



האם דגימות מהביוב יתריעו מפני התפרצות קורונה בשכונות וערים נגועות? חוקרים מאוניברסיטת בן-גוריון בנגב פיתחו שיטה לניטור כמויות הוירוס באוכלוסייה באמצעות מערכות שפכים

קבוצת מחקר מאוניברסיטת בן-גוריון בנגב בהובלת פרופ' אריאל קושמרו מהמחלקה להנדסת ביוטכנולוגיה ובשיתוף עם דר' איתי בר-אור מהמעבדה המרכזית לנגיפים במשרד הבריאות פיתחה כלי להתראה מוקדמת בפני התפרצות קורונה ולניטור התפשטות הוירוס על פי איזורים בהתבסס על בדיקת מערכת הביוב בשכונות ובערים. המחקר נערך בחלקו במסגרת כוח הפעולה המחקרי למאבק בקורונה, שהקים נשיא אוניברסיטת בן-גוריון פרופ' דניאל חיימוביץ למציאת פתרונות מהירים ושימיים למאבק במגיפה העולמית.

תוצאות ראשונות של המחקר שנערך בשיתוף המעבדה המרכזית לנגיפים של משרד הבריאות מצביעים על נוכחות של הוירוס בשפכים במקומות שונים, בהם בשפכים המרוכזים של גוש דן ובאופן ספציפי בשפכים של העיר בני ברק. הממצאים מראים שאזורים אחרים בגוש דן נמצאו בשלב זה שליליים. למחקר חשיבות רבה למניעת התפרצויות שכן על פי הספרות המדעית שחרור הוירוסים בצואה והופעתו בשפכים מקדים את הופעת תסמיני הקורונה.

"מטרת הפרויקט היא לספק התרעה לנוכחות של קורונה באוכלוסייה באמצעות ניטור השפכים הגולמיים שמגיעים מהערים", מסביר פרופ' אריאל קושמרו מהמחלקה להנדסת ביוטכנולוגיה ע"ש אברהם וסטלה גולדשטיין-גורן. "התוצאות מראות שאכן ניתן לזהות את הוירוס בביוב בשיטות מולקולאריות. בשיטה זו נוכל לספק מידע לגבי רמת הנגיעות בקורונה באוכלוסייה, לאתר אזורים בעייתיים ולספק התראה ראשונית היכן מתחילה התפרצות".

בשיתוף עם איגוד ערים דן נלקחו דגימות מבורות וצמתי ביוב של ערים ושכונות בעייתיות בגוש דן וכן נאספו דגימות ממט"שים אזוריים בכל רחבי הארץ. החוקרים עיבדו את הדגימות בתהליך הדומה לטיפול בבדיקות קורונה רגילות כאשר נעשה שימוש בהגברת ה-RNA של הוירוס בטכנולוגיות של PCR כמותי.

"בשיטה שפיתחנו אפשר לדגום בנפרד כל עיר ובהמשך גם לבדוק ברמת השכונה", מוסיף פרופ' קושמרו, "נוכחות של וירוס בביוב מלמדת שבאותו אזור יש אנשים נגועים וככל שרמת הוירוסים בביוב עולה, המשמעות היא שיש יותר אנשים נגועים. ניתוח כמות הוירוסים בביוב ביחס לכמות האוכלוסייה יאפשר בעתיד לקבוע כמה אנשים נגועים יש באותו אזור וכך נוכל להתריע על אזורים שמתחילה בהם התפרצות ועל משרד הבריאות לנקוט בצעדי מנע כמו סגר וריבוי בדיקות. מנגד אפשר לבדוק אם כמות הוירוס יורדת בעקבות פעולות שנקטו ולקבוע האם הן אפקטיביות".

צוות המחקר נמצא בשלב של פיתוח השיטה והוכחת היתכנות כאשר בשלב הבא ייבדק האם ישנו מתאם בין כמות החולים לכמות הוירוס בשפכים בערים שונות.

במחקר משתתפים: פרופ' אריאל קושמרו, דר' יקיר ברצ'נקו, דר' עודד ניר, דר' עידו בר זאב, פרופ' זאב רונן, מרילו שנגן וקרין יניב מאוניברסיטת בן גוריון, איתי בר אור מהמעבדה המרכזית לנגיפים במשרד הבריאות ופרופ' ערן פרידלנדר מהטכניון.

