



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO TECNOLÓGICO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA AMBIENTAL**

Lucas Luís Meigre Dias Pereira

**DETECÇÃO DE SARS-CoV-2 EM ÁGUAS RESIDUÁRIAS DA REGIÃO
METROPOLITANA DA GRANDE VITÓRIA (RMGV) COM PROPOSTA DE
MODELAGEM NUMÉRICA POPULACIONAL PARA COVID-19.**

**VITÓRIA
2022**

Lucas Luís Meigre Dias Pereira

**DETECÇÃO DE SARS-CoV-2 EM ÁGUAS RESIDUÁRIAS DA REGIÃO
METROPOLITANA DA GRANDE VITÓRIA (RMGV) COM PROPOSTA DE
MODELAGEM NUMÉRICA POPULACIONAL PARA COVID-19.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação
em Engenharia Ambiental da Universidade Federal do
Espírito Santo como requisito parcial para obtenção de título
de Mestre em Engenharia Ambiental na área de
concentração Saneamento.

Orientador: Prof.^o. Dr. Sérvio Túlio Alves Cassini

VITÓRIA
2022

Ficha catalográfica disponibilizada pelo Sistema Integrado de
Bibliotecas - SIBI/UFES e elaborada pelo autor

M512d Meigre Dias Pereira, Lucas Luís, 1998-
DETECÇÃO DE SARS-CoV-2 EM ÁGUAS RESIDUÁRIAS
DA REGIÃO METROPOLITANA DA GRANDE VITÓRIA
(RMGV) COM PROPOSTA DE MODELAGEM NUMÉRICA
POPULACIONAL PARA COVID-19. / Lucas Luís Meigre Dias
Pereira. - 2022.
85 f. : il.

Orientador: Sérvio Túlio Alves Cassini.
Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental) -
Universidade Federal do Espírito Santo, Centro Tecnológico.

1. Vírus. 2. Epidemiologia molecular. 3. Águas residuais -
Aspectos ambientais. I. Alves Cassini, Sérvio Túlio. II.
Universidade Federal do Espírito Santo. Centro Tecnológico. III.
Título.

CDU: 628



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO TECNOLÓGICO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA AMBIENTAL

Ata da Quadringentésima Quadragésima Primeira (441ª) Sessão de Defesa de Dissertação de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental (PPGEA) do Centro Tecnológico (CT) da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), do aluno **Lucas Luis Meigre Dias Pereira**, candidato ao grau de Mestre em Engenharia Ambiental.

Às dez horas do dia vinte e nove de março de dois mil e vinte e dois (29/03/2022) por videoconferência. O Prof. Dr. Sérvio Túlio Alves Cassini, presidindo a Sessão, deu início aos trabalhos apresentando ao público presente ao candidato **Lucas Luis Meigre Dias Pereira**, e a banca examinadora da dissertação, composta pelos seguintes membros: Prof.^a Dr.^a Regina Pinho Keller – Examinadora Interna - PPGEA/CT/UFES, Prof.^a Dr.^a Liliana Cruz Spano – Examinadora Externa - CCS/UFES e Prof.^a Dr.^a Larissa Bernadino Moro – Examinadora Externa - SECTIDES. O Senhor Presidente da Banca Examinadora, Prof. Dr. Sérvio Túlio Alves Cassini passou em seguida a palavra ao candidato, que em trinta minutos apresentou a Dissertação de Mestrado intitulada **“DETECÇÃO DE SARS-CoV-2 EM ÁGUAS RESIDUÁRIAS DA REGIÃO METROPOLITANA DA GRANDE VITÓRIA (RMGV) COM PROPOSTA DE EPIDEMIOLOGIA BASEADA EM ESGOTOS (EBE)”**. Dando prosseguimento aos trabalhos de defesa da dissertação, o Senhor Presidente passou a palavra aos membros da Banca, um a um, iniciando os comentários de arguição da candidata com a examinadora externa. Após, o Senhor Presidente teceu comentários sobre o trabalho do candidato e franqueou a palavra ao público presente. Findada a arguição, o Senhor Presidente convidou a Banca Examinadora se reunir em separado, para deliberação. Ao retornar, o Senhor Presidente informou ao público presente a decisão da banca que resultou na APROVAÇÃO do examinado. Por fim, o presidente da sessão alertou que o aprovado somente terá direito ao título de Mestre em Engenharia Ambiental após entrega da versão final de sua dissertação, em papel e meio digital, à Secretária do Programa com as correções apontadas pela banca, cumpridos todos os trâmites exigidos pelo Regimento do PPGEA e da homologação do resultado da defesa pelo Colegiado Acadêmico do PPGEA. Por fim, declarou encerrada a sessão, e eu, Sérvio Túlio Alves Cassini, Professor do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental, do Centro Tecnológico, lavrei a presente ata, que irá assinada pelos membros da Banca Examinadora e pelo mestrando.

Prof. Dr. Sérvio Túlio Alves Cassini
Orientador - PPGEA/CT/UFES

Prof.^a Dr.^a Regina Pinho Keller
Examinadora Interna – PPGEA/CT/UFES

Prof.^a Dr.^a Liliana Cruz Spano
Examinadora Externa – CCS/UFES

Prof.^a Dr.^a Larissa Bernadino Moro
Examinadora Externa – SECTIDES

Lucas Luis Meigre Dias Pereira
Mestrando

Vitória/ES, 29 de março de 2022



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO TECNOLÓGICO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA AMBIENTAL

**PARECER ÚNICO DA BANCA
EXAMINADORA**

O candidato **Lucas Luis Meigre Dias Pereira**, orientada pelo **Prof. Dr. Sérgio Túlio Alves Cassini – PPGEA/CT/UFES**, apresentou a dissertação de Mestrado “**DETECÇÃO DE SARS-CoV-2 EM ÁGUAS RESIDUÁRIAS DA REGIÃO METROPOLITANA DA GRANDE VITÓRIA (RMGV) COM PROPOSTA DE EPIDEMIOLOGIA BASEADA EM ESGOTOS (EBE)**”, junto ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental - PPGEA/UFES. Esta dissertação, defendida em sessão pública realizada nesta data, foi avaliada pela banca examinadora, com o seguinte parecer:

(☒) **Aprovada**

(☐) **Reprovada**

Prof. Dr. Sérgio Túlio Alves Cassini
Orientador - PPGEA/CT/UFES

Prof.^a Dr.^a Regina Pinho Keller
Examinadora Interna – PPGES/CT/UFES

Prof.^a Dr.^a Liliana Cruz Spano
Examinadora Externa – CCS/UFES

Prof.^a Dr.^a Larissa Bernadino Moro
Examinadora Externa – SECTIDES

Vitória/ES, 29 de março de 2022



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO TECNOLÓGICO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA AMBIENTAL

**REGISTRO DE JULGAMENTO DE DISSERTAÇÃO DO CANDIDATO AO GRAU DE MESTRE PELO
PPGEA/CT/UFES**

A Banca Examinadora da Dissertação de Mestrado intitulada “**DETECÇÃO DE SARS-CoV-2 EM ÁGUAS RESIDUÁRIAS DA REGIÃO METROPOLITANA DA GRANDE VITÓRIA (RMGV) COM PROPOSTA DE EPIDEMIOLOGIA BASEADA EM ESGOTOS (EBE)**”, elaborada e defendida publicamente por **Lucas Luis Meigre Dias Pereira**, candidato ao grau de MESTRE EM ENGENHARIA AMBIENTAL. Orientado pelo **Prof. Dr. Sérgio Túlio Alves Cassini - PPGEA/CT/UFES**, recomendou após apresentação oral da dissertação, realizada no dia 29 de março de 2022, que a mesma seja:

☒ **Aprovada**

☐ **Reprovada**

Prof. Dr. Sérgio Túlio Alves Cassini
Orientador - PPGEA/CT/UFES

Prof.^a Dr.^a Regina Pinho Keller
Examinadora Interna – PPGEA/CT/UFES

Prof.^a Dr.^a Liliana Cruz Spano
Examinadora Externa – CCS/UFES

Prof.^a Dr.^a Larissa Bernadino Moro
Examinadora Externa – SECTIDES

Vitória/ES, 29 de março de 2022



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO TECNOLÓGICO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA AMBIENTAL

DETECÇÃO DE SARS-CoV-2 EM ÁGUAS RESIDUÁRIAS DA REGIÃO METROPOLITANA DA GRANDE VITÓRIA (RMGV) COM PROPOSTA DE EPIDEMIOLOGIA BASEADA EM ESGOTOS (EBE)

Lucas Luis Meigre Dias Pereira

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Sérgio Túlio Alves Cassini
Orientador - PPGEA/CT/UFES

Prof.^a Dr.^a Regina Pinho Keller
Examinadora Interna – PPGES/CT/UFES

Prof.^a Dr.^a Liliana Cruz Spano
Examinadora Externa – CCS/UFES

Prof.^a Dr.^a Larissa Bernadino Moro
Examinadora Externa – SECTIDES

ELISA VALENTIM GOULART
Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental
UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO

Vitória/ES, 29 de março de 2022



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO TECNOLÓGICO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA AMBIENTAL

**(441^a) Quadringentésima Quadragésima Primeira Sessão de Defesa de
Dissertação de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em
Engenharia Ambiental do CT/UFES**

CANDIDATO: Lucas Luis Meigre Dias Pereira

Orientador: Prof. Dr. Sérvio Túlio Alves Cassini - PPGEA/CT/UFES

Banca Examinadora:

Exam. Interna: Prof.^a Dr.^a Regina Pinho Keller – PPGEA/UFES
Exam. Externa: Prof.^a Dr.^a Liliana Cruz Spano – CCS/UFES
Exam. Externa: Prof.^a Dr.^a Larissa Bernadino Moro – SECTIDES

**Título: “DETECÇÃO DE SARS-CoV-2 EM ÁGUAS RESIDUÁRIAS DA
REGIÃO METROPOLITANA DA GRANDE VITÓRIA (RMGV) COM
PROPOSTA DE EPIDEMIOLOGIA BASEADA EM ESGOTOS (EBE)”**



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO

PROTOCOLO DE ASSINATURA



O documento acima foi assinado digitalmente com senha eletrônica através do Protocolo Web, conforme Portaria UFES nº 1.269 de 30/08/2018, por
SERVIO TULIO ALVES CASSINI - SIAPE 427684
Departamento de Engenharia Ambiental - DEA/CT
Em 04/04/2022 às 16:33

Para verificar as assinaturas e visualizar o documento original acesse o link:
<https://api.lepisma.ufes.br/arquivos-assinados/403237?tipoArquivo=O>



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO

PROTOCOLO DE ASSINATURA



O documento acima foi assinado digitalmente com senha eletrônica através do Protocolo Web, conforme Portaria UFES nº 1.269 de 30/08/2018, por
LILIANA CRUZ SPANO - SIAPE 1172750
Departamento de Patologia - DPA/CCS
Em 05/04/2022 às 10:49

Para verificar as assinaturas e visualizar o documento original acesse o link:
<https://api.lepisma.ufes.br/arquivos-assinados/420369?tipoArquivo=O>



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO

PROTOCOLO DE ASSINATURA



O documento acima foi assinado digitalmente com senha eletrônica através do Protocolo Web, conforme Portaria UFES nº 1.269 de 30/08/2018, por
REGINA DE PINHO KELLER - SIAPE 3245699
Departamento de Engenharia Ambiental - DEA/CT
Em 06/04/2022 às 15:19

Para verificar as assinaturas e visualizar o documento original acesse o link:
<https://api.lepisma.ufes.br/arquivos-assinados/433840?tipoArquivo=O>

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha família, pelo esforço feito para que eu pudesse chegar até essa etapa da minha realização profissional.

Aos meus amigos, pelo apoio, incentivo e torcida pela realização dos meus sonhos pessoais e acadêmicos.

Aos meus amigos do LACAR, por toda ajuda, apoio, descontração e momentos felizes que tivemos juntos.

*"Embora os sábios, ao morrer, saibam que a treva lhes perdura,
Porque suas palavras não garfaram a centelha esguia,
Eles não entram nessa noite acolhedora com doçura."
Dylan Thomas em "No sono campestre" (1952)*

RESUMO

Após identificação inicial do SARS-CoV-2 e a declaração pela OMS da pandemia de COVID19, ocorrido em 11 de março de 2020, Medema et al (2020) descreveram que, através da análise de amostras de esgoto bruto de estações de tratamento de esgoto e aeroportos, foi possível identificar o SARS-COV-2, sendo o primeiro trabalho a detectar o vírus em amostras de águas residuárias. Portanto, este estudo tem como objetivo realizar a detecção de sars-cov-2 em águas residuárias da região metropolitana da grande vitória (RMGV), no estado do Espírito Santo, em valões e hospitais e estabelecer, através de uma ferramenta computacional desenvolvida, uma proposta de compilação e divulgação de dados baseada na epidemiologia baseada no esgoto (EBE). Foram coletadas amostras de esgoto bruto por amostragem simples em valões e hospitais e concentrados através de precipitação por Polietilenoglicol. O RNA foi extraído utilizando *beads* magnéticas e a detecção realizada através dos genes alvo E e RdRp. No total de amostras avaliadas, sete (25,9%) foram determinadas como positivas para a presença do SARS-CoV-2 em valões com Ct médio de 26 e trinta e duas (45,7%) em hospitais com Ct médio de 28. Foi possível detectar VoCs de SARS-CoV-2 em 4 amostras oriundas de valões, sendo detectada a variante gama (P1). Os algoritmos utilizados para teste da ferramenta computacional não apresentaram linearidade satisfatória de resultados, porém, evidenciaram a potencialidade dessa ferramenta desenvolvida para estudo estudos de avaliação epidemiológica. este estudo é o primeiro a estabelecer a correlação da detecção de rna de sars-cov-2 em esgoto urbano presente nos valões, com agrupamentos populacionais localizados no município de Vila Velha, Espírito Santo, bem como em hospitais da região metropolitana da grande vitória, implantando com sucesso a metodologia proposta. Recomenda-se a manutenção e desenvolvimento de novos estudos que busquem definir padronizações para o monitoramento ambiental que possam contribuir para o avanço e implementação da ferramenta computacional aqui testada para abordagens e estratégias locais de epidemiologia baseada no esgoto (EBE).

ABSTRACT

After the identification of SARS-CoV-2 and the declaration by the WHO of the COVID19 pandemic, Medema et al (2020) described that, through the analysis of samples of raw wastewater from treatment plants and airports, it was possible to identify the RNA of SARS-COV-2, being the first work to detect that virus in samples of wastewater. Therefore, this study aims to carry out the detection of SARS-CoV-2 in wastewater from the metropolitan region of Grande Vitória (RMGV), in the state of Espírito Santo, in ditches and hospitals and to establish, through a developed computational tool, a proposal for the compilation and dissemination of data based on wastewater-based epidemiology (WBE). Samples of raw wasteeater were collected in ditches and hospitals and concentrated through precipitation by polyethylene glycol. RNA was extracted using magnetic beads and detection was performed through the target genes E and RdRp. In the total of samples evaluated, seven (25.9%) were determined to be positive for the presence of SARS-CoV-2 in ditches with an average Ct of 26 and thirty-two (45.7%) in hospitals with an average Ct of 28 .It was possible to detect SARS-CoV-2 VoCs in 4 samples from ditches, with the gamma variant (P1) being detected. The algorithms used to test the computational tool did not show satisfactory linearity of results, however, they showed the potential of this tool developed for the study of epidemiological evaluation studies. This study is the first to establish the correlation of the detection of SARS-CoV-2 RNA in urban wastewater present in the ditches, with population groups located in the municipality of Vila Velha, Espírito Santo, as well as in hospitals in the RMGV, successfully implementing the proposed methodology. It is recommended the maintenance and development of new studies that seek to define standards for environmental monitoring that can contribute to the advancement and implementation of the computational tool tested here for local approaches and strategies of wastewater-based epidemiology (WBE).

LISTA DE ABREVIATURAS

ACE2 - Enzima Conversora de Angiotensina 2

COVID – Doença do coronavírus “*Coronavirus Disease*”

CoV - Coronavírus

CDC – Centro de prevenção e controle de doenças “Centers for Disease Control and Prevention”

CPID - Centro de Pesquisa, Inovação e Desenvolvimento

DNA - Ácido desoxirribonucleico

EBE - Epidemiologia Baseada no Esgoto

ETE - Estação de tratamento de esgoto

LACAR - Laboratório de caracterização física, química e microbiológica

MERS – Síndrome Respiratória do Oriente Médio “*Middle East Respiratory Syndrome*”

MUG - metilumbeliferil- β -D-glucoronídeo

OMS - Organização Mundial da Saúde

ONGP - orto-nitrofenil- β -D-galactopiranosídeo

ORF – Fase de leitura aberta “*Open Reading Frame*”

PEG - Polietileno Glicol

PCR – Reação em cadeia da polimerase “*Polymerase Chain Reaction*”

qPCR – Reação em cadeia da polimerase quantitativa “*Quantitative Polymerase Chain Reaction*”

RNA - Ácido ribonucleico

mRNA – RNA mensageiro

ssRNA – RNA de fita simples “*single strain RNA*”

RT - Transcriptase Reversa

SARS – Síndrome Respiratória Aguda Severa “*Severe Acute Respiratory Syndrome*”

WBE – Epidemiologia baseada no esgoto “*Wastewater Based Epidemiology*”

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Histórico de surtos e epidemias importantes causadas por espécies de coronavírus. Em 2019, sete anos após o surto de SARS-CoV ocorrido na China, surge o SARS-CoV-2, causando a COVID-19 (LEDUC et al., 2004; KHALIL et al., 2020)....	16
Figura 2 – Classificação taxonômica do SARS-CoV-2 por ordem, família, subfamília, gênero e espécie (ICTV; 2021).....	17
Figura 3: Estrutura genômica comparativa dos β CoVs SARS-CoV-2, SARS-CoV e MERS-CoV (SHEREEN et al., 2020).....	18
Figura 4: Organização do genoma completo do SARS-CoV-2 contendo representação e função de suas proteínas não estruturais, estruturais e proteínas acessórias (ARYA et al., 2020).....	19
Figura 5: Ciclo de replicação representado do SARS-CoV-2. A numeração de 1 a 12 representa as etapas do ciclo, da adesão à formação de novas partículas virais (ARYA et al., 2020).....	20
Figura 6: Esquema representativo das proteínas estruturais pertencentes ao SARS-CoV-2, relacionando com a estrutura genômica apresenta pelo vírus (International Committee on Taxonomy of Viruses, 2021).....	21
Figura 7: A) Representação esquemática da estrutura de domínio do monômero e monômero de proteína S na conformação aberta (B) (ARYA et al., 2020).....	22
Figura 8: Representação da ligação da porção do receptor do domínio de ligação da proteína S com o receptor ACE2 em células hospedeiras.....	22
Figura 9: Processo de adesão e adsorção celular de SARS-CoV-2 mediado pela interação da proteína S com ACE2 da célula hospedeira (CHEN et al., 2021).....	23
Figura 10: Epidemiologia Baseada no Esgoto e suas aplicações em núcleos populacionais (SIMS & KASPRZYK-HORDERN, 2020).....	29
Figura 11: Metodologias de concentração e detecção de vírus em amostras e água e esgoto (APHA, 2017).....	33
Figura 12: Fluxograma de demonstração do fluxo de análise e implementação de metodologia proposta das amostras coletadas no estudo.....	39
Figura 13: Locais de coleta das amostras de valões durante o período de Setembro de 2020 à Abril de 2021.....	41

Figura 14: : Locais de coleta das amostras de hospitais durante o período de Novembro de 2020 à Abril de 2021.....	43
Figura 15: Representação gráfica do número de cópias de RNA obtidas por RT-qPCR em escala logarítmica correlacionada com a média móvel de casos na região de coleta.....	51
Figura 16: Representação gráfica do número de cópias de RNA obtidas por RT-qPCR em escala logarítmica correlacionada com o número de pacientes internados com COVID em enfermaria no HEJSN	59
Figura 17 - Representação gráfica do número de cópias de RNA obtidas por RT-qPCR em escala logarítmica correlacionada com o número de pacientes internados com COVID em enfermaria no HUCAM.....	61
Figura 18 - Representação gráfica do número de cópias de RNA obtidas por RT-qPCR em escala logarítmica correlacionada com o número de pacientes internados com COVID em enfermaria no HEAC.....	61
Figura 19: Representação da interface principal do modelo computacional proposto para aplicar as equações de EBE propostas.....	62
Figura 20: Interface de locais salvos no modelo computacional proposto para aplicar as equações de EBE propostas.....	63
Figura 21: Interface de demonstração dos resultados no modelo computacional proposto para aplicar as equações de EBE propostas.....	63

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Coordenadas e descrição do número de coletas realizadas em valões de Setembro de 2020 à Abril de 2021.....	40
Tabela 2: Coordenadas e descrição do número de coletas realizadas em hospitais de Novembro de 2020 à Abril de 2021.....	42
Tabela 3 : Médias de Resultados obtidos das análises físico-químicas e microbiológicas realizadas nas amostras positivas para SARS-CoV-2 coletadas em valões de Setembro de 2020 à Abril de 2021.....	48
Tabela 4: Consolidação dos dados de análise dos pontos de coleta de valões durante o período de Setembro de 2020 à Abril de 2021 em relação ao número total de amostras.....	50
Tabela 5 - Resultados obtidos das análises físico-químicas e microbiológicas realizadas nas amostras positivas para SARS-CoV-2 coletadas em hospitais de Novembro de 2020 à Abril de 2021.....	54
Tabela 6: Consolidação dos dados de análise dos pontos de coleta de valões durante o período de Novembro de 2020 à Abril de 2021 em relação ao número total de amostras.....	56
Tabela 7 - Modelo de inferência quantitativa de pacientes infectados gerados pela interface proposta e testada para o Hospital Estadual Jayme dos Santos Neves. O quantitativo de Cópias genômicas é representado por CG, a incidência inferida pelo modelo por IM e a Incidência real por IR.....	64

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 OBJETIVOS	15
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	15
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
3.1 CORONAVÍRUS.....	16
3.1.1 – Histórico	16
3.1.2 Classificação taxonômica e estrutura viral	18
3.1.3 Proteínas não estruturais e ciclo de replicação	20
3.1.4 Proteínas estruturais	21
3.2 Epidemiologia Baseada no Esgoto	26
3.2.1 – Primeiros avanços	26
3.2.2 – EBE aplicada à virologia.....	27
3.2.3 Presença de SARS-CoV-2 no esgoto.....	29
3.3 MÉTODOS DE CONCENTRAÇÃO E EXTRAÇÃO DO RNA VIRAL.....	31
3.3.1 – Filtros de Microporosidade	31
3.3.2 – Precipitação por hidróxido de alumínio	32
3.3.3 – Precipitação por polietilenoglicol	33
3.3.4 – Usos e aplicabilidades.....	33
3.4 DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE RNA VIRAL POR qPCR	37
4 METODOLOGIA.....	40
4.1 COLETA DE AMOSTRAS.....	41
4.2 ANÁLISES FÍSICO QUÍMICAS	44
4.3 CONCENTRAÇÃO DE RNA.....	45
4.4 EXTRAÇÃO DE RNA	45
4.5 DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DO RNA VIRAL	46
4.6 DETECÇÃO DA VARIANTE EMERGENTE DE SARS-COV-2 GAMMA (P1)	46
4.7 MODELAGEM DE EBE	47
4.7.1 PROPOSTA DE UM MODELO DE ESTIMATIVA NUMÉRICA POPULACIONAL PARA COVID-19.....	48
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	49
5.1 Valões	49
5.1.1 – Análises físico-químicas.	49
5.1.3 – Detecção de SARS-CoV-2 no esgoto.....	51
5.2 HOSPITAIS	55
5.2.1 – Análises físico-químicas	55
5.2.1 – Detecção e quantificação de SARS-CoV-2	57

5.3 – MODELAGEM NUMÉRICA POPULACIONAL PARA COVID19 E FERRAMENTA COMPUTACIONAL DE AGRUPAMENTO DE DADOS	63
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	68
7 CONCLUSÕES	70
8 REFERÊNCIAS.....	71

1 INTRODUÇÃO

No dia 11 de março de 2020, a Organização Mundial da Saúde (OMS) declarou como pandemia o avanço da síndrome respiratória surgida em Wuhan, China, em dezembro de 2019 e causada pelo novo agente viral nomeado SARS-COV-2, causando, atualmente, mais de 104 milhões de casos confirmados e mais de 2 milhões de mortes.

