er naturlige, daglige udsving i SARS-CoV-2 koncentrationerne i spildevandet, hvilket blandt skyldes forskelle i afføringsmønstre og mængde af virus, den enkelte person udskiller.

Resultatet af en enkelt spildevandsprøve kan derfor ikke stå alene, men bør sammenholdes med den omkringliggende periode. For at lette observationen af reelle stigninger eller fald i viruskoncentrationer over tid blev den normaliserede gennemsnitlige SARS-CoV-2-koncentration inden for de seneste tre døgn op til udtagning af spildevandsprøverne udregnet for hver dag for hvert prøveudtagningssted.

Sammenligning af koncentration af SARS-CoV-2 i spildevandet med incidensen af covid-19 blandt borgerne i oplandet, hvor spildevandsprøven kommer fra

For hvert rensningsanlæg og hver pumpestation blev der indhentet oplysninger om hvilke borgere, der var bosat i det tilhørende opland. Oplysningerne blev brugt til at sammenholde resultaterne af spildevandsanalyserne med antallet af borgere med en positiv PCR- og antigen test i det specifikke opland. For at korrigere for varierende varighed af SARS-CoV-2-udskillelse samt testaktivitet, der varierede afhængigt af ugedage, er incidensen udregnet som en gennemsnitlig incidens per 100.000 borgere inden for de seneste syv døgn op til udtagning af spildevandsprøven.



Resultater og diskussion

Udtagning og analyse af spildevandsprøver

I den indledende fase af spildevandsovervågningen i juli måned skulle der indsamles og analyseres 600 spildevandsprøver fra 20 prøvetagningssteder. Heraf blev 16 spildevandsprøver ikke udtaget og leveret som planlagt. Dette var på grund af problemer med selve prøveudtagningen eller bortkomne prøver i forbindelse med transporten til det primære laboratorium. Yderligere seks spildevandsprøver kunne ikke analyseres i laboratoriet på grund af vedvarende utilstrækkelighed af den tekniske kvalitet af selve prøveanalysen. Således blev i alt 578 (96%) af spildevandsprøverne succesfuldt analyseret i perioden. For 27 (4,7%) af de succesfuldt analyserede prøver, var der forhøjet usikkerhed omkring koncentrationen af SARS-CoV-2 på grund af problemer med analysen.