כתבה בערוץ 12





הביוב יביס את הנגיף? חוקרים פונים למערכת השפכים כדי לבלום את הקורונה

ברחבי העולם מפתחים מערכות לזיהוי ריכוזי קורונה במי שפכים, בדומה למערכות שכבר מזהות פתוגנים מסוגים אחרים. המטרה: לאתר במהירות מוקדי התפרצות, ובעזרת הנתונים לקבוע היכן נחוצות הגבלות חברתיות

אסף רונאל 16.04.2020 09:20

אחד האתגרים הגדולים בהתמודדות עם התפשטות הקורונה הוא זיהוי של מוקדי התפרצות והדבקה. זהו גם אחד המכשולים הגדולים שיהיה צורך להתגבר עליהם בטרם יהיה אפשר לבטל את ההנחיות המחמירות בנוגע לריחוק פיזי, שאומצו בישראל וברחבי העולם. בלי מנגנונים אמינים ויעילים לזיהוי אזורים שיש בהם שיעור הדבקה גבוה, כל ניסיון לחזור לשגרה עלול לגרום להתפרצות חסרת שליטה של המחלה ולאיים שוב על יציבות מערכת הבריאות.

אחת הדרכים שחוקרים ברחבי העולם, וגם בישראל, בוחנים בימים אלו ליצירת מנגנון כזה היא ניטור שפכים, כדי לאתר סימנים לנוכחות הנגיף במי הביוב. מחקרים מראים כי חולי קורונה מפרישים את הנגיף בצואה, וכך הנגיף מגיע למערכת הביוב.

מערכת הביוב בנויה בצורה היררכית — כך שכל תת אזור משויך לאזור רחב יותר, מסביר פרופ' ערן פרידלר מהפקולטה להנדסה אזרחית וסביבתית בטכניון, השותף במאמץ הישראלי לפתח מערכת ניטור כזאת. מסיבה זו אפשר לנטר את השפכים בנקודות מסוימות וכך לזהות שיעור ממוצע של חולים ברמה של רובע או שכונה.

"מערכת ניטור שכזו תאפשר לבדוק אוכלוסיות שלמות ולהשוות בין עוצמת אותות שונים לנוכחות הנגיף, וכך להתמקד באזורים שבהם יש הדבקה גבוהה בלי בדיקות של האוכלוסייה עצמה ובלי צורך להגיע לאנשים רבים, לפחות עד זיהוי מוקד ההתפרצות", מסביר פרופ' פרידלר.

בעתיד, הוא מוסיף, יהיה אפשר להשתמש במערכת כדי לזהות מוקדי התפרצות בשלב מוקדם, ולפי זה לכוון את הבדיקות ואת הגבלת האוכלוסייה אם תידרש. ככל הנראה, המערכת תוכל לזהות גם נשאים של נגיף הקורונה שאינם מראים תסמינים — דבר שיש בו יתרון, שכן יש סיכוי נמוך יותר שאנשים אלו יפנו להיבדק.

כיום יותר מ-12 קבוצות מחקר ברחבי העולם עוסקות במאמצים לזהות סימנים לנגיף הקורונה במי הביוב. עד כה הצליחו חוקרים בהולנד, ארה"ב ושוודיה לזהות את הנגיף בשפכים. האתגרים שהחוקרים מתמודדים עמם הם פיתוח דרכים למיצוי הנגיף ממי הביוב ומדידת שיעור הנוכחות המדויק שלו, וכן זיהוי נקודות אסטרטגיות למדידה, שיינתנו תמונה מדויקת ככל האפשר של תפוצת הנגיף. עוד שאלה שטרם הוכרעה לגמרי היא מה מספר נגיפי הקורונה הממוצע שאדם חולה מפריש

בצאה — נתון חיוני כדי להסיק כמה בני אדם חולים במחלה מתוך ריכוז הנגיף במי הביוב.

במחקר שנערך במדינת מסצ'וסטס בארה"ב ועלה בשבוע שעבר לשרת טרום-ביקורת עמיתים, דיווחו החוקרים על מציאת נגיפי קורונה במתקן טיפול שפכים שמשמש אזור עירוני במדינה. לפי המחקר, ניתוח ריכוזי הנגיף במי הביוב מלמד שבאזור היו בסוף חודש מארס יותר מ-2,300 חולים, אף שלפי הבדיקות היו שם 446 חולים מאומתים בלבד. חוקרים מהולנד דיווחו במאמר מוקדם יותר כי הם הצליחו לזהות נוכחות של הנגיף בקהילות מסוימות עוד בטרם אבחנו הרשויות אפילו מקרה אחד באותן קהילות.

הרעיון לנטר מי הביוב לזיהוי פתוגנים אינו חדש. חוקרים בהולנד וברחבי העולם משתמשים בשיטה לזיהוי התפרצויות של נורו-וירוס (נגיף הגורם לדלקות במערכת העיכול), חיידקים עמידים לאנטיביוטיקה, נגיפי פוליו וחצבת. השיטה נפוצה גם במחקרים, וביישומים שונים באירופה משתמשים בניתוח מי הביוב כדי להעריך את מידת השימוש בסמים בקרב אוכלוסיות שונות.

בישראל משרד הבריאות מפעיל זה זמן מערך של ניטור מי ביוב, שמשמש לזיהוי התפרצויות של נגיף הפוליו. המערכת של משרד הבריאות לאיתור נוכחות נגיפי פוליו בשפכים אפשרה ב-2013 לזהות התפרצות של נגיף הפוליו בדרום הארץ — זיהוי שבעקבותיו יצא משרד הבריאות במבצע חיסונים שמנע את התפשטות המחלה.