No Brasil, já no segundo trimestre de 2021, o número de infectados atingiu mais de 20 milhões de brasileiros com cerca de 561 mil óbitos, em contínuo processo de avanço da doença (JOHN HOPKINS UNIVERSITY, 2021). O Estado do Espírito Santo, até o dia 04 de fevereiro de 2021, apresentou cerca de 545 mil casos, com 11.959 óbitos, demonstrando um percentual de letalidade de 2,2% (SECRETARIA DE SAÚDE DO ESPÍRITO SANTO, 2021).

Em maio de 2020, estudos realizados grupos de pesquisadores chineses monitoraram a saúde de pacientes infectados pelo SARS-COV-2, reportando pela primeira vez a presença do coronavírus nas fezes dos pacientes que apresentaram teste de RT-qPCR (PCR em tempo real) positivo por swab nasofaríngeo, assintomáticos ou não e sua persistência mesmo após teste do swab negativo (XIAO et al., 2020; WU et al., 2020).

Destarte, uma vez que estes estudos descreveram que pacientes contaminados com o coronavírus, sintomáticos ou não, eliminam o vírus pelas fezes, iniciou-se a busca por traços do microrganismo no esgoto bruto urbano. Um estudo publicado por Medema et al (2020) revelou que, através da análise de amostras de esgoto bruto de estações de tratamento de esgoto e aeroportos na Holanda, foi possível identificar o SARS-COV-2, sendo o primeiro trabalho a detectar o vírus em amostras de águas residuárias.

Estes resultados contribuíram para o desenvolvimento de estudos semelhantes pelo mundo, que revelaram que o vírus estava em circulação antes dos primeiros pacientes sintomáticos serem hospitalizados e os primeiros casos serem confirmados (LA ROSA et al., 2020; HARAMOTO et al., 2020; ORIVE et al., 2020; AHMED et al., 2020; WANG et al., 2020; RANDAZZO et al., 2020).

No Brasil, um estudo revelou que o coronavírus já estava em circulação na região sul do país desde novembro de 2019, data anterior à primeira notificação realizada em 31 de dezembro de 2020 em Wuhan, China (FONGARO et al., 2020).

Desta forma, fica a importância do entendimento do papel do esgoto como fonte de dados epidemiológicos (FOLADORI et al., 2020).

A Epidemiologia Baseada no Esgoto surge como uma ferramenta importante de entendimento e rastreamento da circulação de vírus e outras doenças em uma comunidade, oferecendo oportunidades para estimar sua prevalência, diversidade genética e distribuição geográfica. Os sistemas de águas residuárias oferecem uma abordagem prática para identificar vírus excretados nas fezes de uma região inteira, mesmo que não estejam evidentes pela vigilância clínica, uma vez que abordagens epidemiológicas tradicionais podem ser limitadas pela natureza assintomática dos pacientes e pela subnotificação de casos clínicos.

Diante da importância de estudos que correlacionem a presença do SARS-CoV-2 em águas residuárias com dados epidemiológicos gerados pela testagem clínica de pacientes diagnosticados com a COVID-19, este estudo busca detectar a presença do vírus no esgoto bruto e estabelecer um sistema de epidemiologia baseada no esgoto para avaliação, indexação e divulgação dos dados obtidos.

2 OBJETIVOS

Realizar a detecção de sars-cov-2 em águas residuárias da região metropolitana da grande vitória (RMGV) com proposta de divulgação de dados baseada na epidemiologia baseada no esgoto (EBE).

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Implementar uma metodologia de concentração, extração e detecção do SARS-COV-2 em amostras de esgoto urbano (valões) e hospitais da região metropolitana da grande Vitória (RMGV).
- Correlacionar dados de monitoramento viral com modelos de Epidemiologia Baseada em Esgotos (EBE).
- Propor um sistema de EBE.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 CORONAVÍRUS

3.1.1 – Histórico

Doenças de etiologia viral são responsáveis por grande parte dos surtos, epidemias e pandemias que atingiram a humanidade dos séculos XVIII ao XXI, sendo a grande maioria delas zoonoses, ou seja, transmitidas de animais vertebrados para o homem, permitindo que neste último haja replicação e transmissão da doença para outros seres humanos (KHALIL et al., 2020).

Um grande número de doenças virais origina-se devido à ampla capacidade de vírus, especialmente vírus de RNA, de sofrerem mutações e se adaptarem à novas espécies como hospedeiros a fim de aumentar a sua capacidade de perpetuação. O estreitamento territorial entre espécies, causado primordialmente pelo aumento do número populacional, exploração territorial, desmatamento e urbanização, origina a associação entre dois ou mais grupos, favorecendo o surgimento de doenças emergentes transmitidas entre ambas as espécies, em especial, causadas por vírus devido à alta capacidade de mutação e salto entre populações (FOSTER et al., 2018; KHALIL et al., 2020).

Portanto, a emergência de zoonoses como infecções pelo coronavírus evidencia o papel indispensável dos seres humanos na perpetuação e emergência de novas doenças, favorecendo surtos e epidemias, podendo resultar em pandemias declaradas (KHALIL et al., 2020).

Em novembro de 2002, em Foshan, China, ocorreram os primeiros relatos do primeiro surto de síndrome respiratória aguda grave, que se espalhou por diversos países e resultou em 774 mortes e 8096 casos notificados. Neste caso, o agente etiológico foi um coronavírus definido como o SARS-CoV (Sigla do inglês Severe Acute Respiratory Syndrome CoronaVirus) (LEDUC et al., 2004).

Posterior à este surto, em 2012, 10 anos após o primeiro surgimento da SARS-CoV, um novo coronavírus, o MERS-CoV, foi isolado e determinado como causador da a

síndrome respiratória do Oriente Médio, resultando em 1728 casos confirmados e 627 mortes (**Figura 1**) (KHALIL et al., 2020).

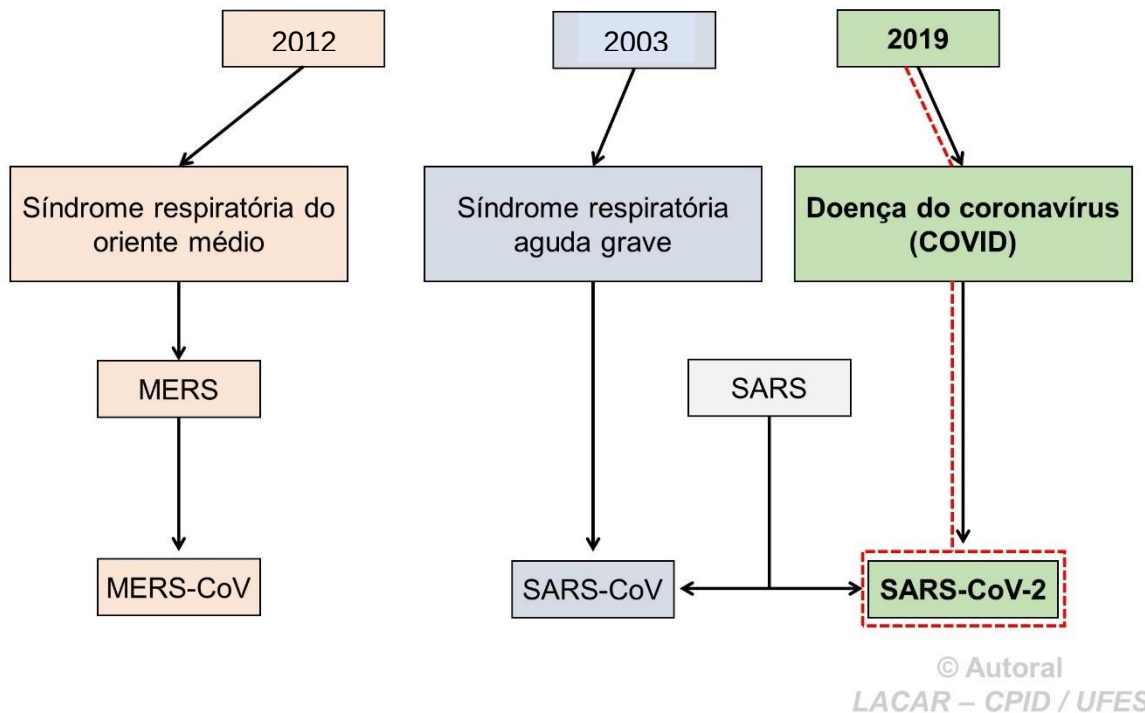


Figura 1 – Histórico de surtos e epidemias importantes causadas por espécies de coronavírus. Em 2019, sete anos após o surto de SARS-CoV ocorrido na China, surge o SARS-CoV-2, causando a COVID-19 (LEDUC et al., 2004; KHALIL et al., 2020)

Em 2019, 7 anos após os últimos relatos de casos de doenças causadas por coronavírus, surge em Wuhan, China, o que seria declarada em março de 2020, como pandemia, a COVID-19 (Sigla do inglês CoronaVirus Disease – 2019. Esta doença, de sintomatologia semelhante às ocorridas anteriores, porém, de maior potencial de transmissão, foi declarada como causada pelo SARS-CoV-2, descrito inicialmente por Zhu e Colaboradpres (2019), um novo vírus pertencente à família dos coronavírus que, até o primeiro trimestre de 2022, havia causado 378 milhões de casos com cerca de 5.7 milhões de mortes associadas à infecção (WHO, 2020; JOHN HOPKINS UNIVERSITY, 2021).

3.1.2 Classificação taxonômica e estrutura viral

O SARS-CoV-2 é o sétimo vírus da família *Coronaviridae* a ser descoberto e catalogado como capaz de infectar humanos, pertencente ao gênero betacoronavirus (β -CoV). Os gêneros *Alphacoronavirus* e *Betacoronavirus* infectam mamíferos, enquanto *Gammacoronavirus* e *Deltacoronavirus* infectam pássaros e outros seres vivos. (**Figura 2**) (ICTV, 2021).

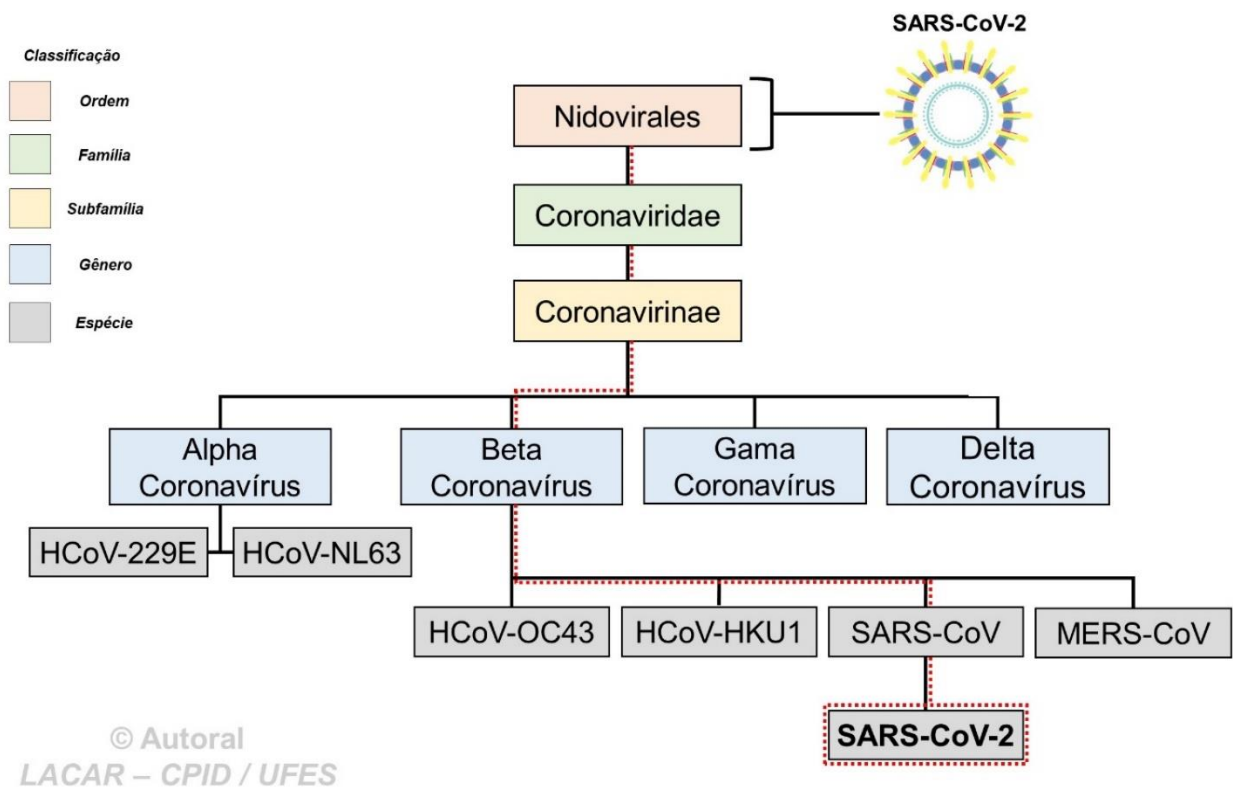


Figura 2 – Classificação taxonômica do SARS-CoV-2 por ordem, família, subfamília, gênero e espécie (ICTV, 2021).

Filogeneticamente, o SARS-CoV-2 é mais semelhante ao SARS-CoV do que ao MERS-CoV, últimos vírus da mesma família responsáveis por causar surtos e epidemias e pertencentes ao gênero β -coronavírus (β CoVs) (RAHIMI et al., 2021).

O SARS-CoV-2, especificamente, pertence à linhagem B dos β CoVs, sendo um vírus envelopado, com diâmetros médios de 80 a 120 nm. São constituídos de RNA não segmentado, fita simples (ssRNA), sentido positivo, 5'-cap, 3'-poliadenilado (**Figura 3**).

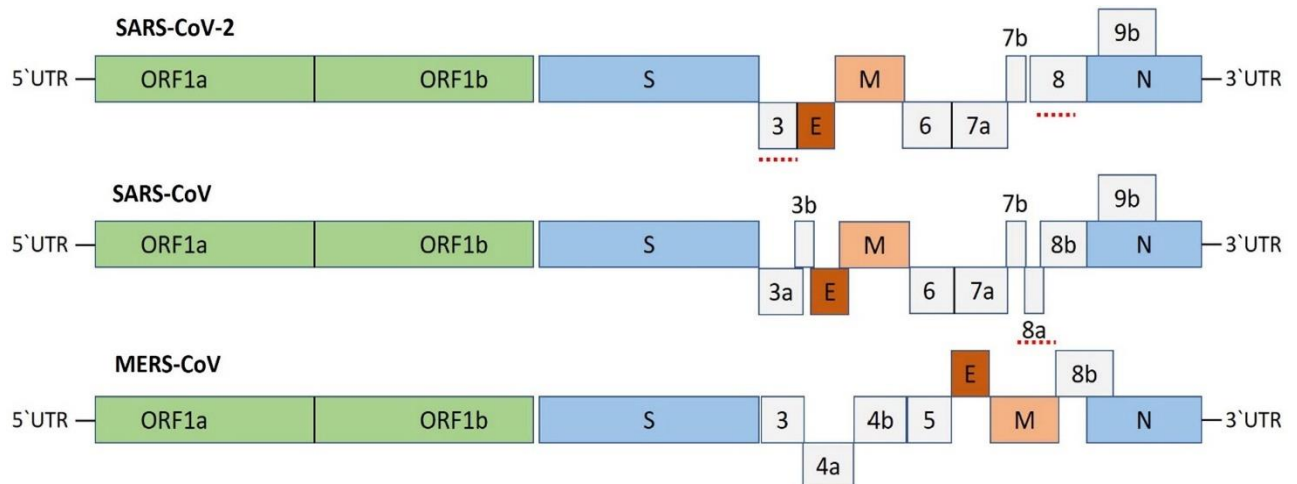


Figura 3: Estrutura genômica comparativa dos β CoVs SARS-CoV-2, SARS-CoV e MERS-CoV. Nesta figura é possível observar as diferenças pontuais entre os genomas das 3 espécies de coronavírus responsáveis por surtos, epidemias e pandemias. (SHEREEN et al., 2020)

O seu genoma apresenta sequências que exibem um comprimento diverso de 29,8 kb a 29,9 kb com 12 *open reading frames* (ORFs) que codificam 27 proteínas. A organização genômica inclui a sequência líder 5'- ORF1/ab-S- ORF3a- E-MORF6a- ORF7a- ORF7b- ORF8- N-ORF10-3' da esquerda para a direita (RAHIMI et al., 2021).

Uma série de sequências reguladoras de transcrição (TRS) está situada na junção entre cada uma dessas ORFs, bem como na extremidade 5' do RNA genômico. Grande parte do RNA do SARS-CoV-2 compreende a região ORF1a/b, codificante para 16 proteínas não estruturais (nsp1-16), incluindo o gene para a RNA polimerase RNA dependente (RdRp / nsp12), importante para o ciclo do SARS-CoV-2 por atuar no processo de replicação do seu genoma (Figura 4) (RAHIMI et al., 2021).

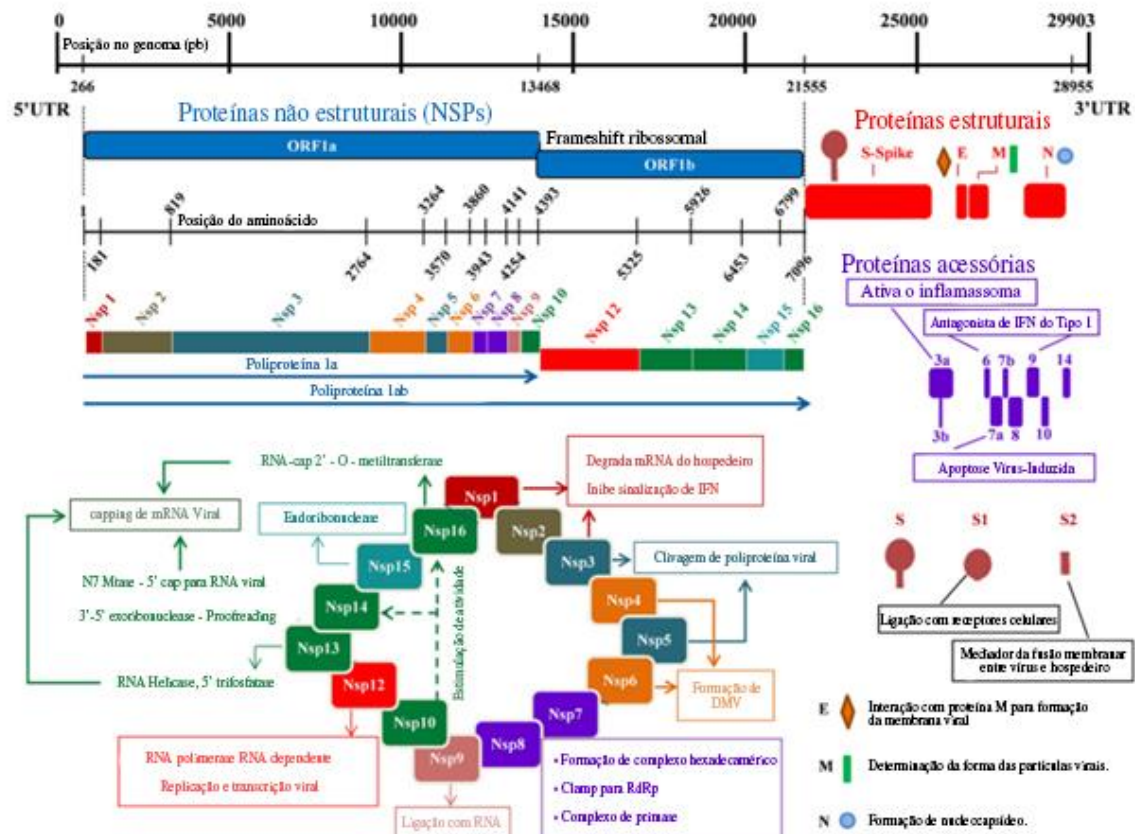


Figura 4: Organização do genoma completo do SARS-CoV-2 contendo representação e função de suas proteínas não estruturais, estruturais e proteínas acessórias (ARYA et al., 2020).

3.1.3 Proteínas não estruturais e ciclo de replicação

As proteínas não estruturais (NSPs – “*Non structural proteins*”) são definidas como complexos proteicos produzidos através do RNA viral e responsáveis por diversas funções relacionadas à replicação viral (ARYA et al., 2020).

O ciclo de replicação envolve, especificamente, as etapas de adesão, adsorção, replicação viral e liberação do vírion. Inicialmente, as partículas virais ligam-se à receptores enzima conversora de angiotensina 2 (ACE 2) através da proteínas spike (S).

Após a entrada na célula, o RNA genômico viral é liberado e traduzido pelos ribossomos da célula infectada. Resultantes do processo inicial de tradução, as poliproteínas pp1a e pp1ab são clivadas por proteases virais (PLpro / Mpro), gerando as proteínas não estruturais Nsp1-16 (**Figura 5**) (THOMS et al., 2021).

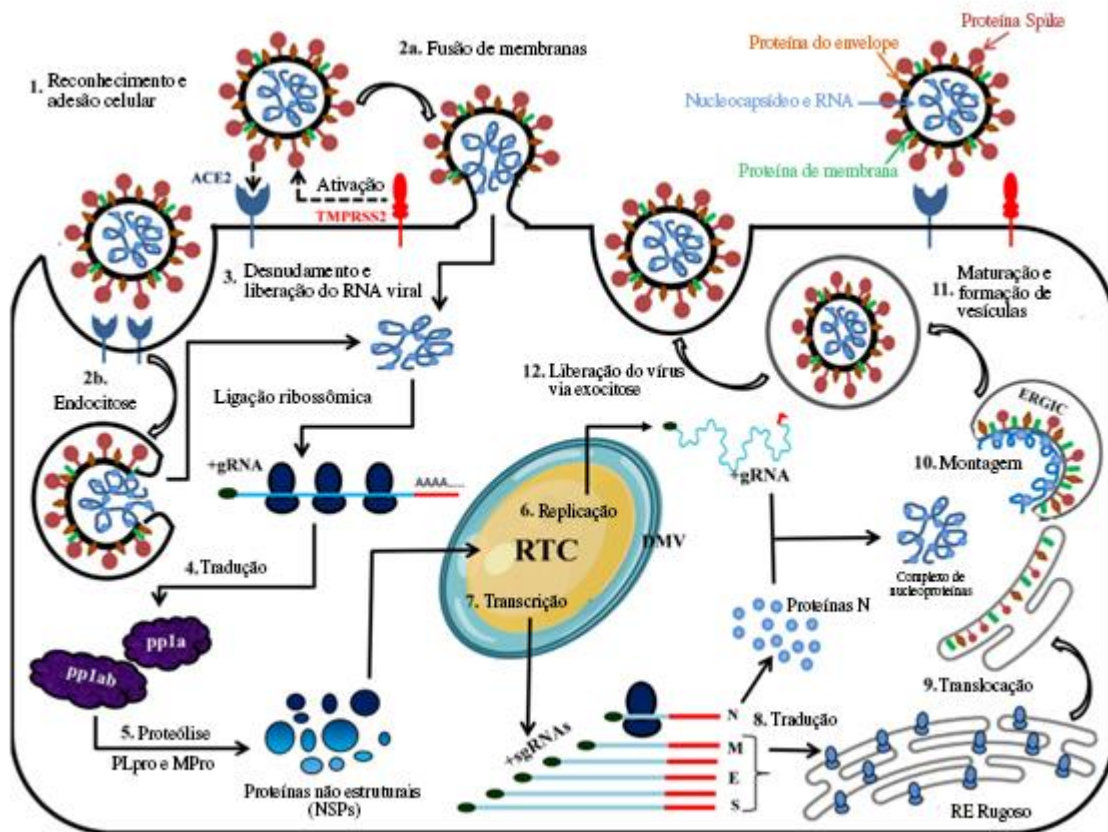


Figura 5: Ciclo de replicação representado do SARS-CoV-2. A numeração de 1 a 12 representa as etapas do ciclo, da adesão à formação de novas partículas virais (ARYA et al., 2020).