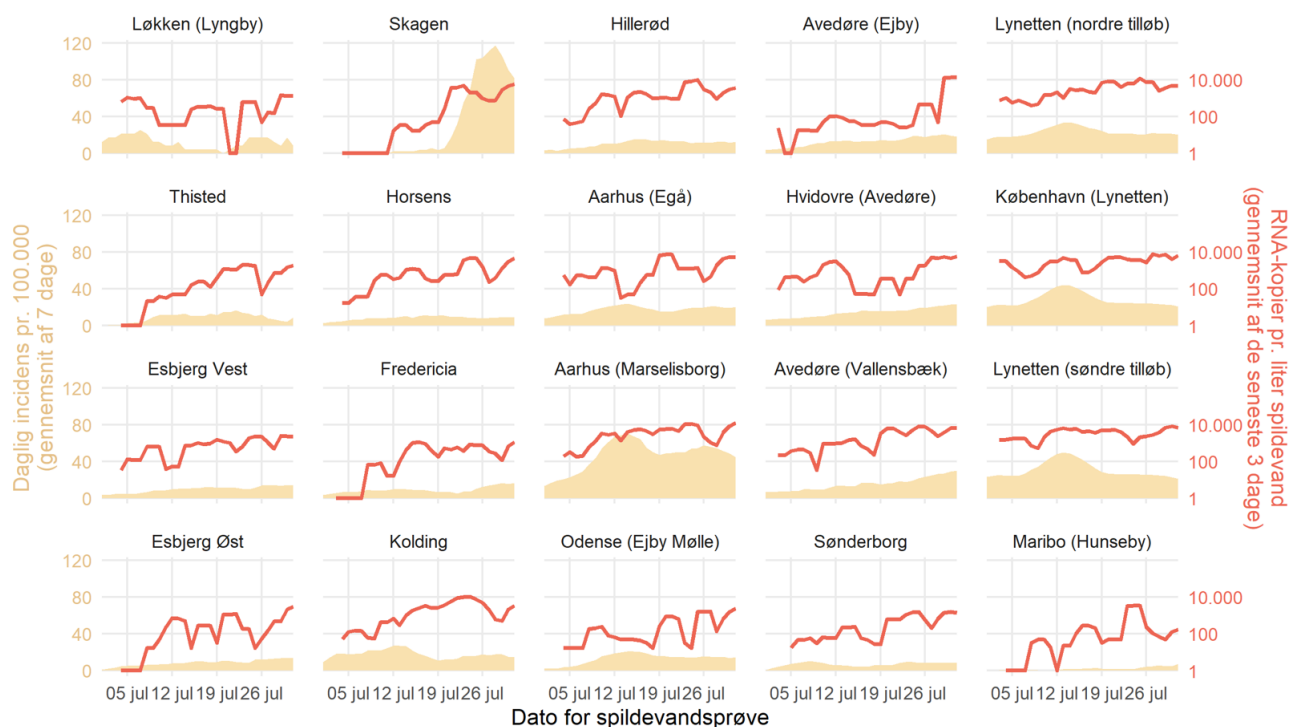
Den forventede tid, fra Eurofins modtog spildevandsprøverne, til et analysesvar blev rapporteres til SSI, var ca. et døgn. I juli måned blev svarene fra 50% af de succesfuldt analyserede prøver rapporteret til SSI inden for et døgn, 70% af prøverne blev besvaret inden for to døgn og 90% af prøvesvarene var afrapporteret til SSI inden for tre døgn.

Resultater af spildevandsanalyserne

Tre-dages gennemsnit af normaliserede spildevandsresultater overfor syv-dages gennemsnit af nydiagnosticerede med SARS-CoV-2 er præsenteret i figur 3. Der var i en vis udstrækning overensstemmelse mellem fund af SARS-CoV-2 i spildevand og tilstedeværelse af borgere i oplandet, der blev testet positiv for SARS-CoV-2. For en del rensningsanlæg og pumpestationer, særligt i Skagen, men også i Esbjerg Vest og Strandvænget pumpestation, sås en tydelig sammenhæng mellem koncentrationen af SARS-CoV-2 i spildevandet og incidensen af positivt testede borgerne i de tilhørende oplande. For andre rensningsanlæg og