במחקר הישראלי משתתפים, לצד פרופ' פרידלר, גם פרופ' אריאל קושמרו מהפקולטה להנדסת ביטכנולוגיה ואוהד רינות מהפקולטה לרפואה באוניברסיטת בן גוריון בנגב, ד"ר יאיר לואיס מהטכניון, ד"ר איתי בר אור, מנהל המרכז הארצי לנגיפים בסביבה מהמעבדה המרכזית לנגיפים של משרד הבריאות, לצד אחרים.

פרופ' פרידלר אומר כי הם מקווים להציג הוכחת היתכנות (Proof of Concept) של השיטה בתוך שבועיים-שלושה, ואז להתקדם וליישמה במידה נרחבת יותר. "אנחנו רוצים להודות גם לאנשי מקצוע רבים מתחום המים והשפכים, מרשויות ארציות ומקומיות, חברות, תאגידי מים וביוב ומהנדסים יועצים, שהתגייסו בחפץ לב לעזור בדיגום", מוסיף פרופ' פרידלר.

מכיוון שהמערכת עובדת על זיהוי החומר הגנטי של נגיפים, אם היא תראה את יעילותה ותיפרס בפריסה ארצית, בעתיד היא תוכל לשמש גם לזיהוי נוכחות של נגיפים אחרים מרגע שיפוענח הרצף הגנטי שלהם: אם נגיפים הפוגעים בבני אדם היום, ואם נגיפים חדשים שיקפצו מבעלי חיים לבני אדם, ויאיימו להיהפך למגפות כלל-עולמיות בשנים ובעשורים הבאים.



Tracking the Coronavirus Through Wastewater Testing

April 22, 2020

Medical Research

The Jerusalem Post — Israel has started analyzing wastewater for the novel coronavirus to estimate the number of infections at a population level, according to Dr. Itay Bar-Or head of the Health Ministry's national lab for environmental virology

If successful, the method could also be used as an early-warning tool to alert the country to a second wave of infection.

The team that includes **Prof. Ariel Kushmaro** and Ehud Rinnot, from BGU's Environmental Biotechnology Lab in its **Avram and Stella Goldstein-Goren Department of Biotechnology and Engineering**, first started testing stool on a small scale in the clinic.



When initial tests showed the virus in the waste, they started collecting sewage.

"If you don't have a lot of clinical tests [on people], you can use environmental monitoring," Bar-Or said. "You cannot get an exact number [of those sick], but you can get an approximation of the magnitude of infection."

The team did multiple tests in the same location, tracking if the virus found in the sewage increased as the number of infected people did – and the numbers correlated

More worrisome, he said, would be if the numbers did not correlate, which is exactly how he hopes that the testing method will be used.

"If you go to a city with only a small number of known sick people and you see a very strong signal in the sewage, you can say that something is wrong and more tests should be done," he explains.

Bar-Or notes that this method could be used to test sewage plants specific to senior living facilities, for example. If no trace of the virus is found, the country could assume residents are safe. If the virus is there, then residents and staff could be rapidly screened.

In addition, the method would allow Israel to make more informed decisions about which neighborhoods and cities to lock down – and when to lift their closures

[Read more on *The Jerusalem Post* >>](#)

[Learn more about BGU's COVID-19 Response Effort >>](#)

Stories Like This



New Technology Predicts Critical Blood Flow Issues

Sep 04, 2018

Tags: [Medical Research](#), [Press Releases](#)



BGU Med Student Develops Software to Accelerate COVID-19 Trials

Apr 24, 2020

Tags: [Medical Research](#)



BGU Water Researcher Develops Self-Sterilizing Air Filter

Apr 24, 2020

Tags: [Medical Research](#)

Regressing SARS-CoV-2 sewage measurements onto COVID-19 burden in the population: a proof-of-concept for quantitative environmental surveillance

Itay Bar-Or¹⁺, Karin Yaniv²⁺, Marilou Shagan², Eden Ozer⁹, Oran Erster¹, Ella Mendelson^{1,12}, Batya Mannasse¹, Rachel Shirazi¹, Esti Kramarsky-Winter², Oded Nir⁵, Hala Abu-Ali⁵, Zeev Ronen⁵, Ehud Rinott⁶, Yair E. Lewis⁷, Eran Friedler⁹, Eden Bitkover¹⁰, Yossi Paitan¹¹, Yakir Berchenko^{4*} and Ariel Kushmaro^{2,3*}

¹ Central Virology Lab, Ministry of Health, Sheba Medical Center, Israel

² Avram and Stella Goldstein-Goren, Department of Biotechnology Engineering, Ben-Gurion University of the Negev, Beer-Sheva, Israel.