Grande parte das *NSPs* estão relacionadas com papel de apoio e função enzimática para replicação e transcrição do genoma viral na célula hospedeira para a produção de novos vírions ou transcrição de mRNAs sub-genômicos, que desempenham importante papel na formação de novas partículas virais, uma vez que são traduzidos para as proteínas estruturais S, N, E e M (ARYA et al., 2020).

3.1.4 Proteínas estruturais

O SARS-CoV-2 possui quatro proteínas principais presentes em sua estrutura, sendo elas a glicoproteína espicular '*Spike*' (S), proteína do envelope (E), glicoproteína da membrana (M) e proteína do nucleocapsídeo (N) (**Figura 6**) (International Committee on Taxonomy of Viruses, 2021).

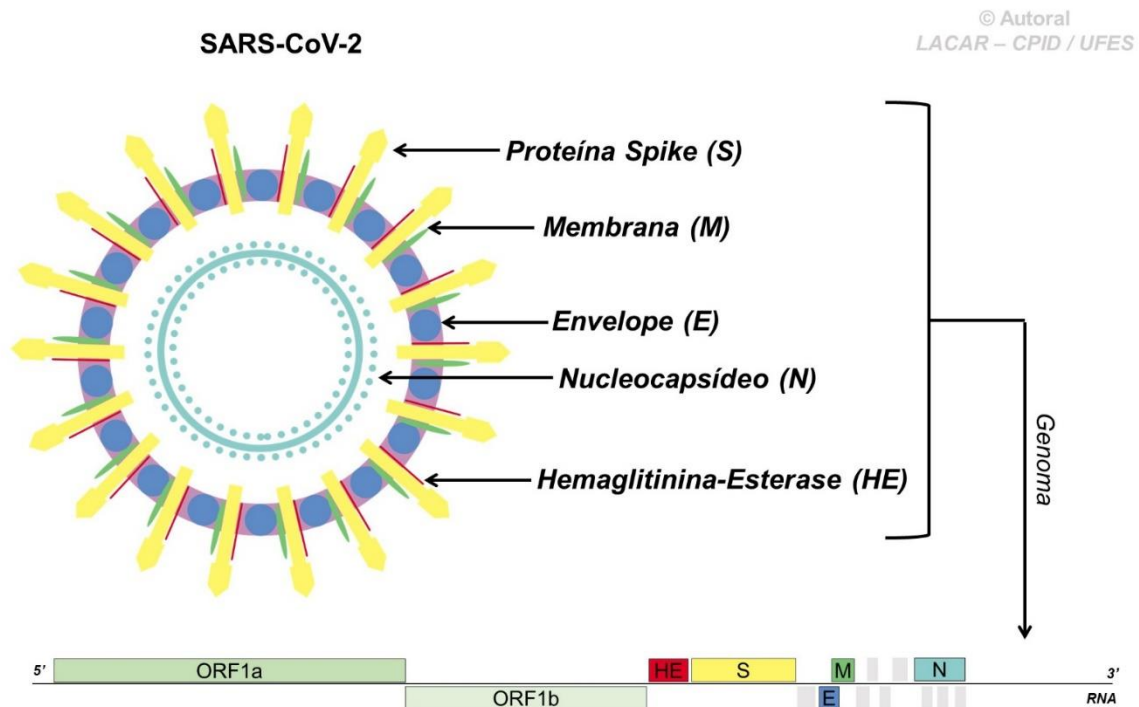


Figura 6: Esquema representativo das proteínas estruturais pertencentes ao SARS-CoV-2, relacionando com a estrutura genômica apresentada pelo vírus (International Committee on Taxonomy of Viruses, 2021).

3.1.4.1 Proteína S (Spike)

A proteína estrutural S desempenha importante papel no processo de replicação viral, pois é a proteína que desempenha o papel de ancoragem e adesão da partícula viral à superfície da célula hospedeira através da sua ligação com o receptor ACE2 (ARYA et al., 2020; WANG et al, 2020).

A proteína S possui duas subunidades principais, S1 e S2, compartilhando 77% da sequência no genoma viral com a proteína presente no SARS-CoV, vírus responsável pelo surto ocorrido em 2002 na China. A subunidade S1 desempenha um papel no reconhecimento e ligação do receptor, enquanto a subunidade S2 medeia a fusão das membranas celulares do vírus e do hospedeiro. (**Figura 7**).

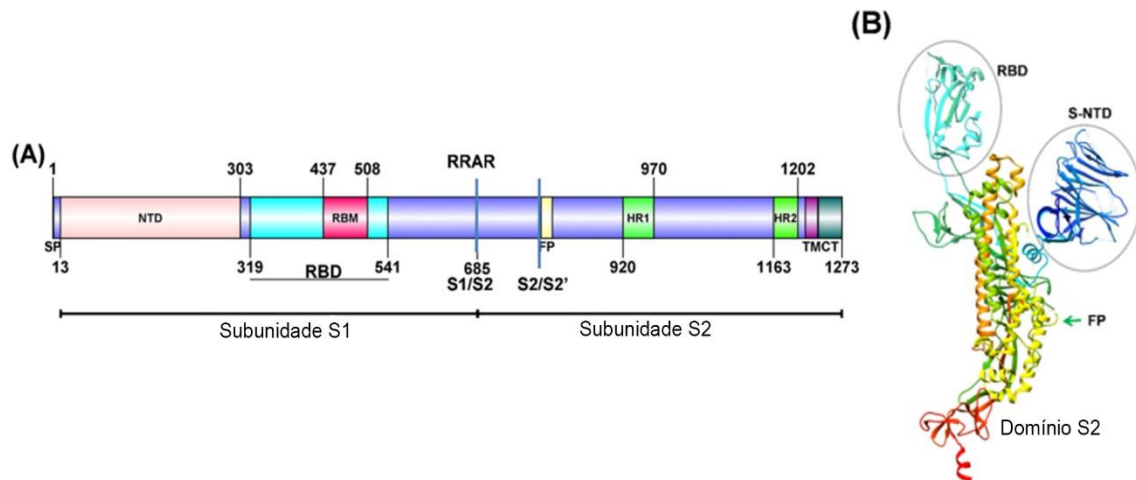


Figura 7: A) Representação esquemática da estrutura de domínio do monômero e monômero de proteína S na conformação aberta (B) (ARYA et al., 2020).

No estágio inicial do ciclo de replicação o processo de adesão da partícula viral à célula hospedeira se dá através da interação da proteína S com receptores ACE2 presentes na superfície celular (**Figura 8**).

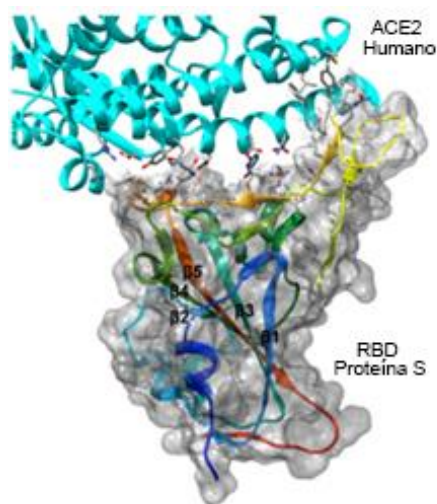


Figura 8: Representação da ligação da porção do receptor do domínio de ligação da proteína S com o receptor ACE2 em células hospedeiras.

No domínio peptidase da ACE2 ocorre a ligação do receptor do domínio de ligação (RBD) à região S1 da proteína S, resultando em clivagem da região entre S1 e S2. Este processo culmina em liberação de S1 e alteração da conformação de S2, que se estende até a membrana da célula hospedeira, sofrendo sucessivas clivagens

mediadas por serina-proteases de membrana do tipo II (TMPRSS), promovendo a fusão entre a membrana do vírus e a membrana da célula hospedeira (**Figura 9**).

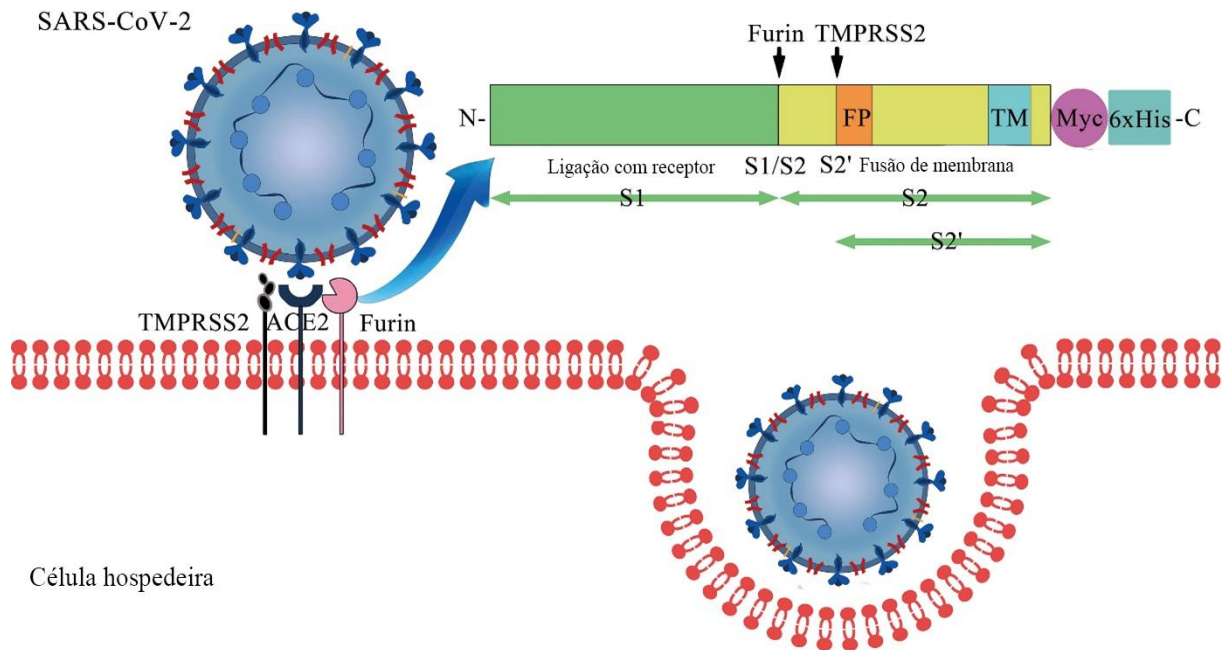


Figura 9: Processo de adesão e adsorção celular de SARS-CoV-2 mediado pela interação da proteína S com ACE2 da célula hospedeira (CHEN et al., 2021).

3.1.4.2 Proteína N (Nucleocapsídeo)

A proteína formadora do Nucleocapsídeo (N) possui importante função estrutural relacionada ao genoma viral, uma vez que empacota o RNA viral em formato helicoidal, chamado de ribonucleocapsídeo (RNP), participando da montagem de vírions pela encapsidação do genoma (ARYA et al., 2020).

Consiste em dois domínios altamente conservados: o domínio de ligação de RNA N-terminal (N-NTD; 46- 174) e o domínio de dimerização C-terminal (NCTD; 247-364) separados por uma região rica em serina/arginina.

A proteína N é produzida em alta abundância durante o processo de infecção, sendo altamente imunogênico e um alvo para desenvolvimento de vacinas. Além disso, a região do genoma viral relacionada com a produção desta proteína, o gene N, é utilizado como alvo para detecção de vírus em amostras clínicas de pacientes infectados, sintomáticos ou não, devido à sua abundância durante o processo infeccioso e especificidade (ARYA et al., 2020).

3.1.4.3 Proteína M (Membrana)

A proteína de membrana (M) é composta por 222 aminoácidos e caracterizada como glicoproteína transmembrana longa, sendo a proteína estrutural mais abundante no SARS-CoV-2. Possui três domínios principais: ectodomínio N-terminal seguido por três hélices transmembranares (TMH1-TMH3) e o endo-domínio C-terminal. Sua função está relacionada com indução de flexão de membrana, servindo como ponto para montagem de novos vírions. Este processo ocorre através de múltiplas interações homotípicas e heterotípicas com outras proteínas estruturais. (ARYA et al., 2020).

3.1.4.4 Proteína E (Envelope)

A proteína do envelope (E) é a menor estrutural proteica transmembrana do SARS-CoV-2, possuindo 75 aminoácidos em três domínios: um N-terminal hidrofílico, um hidrofóbico transmembranar (TMD) seguido por um longo endo-domínio C-terminal hidrofílico (ARYA et al., 2020).

A proteína E possui um papel importante no que tange ao desenvolvimento de sintomas relacionados à infecção do SARS-CoV-2, atuando na ativação do inflamassoma do hospedeiro e causando a tempestade de citocinas que origina a resposta inflamatória exacerbada característica durante o processo infeccioso.

O gene E, responsável por codificar a proteína, é utilizado como alvo em protocolos de PCR em tempo real para detecção de SARS-CoV-2, assim como o gene N citado anteriormente. Além disso, a característica de ativação de respostas inflamatórias pode induzir facilitação da disseminação viral, o que torna a proteína E um importante alvo vacinal (SCHOEMAN et al., 2020).

3.2 Epidemiologia Baseada no Esgoto

3.2.1 – Primeiros avanços

Doenças infecciosas de alto potencial de transmissão possuem o monitoramento do espalhamento da doença como meio de prevenção, intervenção e controle no núcleo populacional afetado. Estas metodologias dependem diretamente da capacidade dos sistemas de saúde e vigilância sanitária de testarem, identificarem e isolarem um indivíduo doente para que o ciclo de transmissão da doença seja interrompido.

Porém, o sistema de monitoramento por testagem de doentes desenvolve lentidão para tomada de decisões e pouca precisão no controle de emergências epidemiológicas, abrindo janelas para aumento da transmissão (SIMS & KASPRZYK-HORDERN, 2020).

Para auxiliar na prevenção, intervenção e controle da doença de maneira rápida e eficaz, de modo que seja possível interferir diretamente na tomada pública de decisões, alguns estudos epidemiológicos observaram os diferentes meios em que era possível detectar os agentes etiológicos de diversas doenças.

Em 1983, Feachem descreveu a possibilidade de monitoramento de microrganismos causadores de doenças através do esgoto, teorizando que, uma vez que estes microrganismos podiam estar presentes em excretas e fluidos corporais, também poderiam estar presentes no esgoto urbano, servindo de meio para o estudo destas doenças.

Partindo deste princípio, MANOR (1999), consolidando uma série de resultados obtidos pelo Laboratório de Saúde Pública de Israel, descreveu a proposta feita por este para um modelo de vigilância e monitoramento ambiental utilizando o esgoto como matriz de análise para a pesquisa e monitoramento de poliovírus, buscando entender o espalhamento da doença e efetividade vacinal (MANOR et al., 1999)

Os estudos foram conduzidos de 1989 à 1998 e, através deles, foi possível determinar o surgimento de 4 novos surtos de poliovírus sem surgimento ou detecção de

pacientes sintomáticos. Os mesmos estudos foram desenvolvidos na Finlândia, obtendo-se resultados semelhantes (MANOR et al., 1999).

Daughton (2001) aplicou em seus estudos de abordagem farmacológica os conceitos desta abordagem teórica idealizada para o monitoramento de doenças. Zuccato et al (2005) delinearam e definiram portanto o surgimento do termo “ Epidemiologia Baseada no Esgoto”, em que, então, também se tornava possível o monitoramento de parâmetros fisiológicos de grupos populacionais através da análise direta do esgoto bruto em estações de tratamento de esgoto ou sistemas de esgotamento sanitário nas regiões estudadas.

Nestes trabalhos, definiram-se as primeiras metodologias para monitoramento de uso de drogas ilícitas por grupos populacionais através da detecção no esgoto dos metabólitos excretados pelo usuários.

3.2.2 – EBE aplicada à virologia

Os vírus compreendem grande parte da carga microbiológica presente em amostras de esgoto bruto, sendo alguns deles responsáveis por doenças relacionadas à surtos e epidemias. Estes são parasitas intracelulares obrigatórios, portanto, não conseguem realizar replicação quando presentes no esgoto, diferente de alguns grupos bacterianos (XAGORARAKI & O'BRIEN , 2020).

Essa característica viral indica que a carga de partículas que pode ser encontrada no esgoto bruto está diretamente relacionada com o número de pessoas infectadas. Diversos grupos de vírus, principalmente aqueles que possuem a água como parte do seu ciclo infeccioso, podem ser detectados em amostras de esgoto bruto. Isto inclui adenovírus, astrovírus, enterovírus, vírus da hepatite A e E e norovírus e rotavírus, sendo estes dois últimos relacionados com a ocorrência de surtos de gastroenterite (GANESH et al., 2013).

Em 2014, um estudo desenvolvido na Suécia demonstrou a presença de Norovírus e Vírus da Hepatite A semanas antes do surgimento dos primeiros casos sintomáticos e detectados destas doenças pelo sistema de saúde pública da região. Estes resultados demonstraram, em estágios iniciais, a possibilidade da EBE ser utilizada como ferramenta de monitoramento e controle da doença antes do surgimento dos primeiros casos detectados, auxiliando no controle de grupos e na tomada pública de decisões (HELLMÉR et al., 2014).

Esse avanço do uso da EBE como ferramenta de monitoramento ambiental para vírus não transmissíveis pela água, em especial o SARS-CoV-2, é descrito como importante aliado nos processos de monitoramento ambiental de patógenos, prevenção, intervenção e controle do avanço da doença. Estudos que utilizam como base analítica modelos computacionais demonstram que ferramentas de EBE associadas à vigilância epidemiológica podem ser importantes para a economia de bilhões de dólares durante o curso da pandemia (HART et al., 2020).

A EBE aplicada ao monitoramento viral auxilia no manejo de curvas de contágio, detecção de comunidades com alta taxa de pacientes infectados e avaliação de eficácia vacinal. Os dados gerados através dessa ferramenta podem ser interpretados e utilizados pelos sistemas de saúde pública para contribuir em mapas de probabilidade de infecção e no manejo de recursos e isolamento de regiões com altas cargas virais detectadas, fornecendo importantes modelos epidemiológicos (SODRÉ et al., 2020; O'BRIEN & XAGORARAKI, 2019; PRADO et al., 2021; KITAJIMA et al., 2020).

Modelos epidemiológicos, por sua vez, envolvem protocolos de coleta de amostras bem estabelecidos, bem como testagem, avaliação e interpretação de dados e tomada de decisões públicas (**Figura 10**) (SIMS & KASPRZYK-HORDERN, 2020; O'BRIEN & XAGORARAKI, 2019).

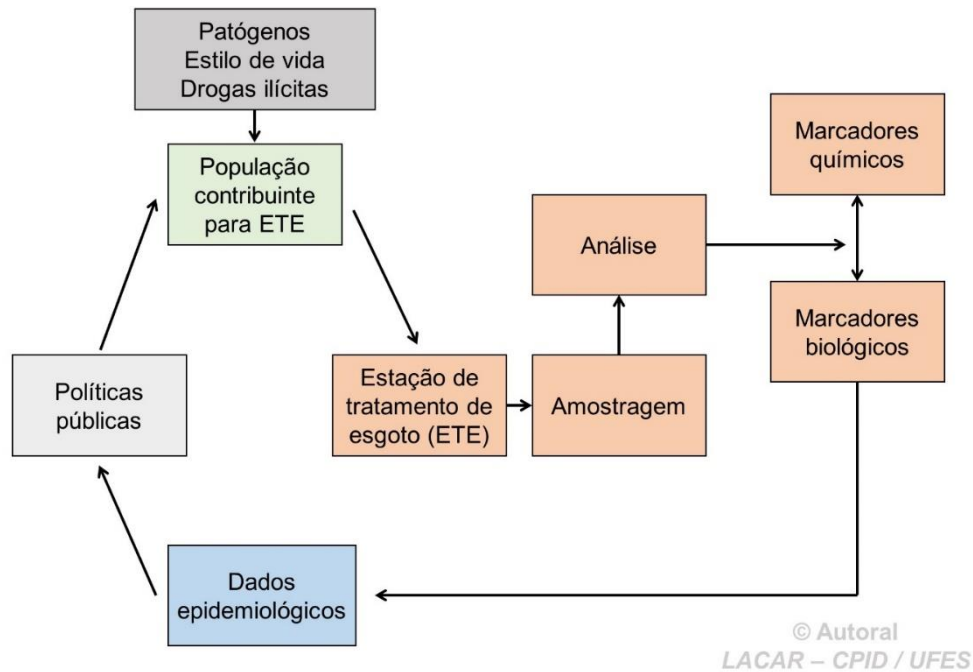


Figura 10: Consolidação das aplicações da EBE e sua correlação com núcleos populacionais contribuintes (SIMS & KASPRZYK-HORDERN, 2020).

3.2.3 Presença de SARS-CoV-2 no esgoto

Diante do avanço da COVID-19, estudos foram desenvolvidos para entender a patogênese da doença. Similar ao SARS-CoV e outros vírus da família dos Coronavírus, o SARS-CoV-2 utiliza o receptor de angiotensina de metalocarboxil peptidase (ACE2) para adesão celular (SCIALO et al., 2020).

A ACE2 é naturalmente pouco expressa em tecidos pulmonares, porém, a inflamação induzida pela presença do vírus resulta em aumento da expressão do receptor, favorecendo a adsorção viral na célula. (YAN et al., 2020).

Ainda que pouco expresso naturalmente em células pulmonares, o ACE2 é altamente expresso no intestino delgado e cólon. Esta descoberta favoreceu o entendimento da ocorrência de sintomatologia gastrointestinal em alguns pacientes positivos para SARS-CoV-2 como diarreia e desconforto intestinal (WANG et al., 2020; ZOU et al., 2020; SERFOZO et al., 2020; ZHUANG et al., 2020; ZIEGLER et al., 2020).

Sendo assim, estudos monitoraram a saúde e sintomatologia de alguns pacientes infectados pelo SARS-CoV-2 que possuíam ou não sintomas gastrointestinais, reportando, pela primeira vez a presença do vírus em amostras de fezes destes pacientes, com percentual de cerca de 60% dos pacientes avaliados, sendo possível manter a detecção do vírus nas fezes mesmo após o teste de swab nasofaríngeo negativo (CHEN et al., 2020; ZHANG et al., 2020; KIPKORIR et al., 2020; XIAO et al., 2020a; XIAO et al., 2020b; WANG et al., 2020).