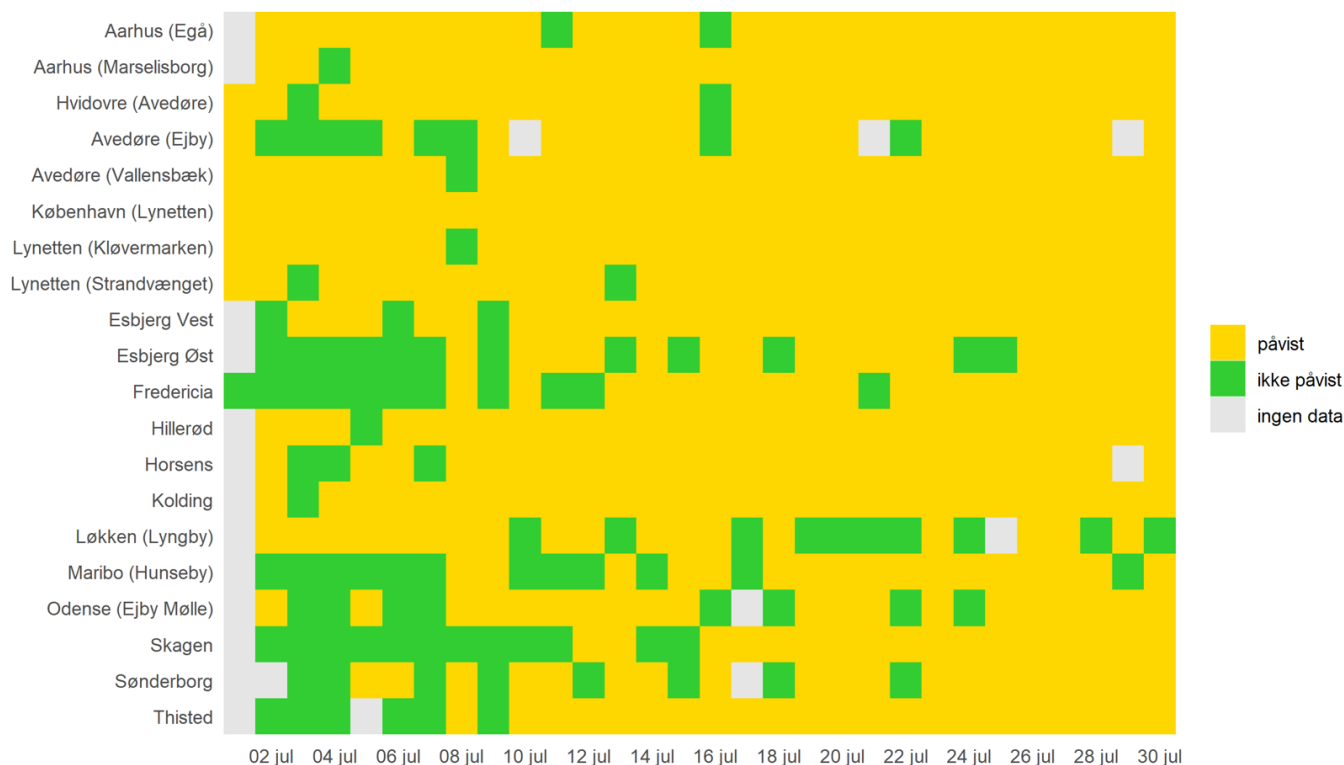
pumpestationer, eksempelvis Marselisborg, Egå og Kløvermarkens pumpestation, var en sådan sammenhæng vanskeligere at påvise. Det kan ikke udelukkes, at den observerede incidensstigning, der i perioden kunne ses i oplandet til Marselisborg rensningsanlæg, var forudgået af en stigning i viruskoncentrationerne i spildevand, som blot ikke er registreret, fordi det tidsmæssigt lå forud for periodens test af spildevand. Den umiddelbare diskrepans mellem observeret viruskoncentration i spildevand og incidenstal, der ses i en del af de andre rensningsanlæg, fx Løkken, Thisted, Avedøre, Esbjerg Øst og Maribo Renseanlæg, kan skyldes flere faktorer, herunder: Relativt små oplande, hvorved biologiske variationer i virusudskillelse bliver tydeligere at se, turister, problemer med prøvetagerne (fx tilkløttet prøvetager) eller relativt lave viruskoncentrationer i spildevand, hvorved naturlige udsving i højere grad dominerer billedet. Naturlige udsving af viruskoncentrationer kan skyldes flere faktorer, herunder varierende sammensætning af spildevandet på grund af fx industri, der kan påvirke laboratorieanalyserne samt fortyndingerne af spildevandet og temperaturafhængig, varierende nedbrydning af virus i kloaknettet.



Figur 3. Resultaterne af spildevandsanalyserne for SARS-CoV-2 samt incidensen af SARS-CoV-2 blandt borgerne i oplandene til de viste renseanlæg og pumpestationer.

- Den gule graf viser det gennemsnitlige antal borgere pr.100.000, der er testet positiv for SARS-CoV-2 (PCR- eller antigen test) i oplandet til renseanlægget eller pumpestationen over de seneste syv dage op omkring udtagning af spildevandsprøven.
- Den røde kurve viser for hvert renseanlæg / pumpestation det gennemsnitlige antal SARS-CoV-2 RNA kopier pr. liter spildevand de seneste tre dage op til og med udtagning af prøven.
- Antallet af SARS-CoV-2 RNA kopier pr. literspildevand er normaliseret for nedbør.