³ The Ilse Katz Center for Meso and Nanoscale Science and Technology, Ben-Gurion University of the Negev, Be'er Sheva 8410501, Israel.

⁴ Department of Industrial Engineering and Management, Ben-Gurion University of the Negev, Beer-Sheva 84105, Israel

⁵ Zuckerberg Institute for Water Research (ZIWR), Blaustein Institutes for Desert Research, Ben-Gurion University of the Negev, Sede Boker, 84990, Israel

⁶ Faculty of Health Science, Ben-Gurion University of the Negev, Beer-Sheva, Israel

⁷ Faculty of Medicine, Technion-Israel Institute of Technology, Israel

⁸ Faculty of Civ. and Env. Eng., Technion-Israel Inst. of Technology; Haifa 32000, Israel

⁹ Department of Life Sciences, Ben-Gurion University of the Negev, Beer Sheva, Israel

¹⁰ Department of Chemical Engineering, Technion - Israel Institute of Technology, Haifa 32000, Israel

¹¹ Clinical Microbiology Laboratory, Meir Medical Center, 44282, Kfar Saba, Israel.

¹² School of Public Health, Sackler Faculty of Medicine, Tel-Aviv University, Tel-Aviv, Israel

* Corresponding authors: arielkus@bgu.ac.il, berchenk@bgu.ac.il

+ Equal contributors

Abstract

SARS-CoV-2 is an RNA virus, a member of the coronavirus family of respiratory viruses that includes SARS-CoV-1 and MERS. COVID-19, the clinical syndrome caused by SARS-CoV-2, has evolved into a global pandemic with more than 2,900,000 people infected. It has had an acute and dramatic impact on health care systems, economies, and societies of affected countries within these few months. Widespread testing and tracing efforts are employed in many countries in order to contain and mitigate this pandemic. Recent data has indicated that fecal shedding of SARS-CoV-2 is common, and that the virus can be detected in wastewater. This indicates that wastewater monitoring is a potentially efficient tool for epidemiological surveillance of SARS-CoV-2 infection in large populations at relevant scales. Collecting raw sewage data, representing specific districts, and crosslinking this data with the number of infected people from each location, will enable us to derive and provide quantitative surveillance tools. In particular, this will provide important means to (i) estimate the extent of outbreaks and their spatial distributions, based primarily on in-sewer measurements (ii) manage the early-warning system quantitatively and efficiently (and similarly, verify disease elimination). Here we report the development of a virus concentration method using PEG or alum, providing an important tool for detection of SARS-CoV-2 RNA in sewage and relating it to the local populations and geographic information. This will provide a proof of concept for the use of sewage associated virus data as a reliable epidemiological tool.

Introduction

Waterborne pathogens, including viruses, bacteria and protozoa can be shed into the urban water cycle *via* sewers, (Gormley et al. 2017 and 2020) urban runoff, agricultural runoff and wastewater discharges (Arnone and Walling, 2007; La Rosa et al., 2012). Indeed, it has been reported that there are high concentrations of virus particles in wastewater treatment plants (WWTP), varying from 10^8 to 10^{10} viral particles per milliliter (Otawa et al., 2007). Coronavirus SARS-CoV-2 is a novel RNA virus belonging to a group of viruses that includes amongst others SARS and MERS. SARS-CoV-2 is one of more than 37 coronaviruses in the *Coronaviridae* family, within the order *Nidovirales*, and it is currently causing a major pandemic with over 2,900,000 people infected globally. It causes COVID-19, a disease that has daunting effect on health care systems, economies, and societies of affected countries. As a member of the *Coronaviridae*, which includes viruses known to cause respiratory and/or intestinal infections, SARS-CoV-2 spreads primarily via micro droplets, reflecting its survivorship in humid environments (Chin et al. 2020). Recent reports have detailed SARS-CoV-2 shedding in human stool (Gao et al. 2020; Hindson 2020; Xu et al. 2020). Interestingly it has been demonstrated that a similar corona virus, SARS-CoV-1 can survive in sewage for 14 days at 4°C, and for 2 days at 20°C, and its RNA can be detected for 8 days, even though the virus was inactive (Gundy et al. 2009; Wang et al. 2005). In recent studies, the SARS-CoV-2 virus was reported to be present in wastewater in treatment facilities (Hindson et al. 2020; Medema et al. 2020; Naddeo and Liu 2020; Wurtzer et al. 2020; Wu et al. 2020). Despite this, we are still lacking sufficient studies regarding the fate of SARS-CoV-2 throughout the different stages of wastewater collection and treatment.