A partir destes relatos iniciais, Medema et al (2020) realizou a primeira descrição da presença de SARS-CoV-2 em amostras de esgoto bruto proveniente de estações de tratamento e de um aeroporto.

Em seguida, Wu et al (2020) identificaram a presença do vírus em amostras de estações de tratamento (ETE) situadas no estado de Massachusetts, nos Estados Unidos. Este estudo foi o primeiro a detectar cargas virais no esgoto maiores do que o número provável de infectados descrito para as regiões compreendidas pela ETE, delineando como causa provável a subnotificação de casos na região, uma vez que pacientes assintomáticos também podem eliminar o vírus nas fezes e transmiti-lo por vias aéreas.

Em estudo desenvolvido na Itália, La Rosa et al (2020) descreve que, através da análise de amostras de esgoto bruto de Dezembro de 2019, antes do início da pandemia, foi possível identificar o SARS-COV-2, sugerindo que o vírus estava em circulação no país antes da declaração de pandemia pela OMS e da divulgação do primeiro caso confirmado.

Este trabalho publicado resultou no desenvolvimento de diversos outros estudos pelo mundo que buscavam identificar a presença do vírus em amostras de esgoto datadas de antes da identificação dos primeiros pacientes sintomáticos e diagnosticados com SARS-CoV-2 (MEDEMA et al., 2020; HARAMOTO et al., 2020; ORIVE et al., 2020; AHMED et al., 2020; WANG et al., 2020; RANDAZZO et al., 2020).

No Brasil, estudos desenvolvidos revelaram que o vírus já estava em circulação meses antes da primeira notificação de paciente contaminado pelo SARS-CoV-2 no mundo, feita em 31 de dezembro de 2019, em Wuhan, China, local de início da pandemia (FONGARO et al., 2019).

3.3 MÉTODOS DE CONCENTRAÇÃO E EXTRAÇÃO DO RNA VIRAL

Métodos de concentração viral em amostras ambientais constituem grande parte do processo de evolução da virologia ambiental e buscam ser eficientes em suas taxas de recuperação do vírus analisado e nos custos atribuídos à realização do método. Em sua maioria, estes estão relacionados à concentração pela ligação com proteínas estruturais virais ou com o material genético do vírus estudado (BOSCH et al., 2008, WYN-JONES & SELLWOOD, 2001).

Estes métodos também são possíveis de serem aplicados à amostras em que não há integridade da partícula viral, buscando portanto concentrar o seu material genético, explorando as cargas associadas aos ácidos nucleicos e ao meio em que eles estão suspensos, por filtração em filtros de microporosidade, precipitação por hidróxido de alumínio ou em métodos de precipitação por polietileno glicol, sugeridos no *Standard methods for the examination of water and wastewater* como os três métodos para realização de concentração de vírus em amostras ambientais (BOSCH et al., 2008; APHA, 2017).

A escolha do método utilizado depende diretamente da natureza da amostra a ser avaliada e do vírus presente nela, uma vez que alguns métodos possuem limitações à presença de interferentes, ao volume amostral e densidade viral ou à integridade da partícula viral, sendo alguns eficientes para detecção de partículas íntegras e outros para detecção de material genético suspenso.

3.3.1 – Filtros de Microporosidade

O método de concentração por filtração em membranas ou filtros de microporosidade baseia-se na adsorção da partícula viral ou do material genético do vírus ,presentes

em meio aquoso, em filtros ou membranas carregados eletronegativamente ou positivamente. Os filtros ou membranas utilizados podem ser compostos de celulose ou fibra de vidro e, a depender do tipo de carga aplicado à membrana, deve-se realizar a regulação do pH para favorecer à adsorção (APHA, 2017).

Em etapa posterior à adsorção, é realizada a eluição do material por filtração com eluente alcalino em pequenos volumes a fim de se obter o que ficou retido na membrana utilizada (APHA, 2017). Este método possui três limitações básicas associadas à aplicabilidade do métodos: I – A presença de uma alta carga de sólidos suspensos na amostra pode resultar na rápida saturação ou entupimento da membrana/filtro utilizados; II – A presença de altas taxas de matéria orgânica pode prejudicar no processo de adsorção da partícula viral à superfície carregada; III – A taxa de recuperação atribuída ao método pode sofrer drástica diminuição com uma etapa de clarificação antes da passagem da amostra pelo filtro ou membrana. Esta etapa de clarificação remove sólidos suspensos, porém, remove também consigo partículas virais que podem estar adsorvidas nos sólidos (APHA, 2017).

3.3.2 – Precipitação por hidróxido de alumínio

O método de precipitação utiliza o princípio de cargas negativas associadas à partícula viral, em que um reagente carregado eletropositivamente se liga à esta partícula favorecendo a sua precipitação após centrifugação. Este método pode ser empregado para concentrar pequenos volumes de água e esgoto ou como método secundário à filtração de microporosidade, sendo aplicado no eluído a fim de se obter uma melhor concentração.

O reagente mais utilizado para de precipitação por adsorção é o hidróxido de alumínio ($\text{Al}(\text{OH})_3$). As limitações impostas ao método delimitam-se ao volume da amostra, que, para a precipitação por adsorção, é ideal que seja pequeno e na carga de matéria orgânica na amostra que, assim como no método de filtros de microporosidade, também interfere na adsorção (APHA, 2017).

3.3.3 – Precipitação por polietilenoglicol

O método de precipitação por polietilenoglicol (PEG) de alto peso molecular foi desenvolvido e aplicado em 1969 por Horzinek et al, para concentração de arbovírus. Este método, devido à seu baixo custo e relativa eficiência, foi adaptado e aplicado à diversos outros estudos relacionados à concentração de vírus de RNA (POLSON et al., 1972; KIM et al., 2008). Em 2015, Warnes et al aplicaram o método de concentração por PEG para o HCoV-229E, vírus da família dos coronavírus.

O método consiste na separação das moléculas de água que estão ao redor da molécula de ácido nucleico pelo PEG, tornando-o exposto à outras moléculas de RNA. (RUSIÑOL et al., 2020; PHILO et al., 2021) Essa exposição causa agregação das moléculas. Ao passo que a neutralização ocorre, um sal é aplicado para neutralizar a carga negativa dos fosfatos presentes na molécula de ácido nucleico. Ao promover a agregação, uma posterior centrifugação termina com a precipitação do material genético a ser obtido (APHA, 2017).

Para SARS-CoV-2, o método de precipitação por polietilenoglicol foi aplicado por diversos estudos (HATA et al., 2020; LA ROSA et al., 2020; WU et al., 2020; KUMAR et al., 2020). Em estudo desenvolvido por Kumar et al (2020), a concentração com PEG + NaCl foi suficiente para remoção de inibidores dos sistemas de detecção de material genético viral, como a RT-qPCR (BUSTIN et al., 2020; SCHRIEWER et al., 2011).

3.3.4 – Usos e aplicabilidades

As diferentes técnicas de concentração do material genético viral podem ser combinadas para obter melhor eficiência na recuperação do DNA/RNA avaliado ou na remoção de inibidores. Variações nas técnicas de filtração por microporosidades, associadas com precipitação por PEG tem sido utilizadas para realizar detecção de SARS-CoV-2 em amostras de esgoto bruto.

Essa variação consiste na aplicação de um modelo de filtração por microporosidade para remoção de partículas e outros microrganismos indesejados e concentração do filtrado, obtendo-se recuperação do material genético do vírus avaliado. Para

manutenção da eficiência da técnica de concentração, deve ser realizado um bom processo de extração do material genético e posterior escolha da técnica empregada para detecção (**Figura 11**) (KUMAR et al., 2020).

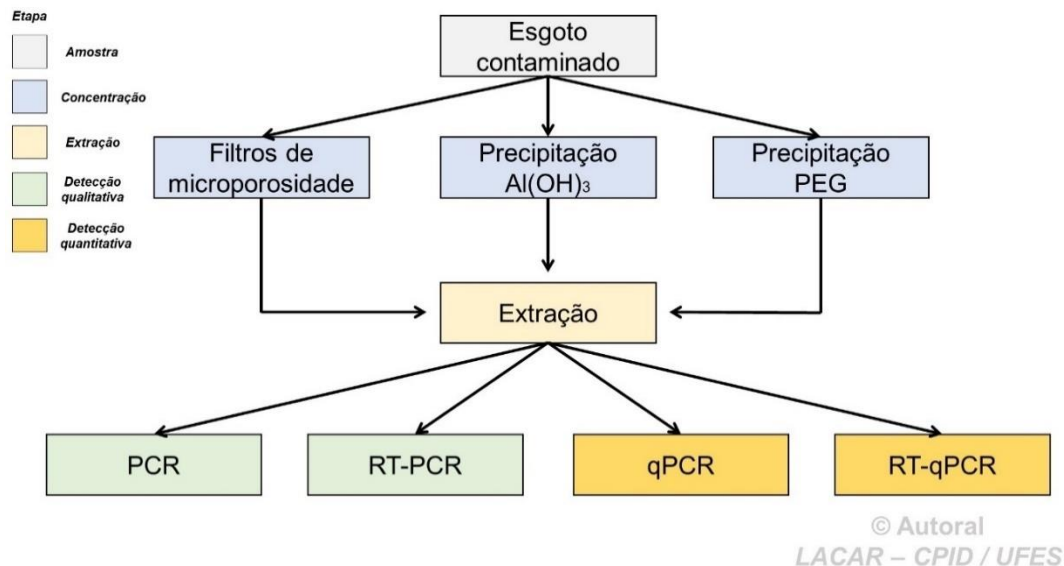


Figura 11: Metodologias de concentração e detecção de vírus em amostras e água e esgoto (APHA, 2017).

No presente estudo, a metodologia implementada para concentração de material genético viral foi a de precipitação por polietilegoglicol (PEG), um polímero amplamente utilizado na indústria farmacêutica e médica.

Os primeiros estudos de empregabilidade do PEG para precipitação de proteínas foram descritos por Lerman et al (1971), destacando o potencial desta molécula de alterar a solubilidade de alguns compostos proteicos independente da solução.

Estes estudos demonstraram que, em presença de sais, o PEG possui potencial de condensação de moléculas de ácidos nucleicos, ficando essa característica definida como condensação induzida por complexo sal-polímero (*polymer and salt-induced (psi)*), ou condensação ψ .

Este fenômeno está relacionado com a capacidade do polímero em tornar hidrofóbico o ambiente próximo à molécula de material genético, permitindo que elas precipitem e se mantenham próximas umas das outras, concentrando-as. O sal empregado na reação neutraliza a carga negativa dos grupamentos fosfato dos ácidos nucleicos (ATHAT & INGHAM, 1981; BLOOMFIELD et al., 1997; CHENG et al., 2015).

Para a precipitação por PEG empregada neste estudo, foi utilizado polietilenoglicol de alto peso molecular (PEG 8000). Ramos et al (2005) em seus estudos de estabelecimento de relação entre concentração e peso molecular do polímero, estabeleceram haver forte evidência de relação entre o potencial de concentração de material genético e o peso molecular do PEG utilizado.

Estudos posteriores de cinética e interação entre substâncias demonstraram que moléculas de PEG de maior peso molecular, quando empregada para concentração de material genético, funcionam melhor e possuem maior potencial de precipitação em comparação com moléculas de baixo peso molecular (PEG 300, 600, 1500 e 4000) (HIRANO et al., 2012 ;OJALA et al., 2014).

Estudos recentes de aplicabilidade do método de concentração por PEG para precipitação de material genético de SARS-CoV-2 demonstraram potencial e bons percentuais de recuperação do alvo. Ahmed et al (2020) utilizaram o vírus da hepatite murina (MHV), um betacoronavírus que infecta camundongos, como substituto para avaliar técnica de recuperação de material genético em diferentes metodologias de concentração. Em seus resultados, o método em que o PEG é utilizado obteve 44% de recuperação do material genético.

A metodologia utilizada em nosso estudo empregando PEG foi descrita por Kumar et al (2020). Em seu estudo, os autores descrevem o método como eficiente em recuperação de material genético do SARS-CoV-2 quando comparado com controles moleculares para processos de inibição.

Estudos posteriores em que foram utilizadas cópias genômicas do SARS-CoV-2 para determinar o potencial de recuperação do PEG foram realizados. Pérez-Cataluña et al (2021) desenvolveram um estudo para avaliação metodológica utilizando amostras de esgoto previamente testadas para SARS-CoV-2 e caracterizadas como amostras negativas.

No desenvolvimento desse estudo, foram avaliadas diferentes metodologias de concentração semeando o esgoto com três grupos virais diferentes, o PEDV, Mengovirus e o SARS-CoV-2. O estudo demonstra que a metodologia de concentração por PEG obteve maiores percentuais de recuperação quando aplicada para o SARS-CoV-2, recuperando cerca de 52.8% do material genético inoculado.

Estudos semelhantes foram realizados e determinam que utilizar o PEG é uma abordagem de potencial para recuperação de material genético de SARS-CoV-2 em esgoto bruto não tratado (BARRIL et al., 2020; JAFERALI et al., 2020; WU et al., 2020; KOCAMEMI et al., 2020; ZHANG et al., 2020; BAR-OR et al., 2020).

Após os procedimentos de precipitação e concentração, a metodologia de extração de material genético viral empregada nesse estudo envolveu a utilização de kit comercial de extração por *beads* magnéticas.

Esta metodologia de extração possui grande potencial para aplicabilidade em amostras com baixas concentrações de materiais genéticos, dada à sensibilidade da extração conferida pelo uso das *beads* (KLEIN et al., 2020).

3.4 DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE RNA VIRAL POR qPCR

O início da implantação de técnicas de detecção de vírus em amostras ambientais datam de 1940, em estudos utilizando poliovírus. Desde então, houve avanço exponencial das técnicas de detecção de partículas virais no meio ambiente, com grande passo dado na década de 90 com a implantação das inovadoras técnicas de biologia molécula (METCALF et al., 1995).

As técnicas de biologia molecular, como PCR e RT-PCR permitiram à virologia ambiental o aumento da sensibilidade e especificidade na detecção dos vírus, uma vez que viabilizam detecções em amostras fracas, sendo necessário, para algumas técnicas, apenas 1 partícula viral para que seja possível obter um resultado positivo. Além disso, é possível também obter valiosos dados acerca do genoma viral, buscando entender o surgimento de novas espécies e descrever com precisão os processos epidemiológicos relacionados à doença causada pelo vírus avaliado (BUSTIN et al., 2020).

Atualmente, além da técnica de PCR convencional, que consiste na amplificação do material genético e posterior visualização qualitativa do resultado por eletroforese, houve o surgimento da técnica de PCR em tempo real e sua aplicação no campo da virologia ambiental.

Na técnica de PCR em tempo real, ou qPCR, o material genético viral (RNA ou DNA) é detectado quantitativamente com relação ao número de cópias genômicas presentes na amostra. Por sua vez, este número de cópias apresenta correlação direta com o número de partículas virais eliminadas pela população infectada, sendo possível dimensionar o número de partículas virais ou o número provável de pessoas infectadas em determinada região que origina o esgoto analisado (BUSTIN et al., 2020).

Metodologicamente, a avaliação empregada para a detecção do SARS-COV-2 em amostras de esgoto é a RT-qPCR (PCR em tempo real) utilizando os genes alvo N e E, ORF1a e ORF1b (RdRp) e o gene S (MEDEMA et al., 2020; WURTZER et al., 2020, BAR-OR I et al., 2020; RIMOLDI et al., 2020; KUMAR et al., 2020; KOCAMENI et al., 2020; HARAMOTO et al., 2020; ZHANG et al., 2020, WU et al., 2020; XU et al., 2020; BALBOA et al., 2021) .

A escolha do gene utilizado para a detecção PCR em tempo real depende da natureza da amostra, do modo de concentração e do método de extração utilizado (HAMOUDA et al., 2021). Buscando entender a eficiência de detecção para cada gene, Jung et al (2020) realizaram um estudo comparativo da eficiência de detecção, sugerindo que os genes N e a região ORF1ab são mais eficientes para a detecção do SARS-CoV-2.

Pino et al. (2021) realizou um estudo de avaliação de métodos para detecção de SARS-CoV-2 e sua influência nos percentuais de detecção e positividade de amostras. Os autores descrevem que, ao observarem a eficiência de detecção, independente do método de concentração aplicado, o gene E foi o único que foi possível detectar em todas as amostras avaliadas., com eficiência de detecção em 97%. O gene RdRp, também avaliado pelo estudo, apresentou eficiência de 90%, apesar de não ter sido detectado em todas as amostras avaliadas. Quando considerados os métodos de concentração, a concentração por PEG, utilizada em nosso estudo, apresentou percentuais de recuperação de material genético viral e suficiente para detecção dos genes E e RdRp.

Medema et al (2020) realizaram detecção de RNA viral por RT-qPCR em amostras de esgoto retiradas de estações de tratamento na Holanda. Com menor taxa de substâncias inibidores e maior controle das regiões compreendidas , foi possível, utilizando o gene alvo E, detectar a presença do vírus em 57% das amostras testadas (4/7). Estudos que realizaram detecção por PCR digital também obtiveram maiores resultados nos percentuais de detecção para o gene E (Al et al., 2021).

O “*Centers for Disease Control and Prevention*” (Atlanta, EUA) sugere que o gene E seja utilizado para a detecção de SARS-CoV-2 em amostras de esgoto, por elevada eficiência demonstrada em estudos publicados Corman et al (2020).

A correlação entre a análise de PCR quantitativa do material genético do vírus SARS-COV-2 no esgoto e o dimensionamento do número de pessoas infectadas em uma região constitui a base teórica que caracteriza a Epidemiologia Baseada em Esgotos (EBE) (FOLADORI et al., 2020; KUMAR et al., 2020).

4 METODOLOGIA

As análises foram realizadas no LACAR-CPID (Laboratório de caracterização física, química e microbiológica - Centro de Pesquisa, Inovação e Desenvolvimento) em Cariacica, Espírito Santo e vinculado à Universidade Federal do Espírito Santo, Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Espírito Santo (FAPES) e Secretaria da Ciência, Tecnologia, Inovação, Educação Profissional e Desenvolvimento Econômico (SECTIDES). O procedimento para análise das amostras foi realizado conforme o seguinte fluxograma:

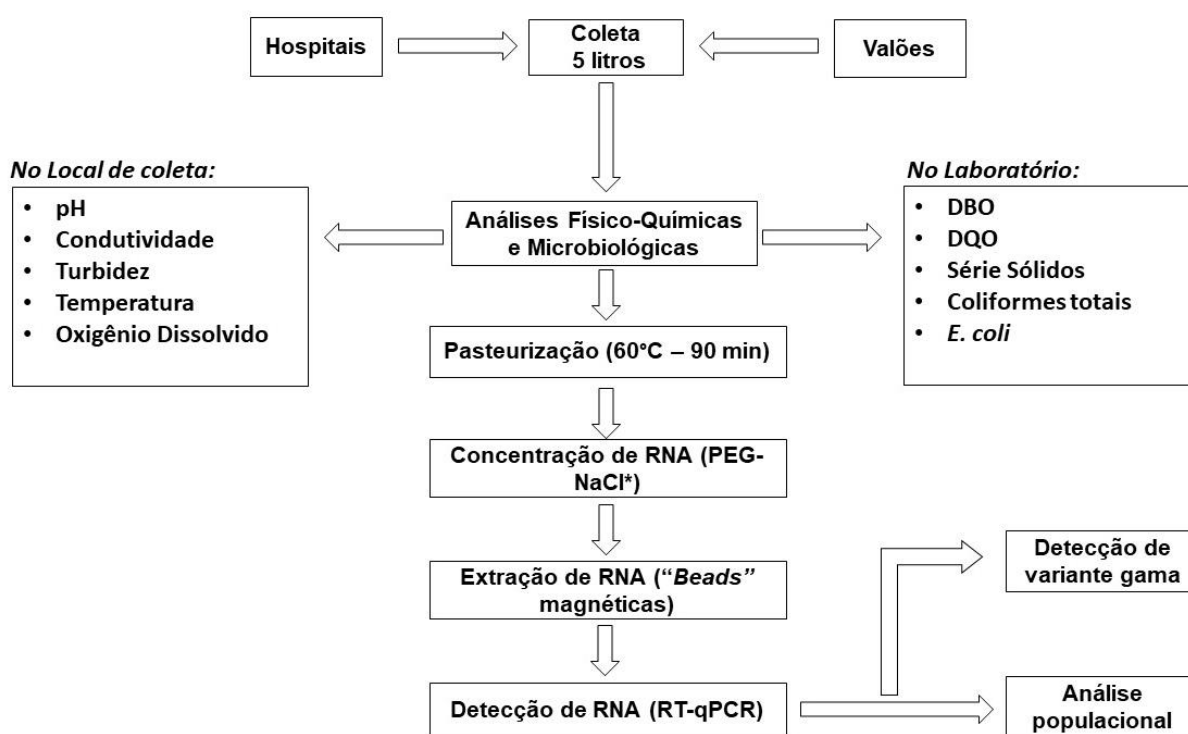


Figura 12: Fluxograma para análise e implementação de metodologia proposta das amostras coletadas neste estudo.

4.1 COLETA DE AMOSTRAS

As amostras foram coletadas em sistemas de coleta de esgoto urbano e hospitalar compreendendo valões e hospitais estaduais da região metropolitana da grande vitória (RMGV).

Foram utilizados frascos de 5L previamente sanitizados com álcool 70%. As coletas foram realizadas no período de Setembro de 2020 à Abril de 2021, com diversificação das datas e pontos de coleta.

Os pontos de coleta em valões foram determinados de acordo com a detecção visual de densidade populacional e suas possíveis contribuições para o valão. Foram definidos 5 pontos de coleta, localizados no município de Vila Velha, Espírito Santo, que compreendem valões que recebem esgoto bruto de residências localizadas nos bairros de Itapoã (P1), Vasco da Gama e Cobilândia (P2), Divino Espírito Santo (P3), Boa Vista (P4) e Praia de Gaivotas (P5) descritos e ilustrados na tabela 1 e figura 13.

Tabela 1: Coordenadas e descrição do número de coletas realizadas em valões de Setembro de 2020 à Abril de 2021.