I den første uge af juli var der en del af prøvetagningsstederne, særligt i Jylland og på Fyn, hvor der ikke blev påvist SARS-CoV-2 i spildevandet. I løbet af juli ændrede billedet sig, så det i slutningen af måneden kun var i ganske få af de udtagne prøver, der ikke blev påvist SARS-CoV-2 i spildevandet (Odense, Esbjerg Øst og Løkken, se figur 4).



Figur 4. Tilstedeværelse (påvist/ikke påvist) af SARS-CoV-2 i spildevandsprøverne for hvert rensningsanlæg og pumpestation pr. dag

Rapportering af laboratorieanalyser

Af i alt 578 prøver taget i løbet af juli måned, blev de 483 (84%) fundet positive for SARS-CoV-

2. Af disse var 193 (40%) så svagt positive, at det ikke var muligt at bestemme koncentrationen af SARS-CoV-2-RNA i prøverne. Yderligere 40 prøver (7%) havde så høje CT værdier, at yderligere analyser med succesfuld sekventering er usandsynlig.

Resultater af sekventeringen:

Blandt de 483 positive prøver, der blev sendt fra det primære laboratorium til SSI, var 50,1% for svage til, at sekventering var mulig, hvilket stemmer godt overens med de rapporterede viruskoncentrationer fra det primære laboratorium. I alt har det indtil nu været muligt at sekventere 37% af de positive prøver, hvilket svarer til 87% af de prøver, hvor der var virussignal nok til, at sekventering kunne være muligt. SSI arbejder fortsat på at optimere sekventeringsmetoden med henblik på at kunne opnå en højere andel sekventerede prøver



fremadrettet. Især tidligt i prøveperioden er andelen af svage prøver stor, hvorfor der ikke er helt så mange variantanalyser fra denne periode. Det var i denne periode, at Delta-varianten begyndte meget hurtigt at erstatte Alpha-varianten iblandt de humane prøver. Dette ses også i analyserne af spildevandsprøverne, hvor Delta-varianten var den dominerende variant i 83% af prøverne, hvorimod Alpha-varianten kun var den dominerende variant i 7% af prøverne. Skiftet imellem dominansen af henholdsvis Alpha- og Delta kunne også ses i spildevandsprøverne, idet begge varianter er fundet i nogenlunde samme mængde i 11% af prøverne.

Sammenfatning

Spildevandsprøver blev dagligt udtaget og analyseret fra 20 udvalgte rensningsanlæg og pumpestationer på tværs af landet i hele juli måned og resultaterne er løbende blevet offentliggjort på SSI's hjemmeside i perioden ([Se her](#)). Denne indledende spildevandsovervågning har vist følgende:

- I områder, hvor der var personer, der blev testet positiv for covid-19, er virus også blevet påvist i spildevandet.
- I områder, hvor der i en periode ikke var personer, der blev testet positiv for covid-19, blev virus heller ikke påvist i spildevandet.
- I observationsperioden blev et signal på stigende SARS-CoV-2-smitte identificeret ved hjælp af spildevandsovervågningen i Skagen. Her blev en stigning af virusindholdet i spildevandet observeret forud for en stigning i incidensen i befolkningen.
- Sammenhængen mellem mængden af SARS-CoV-2virus i spildevandet og antallet af personer, der er testet positiv for covid-19 i det område spildevandsprøven stammer fra, var ikke entydigt tilstede for de forskellige prøveudtagningssteder. Eksempelvis



blev der ikke identificeret en stigning af virusindholdet i spildevandet i Marselisborg (Århus) forud for en stigning i smittede i befolkningen (som tilfældet var i Skagen).