Presence and prevalence of SARS-CoV-2 in wastewater provides a valuable epidemiological data source (Lodder & de Roda Husman, 2020). Wastewater-based epidemiology (WBE) is a new discipline concerned with mining chemical and biological information from municipal wastewater. WBE has been applied for populations around the globe to measure chemicals consumption and exposure patterns (Choi et al. 2019). It was proven to be useful for preclinical identification (i.e., before the population exhibited symptoms) of Aichi virus (Lodder & de Roda Husman, 2020), for monitoring antibiotic resistance on a global scale (Lodder & de Roda Husman 2020), for quantitative polio surveillance (Berchenko et al. 2017), and also as fecal indicators (Gu et al. 2018, Saeidi et al. 2018). In particular, in our previous work, (Berchenko et al. 2017) we obtained valuable epidemiological information regarding polio by analyzing two unique data sets collected during a “natural experiment”

provided by the 2013 polio outbreak in Israel (wastewater data from different locations, and records of supplemental immunization with the live vaccine). The parametric characterization of the linear dose-dependent relationship between the number of poliovirus shedders and the amount of poliovirus in sewage yielded a powerful tool for quantitative environmental surveillance (Berchenko et al. 2017). Here we report a similar study aimed at developing similar quantitative tools for SARS-CoV-2 in wastewater. These results will enable early identification and spatial-based monitoring of future outbreaks, and could be used to confirm virus elimination or to validate the need for more containment efforts.

Material and methods

Sampling: Samples were taken from wastewater treatment plants in different locations in Israel (see Table 2) as well as samples of raw sewage from different districts from the Tel Aviv metropolis. Sampling equipment was sanitized and properly sterilized (cooler, sampling bottles, biohazard bags, etc.). In addition, we used automatic samplers at targeted hot-spot areas for 24 hours. Around 200 ml were collected every 30 min for the 24 hours. Samples from the automatic sampler (6-10 L) were transported immediately to the lab where samples were poured to 2L of clean plastic bottles. Fresh 1 ml of raw sewage was taken directly into lysis buffer for RNA extraction. The rest of the sample was stored at -20°C or -80°C for virus concentration and RNA extraction stages.

Sample concentration and analysis: Viral particles from approximately 0.25-1 liter of sewage/wastewater /effluent samples were concentrated using first centrifugation to remove sediment and large particles. Secondary concentration of the supernatant was performed using polyethylene glycol (PEG) or alum (20mg/l) precipitation, followed by additional centrifugation. The mixture was incubated at 4°C with 100-rpm agitation for about 12h, then centrifuged at 14,000 g for 45 min at 4°C to pellet the virus particles. Virus particles were then resuspended in phosphate buffered saline (PBS). The aqueous phase (containing virus particles) was collected and filtered through a 0.22µm filter. Ultra-15 centrifugal tubes with a molecular weight cutoff of 30 kDa (Amicon) were used to further concentrate the sample to a final volume of 1 ml. Samples were stored at -20/-80°C until further analysis. After primary and secondary concentrations, viral RNA was extracted from the samples using viral RNA extraction kit (RNeasy mini kit- QIAGEN and EasyMAG -bioMerieux, France) and then stored at - 80°C.

Identification and quantification of Corona virus: The extracted viral nucleic acids were reverse transcribed and qPCR for the cDNA was performed using mixture containing Fast Start Universal Probe Master, forward and reverse primers including TaqMan probe. Duplicate qPCR amplification was performed in a Step One Plus real-time PCR system. Both positive-control and negative-control assays were performed for quality control. Serial dilutions of plasmid DNA containing the SARS-CoV-2 E gene used to generate the standard curve.

Results and discussion

This study enabled us to establish novel virus concentration methods (Tables 1 & 2). These methods were validated using sewage samples from the Dan Panorama Hotel in Tel Aviv, which currently functions as a COVID-19 isolation facility. Results show that the most efficient concentration methods were achieved using PEG and Alum reaching positive values with qPCR Ct of 33 and 33.6 for PEG and Alum, respectively (Table 1). We further established a proof-of-concept for our ability to detect SARS-CoV-2 RNA from raw sewage samples from different location in Israel (Table 3). We found traces of the virus in sewage originating from the Sorek wastewater treatment plant (Ct 32.9) as well as from Bnei Brak city sewage sampling points (Ct 33-37). The concentration of the virus RNA (as Ct) in the Bnei Brak sewage (the sampling points do not cover all the sewage distribution system in the city) correlated with the general number of COVID-19 positive individuals in the city (see Figure 1). Furthermore, the change observed in the Jerusalem sampling points from the end of March to 21 to April may demonstrate the dynamics of COVID-19 outbreak in the community. Interestingly the Beer Sheva, and Haifa samples were negative ($>Ct$ 40) for SARS-CoV-2, possibly related to the low proportion of infected people in these cities (Table 3).

In conclusion, we present a preliminary study demonstrating a proof-of-concept for the detection of SARS-CoV-2 RNA in sewage. We also present a linear “dose-dependent” curve as a tool for viral surveillance in environmental samples. However, we urge the readers to be cautious in their use of fig. 1 as a basis for their own data since: (i) our previous work (Berchenko et al. 2017) showed how different localities should be compared by considering daily sewage production as a measure of the local population size, and (ii) our work is still preliminary and ongoing, therefore further data is still warranted. Furthermore, we present two methods for viral isolation from wastewater by concentration with PEG and/or alum.