	Ponto de coleta	Número de coletas	Período
VALÕES	P1 – ITAPOÃ	9	Setembro de 2020 à Abril de 2021
	P2 – COBILÂNDIA	8	
	P3 – DIVINO ES	3	
	P4 – BOA VISTA	5	
	P5 - GAIVOTAS	2	
	Total	27	

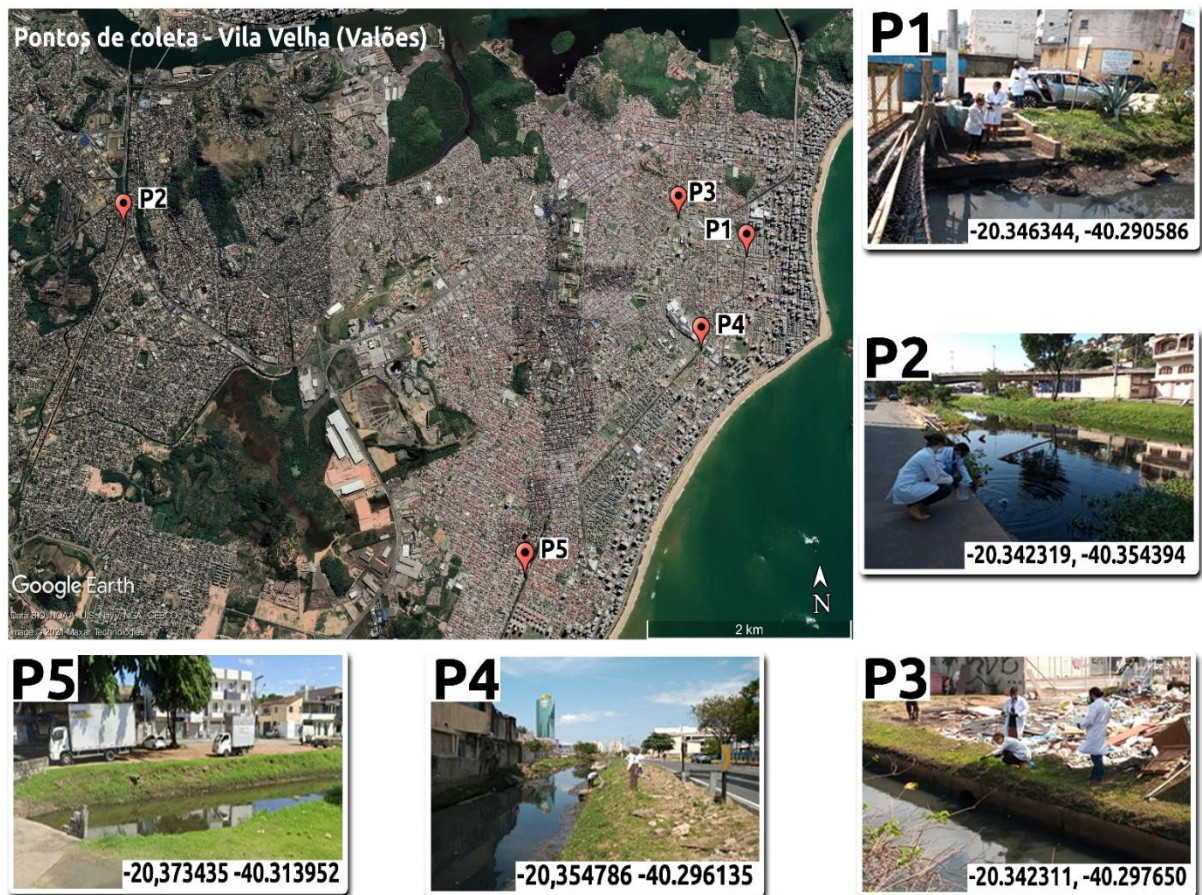


Figura 13: Locais de coleta das amostras de valões durante o período de Setembro de 2020 à Abril de 2021.

No caso dos hospitais, a amostragem **foi** realizada nos respectivos sistemas de tratamento, quando presente. Em alguns casos, o sistema de tratamento estava ausente e o respectivo esgoto hospitalar coletado ligado diretamente à rede da concessionária estadual de saneamento (CESAN – Espírito Santo). Deve-se ressaltar as péssimas condições de manutenção desses sistemas de tratamento, com acúmulo de detritos e sucateamento de seus componentes.

Foram selecionados 4 hospitais estaduais nos municípios de Vila Velha, Cariacica, Vitória e Serra. Para o município de Vila velha, o Centro de Reabilitação Física do Espírito Santo (CREFES) foi determinado para a coleta do esgoto oriundo de todas as alas do hospital. Esta coleta foi realizada na caixa de saída para o sistema de esgotamento sanitário público, uma vez que este hospital não possui sistema de tratamento de esgoto.

No município de Cariacica, foi determinado o Hospital Estadual de Atenção Clínica (HEAC) para a coleta do esgoto. A coleta foi realizada em dois pontos, sendo o ponto 1 em uma fossa séptica que recebe o esgoto oriundo da ala psiquiátrica do hospital e o ponto 2 no gradeamento que precede o sistema de tratamento do hospital que recebe esgoto proveniente da ala clínica hospitalar.

No município de Vitória, o Hospital Universitário Cassiano Antônio de Moraes (HUCAM) foi determinado como local de coleta. O ponto 1 compreende a entrada da caixa de passagem oriundo de todas as alas do hospital. O ponto 2 compreende a caixa de saída do esgoto para o sistema de esgotamento sanitário público, uma vez que este hospital não possui sistema de tratamento de esgoto. O ponto 3 é um lago localizado atrás do hospital.

No município de Serra, o Hospital Estadual Jayme dos Santos Neves (HEJSN) foi determinado compreendendo dois pontos. No ponto 1, foram coletadas amostras na entrada do sistema de tratamento de esgoto hospitalar por sistema de fossa filtro. O ponto 2 foi realizado na saída do sistema de tratamento de esgoto (**Tabela 2; Figura 14**).

Tabela 2: Coordenadas e descrição do número de coletas realizadas em hospitais de Novembro de 2020 à Abril de 2021.

HOSPITAIS	Unidade	Número de coletas
	CREFES – Vila Velha	9
	HEAC – Cariacica	8
	HUCAM – Vitória	3
	HEJSN - Serra	5
Total		27

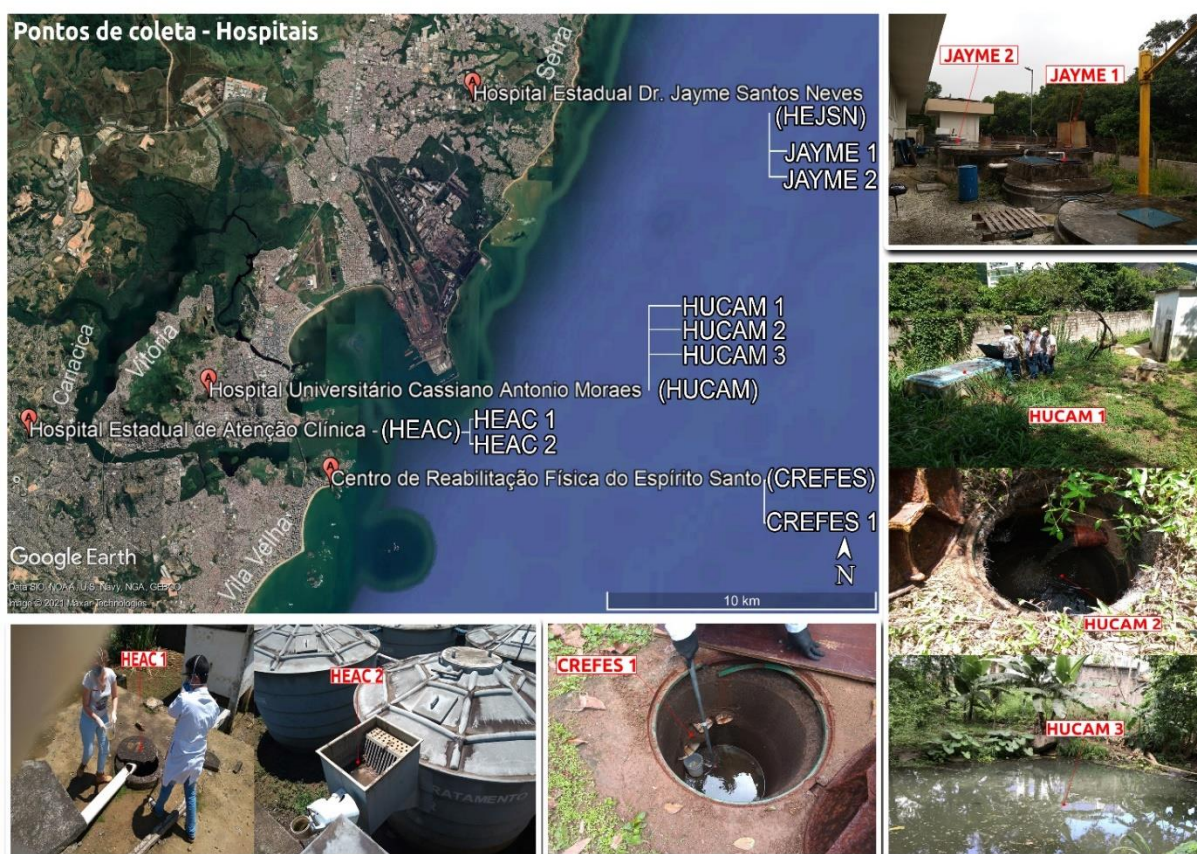


Figura 14: Locais de coleta das amostras de hospitais durante o período de Novembro de 2020 à Abril de 2021.

4.2 ANÁLISES FÍSICO QUÍMICAS

Foram realizadas leituras de pH, condutividade, turbidez, temperatura e oxigênio dissolvido do ponto de coleta em questão utilizando medidor multiparâmetro por sonda Hanna HI98194 previamente calibrada conforme instruções do fabricante e utilizando solução padrão do aparelho (Hanna Instruments, Limena – ITA) em cada coleta realizada. As análises de Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO), Demanda Química de Oxigênio (DQO), Colimetria pelo método cartela Colilert® e análise de Série Sólidos foram realizadas conforme descrito e recomendado por APHA (2017).

4.3 CONCENTRAÇÃO DE RNA

A concentração de RNA foi realizada conforme método de precipitação por polietilenoglicol (PEG) descrito por Kumar et al (2020). As amostras foram divididas em tubos tipo Falcon de 50 ml livres de RNase previamente esterilizados e pasteurizadas em banho-maria a 60°C por 90 minutos para inativação viral. Quando as amostras retornaram à temperatura ambiente, foram centrifugadas $4.500 \times g$ por 30 min. Em seguida o sobrenadante foi filtrado em membranas de 0,22 μm e cada filtrado de esgoto foi concentrado usando o método de polietilenoglicol - PEG.

Para o método selecionado, 80 g.L⁻¹ de PEG 8000 ($\geq 99\%$) e 17,5 g.L⁻¹ de NaCl para biologia molecular ($\geq 99\%$) foram adicionados em 25 mL de filtrado. Em seguida, as amostras foram incubadas “overnight” a 17°C e 100 rpm. No dia seguinte, foram centrifugadas a $13.000 \times g$ durante 90 min e após centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o “*pellet*” ressuspenso em 300 μL de água livre de RNase. O “*pellet*” assim ressuspenso foi utilizado para extração de RNA.

4.4 EXTRAÇÃO DE RNA

Na extração foi utilizado o kit MagMAX™ Microbiome Ultra Nucleic Acid Isolation (Thermo Fisher Cientific) de extração por “*beads*” magnéticas composto de um tampão de lise, solução ligante, solução de lavagem, solução de eluição, proteinase K, “*beads*” magnéticas para ligação com ácidos nucleicos e tubos para reação OR 96DW, seguindo recomendações do fabricante (THERMO FISHER SCIENTIFIC, 2021).

Os extraídos foram analisados por espectrofotometria utilizando a leitora Epoch™ (BioTek US, Vermont, USA) associada à placa multi-volume e multi-amostra Take3™ (BioTek US, Vermont, USA) de 16 poços para detecção de ácidos nucleicos em volumes de 2 μl sem diluição. O objetivo desta análise foi validar a extração em uma leitura para detecção de RNA. Foram consideradas como adequadas para realização da RT-qPCR amostras que apresentaram leituras acima de 2 ng/ μl .

4.5 DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DO RNA VIRAL

O processo de detecção do RNA de SARS-CoV-2 foi realizado por pcr em tempo real (RT-qPCR) utilizando os genes alvo E (Envelope) e RdRp (RNA polimerase dependente). Para este fim, foi utilizado o kit molecular Bio Gene COVID-19 PCR (Quibasa - Química Básica Ltda, Belo Horizonte, MG, Brasil) seguindo recomendações fornecidas pelo fabricante. O kit é composto de controle positivo, controle negativo, mix Taq, solução PCR E, solução PCR RdRp e padrão de quantificação em concentração de 2×10^5 cópias / μL . Para cada placa de reação, foi feita curva padrão para estabelecimento da quantificação de RNA de SARS-COV-2 em duplicata com as diluições de 2×10^5 , 2×10^4 , 2×10^3 e 2×10^5 a partir do padrão de quantificação do kit. Foram adicionadas 5 μL de cada amostra em um volume final de reação de 20 μL .

As reações de transcrição reversa, amplificação e detecção da fluorescência emitida pelas sondas foram realizadas em duplicata no termociclador CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad, Berkeley, CA) sob as devidas condições metodológicas: 55°C a 10 min para a transcrição reversa, 95°C a 3 min para desnaturação, 50 ciclos de 95°C a 15s seguido de 60°C a 60s. Serão consideradas positivas aquelas reações com valores de limite de ciclo (Ct) abaixo de 40 ciclos e acima de 15 ciclos registrados em pelo menos um dos dois poços testados para a amostra.

4.6 DETECÇÃO DA VARIANTE EMERGENTE DE SARS-COV-2 GAMMA (P1)

Conforme reportado por Naveca et al. (2021), verificou-se a emergência da variante gama (P1) considerada de muita importância devido à sua rápida disseminação em Manaus (AM) e posteriormente disseminada para outros estados, com predominância nas amostras clínicas testadas e associadas ao aumento de casos e óbitos.

Neste contexto, o presente estudo realizou a determinação desta variante dentre as amostras positivas para SARS-CoV-2 originalmente detectadas no decorrer do estudo.

A detecção foi realizada por RT-qPCR “*end-point*” utilizando os primers forward (P.1/VOCs-FNF 5'- GGGTGATGCGTATTATGACATGGTTGG), um primer reverso (P.1 / VOCs-FNR 5'- CTAGCACCATCATCATACACAGTTCTTGC) e uma sonda (P.1 / VOCs-FNP 5' FAM (ZEN) - TGGTTGATACTAGTTTGAAGCTAAAA) desenvolvidos por Naveca et al (2021) e sintetizados pela IDT Síntese Biotecnologia (Belo horizonte, MG, Brasil).

Os primers e as sondas foram utilizados com o Onestep RT-qPCR 96T MASTERMIX (Quibasa - Química Básica Ltda, Belo Horizonte, MG, Brasil). As reações foram realizadas em duplicata no termociclador CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad, Berkeley, CA).

4.7 MODELAGEM DE EBE

Os valores obtidos na quantificação em cópias de RNA por mL dos resultados positivos para detecção de SARS-CoV-2 foram transformados em escala logarítmica para melhor visualização das grandezas em gráficos, para ambos os locais de coleta (Hospitais e Valões).

Para os valões, os valores quantificados obtidos foram combinados para toda a região de estudo, compreendendo o município de Vila Velha e, sendo assim, plotados em um gráficos estabelecendo comparação com a média móvel do número de casos confirmados de COVID-19 na determinada região avaliada para o dia da detecção.

Para os hospitais, os valores obtidos foram plotados e para o HEJSN, referência no tratamento de COVID-19, os resultados foram estabelecidos comparando os dados de quantificação com o número de pacientes internados com COVID-19 nas enfermarias do hospital.

A compilação de dados, análise e plotagem gráfica foram realizadas utilizando o software GraphPad Prism V7.0 e GraphPad QuickCalcs (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EUA).

4.7.1 PROPOSTA DE UM MODELO DE ESTIMATIVA NUMÉRICA POPULACIONAL PARA COVID-19

Foram aplicados os modelos e algoritmos definidos propostos por Hart e Halden (2020) combinado com modelos de predição de carga orgânica, concentração e tempo de meia vida de material genético propostos por Gundy et al (2008), Wölfel et al (2020) e McMahan et al (2020). Estes algoritmos foram aplicados através de uma ferramenta computacional desenvolvida utilizando o Windows Forms do Visual Studio com banco de dados SQL, usando o SQL Manager como ferramenta para configuração.

Para o modelo, foram considerados os valores de quantificação em cópias genômicas por dia. A vazão considerada foi de $21,6 \text{ m}^3 / \text{dia}$, avaliada como média para o ponto de coleta em questão. A fim de interpretação dos resultados, os valores inferidos pelo modelo foram avaliados conforme a incidência a cada mil habitantes.

O código fonte e arquivos necessários para visualização e teste do software estão indexados no GitHub para livre acesso da comunidade científica sob licença Creative Commons Zero v1.0 Universal e podem ser obtidos através do link < <https://github.com/meigre/ViralCPID---EBE-Software.git> >.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Valões

5.1.1 – Análises físico-químicas.

As amostras apresentaram médias de pH entre 6,91 e 7,04, com valores de DQO entre 62,3 e 495,6 mg/L e DBO5 entre 20 e 224 mg/L (**Tabela 3**).

Tabela 3 : Médias de resultados obtidos das análises físico-químicas e microbiológicas realizadas nas amostras positivas para SARS-CoV-2 coletadas em valões de Setembro de 2020 à Abril de 2021.

Local	Pontos de coleta	pH	Condutividade $\mu\text{S}/\text{cm}^2$	DQO (mg/L)	DBO 5 (mg/L)	Colimetria (Cel/100 mL)	ST (mg/L)
VALÕES	P1	6,91	1315,5	495,6	224	1,96E+07	876,2
	P2	7,13	6939	141,5	80	8,48E+06	1896,5
	P3	6,89	858	168,9	93	1,98E+07	461,1
	P4	6,94	886,5	308,5	175	1,56E+07	496,9
	P5	7,04	536	62,3	20	8,16E+05	256

Em sua característica geral, valão define-se por um corpo d'água em curso com poluição difusa por lançamento de esgoto urbano provenientes de residências e outras atividades econômicas sem ligação com a rede de esgotamento sanitária pública.

Os dados obtidos por este estudo demonstram que características encontradas estavam em conformidade com as tipologias de esgoto descritas por Jordão e Pessoa (2017).

O ponto 2 de coleta, localizado nas proximidades do bairro de Cobilândia e ponto mais próximo da saída do corpo d'água para o mar, apresentou valores elevados de condutividade, com média de 6939 $\mu\text{S}/\text{cm}^2$, DBO5 de 80 mg/L e DQO de média 141,5 mg/L.

O elevado valor de condutividade pode estar relacionado com o elevado teor de íons cloreto (Cl^-) e íons sódio (Na^+) presentes neste corpo d'água devido à sua proximidade com o mar, movimento de marés e com áreas de mangue, caracterizando uma água ligeiramente salobra e que pode ser observado através da análise de

sólidos totais, que apresentou resultados da ordem de 1896 mg/L (Tabela 1) (SILVEIRA et al., 2015).

De acordo com normas técnicas internas publicadas pela Companhia de Saneamento Básico do Estado de São Paulo (SABESP), o alto teor de íons cloreto em esgotos causa elevada discrepância nos resultados de DQO por oxidação dos compostos, o que explica os resultados de DQO e DBO para o ponto 2 levando em consideração o elevado nível de poluição por esgoto doméstico urbano no local.

No que tange à observação dos resultados de análises para colimetria e presença de microrganismos de origem fecal, como *E. Coli*, nosso estudo encontrou resultados de presença de coliformes totais em ordens de grandeza entre 10^{-5} e 10^{-7} , compatíveis com concentrações de coliformes fecais em esgoto bruto (JORDÃO & PESSOA, 2017).

O ponto 5, diferente dos outros pontos de coleta observados, é o ponto de coleta mais distante do mar e que apresentava menor fluxo e em uma região com um menor número de residências contribuindo para a poluição do corpo d'água com esgoto doméstico. Nesse sentido, observando os resultados encontrados na tabela 1, o ponto 5 obteve os menores níveis de condutividade, DQO, DBO5 e ST.

Em um estudo realizado por Amoah et al. (2022), foi possível estabelecer os parâmetros físico-químicos de mostras retiradas de estações de tratamento de esgoto que seriam utilizadas posteriormente para análise de presença de RNA viral. Em sua pesquisa, os autores descrevem variações de pH entre 7.1 e 7.4 e DQO entre 554 mg/L e 993 mg/L, estando dentro dos parâmetros determinados para esgoto oriundo de fonte doméstica e compatíveis com os resultados encontrados em nosso estudo, ainda que a fonte amostral seja divergente (AMOAH et al., 2022).

5.1.3 – Detecção de SARS-CoV-2 no esgoto

No total de amostras avaliadas, sete (25,9%) foram determinadas como positivas para a presença do SARS-CoV-2 em valões com Ct médio de 26 (**Tabela 4**). Estudos que realizaram detecção de SARS-CoV-2 em amostras de esgoto doméstico urbano de natureza similar ao testado nas regiões compreendidas por este estudo e utilizando como alvo de detecção os genes E ou RdRp demonstraram efetividade similar na detecção (FONGARO et al., 2021; LI et al., 2021; KAYA et al., 2021).

Tabela 4: Consolidação dos dados de análise dos pontos de coleta de valões durante o período de Setembro de 2020 à Abril de 2021 em relação ao número total de amostras.

LOCAL DE COLETA	Número total de amostras / ponto (n)	AMOSTRAS POSITIVAS (%)
P1	9	3 (33%)
P2	8	1 (12,5%)
P3	3	1 (33%)
P4	5	1 (20%)
P5	2	1 (50%)

No ponto 1 e no ponto 3, regiões de maior densidade demográfica, 33% das amostras coletadas foram positivas. O ponto 5 apresentou percentual de detecção em 50%, sendo o maior entre os pontos coletados, podendo este fato estar relacionado com as características físico-químicas do esgoto analisado. Comparando os resultados de recuperação realizados em amostras de esgoto com amostras de água deionizada, Pino et al (2021) indicam que a qualidade da matriz de avaliação influencia diretamente no resultado da recuperação obtida.

Amoah et al (2022), em seu estudo recente de correlação de características físico-químicas do esgoto com percentuais de carga viral de SARS-CoV-2 no esgoto, descreveu que a demanda química de oxigênio está estritamente relacionada com a concentração de RNA de SARS-CoV-2 no esgoto, definindo que amostras que apresentam menor DQO tem maiores chances de apresentarem maiores concentrações de RNA Viral, porém, sem estabelecer a correlação direta.

Estudos sugerem que esta correlação poderia estar ligada à quantidade de matéria orgânica presente em amostras de esgoto com altos valores de DQO. Amostras com altas concentrações de matérias orgânicas podem resultar em baixas concentrações de RNA viral devido à capacidade de adsorção do material genético e de partículas virais em sólidos. Forés et al (2021) relatou esta relação direta em seu estudo ao descrever que cerca de 23% do SARS-CoV-2 presentes no esgoto estão aderidos à partículas de sólidos. Quando observados os parâmetros avaliados em nosso estudo, os pontos de coleta com menor percentual de detecção (P2) apresentava os maiores valores de DQO e Sólidos totais, assim como o ponto com maior percentual de detecção (P5) apresentou menores valores de DQO e sólidos totais, corroborando os estudos supracitados.

Em relação à quantificação do RNA de SARS-CoV-2, em cópias por mL, obtida por RT-qPCR, os resultados foram agrupados e transformados em escala logarítmica e organizadas na forma gráfica compreendendo os pontos quantificados para ambos os genes alvo e utilizando a média móvel de casos de infecção pelo SARS-CoV-2 na região de Vila Velha obtidos pelo Painel COVID-ES (Secretária de Estado de Saúde do Espírito Santo (SESA), Vitória - ES, Brasil) como parâmetro direto de comparação com os resultados obtidos e conforme a semana epidemiológica em que a coleta foi realizada (**Figura 15**).