- For nogle af de udvalgte rensningsanlæg og pumpestationer var der ganske store udsving i mængden af målt virus i spildevandet.
- Udsvingene af den målte mængde SARS-CoV-2-virus i spildevandet kan skyldes en lang række forhold, herunder mekaniske problemer med prøvetagningen, forskellige biologiske faktorer og laboratorietechniske udfordringer.
- Det er muligt, ved sekventering af en del af spike-genet, at vise hvilke varianter, der er dominerende i spildevandet, dog ikke i alle (meget svagt positive) prøver. Der arbejdes løbende på optimering af sekvenseringsmetoden.
- Det er muligt, ved sekventering, at dokumentere, når der sker et skifte i dominerende variant, samt at detekterer flere forskellige varianter i samme prøve.
- De varianter, der blev fundet ved sekventering af spildevandet stemte godt overens med, hvad der blev fundet i de humane prøver fra de individuelle persontest.

Hvad har vi lært i den første fase af spildevandsovervågningen?

- Spildevandsovervågning lader fortsat til at være et fornuftigt/lovende redskab i den fremtidige covid-19-overvågningsportefølje; særligt i en situation hvor stadig færre personer testes.
- I Skagen blev et signal på stigende smitte identificeret i overvågningsperioden, hvorefter incidensen i befolkningen steg.



- I nogle områder målt betydelige daglige udsving i virusmængden i spildevandet. En del af disse udsving kan formentlig forklares ved en forskellig sammensætning af spildevandet fra dag til dag, fx pga. regn, vand fra industri mm.
Spildevandsresultaterne er normaliseret for regn, men der arbejdes fortsat på at forbedre metoderne til at normalisere resultaterne.
- Spildevandsresultaterne skal evalueres for det enkelte rensningsanlæg/prøveudtagningssted. Det er på nuværende tidspunkt ikke muligt at sammenligne prøver på tværs af forskellige rensningsanlæg på grund af grundlæggende forskelle i sammensætning af spildevandet fx i forhold til mængden af industrispildevand og befolkningsstørrelse med mere.
- Egentlige signaler på stigende smitte kan formentlig kun vurderes på baggrund af flere på hinanden følgende spildevandsprøvemålinger med høj virusmængde. Flere ugentlige spildevandsanalyser er derfor nødvendige.
- Det er muligt at adskille sekvenserne, selvom der er mere end en variant tilstede i samme prøve, hvilket muliggør detektion af en variant, der er stigende i forekomst, inden den bliver dominerende.
- Optimering er nødvendigt for at kunne sekventere fra spildevandsprøver, der blot er svagt positive.



Referencer

1. Wong, M. C. *et al.* Detection of SARS-CoV-2 RNA in fecal specimens of patients with confirmed COVID-19: A meta-analysis. *J. Infect.* **81**, e31–e38 (2020).
2. Agrawal, S., Orschler, L. & Lackner, S. Long-term monitoring of SARS-CoV-2 RNA in wastewater of the Frankfurt metropolitan area in Southern Germany. *Sci. Rep.* **11**, 5372 (2021).
3. Saguti, F. *et al.* Surveillance of wastewater revealed peaks of SARS-CoV-2 preceding those of hospitalized patients with COVID-19. *Water Res.* **189**, 116620 (2021).
4. Randazzo, W. *et al.* SARS-CoV-2 RNA in wastewater anticipated COVID-19 occurrence in a low prevalence area. *Water Res.* **181**, 115942 (2020).
5. Hata, A., Hara-Yamamura, H., Meuchi, Y., Imai, S. & Honda, R. Detection of SARS-CoV-2 in wastewater in Japan during a COVID-19 outbreak. *Sci. Total Environ.* **758**, 143578 (2021).
6. Statens Serum Institut. *Monitorering af SARS-CoV-2 i spildevand på Bornholm – 9. marts til 7. april 2021.* <https://www.ssi.dk/-/media/arkiv/subsites/covid19/overvaagningsdata/sars-cov-2-overvgning-via-spildevand-p-bornholm.pdf?la=da> (2021).