Understanding the ecology of SARS-CoV-2 in human waste could lead to environmental applications including efficient monitoring and surveillance of SARS-CoV-2. In the future, this study may also provide tools to for sewage monitoring as an early warning alarm for SARS-CoV-2 outbreaks in the population.

Table 1. SARS-CoV-2 virus concentration methods from sewage

Sample	Method (reference)	Ct value		Interpretation
		FAM (SARS-CoV-2)	VIC (Internal reference β -actin)	
Positive Control	BGI kit (Real Time Fluorescence RT-PCR)	27.4	27.3	Positive
TLV1 pellet	Kazama et al. 2016	32.8	31.0	Positive
TLV1 supernatant		33.1	31.9	Positive
TLV2	Mathis et al. 2017	Undetermined	34.5	Negative
TLV3	Gu et al, 2018	Undetermined	36.4	Negative
TLV4 pellet	20mg alum per liter	33.6	31.6	Positive
TLV4 supernatant		35.4	35.7	Negative

Table 2: SARS-CoV-2 detection using Alum concentration method and spin column RNA mini kit

Sample	Volume	SARS-CoV-2 (Ct)	Interpretation
Bnei-Brak	200ml	33.02	Positive
Shafdan	400ml	32.01	Positive
Beit-Shemesh	400ml	Undetermined	Negative
Tel Aviv, North East	200ml	Undetermined	Negative
Elad, Pethach Tikva	200ml	Undetermined	Negative

Table 3. Proof-of-concept for detecting SARS-CoV-2 from raw sewage in different localities in Israel

Name of place	Main characteristic **	Date of sampling	SARS-CoV-2 (Ct)	Adenovirus (Ct)	MS2 (Ct)	# of positive for COVID-19
Haifa	WWTP	10/03/2020	ND*	30.85	ND	
Shafdan	WWTP	10/03/2020	ND	30.48	ND	
Rahat	WWTP	25/03/2020	ND	31.14	45.57	
Arara	WWTP	25/03/2020	ND	30.17	ND	
Beer Sheva	WWTP	25/03/2020	ND	31.13	33	
Ayalon	WWTP	25/03/2020	ND	30.59	ND	
Zfat	WWTP	26/03/2020	ND	33.33	33.53	
El Hamra	WWTP	26/03/2020	ND	33.82	33.29	
Haifa	WWTP	26/03/2020	ND	31.32	49.78	
Haifa	WWTP	26/03/2020	ND	ND	ND	
Sheba Hospital	HC (SN)	30/03/2020	33.22	36.9	34.43	
Kidron (Jerusalem)	WWTP	30/03/2020	ND	31.22	29.42	
Sorek (Jerusalem)	WWTP	30/03/2020	38.5	32.9	27.58	
Og (Jerusalem)	WWTP	30/03/2020	ND	31.13	ND	
Haifa	WWTP	30/03/2020	ND	32.79	ND	
Dan Panorama Hotel	IF (SN)	03/04/2020	38.03	ND	31.37	
Shmoel Ha Roffea	HC (SN)	03/04/2020	ND	ND	41.19	
Bnei Brak	SN	03/04/2020	37.24	32.14	32.46	1253
Bnei brak	SN	03/04/2020	35.57	32.88	36.1	1669
Haifa	WWTP	05/04/2020	ND	33.73	ND	
Dan Panorama Hotel	IF (SN)	13/04/2020	35.51	ND	ND	
Bnei Brak	SN	13/04/2020	33.75	36.59	32.68	2052
Nir David	SN	15/04/2020	ND	36.72	ND	
Nir Etzion	IF (SN)	16/04/2020	32.76	47.3	ND	
Sorek (Jerusalem)	WWTP	21/04/2020	34.66	32.99	ND	
Og (Jerusalem)	WWTP	21/04/2020	36.95	32.38	24.42	

* ND = Not detected / Undetermined (>Ct 40)

** HC – Hospital treating SARS-COV-2 patients; IF – isolation facility; SN – Sewer network; WWTP – wastewater treatment plant