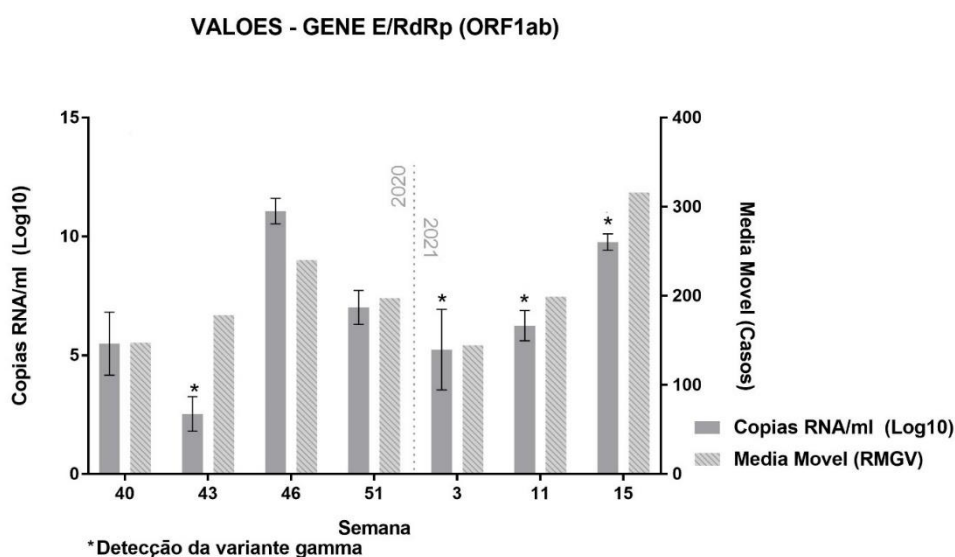


Figura 15: Representação gráfica do número de cópias de RNA obtidas por RT-qPCR em escala logarítmica correlacionada com a média móvel de casos na região de coleta.

Os resultados de quantificação, obtidos conforme padronização da quantificação realizada, compreenderam as semanas epidemiológicas 40, 43, 46 e 51 do ano de 2020 e 3, 11 e 15 do ano de 2021. De maneira geral, quando observados os valores de quantificação observa-se uma tendência de subida da média móvel de casos posterior ao aumento na concentração de SARS-CoV-2 nas amostras de esgoto avaliadas.

Na semana 43, observou-se os resultados apresentaram valores inversamente proporcionais à tendência de subida do número de casos. Este fato pode estar relacionado ao aumento da vazão e da diluição das amostras nesta semana epidemiológica, visto que no momento da coleta o tempo estava chuvoso há pelo menos 48 horas.

No estado do Espírito Santo, houve implementação de diversas medidas restritivas para conter o avanço da COVID-19. Uma dessas medidas, um lockdown com restrição de funcionamento de comércios com alto potencial de aglomeração ocorreu entre as semanas 45 e 47 de 2020, compreendendo o mês de Novembro.

Quando observados os resultados de quantificação obtidos no estudo, foi possível identificar aumento no número de cópias por mL de RNA de SARS-CoV-2 quantificado na semana 46, estando proporcional ao aumento de número de casos de COVID-19 à época. Sendo assim, foram impostas pelo governo local as medidas de restrição supracitadas o que resultou em uma diminuição direta do número de casos nas semanas epidemiológicas seguintes e que pôde ser identificado também pelo presente estudo quando feita a avaliação de material genético no esgoto.

Estes resultados confirmam a eficiência das medidas restritivas para conter o avanço do SARS-CoV-2 e da COVID-19 avaliada mediante monitoramento através do esgoto. Em um estudo recente, pesquisadores avaliaram a concentração de material genético viral em um período pré e pós-lockdown em regiões do Havaí (EUA). Em seus resultados, os autores descrevem a queda nas concentrações de RNA de SARS-CoV-2 durante e após o período de lockdown (LI et al., 2021). Resultados semelhantes podem ser encontrados em estudos que avaliaram concentrações e eficiência do

lockdown em suas regiões de pesquisa (WURTZER et al., 2020; TROTTIER et al., 2020; CHAKRABORTY et al., 2021).

O retorno do aumento das concentrações de RNA viral quantificadas pelo nosso estudo se deu nas semanas epidemiológicas 3, 11 e 15 do ano de 2021. A imposição de medidas restritivas pelo governo local para conter o avanço da doença foi realizada entre a semana 10 e 16 de 2021, quando as concentrações de RNA no esgoto já apresentavam valores elevados concernente ao aumento do número de casos na região.

Este aumento do número de casos ocorrido entre as semanas 11 e 15 já podia ser observado na semana 3, demonstrando a eficiência do monitoramento viral utilizando como matriz de análise o esgoto doméstico urbano. Corroborando estes resultados, Wurtzer et al (2020) descrevem em seu estudo que o monitoramento quantitativo da presença de SARS-CoV-2 no esgoto pode gerar dados e informações importantes para a tomada de decisões pelo poder público local e para o monitoramento do avanço da doença.

Em adição à importância deste monitoramento, Randazzo et al (2020), em um de seus estudos de monitoramento ambiental para SARS-CoV-2, identificou e descreveu o aumento da concentração de RNA viral em amostras de esgoto em uma região de baixa incidência de COVID-19 anterior ao aumento repentino do número de casos.

Considerando o aumento do número de casos identificados nas primeiras semanas epidemiológicas de 2021 e o surgimento da variante gama (P1) no Brasil no final de 2020 em Manaus, capital do Amazonas, e sendo responsável pela totalidade de casos graves na região à época, o presente estudo avaliou conforme Naveca et al (2021) as amostras positivas para SARS-CoV-2 a fim de identificar a variante gama (P1).

Foi possível identificar amostras positivas para a variante gama (P1) na semana 43 do ano de 2020 e nas semanas 3, 11 e 15 de 2021. O uso dos primers propostos por Naveca et al (2021) busca identificar em ORF1b os polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) nas proteínas não estruturais nsp13, nsp14, nsp15 e nsp16.

Estudos recentes realizaram a detecção de variantes de importância (VoC – *Variants of Concern*) utilizando como matriz de estudo o esgoto. Peterson et al (2021) identificaram a presença de VoCs no esgoto, sendo possível identificar a variante P.1, alvo do nosso estudo.

As amostras identificadas como positivas para a variante gama (P.1) aguardam sequenciamento no Laboratório de Desenvolvimento Tecnológico em Virologia do Instituto Oswaldo Cruz (IOC – FIOCRUZ/RJ).

5.2 HOSPITAIS

5.2.1 – Análises físico-químicas

As amostras avaliadas apresentaram diferentes características quando observados alguns dos seus parâmetros físico-químicos. Os valores de condutividade observados nos pontos de coleta localizados no HEJSN e no HUCAM foram elevados quando comparados com a média de condutividade encontrada em esgoto sanitário bruto ou esgoto doméstico urbano variando entre 1092,6 e 2327,5 $\mu\text{S}/\text{cm}^2$ para ambos os pontos de coleta (**Tabela 5**).

Tabela 5 – Médias de resultados obtidos das análises físico-químicas e microbiológicas realizadas nas amostras positivas para SARS-CoV-2 coletadas em hospitais de Novembro de 2020 à Abril de 2021.

<u>Local</u>		<u>Pontos de coleta</u>	pH	Condutividade $\mu\text{S}/\text{cm}^2$	DQO (mg/L)	DBO 5	Colimetria (Cel/100 mL)	ST (mg/L)
HOSPITAIS	HEJSN	HEJSN 1	7,1	1093	1017	428	1,68E+07	658
		HEJSN 2	6,7	1598	999	450	1,48E+07	752
	HUCAM	HUCAM 1	7,3	2327	822	427	1,74E+07	1346
		HUCAM 2	7,4	2174	854	398	1,78E+07	1312
		HUCAM 3	7,3	559	162	47	2,32E+06	360
	CREFES	CREFES 1	7,8	1016	773	192	9,23E+06	476
	HEAC	HEAC 1	7,2	910	474	221	1,01E+07	411
		HEAC 2	8,2	1080	979	246	9,93E+06	567

Os parâmetros de DQO e DBO5, para todos os pontos de coleta nos hospitais, apresentaram valores dentro dos parâmetros médios estabelecidos para esgotos sanitários brutos e esgotos domésticos, ainda que oriundos de matrizes diferentes.

O HUCAM 3, ponto de coleta existente dentro do Hospital Universitário Cassiano Antônio de Moraes, e que se configura como uma lagoa que recebe escoamento de uma nascente de água e de águas provenientes de chuvas, apresentou os menores valores de DQO e DBO5, abaixo do preconizado para esgotos urbanos.

No entanto, foi possível identificar alta carga de coliformes neste corpo d'água, o que indica contribuição indireta da rede de esgotamento sanitário do hospital e o valida como ponto de interesse para a detecção viral posterior (JORDÃO & PESSOA, 2017).

O Centro de Reabilitação Física do Espírito Santo (CREFES), se configurou como ponto que apresentou características físico-químicas mais próximas ao esgoto doméstico, uma vez que esta instituição de saúde possui baixa rotatividade, ausência de internações e é utilizada pelo governo local como instituição de tratamento e recuperação de problemas de saúde relacionados à mobilidade. Este ponto de coleta possuía a menor vazão, menor diluição e maior tempo de retenção, o que pode ter contribuído para o ligeiro aumento da condutividade encontrada.

Quando observados estudos comparativos de parâmetros físico-químicos em esgoto hospitalar, os parâmetros encontrados neste estudo estão próximos de valores encontrados em outros continentes. A média de valores de DBO5 em esgoto hospitalar na Europa e na Ásia foi definida como cerca de 200 mg/L. Em contrapartida, um estudo publicado no Brasil encontrou um valor de DBO5 para esgoto hospitalar definido em 1268 mg/L. Como citado, os valores encontrados em nosso estudo permeiam diferentes realidades em diferentes continentes, estando abaixo dos estudos para América do Sul (CEZIMBRA et al., 2015; MAJUNDER et al., 2021).

Observando outro parâmetro, a média de valores de DQO na América do Sul é de 591 mg/L, com concentrações altas (2464 mg/L) encontradas em estudos publicados no Brasil. Assim como relacionado à DBO5, as médias de DQO encontradas em nosso

estudo para esgoto hospitalar estão abaixo da média definida por publicações na América do Sul e no Brasil (PRADO et al., 2011; MAJUNDER et al., 2021).

5.2.1 – Detecção e quantificação de SARS-CoV-2

No total de amostras avaliadas, trinta e duas (45,7%) foram determinadas como positivas para a presença do SARS-CoV-2 em hospitais com Ct médio de 28 (**Tabela 6**).

Tabela 6: Consolidação dos dados de análise dos pontos de coleta de valões durante o período de Novembro de 2020 à Abril de 2021 em relação ao número total de amostras.

HOSPITAL	PONTO	COLETADO	POSITIVOS
HEAC	HEAC 1	9	5 (55,6%)
	HEAC 2	9	4 (44,4%)
CREFES	CREFES 1	9	2 (22,2%)
HUCAM	HUCAM 1	12	5 (41,7%)
	HUCAM 2	7	3 (42,9%)
	HUCAM 3	8	1 (12,5%)
HEJSN	HEJSN 1	8	8 (100%)
	HEJSN 2	8	4 (50%)

Estudos que realizaram detecção de SARS-CoV-2 em amostras de esgoto hospitalar demonstraram diferentes efetividades quando observados os percentuais encontrados no presente estudo.

Karami et al (2021) realizou um estudo comparando percentuais de amostras positivas para SARS-CoV-2 em esgotos domésticos e esgotos hospitalares. Os autores descreveram um percentual de 19.73% (15/73) de positivos nas amostras oriundas de sistema de esgotamento doméstico urbano e apenas uma amostra positiva encontra em esgoto hospitalar.

O menor número de amostras positivas, ainda que pesquisados em zonas de alto risco para a COVID-19, pode estar relacionado com o método de concentração definido pelos pesquisadores, realizado com sucessivas centrifugações e extração no sobrenadante, sem metodologia de precipitação de material genético.

Um estudo publicado por Gonçalves et al (2021) descreve fatos importantes que atestam a necessidade de métodos de concentração melhor definidos para recuperação de material genético viral em amostras de esgoto hospitalar. Quando realizadas metodologias de detecção pelo gene E e RdRp sem realizar concentração, foi possível detectar o SARS-CoV-2 em 13.4% (2/15) das amostras.

Quando aplicada metodologia de concentração por ultracentrifugação utilizando filtros AMICON 30 kDa, o percentual de positivos aumentou para 26.7% (4/15). Utilizando filtros AMICON 10 kDa, 10 amostras foram confirmadas como positivas para SARS-CoV-2, evidenciando um percentual real de 66.7%. Estes dados demonstram a importância da escolha da melhor metodologia de concentração de RNA viral para a realidade na qual o estudo está inserido.

Os resultados encontrados no presente estudo corroboram os descritos por Zhang et al (2020) que demonstraram possível e eficiente a detecção de SARS-CoV-2 em amostras de esgoto hospitalar quando utilizada a metodologia de concentração por polietilenoglicol (PEG).

Os pontos de coleta que compreendem o Hospital Estadual Jayme dos Santos Neves (HEJSN) obtiveram os melhores percentuais de positivos. No ponto definido como HEJSN 1, localizado na entrada do sistema de tratamento implantado no hospital, 100% (8/8) das amostras coletadas foram positivas para SARS-CoV-2.

Foi possível detectar o RNA viral na saída do sistema de tratamento, com um percentual de 50% de positivos (4/8). O alto número de positivos em relação a outros hospitais definidos no estudo tem relação com a utilização da instituição de saúde no que tange ao tratamento de doenças, sendo o HEJSN o hospital definido pelo governo

local como referência no tratamento de COVID-19, possuindo o maior número de internados pela doença.

Em contrapartida, encontramos amostras positivas em hospitais que não possuíam pacientes internados com COVID-19, como o CREFES, que obteve 22.2% (2/9) de amostras positivas. Este fato evidencia o possível potencial de propagação da doença por pacientes assintomáticos e que frequentam alas hospitalares de cuidados não relacionados ao tratamento da COVID-19.

Estes resultados e conclusões se tornam evidentes quando observados outros estudos. Acosta et al (2021), ao analisar esgoto proveniente de um hospital terciário, definido como instituição de saúde eletiva equivalente à clínicas para consultas de especialidades, descreveu amostras positivas para SARS-CoV-2, ainda que em instituição de saúde não específica para tratamento de COVID-19.

Além disso, os pesquisadores ainda demonstram a possibilidade de monitoramento do número de casos de infecções através do esgoto de instituições secundárias e terciárias, uma vez que são centros de alta circulação de pessoas e que não necessariamente frequentarão pacientes sintomáticos. Estes resultados foram semelhantes aos demonstrados pelo presente estudo.

Com o objetivo de interpretar os impactos dos níveis da detecção e quantificação do SARS-CoV-2 nas amostras de esgoto nos hospitais definidos e sua relação direta com o número de pacientes, foi avaliado o número de pacientes internados em enfermarias nos dias das coletas realizadas no Hospital Estadual Jayme dos Santos Neves (HEJSN) (**Figura 16**).

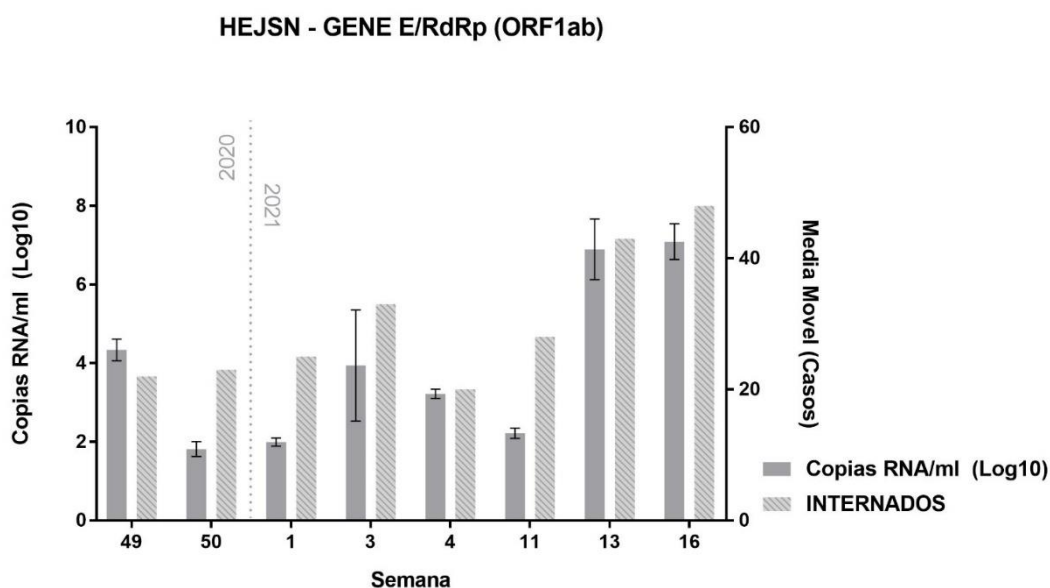


Figura 16: Representação gráfica do número de cópias de RNA obtidas por RT-qPCR em escala logarítmica correlacionada com o número de pacientes internados com COVID em enfermaria no HEJSN.

Quando observados os valores de cópias por mL de RNA quantificados em nosso estudo para o HEJSN, o número de internados variou conforme a quantificação observada. Em uma análise de correlação, o R de Pearson foi definido em 0.84, demonstrando forte correlação entre o número de internados em enfermarias por COVID-19 e a concentração de RNA ao longo das semanas avaliadas no ano de 2020 e 2021.

Um estudo multicêntrico realizado por Acosta et al (2021) avaliou a presença de SARS-CoV-2 em esgotos de hospitais e correlacionou a concentração de RNA obtidas para os genes N1 e N2 com o número de internações nas regiões estudadas. Os pesquisadores encontraram um R de Pearson de 0.67 e 0.79, respectivamente. Estes valores estão próximos dos encontrados pelo presente estudo.

Esta correlação é análoga à encontrada para o aumento de casos em regiões estudadas para o monitoramento de RNA de SARS-CoV-2 em esgotos domésticos. Tendo em vista este fator, os hospitais demonstram ser importantes objetos de estudo para o desenvolvimento e aprimoramento de técnicas de detecção vira, tornando-as mais sensíveis e específicas para que possam ser aplicadas em amostras mais diluídas, como em sistemas de esgotamento sanitário urbano ou em valões, muito

comuns em agrupamentos populacionais que não possuem ligação com a rede de saneamento básico municipal.

Diferente de estudos que realizaram suas detecções em amostras retiradas diretamente da rede de esgotamento sanitário doméstico, nosso estudo realizou a detecção buscando entender o espalhamento da doença em grupos populacionais através de amostragem simples em valões. Os valões, na realidade desse estudo, representam uma matriz de análise mais diluída dada à natureza e influência de marés e chuvas nos corpos d'água poluídos.

Levando em consideração este fator e a manutenção da metodologia proposta para ambas as matrizes de análise (esgoto sanitário bruto e esgoto hospitalar), as amostras hospitalares apresentaram um percentual de positivos 19,8% maior do que as amostras de valões. Este fato pode estar relacionado com a concentração das amostras, como citado anteriormente, e à possibilidade da presença de RNA de SARS-CoV-2 no esgoto, que possui maiores chances de ser encontrado no esgoto hospitalar e pode ser encontrado em concentrações maiores se analisados por diferentes metodologias de concentração e detecção (GONÇALVES et al., 2021).

A quantificação do RNA de SARS-CoV-2 para HUCAM e HEAC estão descritos na **figura 17** e **figura 18**, respectivamente. Não houveram pontos de detecção suficientes para a representação gráfica da quantificação em função do período de coleta para o CREFES. Não foi possível obter o quantitativo de internados com COVID-19 nestes hospitais, limitando à análise ao HEJSN.

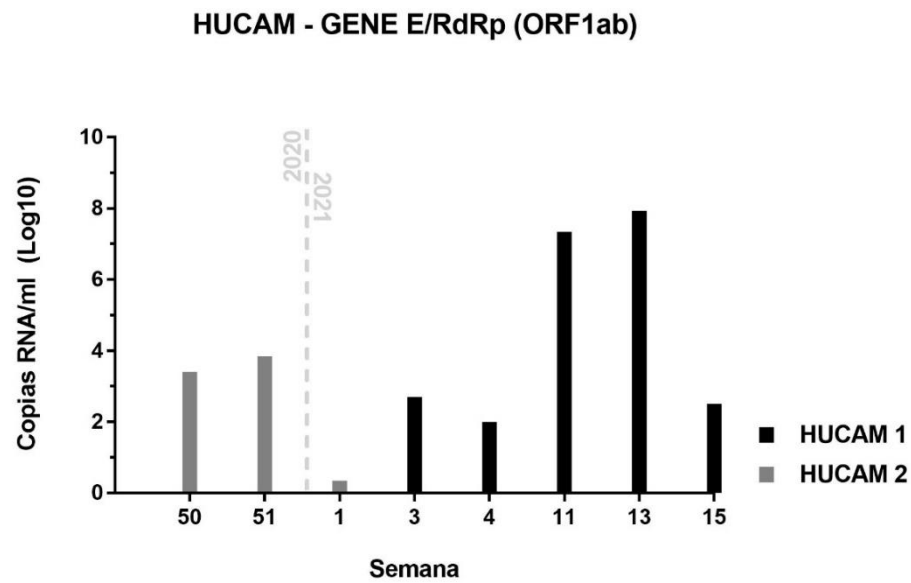


Figura 17 - Representação gráfica do número de cópias de RNA obtidas por RT-qPCR em escala logarítmica correlacionada com o número de pacientes internados com COVID em enfermaria no HUCAM.

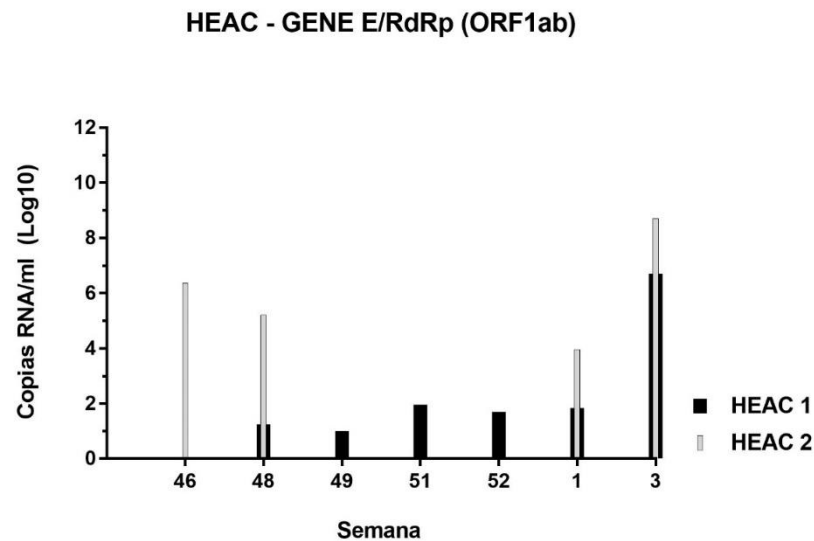


Figura 18 - Representação gráfica do número de cópias de RNA obtidas por RT-qPCR em escala logarítmica correlacionada com o número de pacientes internados com COVID em enfermaria no HEAC.

5.3 – MODELAGEM NUMÉRICA POPULACIONAL PARA COVID19 E FERRAMENTA COMPUTACIONAL DE AGRUPAMENTO DE DADOS

Tendo em vista a possibilidade de avaliação do número de pessoas infectadas com base na quantificação obtida por RT-qPCR, vários autores (HART & HALDEN, 2020; MIURA et al., 2021; HONG et al., 2021) sugerem a utilização de modelos específicos de epidemiologia baseada no esgoto para estimativa numérica populacional de infectados.

Com o potencial de predição baseado na correlação entre pacientes internados e concentração de RNA observado neste estudo, foi definido como modelo para teste da ferramenta computacional os algoritmos combinados propostos por Hart e Halden (2020), Gundy et al (2008), Wölfel et al (2020) e McMahan et al (2020) o Hospital Estadual Jayme dos Santos Neves (HEJSN). Este ponto de coleta foi escolhido devido ao elevado número de amostras positivas e por ser o hospital referência para tratamento de COVID-19 na região.

O programa apresenta uma interface onde o usuário insere os dados individualmente, para então conferir e colocá-los no banco de dados (**Figuras 19; 20**). Ao aplicar os dados destinados para a realização dos cálculos propostos, a interface gera o número mais provável de infectados para a determinada região em questão seguindo a metodologia proposta. Há também a possibilidade de salvar as análises realizadas para acesso posterior (**Figura 21**).

Figura 19: Representação da interface principal do modelo computacional proposto para aplicar as equações de EBE propostas.

Home

Arquivo

Inserir Dados Exibir Dados

Local:

Temperatura (°C):

Gene Pesquisado:

Carga Viral (RNA/ml):

Controle Interno:

Dia da Coleta: quinta-feira, 7 de outubro de 2021

Inserir

Figura 20: Interface de locais salvos no modelo computacional proposto para aplicar as equações de EBE propostas.

Home

Arquivo

Inserir Dados Exibir Dados

Local: Jayme dos Santos Neves

Temperatura (°C): 28

Gene Pesquisado: E

Carga Viral (RNA/ml): 2000

Controle Interno: A1

Dia da Coleta: quinta-feira, 7 de outubro de 2021

Inserir

Inserir Dados

O número de Infectados em Jayme dos Santos Neves No dia 07/10/2021 é: 129
Você Deseja Salvar Este Resultado?

Sim Não

Figura 21: Interface de demonstração dos resultados no modelo computacional proposto para aplicar as equações de EBE propostas.

No presente estudo, os dados gerados de número mais provável de infectados (NPI) foram interpretados conforme a incidência a cada mil pessoas (**Tabela 7**).

Tabela 7 - Modelo de inferência quantitativa de pacientes infectados gerados pela interface proposta e testada para o Hospital Estadual Jayme dos Santos Neves. O quantitativo de Cópias genômicas é representado por CG, a incidência inferida pelo modelo por IM e a Incidência real por IR.

HEJSN		INTERNADOS - ENFERMARIA		TOTAL DE PESSOAS	INCIDÊNCIA	
<i>Semana epidemiológica</i>	<i>CG / Dia</i>	<i>COVID19</i>	<i>OUTROS</i>	<i>HOSPITAL</i>	<i>IM</i>	<i>IR</i>
49	3120	22	40	2388	84,2	9
50	6	23	47	2405	0,1	9,6
1	10	25	38	2464	0,2	10,1
3	3684	33	39	2493	95,5	13
4	216	20	38	2487	5,6	8
11	21,7	28	35	2538	0,6	11
13	5348	43	34	2647	130,7	16
16	4866	48	45	2892	108,6	17

De maneira geral, quando observados os dados gerados aplicando os algoritmos testados pelo presente estudo, observou-se pouca linearidade no potencial de inferência dos modelos propostos para a realidade na qual está inserido o estudo.

Na semana epidemiológica 49, o algoritmo inferiu uma incidência de 84 infectados a cada 1000 usuários do sistema hospitalar. Porém, esta semana obteve um dos menores quantitativos de pacientes internados com COVID19 e foi o dia com o menor número de pessoas circulando no hospital.

Este fato, pode estar relacionado com o tempo de retenção e aumento na concentração de RNA de SARS-CoV-2 nas amostras de esgoto devido às horas anteriores e partículas de sólidos suspensas.

Apesar da falta de linearidade quando aplicado o modelo, a incidência inferida parece fazer sentido em quantidades menores de cópias genômicas por dia (Tabela 5).

Em semanas como a semana epidemiológica 13 e 16, a avaliação traz observações interessantes. Na semana 13, a incidência inferida pelo algoritmo foi de 130 infectados a cada 1000 usuários do hospital. Quando observado o número de internados, esse valor foi maior do que o observado na semana 16, quando 48 pessoas estavam internadas com COVID19 no hospital, porém, o modelo inferiu uma menor incidência.

Quando consideradas variáveis como número total de usuários da rede hospitalar, a contribuição para a rede de esgotamento sanitário pode aumentar e resultar em maior diluição do esgoto e consequente diminuição do número quantificável de RNA viral.

Além disso, Hong et al (2021) demonstraram em seus estudos de observação das variáveis de modelagem aplicadas à epidemiologia baseada no esgoto para detecção de SARS-CoV-2 que, para manutenção e linearidade da detecção do vírus em esgoto, o número de pacientes infectados deve se manter entre 253 e 409 casos positivos para cada 10 mil habitantes.

Como descrito por Miura, Kitajuma e Omori (2021), o percentual variável de liberação de partículas virais nas fezes também influencia diretamente em modelos matemáticos. O modelo utilizado pelos autores define uma média de liberação de vírus nas fezes de cerca de 26 dias. Esta média, quando o monitoramento é feito semanalmente assim como em nosso estudo, implica em um aumento de 17 vezes o valor real da incidência calculada, demonstrando a necessidade de sucessivas coletas e de um plano contínuo de monitoramento diário, em diversos momentos do dia, a fim de melhorar a sensibilidade dos modelos de EBE propostos.

Petala et al (2021), levando em consideração o potencial de modelos matemáticos como determinação de estimativas, definiu a construção de um modelo matemático consistente e testado em um núcleo populacional bem definido. O modelo, que tem como principal variável o entendimento da quantidade de dias em que há liberação de partículas virais nas fezes durante o curso da doença, apresentou potencial de predição do número de casos em uma ordem temporal de até 2 dias antes do aumento real da incidência de casos de COVID19 reportados.

A importância da consideração do percentual de liberação de vírus nas fezes foi também evidenciada por Schmitz et al (2021), onde, através de análises de fezes de pacientes assintomáticos, foi evidenciado o alto percentual de contribuição viral fecal desta parcela de infectados e que pode influenciar diretamente na construção de modelos futuros de epidemiologia baseada no esgoto.

O modelo proposto por Hart e Halden (2020), Gundy et al (2008), Wölfel et al (2020) e McMahan et al (2020) e testado por nosso estudo através da ferramenta computacional desenvolvida e colocada para livre acesso não leva em consideração diretamente o número de partículas virais liberadas. Além disso, para inserção destes valores no algoritmo, um novo estudo deve ser desenvolvido diretamente na população contribuinte para o esgoto testado e, na escala do estudo, essa abordagem foi impossibilitada.

Entretanto, a ferramenta computacional desenvolvida funcionou conforme o esperado e possui alto potencial de modificação. Outros modelos de EBE podem ser implantados e calculados através da ferramenta, facilitando a inserção de estudos de EBE nos diferentes centros de monitoramento ambiental de patógenos pelo mundo.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este estudo é o primeiro a estabelecer a presença de SARS-CoV-2 em esgoto sanitário bruto provenientes de valões, em agrupamentos populacionais localizados no município de Vila Velha, Espírito Santo e em Hospitais da região metropolitana, implantando com sucesso a metodologia proposta.

A metodologia foi implantada ,também, com sucesso para a detecção de variantes de importância clínica do vírus SARS-CoV-2. Fato este que pode permitir uma maior abrangência desta metodologia (EBE) para os dados de saúde coletiva do estado do Espírito Santo. Entretanto, a detecção de variantes foi realizada apenas no aspecto qualitativo, necessitando assim de maior investimento para a sua caracterização quantitativa nos esgotos e obtenção das sequências específicas.

O avanço configura uma nova realidade de monitoramento ambiental para o estado do Espírito Santo, que com conhecimento potencial sobre a metodologia implementada e das estratégias de epidemiologia baseada no esgoto (EBE), possui potencial para construção de uma rede de monitoramento ambiental para diversos microrganismos.

Entretanto, recomenda-se a manutenção e desenvolvimento de novos estudos que busquem definir padronizações para o monitoramento ambiental, levando em consideração as características físico-químicas do esgoto avaliado, bem como potencial de recuperação e detecção nas mais diversas técnicas e metodologias propostas para detecção de SARS-CoV-2 no esgoto.

Ainda sim, neste caso, a EBE funciona como importante estratégia de tomada de decisões públicas, e, combinada com a construção de um algoritmo de resultados constantes e aplicado utilizando a ferramenta computacional proposta, torna-se fácil a sua implantação em diversas regiões.

Por fim , a construção de uma ferramenta computacional capaz de integrar equações de modelos de inferência populacional é, principalmente, torná-la pública para aprimoramento e desenvolvimento de estudos futuros. O código-fonte colocado em

livre acesso pode ser modificado para interpretar novos algoritmos de diferentes modelos de inferência, mantendo as características práticas baseadas na interface. Além disso, os dados aqui fornecidos e a metodologia implementada podem contribuir ativamente para o desenvolvimento de estudos futuros de monitoramento ambiental para SARS-CoV-2 e outros microrganismos patogênicos.

7 CONCLUSÕES

A implantação da metodologia para concentração, extração e detecção de RNA de SARS-CoV-2 em amostras de esgoto urbano de valões e hospitais da RMGV apresentou resultados significativos, sendo possível estabelecer e correlacionar os dados de monitoramento ambiental com modelos de EBE propostos. O presente estudo propôs um modelo de EBE aplicado utilizando algoritmos para mensurar o número de pacientes infectados nas regiões avaliadas, não apresentando resultados satisfatórios quando aplicado na realidade do estudo. Porém, os algoritmos propostos se mostraram de fácil aplicação e demonstraram grande potencial para desenvolvimento de novos estudos para melhoria e adaptação do modelo EBE.

8 REFERÊNCIAS

AI, Yuehan; DAVIS, Angela; JONES, Dan; LEMESHOW, Stanley; TU, Huolin; HE, Fan; RU, Peng; PAN, Xiaokang; BOHREROVA, Zuzana; LEE, Jiyoung. **Wastewater SARS-CoV-2 monitoring as a community-level COVID-19 trend tracker and variants in Ohio, United States**. Science of The Total Environment. [S. l.]: Elsevier BV, dez. 2021. DOI 10.1016/j.scitotenv.2021.149757. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.149757>.

ACOSTA, Nicole; BAUTISTA, María A.; HOLLMAN, Jordan; MCCALDER, Janine; BEAUDET, Alexander Buchner; MAN, Lawrence; WADDELL, Barbara J.; CHEN, Jianwei; LI, Carmen; KUZMA, Darina; BHATNAGAR, Srijak; LEAL, Jenine; MEDDINGS, Jon; HU, Jia; CABAJ, Jason L.; RUECKER, Norma J.; NAUGLER, Christopher; PILLAI, Dylan R.; ACHARI, Gopal; ... PARKINS, Michael D. **A multicenter study investigating SARS-CoV-2 in tertiary-care hospital wastewater. viral burden correlates with increasing hospitalized cases as well as hospital-associated transmissions and outbreaks**. Water Research. [S. l.]: Elsevier BV, ago. 2021. DOI 10.1016/j.watres.2021.117369. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2021.117369>

AHMED, Warish; ANGEL, Nicola; EDSON, Janette; BIBBY, Kyle; BIVINS, Aaron; O'BRIEN, Jake W.; CHOI, Phil M.; KITAJIMA, Masaaki; SIMPSON, Stuart L.; LI, Jiaying; TSCHARKE, Ben; VERHAGEN, Rory; SMITH, Wendy J.M.; ZAUGG, Julian; DIERENS, Leanne; HUGENHOLTZ, Philip; THOMAS, Kevin V.; MUELLER, Jochen F. **First confirmed detection of SARS-CoV-2 in untreated wastewater in Australia: A proof of concept for the wastewater surveillance of COVID-19 in the community**. Science of The Total Environment, vol. 728, p. 138764, ago. 2020. DOI 10.1016/j.scitotenv.2020.138764. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.138764>.

AHMED, Warish; BERTSCH, Paul M.; BIVINS, Aaron; BIBBY, Kyle; FARKAS, Kata; GATHERCOLE, Amy; HARAMOTO, Eiji; GYAWALI, Pradip; KORAJKIC, Asja; MCMINN, Brian R.; MUELLER, Jochen F.; SIMPSON, Stuart L.; SMITH, Wendy J.M.; SYMONDS, Erin M.; THOMAS, Kevin V.; VERHAGEN, Rory; KITAJIMA, Masaaki. **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. [S. l.]: Elsevier BV, out. 2020. DOI 10.1016/j.scitotenv.2020.139960. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.139960>.

AMOAHA, Isaac Dennis; ABUNAMA, Taher; AWOLUSI, Oluyemi Olatunji; PILLAY, Leanne; PILLAY, Kriveshin; KUMARI, Sheena; BUX, Faizal. **Effect of selected wastewater characteristics on estimation of SARS-CoV-2 viral load in wastewater**. Environmental Research. [S. l.]: Elsevier BV, jan. 2022. DOI 10.1016/j.envres.2021.111877. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.envres.2021.111877>.

APHA (2017).; et al. **Standard methods for the examination of water and wastewater**. 23ª ed. Washington: American Public Health Association. 1082 p.

ARYA, R. et al. Structural insights into SARS-CoV-2 proteins. *Journal of molecular biology*, v. 433, n. 2, p. 166725, 2021.

ATHAT, D. INGHAM, K. **Mechanism of Precipitation of Proteins by Polyethylene Glycols**. *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY* Printed in U.S. A. Vol. 256, No. 23. Issue of December 10, pp. 12108-12117. 1981

BAR-OR, Itay; YANIV, Karin; SHAGAN, Marilou; OZER, Eden; ERSTER, Oran; MENDELSON, Ella; MANNASSE, Batya; SHIRAZI, Rachel; KRAMARSKY-WINTER, Esti; NIR, Oded; ABU-ALI, Hala; RONEN, Zeev; RINOTT, Ehud; LEWIS, Yair E.; FRIEDLER, Eran; BITKOVER, Eden; PAITAN, Yossi; BERCHENKO, Yakir; KUSHMARO, Ariel. **Regressing SARS-CoV-2 sewage measurements onto COVID-19 burden in the population: a proof-of-concept for quantitative environmental surveillance**. [S. l.]: Cold Spring Harbor Laboratory, 1 May 2020. DOI 10.1101/2020.04.26.20073569. Available at: <http://dx.doi.org/10.1101/2020.04.26.20073569>.

BALBOA, Sabela; MAURICIO-IGLESIAS, Miguel; RODRIGUEZ, Santiago; MARTÍNEZ-LAMAS, Lucía; VASALLO, Francisco J.; REGUEIRO, Benito; LEMA, Juan M. **The fate of SARS-COV-2 in WWTPS points out the sludge line as a suitable spot for detection of COVID-19**. *Science of The Total Environment*, vol. 772, p. 145268, Jun. 2021. DOI 10.1016/j.scitotenv.2021.145268. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.145268>.

BARRIL, Patricia Angélica; PIANCIOLA, Luis Alfredo; MAZZEO, Melina; OUSSET, María Julia; JAUREGUIBERRY, María Virginia; ALESSANDRELLO, Mauricio; SÁNCHEZ, Gloria; OTEIZA, Juan Martín. **Evaluation of viral concentration methods for SARS-CoV-2 recovery from wastewaters**. *Science of The Total Environment*. [S. l.]: Elsevier BV, fev. 2021. DOI 10.1016/j.scitotenv.2020.144105. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.144105>.

BOSCH, Albert; GUIX, Susana; SANO, Daisuke; PINTÓ, Rosa M. **New tools for the study and direct surveillance of viral pathogens in water**. *Current Opinion in Biotechnology*, vol. 19, nº 3, p. 295–301, jun. 2008. DOI 10.1016/j.copbio.2008.04.006. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.copbio.2008.04.006>.

BLOOMFIELD, V. **DNA Condensation by Multivalent Cations**. Department of Biochemistry, University of Minnesota, 1997.

CHAKRABORTY, Paromita; PASUPULETI, Mukesh; JAI SHANKAR, M.R.; BHARAT, Girija K.; KRISHNASAMY, Sundar; DASGUPTA, Sakshi Chadha; SARKAR, Shyamal Kumar; JONES, Kevin C. **First surveillance of SARS-CoV-2 and organic tracers in community wastewater during post lockdown in Chennai, South India: Methods, occurrence and concurrence**. *Science of The Total Environment*. [S. l.]: Elsevier BV, jul. 2021. DOI 10.1016/j.scitotenv.2021.146252. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.146252>

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **U.S. Department of Health & Human Services**, 2020. Disponível em <

<https://www.cdc.gov/healthywater/surveillance/wastewater-surveillance/testing-methods.html>> . Acesso em 25 de julho de 2021

CORONAVIRUS RESOURCE CENTER AT JOHNS HOPKINS UNIVERSITY. **Johns Hopkins University**, 2020. Disponível em < <https://coronavirus.jhu.edu/map.html>> . Acesso em 12 de setembro de 2020.

CORMAN, Victor M; LANDT, Olfert; KAISER, Marco; MOLENKAMP, Richard; MEIJER, Adam; CHU, Daniel KW; BLEICKER, Tobias; BRÜNINK, Sebastian; SCHNEIDER, Julia; SCHMIDT, Marie Luisa; MULDER, Daphne GJC; HAAGMANS, Bart L; VAN DER VEER, Bas; VAN DEN BRINK, Sharon; WIJSMAN, Lisa; GODERSKI, Gabriel; ROMETTE, Jean-Louis; ELLIS, Joanna; ZAMBON, Maria; ... DROSTEN, Christian. **Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR**. Eurosurveillance, vol. 25, no. 3, 23 Jan. 2020. DOI 10.2807/1560-7917.es.2020.25.3.2000045. Available at: <http://dx.doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2020.25.3.2000045>.

CHENG, Chao; JIA, Jun-Li; RAN, Shi-Yong. **Polyethylene glycol and divalent salt-induced DNA reentrant condensation revealed by single molecule measurements**. Soft Matter. [S. l.]: Royal Society of Chemistry (RSC), 2015. DOI 10.1039/c5sm00619h. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1039/c5sm00619h>.

BUSTIN, Stephen A.; NOLAN, Tania. **RT-qPCR Testing of SARS-CoV-2: A Primer**. International Journal of Molecular Sciences, vol. 21, nº 8, p. 3004, 24 abr. 2020. DOI 10.3390/ijms21083004. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms21083004>.

CEZIMBRA, R. **Estudo de Efluentes Hospitalares: Caso Hospital Santa Casa de Misericórdia de São Lourenço do Sul**. Monografia (Bacharelado em Engenharia Ambiental e Sanitária) - Universidade Federal de Pelotas. 2015.

CHEN, Yifei; CHEN, Liangjun; DENG, Qiaoling; ZHANG, Guqin; WU, Kaisong; NI, Lan; YANG, Yibin; LIU, Bing; WANG, Wei; WEI, Chaojie; YANG, Jiong; YE, Guangming; CHENG, Zhenshun. **The presence of SARS-CoV-2 RNA in the feces of COVID-19 patients**. Journal of Medical Virology, vol. 92, nº 7, p. 833–840, 25 abr. 2020. DOI 10.1002/jmv.25825. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1002/jmv.25825>.

CHEN, F. et al. **The impact of ACE2 polymorphisms on COVID-19 disease: Susceptibility, severity, and therapy**. Frontiers in cellular and infection microbiology, v. 11, p. 753721, 2021.

DAUGHTON, Christian G. **Illicit Drugs in Municipal Sewage**. ACS Symposium Series. [S. l.]: American Chemical Society, 2001. p. 348–364. DOI 10.1021/bk-2001-0791.ch020. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1021/bk-2001-0791.ch020>

FEACHEM R.G., Bradley D.J., Garelick H., Mara D.D. **Sanitation and Disease Health Aspects of Excreta and Wastewater Management**. Wiley; Washington DC, USA: 1983.

FINKEL, Y. et al. The coding capacity of SARS-CoV-2. Nature, v. 589, n. 7840, p. 125–130, 2021.

FOSTER, J. E. Viruses as Pathogens. In: Viruses. [s.l.] Elsevier, 2018. p. 189–216.

FOLADORI, Paola; CUTRUPI, Francesca; SEGATA, Nicola; MANARA, Serena; PINTO, Federica; MALPEI, Francesca; BRUNI, Laura; LA ROSA, Giuseppina. **SARS-CoV-2 from faeces to wastewater treatment: What do we know? A review**. Science of The Total Environment, vol. 743, p. 140444, nov. 2020. DOI 10.1016/j.scitotenv.2020.140444. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.140444>.

FONGARO, Gislaine; HERMES STOCO, Patricia; SOBRAL MARQUES SOUZA, Doris; GRISARD, Edmundo Carlos; MAGRI, Maria Elisa; ROGOVSKI, Paula; SCHORNER, Marcos Andre; HARTMANN BARAZZETTI, Fernando; CHRISTOFF, Ana Paula; DE OLIVEIRA, Luiz Felipe Valter; BAZZO, Maria Luiza; WAGNER, Glauber; HERNANDEZ, Marta; RODRIGUEZ-LAZARO, David. **SARS-CoV-2 in human sewage in Santa Catalina, Brazil, November 2019**. [S. l.]: Cold Spring Harbor Laboratory, 29 jun. 2020. DOI 10.1101/2020.06.26.20140731. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1101/2020.06.26.20140731>.

FORÉS, E.; BOFILL-MAS, S.; ITARTE, M.; MARTÍNEZ-PUCHOL, S.; HUNDESA, A.; CALVO, M.; BORREGO, C.M.; COROMINAS, L.L.; GIRONES, R.; RUSIÑOL, M. **Evaluation of two rapid ultrafiltration-based methods for SARS-CoV-2 concentration from wastewater**. Science of The Total Environment. [S. l.]: Elsevier BV, maio 2021. DOI 10.1016/j.scitotenv.2020.144786. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.144786>.

GANESH, Atheesha; LIN, Johnson. **Waterborne human pathogenic viruses of public health concern**. International Journal of Environmental Health Research, vol. 23, nº 6, p. 544–564, dez. 2013. DOI 10.1080/09603123.2013.769205. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1080/09603123.2013.769205>.

GONÇALVES, José; KORITNIK, Tom; MIOČ, Verica; TRKOV, Marija; BOLJEŠIČ, Maja; BERGINC, Nataša; PROSENC, Katarina; KOTAR, Tadeja; PARAGI, Metka. **Detection of SARS-CoV-2 RNA in hospital wastewater from a low COVID-19 disease prevalence area**. Science of The Total Environment. [S. l.]: Elsevier BV, fev. 2021. DOI 10.1016/j.scitotenv.2020.143226. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.143226>.

GUEDES, E.V.R., SPERLING, M.V. **Avaliação Comparativa entre Águas Residuárias de Serviços de Saúde e Águas Residuárias Urbanas**. In: Anais do 23º Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental. Mato Grosso do Sul: ABES, Setembro. 2005.

GUNDY, Patricia M.; GERBA, Charles P.; PEPPER, Ian L. **Survival of Coronaviruses in Water and Wastewater**. Food and Environmental Virology, vol. 1, nº 1, 3 dez. 2008. DOI 10.1007/s12560-008-9001-6. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1007/s12560-008-9001-6>.

HAMOUDA, Mohamed; MUSTAFA, Farah; MARAQA, Munjed; RIZVI, Tahir; ALY HASSAN, Ashraf. **Wastewater surveillance for SARS-CoV-2: Lessons learnt from**

recent studies to define future applications. Science of The Total Environment. [S. l.]: Elsevier BV, mar. 2021. DOI 10.1016/j.scitotenv.2020.143493. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.143493>.

HART, Olga E.; HALDEN, Rolf U. **Computational analysis of SARS-CoV-2/COVID-19 surveillance by wastewater-based epidemiology locally and globally: Feasibility, economy, opportunities and challenges.** Science of The Total Environment, vol. 730, p. 138875, ago. 2020. DOI 10.1016/j.scitotenv.2020.138875. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.138875>.