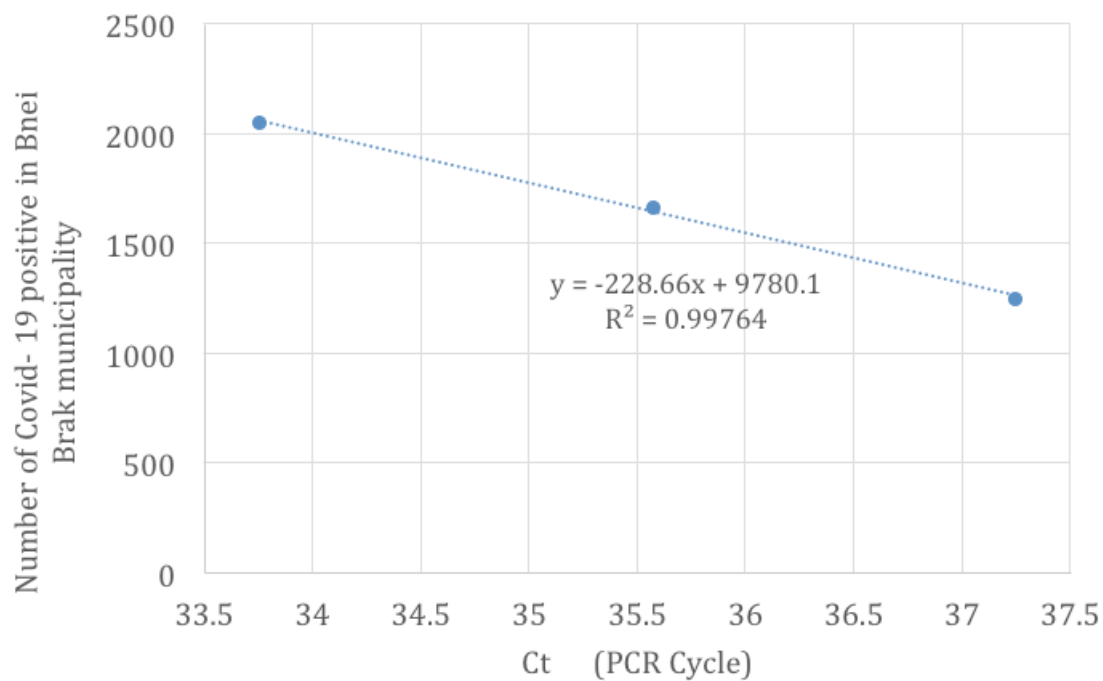


Figure 1. SARS-CoV-2 Ct in raw sewage (qPCR) verses number of positive diagnosed Covid-19 in Bnei Brak city

Reference

1. Arnone RD, Walling JP. 2007. Waterborne pathogens in urban watersheds. *J. Water Health*. 2007 Mar; 5(1):149-62.
2. Berchenko Y., Manor Y., L. S. Freedman, E. Kaliner, I. Grotto, E. Mendelson and A. Huppert. 2017. Estimation of polio infection prevalence from environmental surveillance data. *Science Translational Medicine*; Vol. 9, Issue 383, eaaf6786
3. Chin, A.W.H., Chu, J.T.S., Perera, M.R.A., Hui, K.P.Y., Yen, H.-L., Chan, M.C.W., Peiris, M., Poon, L.L.M., 2020. Stability of SARS-CoV-2 in different environmental conditions. *The Lancet Microbe* 5247, 1. <https://doi.org/10.1101/2020.03.15.20036673>
4. Choi P.M., Thomas K.V., O'Brien J.W., Mueller J.F. (2020) Mining Population Exposure and Community Health via Wastewater-Based Epidemiology. In: Jiang G., Li X. (eds) *A New Paradigm for Environmental Chemistry and Toxicology*. Springer, Singapore.
5. Gao Qin Yan, Ying Xuan Chen, Jing Yuan Fang. 2020. 2019 Novel coronavirus infection and gastrointestinal tract. *J. of Digestive Diseases*, <https://doi.org/10.1111/1751-2980.12851>
6. Gormley M., Aspray TJ., Kelly DA., Rodriguez-Gil C . 2017. Pathogen cross-transmission via building sanitary plumbing systems in a full scale pilot test-rig. *PLoS One*. 2017; 12e0171556
7. Gormley, M., Aspray, T.J., Kelly, D.A., 2020. COVID-19: mitigating transmission via wastewater plumbing systems. *Lancet Glob. Heal.* 30112. [https://doi.org/10.1016/S2214-109X\(20\)30112-1](https://doi.org/10.1016/S2214-109X(20)30112-1)
8. Gu Xiaqiong, Qi Xiang Martin Tay, Shu Harn Te, Nazanin Saeidi, Shin Giek Goh, Ariel Kushmaro, Janelle R Thompson, Karina Yew-Hoong Gin. 2018. Geospatial distribution of viromes in tropical freshwater ecosystems. *Water Research*. Volume 137, 15 June 2018, Pages 220-232.
9. Gundy, P.M., Gerba, C.P. and Pepper, I.L., 2009. Survival of coronaviruses in water and wastewater. *Food and Environmental Virology*, 1(1), p.10.
10. Hjelmsø MH, Hellmér M, Fernandez-Cassi X, Timoneda N, Lukjancenko O, Seidel M, Elsässer D, Aarestrup FM, Löfström C, Bofill-Mas S, Abril JF. Evaluation of methods for the

- concentration and extraction of viruses from sewage in the context of metagenomic sequencing. *PLoS One*. 2017;12(1).
11. Hindson Jordan. 2020. COVID-19: faecal–oral transmission? *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology* (2020). <https://www.nature.com/articles/s41575-020-0295-7>
 12. Kazama S, Masago Y, Tohma K, Souma N, Imagawa T, Suzuki A, Liu X, Saito M, Oshitani H, Omura T. Temporal dynamics of norovirus determined through monitoring of municipal wastewater by pyrosequencing and virological surveillance of gastroenteritis cases. *Water research*. 2016 Apr 1;92:244-53.
 13. La Rosa Corinna , Jeff Longmate, Simon F. Lacey, Teodora Kaltcheva, Rahul Sharan, Denise Marsano, Peter Kwon, Jennifer Drake, Brenda Williams, Sharon Denison, Suenell Broyer, Larry Couture, Ryotaro Nakamura,⁷ Morris I. Kelsey, Arthur M. Krieg, Don J. Diamond and John A. Zaia. 2012. Clinical Evaluation of Safety and Immunogenicity of PADRE-Cytomegalovirus (CMV) and Tetanus-CMV Fusion Peptide Vaccines With or Without Adjuvant. *J Infect Dis*. 2012 Apr 15; 205(8): 1294–1304.
 14. Lodder Willemijn and Ana Maria de Roda Husman. 2020. SARS-CoV-2 in wastewater: potential health risk, but also data source. *The lancet*. DOI:[https://doi.org/10.1016/S2468-1253\(20\)30087-X](https://doi.org/10.1016/S2468-1253(20)30087-X)
 15. Medema, G., Heijnen, L., Elsinga, G., Italiaander, R. and Brouwer, A., 2020. Presence of SARS-Coronavirus-2 in sewage. *MedRxiv*.
 16. Naddeo Vincenzo and Haizhou Liu. 2020. Editorial Perspectives: 2019 novel coronavirus (SARS-CoV-2): what is its fate in urban water cycle and how can the water research community respond? *Environ. Sci.: Water Res. Technol*. DOI: 10.1039/D0EW90015J
 17. Otawa, Kenichi; Lee, Sang Hyon; Yamazoe, Atsushi; Onuki, Motoharu; Satoh, Hiroyasu; Mino, Takashi. 2007. Abundance, diversity, and dynamics of viruses on microorganisms in activated sludge processes. *MICROBIAL ECOLOGY* 53: 143-152
 18. Saeidi Nazanin, Xiaoqiong Gu, Tran Ngoc Han, Shin Giek Goh, Masaaki Kitajima, **Ariel Kushmaro**, Bradley Schmitz, and Karina Gin. 2018. Occurrence

- of traditional and alternative fecal indicators in tropical urban environments under different land use patterns. *Appl. Environ. Microbiol.* 84 (14), e00287-18
19. Wang XW, Li J, Guo T, Zhen B, Kong Q, Yi B, Li Z, Song N, Jin M, Xiao W, Zhu X, Gu C, Yin J, Wei W, Yao W, Liu C, Li J, Ou G, Wang M, Fang T, Wang G, Qiu Y, Wu H, Chao F, Li J. 2005. Concentration and detection of SARS coronavirus in sewage from Xiao Tang Shan Hospital and the 309th Hospital of the Chinese People's Liberation Army. *Water Sci Technol.* 52(8):213-21.
20. Wu FQ; Xiao A; Zhang JB; Gu XQ; Lee WL; Kauffman K; Hanage WP; Matus M; Ghaeli N; Endo N; Duvallet C; Moniz K; Erickson TB; Chai PR; Thompson J; Alm EJ. 2020. SARS-CoV-2 titers in wastewater are higher than expected from clinically confirmed cases. medRxiv preprint doi: <https://doi.org/10.1101/2020.04.05.20051540>
21. Wurtzer S, Marechal V, Mouchel JM, & Moulin L. 2020. Time course quantitative detection of SARS-CoV-2 in Parisian wastewaters correlates with COVID-19 confirmed cases. medRxiv preprint doi: <https://doi.org/10.1101/2020.04.12.20062679>
22. Xu Yi, Xufang Li, Bing Zh1, Huiying Liang, Chunxiao Fang, Yu Gong, Qiaozhi Guo5, Xin Sun, Danyang Zhao, Jun Shen, Huayan Zhang, Hongsheng Liu, Huimin Xia, Jinling Tang, Kang Zhang and Sitang Gong. 2020. Characteristics of pediatric SARS-CoV-2 infection and potential evidence for persistent fecal viral shedding. *Nature Medicine.* <https://doi.org/10.1038/s41591-020-0817-4>.

Acknowledgments

We would like to thank funding from Ben Gurion University, The Corona Challenge Covid-19 (<https://in.bgu.ac.il/en/corona-challenge/Pages/default.aspx>) and to the wastewater treatment plants operators and **IGUDAN** (<http://www.igudan.org.il>) for their help in the sampling efforts.