HARAMOTO, Eiji; MALLA, Bikash; THAKALI, Ocean; KITAJIMA, Masaaki. **First environmental surveillance for the presence of SARS-CoV-2 RNA in wastewater and river water in Japan.** Science of The Total Environment, vol. 737, p. 140405, out. 2020. DOI 10.1016/j.scitotenv.2020.140405. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.140405>.

HATA, Akihiko; HONDA, Ryo; HARA-YAMAMURA, Hiroe; MEUCHI, Yuno. **Detection of SARS-CoV-2 in wastewater in Japan by multiple molecular assays-implication for wastewater-based epidemiology (WBE).** [S. l.]: Cold Spring Harbor Laboratory, 11 jun. 2020. DOI 10.1101/2020.06.09.20126417. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1101/2020.06.09.20126417>.

HELLMÉR, Maria; PAXÉUS, Nicklas; MAGNIUS, Lars; ENACHE, Lucica; ARNHOLM, Birgitta; JOHANSSON, Annette; BERGSTRÖM, Tomas; NORDER, Heléne. **Detection of Pathogenic Viruses in Sewage Provided Early Warnings of Hepatitis A Virus and Norovirus Outbreaks.** Applied and Environmental Microbiology, vol. 80, nº 21, p. 6771–6781, 29 ago. 2014. DOI 10.1128/aem.01981-14. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.01981-14>.

HIRANO, Ken; ICHIKAWA, Masatoshi; ISHIDO, Tomomi; ISHIKAWA, Mitsuru; BABA, Yoshinobu; YOSHIKAWA, Kenichi. **How environmental solution conditions determine the compaction velocity of single DNA molecules.** Nucleic Acids Research. [S. l.]: Oxford University Press (OUP), 6 set. 2011. DOI 10.1093/nar/gkr712. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkr712>.

HORZINEK, Marian. **A Simple Method for Concentration of Arboviruses Propagated in Tissue Culture.** The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, vol. 18, nº 4, p. 588–591, 1 jul. 1969. DOI 10.4269/ajtmh.1969.18.588. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.4269/ajtmh.1969.18.588>.

HONG, Pei-Ying; RACHMADI, Andri Taruna; MANTILLA-CALDERON, David; ALKAHTANI, Mohsen; BASHAWRI, Yasir M.; AL QARNI, Hamed; O'REILLY, Kathleen M.; ZHOU, Jianqiang. **Estimating the minimum number of SARS-CoV-2 infected cases needed to detect viral RNA in wastewater: To what extent of the outbreak can surveillance of wastewater tell us?** Environmental Research. [S. l.]: Elsevier BV, abr. 2021. DOI 10.1016/j.envres.2021.110748. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.envres.2021.110748>.

International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). [S. l.], 30 jun. 2021. Disponível em: <https://ictv.global/taxonomy/>. Acesso em: 27 jun. 2021.

JAFFERALI, Mohammed Hakim; KHATAMI, Kasra; ATASOY, Merve; BIRGERSSON, Madeleine; WILLIAMS, Cecilia; CETECIOGLU, Zeynep. **Benchmarking virus concentration methods for quantification of SARS-CoV-2 in raw wastewater.** Science of The Total Environment. [S. l.]: Elsevier BV, fev. 2021. DOI 10.1016/j.scitotenv.2020.142939. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.142939>.

JORDÃO, E. P.; PESSOA, C. A. **Tratamento de esgotos domésticos.** 8. ed. Rio de Janeiro: ABES, 2017

JUNG, Yu Jin; PARK, Gun-Soo; MOON, Jun Hye; KU, Keunbon; BEAK, Seung-Hwa; KIM, Seil; PARK, Edmond Changkyun; PARK, Daeui; LEE, Jong-Hwan; BYEON, Cheol Woo; LEE, Joong Jin; MAENG, Jin-Soo; KIM, Seong Jun; KIM, Seung Il; KIM, Bum-Tae; LEE, Min Jun; KIM, Hong Gi. **Comparative analysis of primer-probe sets for the laboratory confirmation of SARS-CoV-2.** [S. l.]: Cold Spring Harbor Laboratory, 27 Feb. 2020. DOI 10.1101/2020.02.25.964775. Available at: <http://dx.doi.org/10.1101/2020.02.25.964775>.

KARAMI, Chiman; DARGAHI, Abdollah; VOSOUGHI, Mehdi; NORMOHAMMADI, Ali; JEDDI, Farhad; ASGHARIAZAR, Vahid; MOKHTARI, Ahamad; SEDIGH, Anoshirvan; ZANDIAN, Hamed; ALIGHADRI, Morteza. **SARS-CoV-2 in municipal wastewater treatment plant, collection network, and hospital wastewater.** Environmental Science and Pollution Research. [S. l.]: Springer Science and Business Media LLC, 15 jul. 2021. DOI 10.1007/s11356-021-15374-4. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1007/s11356-021-15374-4>.

KAYA, Devrim; NIEMEIER, Debra; AHMED, Warish; KJELLERUP, Birthe V. **Evaluation of multiple analytical methods for SARS-CoV-2 surveillance in wastewater samples.** Science of The Total Environment. [S. l.]: Elsevier BV, fev. 2022. DOI 10.1016/j.scitotenv.2021.152033. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.152033>.

KIM, Hee-Yeon; KWAK, In-Shin; HWANG, In-Gyun; KO, GwangPyo. **Optimization of methods for detecting norovirus on various fruit.** Journal of Virological Methods, vol. 153, nº 2, p. 104–110, nov. 2008. DOI 10.1016/j.jviromet.2008.07.022. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jviromet.2008.07.022>.

KIPKORIR, Vincent; CHERUIYOT, Isaac; NGURE, Brian; MISIANI, Musa; MUNGUTI, Jeremiah. **Prolonged SARS-CoV-2 RNA detection in anal/rectal swabs and stool specimens in COVID-19 patients after negative conversion in nasopharyngeal RT-PCR test.** Journal of Medical Virology, 2 ago. 2020. DOI 10.1002/jmv.26007. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1002/jmv.26007>.

KITAJIMA, Masaaki; AHMED, Warish; BIBBY, Kyle; CARDUCCI, Annalaura; GERBA, Charles P.; HAMILTON, Kerry A.; HARAMOTO, Eiji; ROSE, Joan B. **SARS-CoV-2 in wastewater: State of the knowledge and research needs.** Science of The Total Environment, vol. 739, p. 139076, out. 2020. DOI 10.1016/j.scitotenv.2020.139076. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.139076>.

KOCAMEMI, Bilge Alpaslan; KURT, Halil; HACIOGLU, Sabri; YARALI, Cevdet; SAATCI, Ahmet Mete; PAKDEMIRLI, Bekir. **First Data-Set on SARS-CoV-2 Detection for Istanbul Wastewaters in Turkey**. [S. l.]: Cold Spring Harbor Laboratory, 6 May 2020. DOI 10.1101/2020.05.03.20089417. Available at: <http://dx.doi.org/10.1101/2020.05.03.20089417>.

KHALIL, Omar Arafat Kdudsi; KHALIL, Sara da Silva. **SARS-CoV-2: taxonomia, origem e constituição**. Revista de Medicina, vol. 99, nº 5, p. 473–479, 10 dez. 2020. DOI 10.11606/issn.1679-9836.v99i5p473-479. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.11606/issn.1679-9836.v99i5p473-479>.

KLEIN, Steffen; MÜLLER, Thorsten G.; KHALID, Dina; SONNTAG-BUCK, Vera; HEUSER, Anke-Mareil; GLASS, Bärbel; MEURER, Matthias; MORALES, Ivonne; SCHILLAK, Angelika; FREISTAEDTER, Andrew; AMBIEL, Ina; WINTER, Sophie L.; ZIMMERMANN, Liv; NAUMOSKA, Tamara; BUBECK, Felix; KIRRMAYER, Daniel; ULLRICH, Stephanie; BARRETO MIRANDA, Isabel; ANDERS, Simon; ... CHLANDA, Petr. **SARS-CoV-2 RNA Extraction Using Magnetic Beads for Rapid Large-Scale Testing by RT-qPCR and RT-LAMP**. Viruses. [S. l.]: MDPI AG, 7 ago. 2020. DOI 10.3390/v12080863. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.3390/v12080863>.

KUMAR, Manish; PATEL, Arbind Kumar; SHAH, Anil V.; RAVAL, Janvi; RAJPARA, Neha; JOSHI, Madhvi; JOSHI, Chaitanya G. **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, vol. 746, p. 141326, dez. 2020. DOI 10.1016/j.scitotenv.2020.141326. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.141326>.

LA ROSA, Giuseppina; MANCINI, Pamela; BONANNO FERRARO, Giusy; VENERI, Carolina; IACONELLI, Marcello; BONADONNA, Lucia; LUCENTINI, Luca; SUFFREDINI, Elisabetta. **SARS-CoV-2 has been circulating in northern Italy since December 2019: Evidence from environmental monitoring**. Science of The Total Environment, vol. 750, p. 141711, jan. 2021. DOI 10.1016/j.scitotenv.2020.141711. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.141711>.

LA ROSA, A. M.; TOLFO, A. M.; MONTEGGIA, L. M.; **Gestão de efluentes de serviços de saúde de Porto Alegre**. XXVII Congresso Interamericano de Engenharia Sanitária e Ambiental, 2000.

LEDUC, James W.; BARRY, M. Anita. **SARS, the First Pandemic of the 21st Century**. Emerging Infectious Diseases, vol. 10, nº 11, p. e26–e26, nov. 2004. DOI 10.3201/eid1011.040797_02. Disponível em: http://dx.doi.org/10.3201/eid1011.040797_02.

LERMAN, L, **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, 1971, 68, 1886–1890.

LI, Bo; DI, Doris Yoong Wen; SANGAM, Prakit; JEON, Min Ki; YAN, Tao. **Fine-Scale Temporal Dynamics of SARS-CoV-2 RNA Abundance in Wastewater during A COVID-19 Lockdown**. Water Research. [S. l.]: Elsevier BV, jun. 2021. DOI

10.1016/j.watres.2021.117093.

Disponível

em:

<http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2021.117093>.

MAJUMDER, Abhradeep; GUPTA, Ashok Kumar; GHOSAL, Partha Sarathi; VARMA, Mahesh. **A review on hospital wastewater treatment: A special emphasis on occurrence and removal of pharmaceutically active compounds, resistant microorganisms, and SARS-CoV-2.** *Journal of Environmental Chemical Engineering*. [S. l.]: Elsevier BV, abr. 2021. DOI 10.1016/j.jece.2020.104812. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jece.2020.104812>.

MANOR, Y., Handsher R., Halmut T., Neuman M., Bobrov A., Rudich H., Vonsover A., Shulman L., Kew O., Mendelson E. **Detection of poliovirus circulation by environmental surveillance in the absence of clinical cases in Israel and the Palestinian authority.** *J. Clin. Microbiol.* 1999;37:1670–1675

MEDEMA, Gertjan; HEIJNEN, Leo; ELSINGA, Goffe; ITALIAANDER, Ronald; BROUWER, Anke. **Presence of SARS-Coronavirus-2 RNA in Sewage and Correlation with Reported COVID-19 Prevalence in the Early Stage of the Epidemic in The Netherlands.** *Environmental Science & Technology Letters*, vol. 7, nº 7, p. 511–516, 20 maio 2020. DOI 10.1021/acs.estlett.0c00357. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1021/acs.estlett.0c00357>.

METCALF, T G; MELNICK, J L; ESTES, M K. **Environmental Virology: From Detection of Virus in Sewage and Water by Isolation to Identification by Molecular Biology-A Trip of Over 50 Years.** *Annual Review of Microbiology*, vol. 49, nº 1, p. 461–487, out. 1995. DOI 10.1146/annurev.mi.49.100195.002333. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.mi.49.100195.002333>.

MIURA, Fuminari; KITAJIMA, Masaaki; OMORI, Ryosuke. **Duration of SARS-CoV-2 viral shedding in faeces as a parameter for wastewater-based epidemiology: Re-analysis of patient data using a shedding dynamics model.** *Science of The Total Environment*. [S. l.]: Elsevier BV, maio 2021. DOI 10.1016/j.scitotenv.2020.144549. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.144549>.

MCMAHAN, Christopher Steven; SELF, Stella; RENNERT, Lior; KALBAUGH, Corey; KRIEBEL, David; GRAVES, Duane; DEEVER, Jessica A.; POPAT, Sudeep; KARANFIL, Tanju; FREEDMAN, David L. **COVID-19 Wastewater Epidemiology: A Model to Estimate Infected Populations.** [S. l.]: Cold Spring Harbor Laboratory, 7 nov. 2020. DOI 10.1101/2020.11.05.20226738. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1101/2020.11.05.20226738>.

NAQVI, A. A. T. et al. Insights into SARS-CoV-2 genome, structure, evolution, pathogenesis and therapies: Structural genomics approach. *Biochimica et biophysica acta. Molecular basis of disease*, v. 1866, n. 10, p. 165878, 2020.

O'BRIEN, Evan; XAGORARAKI, Irene. **A water-focused one-health approach for early detection and prevention of viral outbreaks.** *One Health*, vol. 7, p. 100094, jun. 2019. DOI 10.1016/j.onehlt.2019.100094. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.onehlt.2019.100094>.

OJALA, Heikki; ZIEDAITE, Gabija; WALLIN, Anders E.; BAMFORD, Dennis H.; HÆGGSTRÖM, Edward. **Optical tweezers reveal force plateau and internal friction in PEG-induced DNA condensation.** European Biophysics Journal. [S. l.]: Springer Science and Business Media LLC, 30 jan. 2014. DOI 10.1007/s00249-013-0941-x. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1007/s00249-013-0941-x>.

ORIVE, Gorka; LERTXUNDI, Unax; BARCELO, Damia. **Early SARS-CoV-2 outbreak detection by sewage-based epidemiology.** Science of The Total Environment, vol. 732, p. 139298, ago. 2020. DOI 10.1016/j.scitotenv.2020.139298. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.139298>.

PAINEL COVID-19. **Governo do Estado do Espírito Santo**, 2020. Disponível em < <https://coronavirus.es.gov.br> > . Acesso em 12 de setembro de 2020.

PALÚ, I. D. A. A virologia do Sars-CoV-2. Connection line, v. 0, n. 25, 2021.

PÉREZ-CATALUÑA, Alba; CUEVAS-FERRANDO, Enric; RANDAZZO, Walter; FALCÓ, Irene; ALLENDE, Ana; SÁNCHEZ, Gloria. **Comparing analytical methods to detect SARS-CoV-2 in wastewater.** Science of The Total Environment. [S. l.]: Elsevier BV, mar. 2021. DOI 10.1016/j.scitotenv.2020.143870. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.143870>.

PETALA, M.; KOSTOGLU, M.; KARAPANTSIOS, Th.; DOVAS, C.I.; LYTRAS, Th.; PARASKEVIS, D.; ROILIDES, E.; KOUTSOLIOUTSOU-BENAKI, A.; PANAGIOTAKOPOULOS, G.; SYPSA, V.; METALLIDIS, S.; PAPA, A.; STYLIANIDIS, E.; PAPADOPOULOS, A.; TSIODRAS, S.; PAPAIOANNOU, N. **Relating SARS-CoV-2 shedding rate in wastewater to daily positive tests data: A consistent model based approach.** Science of The Total Environment. [S. l.]: Elsevier BV, fev. 2022. DOI 10.1016/j.scitotenv.2021.150838. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.150838>.

PETERSON, Shelley W.; LIDDER, Ravinder; DAIGLE, Jade; WONITOWY, Quinn; DUECK, Codey; NAGASAWA, Audra; MULVEY, Michael R.; MANGAT, Chand S. **RT-qPCR detection of SARS-CoV-2 mutations S 69–70 del, S N501Y and N D3L associated with variants of concern in Canadian wastewater samples.** Science of The Total Environment. [S. l.]: Elsevier BV, out. 2021. DOI 10.1016/j.scitotenv.2021.151283. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.151283>.

PINO, Nancy J.; RODRIGUEZ, Diana C.; CANO, Laura Castrillón; RODRIGUEZ, Alejandra. **Detection of SARS-CoV-2 in wastewater is influenced by sampling time, concentration method, and target analyzed.** Journal of Water and Health. [S. l.]: IWA Publishing, 30 jul. 2021. DOI 10.2166/wh.2021.133. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.2166/wh.2021.133>.

POLSON, A.; RUIZ-BRAVO, C. **Fractionation of Plasma with Polyethylene Glycol.** Vox Sanguinis, vol. 23, nº 1–2, p. 107–118, 8 jul. 1972. DOI 10.1111/j.1423-0410.1972.tb03818.x. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1423-0410.1972.tb03818.x>.

PRADO, T., Fumian, T. M., Mannarino, C. F., Resende, P. C., Motta, F. C., Eppinghaus, A. L. F., Chagas do Vale, V. H., Braz, R. M. S., de Andrade, J. da S. R., Maranhão, A. G., & Miagostovich, M. P. (2021). **Wastewater-based epidemiology as a useful tool to track SARS-CoV-2 and support public health policies at municipal level in Brazil.** *Water Research*, 191, 116810. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2021.116810>

PRADO, T, et al. **Quantification and molecular characterization of enteric viruses detected in effluents from two hospital wastewater treatment plants**, *Water Res.* 45 (2011) 1287–1297. doi:10.1016/j.watres.2010.10.012.

PHILO, Sarah E.; KEIM, Erika K.; SWANSTROM, Rachael; ONG, Angelo Q.W.; BURNOR, Elisabeth A.; KOSSIK, Alexandra L.; HARRISON, Joanna C.; DEMEKE, Bethel A.; ZHOU, Nicolette A.; BECK, Nicola K.; SHIRAI, Jeffry H.; MESCHKE, J. Scott. **A comparison of SARS-CoV-2 wastewater concentration methods for environmental surveillance.** *Science of The Total Environment*, vol. 760, p. 144215, mar. 2021. DOI 10.1016/j.scitotenv.2020.144215. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.144215>.

RAHIMI, A.; MIRZAZADEH, A.; TAVAKOLPOUR, S. Genetics and genomics of SARS-CoV-2: A review of the literature with the special focus on genetic diversity and SARS-CoV-2 genome detection. *Genomics*, v. 113, n. 1 Pt 2, p. 1221–1232, 2021.

RANDAZZO, Walter; TRUCHADO, Pilar; CUEVAS-FERRANDO, Enric; SIMÓN, Pedro; ALLENDE, Ana; SÁNCHEZ, Gloria. **SARS-CoV-2 RNA in wastewater anticipated COVID-19 occurrence in a low prevalence area.** *Water Research*, vol. 181, p. 115942, ago. 2020. DOI 10.1016/j.watres.2020.115942. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2020.115942>.

RIMOLDI, Sara Giordana; STEFANI, Fabrizio; GIGANTIELLO, Anna; POLESELLO, Stefano; COMANDATORE, Francesco; MILETO, Davide; MARESCA, Mafalda; LONGOBARDI, Concetta; MANCON, Alessandro; ROMERI, Francesca; PAGANI, Cristina; CAPPELLI, Francesca; ROSCIOLI, Claudio; MOJA, Lorenzo; GISMONDO, Maria Rita; SALERNO, Franco. **Presence and infectivity of SARS-CoV-2 virus in wastewaters and rivers.** *Science of The Total Environment*, vol. 744, p. 140911, Nov. 2020. DOI 10.1016/j.scitotenv.2020.140911. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.140911>.

RUSIÑOL, Marta; MARTÍNEZ-PUCHOL, Sandra; FORÉS, Eva; ITARTE, Marta; GIRONES, Rosina; BOFILL-MAS, Sílvia. **Concentration methods for the quantification of coronavirus and other potentially pandemic enveloped virus from wastewater.** *Current Opinion in Environmental Science & Health*, vol. 17, p. 21–28, out. 2020. DOI 10.1016/j.coesh.2020.08.002. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.coesh.2020.08.002>.

SERFOZO, Peter; WYSOCKI, Jan; GULUA, Gvantca; SCHULZE, Arndt; YE, Minghao; LIU, Pan; JIN, Jing; BADER, Michael; MYÖHÄNEN, Timo; GARCÍA-HORSMAN, J. Arturo; BATLLE, Daniel. **Ang II (Angiotensin II) Conversion to Angiotensin-(1-7) in the Circulation Is POP (Prolyl oligopeptidase)-Dependent and ACE2 (Angiotensin-Converting Enzyme 2)-Independent.** *Hypertension*, vol. 75, nº 1, p.

173–182, jan. 2020. DOI 10.1161/hypertensionaha.119.14071. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.119.14071>.

SIMS, Natalie; KASPRZYK-HORDERN, Barbara. **Future perspectives of wastewater-based epidemiology: Monitoring infectious disease spread and resistance to the community level**. Environment International, vol. 139, p. 105689, jun. 2020. DOI 10.1016/j.envint.2020.105689. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.envint.2020.105689>.

SILVEIRA, A. P. P.; NUVOLARI, A.; DEGASPERI, F.T.; FIRSOFF, W. **Dessalinização de águas**. 1. ed. São Paulo, 2015

SODRÉ, Fernando; BRANDÃO, Cristina; VIZZOTTO, Carla; MALDANER, Adriano. **EPIDEMIOLOGIA DO ESGOTO COMO ESTRATÉGIA PARA MONITORAMENTO COMUNITÁRIO, MAPEAMENTO DE FOCOS EMERGENTES E ELABORAÇÃO DE SISTEMAS DE ALERTA RÁPIDO PARA COVID-19**. Química Nova, 2020. DOI 10.21577/0100-4042.20170545. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.21577/0100-4042.20170545>.

SCIALO, Filippo; DANIELE, Aurora; AMATO, Felice; PASTORE, Lucio; MATERA, Maria Gabriella; CAZZOLA, Mario; CASTALDO, Giuseppe; BIANCO, Andrea. **ACE2: The Major Cell Entry Receptor for SARS-CoV-2**. Lung, vol. 198, nº 6, p. 867–877, 10 nov. 2020. DOI 10.1007/s00408-020-00408-4. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1007/s00408-020-00408-4>.

SCHMITZ, Bradley W.; INNES, Gabriel K.; PRASEK, Sarah M.; BETANCOURT, Walter Q.; STARK, Erika R.; FOSTER, Aidan R.; ABRAHAM, Alison G.; GERBA, Charles P.; PEPPER, Ian L. **Enumerating asymptomatic COVID-19 cases and estimating SARS-CoV-2 fecal shedding rates via wastewater-based epidemiology**. Science of The Total Environment. [S. l.]: Elsevier BV, dez. 2021. DOI 10.1016/j.scitotenv.2021.149794. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.149794>.

SCHRIEWER, A.; WEHLMANN, A.; WUERTZ, S. **Improving qPCR efficiency in environmental samples by selective removal of humic acids with DAX-8**. Journal of Microbiological Methods, vol. 85, nº 1, p. 16–21, abr. 2011. DOI 10.1016/j.mimet.2010.12.027. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mimet.2010.12.027>.

SHEREEN, M. A. et al. COVID-19 infection: Origin, transmission, and characteristics of human coronaviruses. Journal of advanced research, v. 24, p. 91–98, 2020.

THERMO FISHER SCIENTIFIC. **MagMAX Viral and Pathogen Nucleic Acid Isolation Kits**, 2021. Disponível em < <https://www.thermofisher.com/br/en/home/life-science/dna-rna-purification-analysis/automated-purification-extraction/automated-magmax-kits-nucleic-acid-extraction/magmax-viral-pathogen-extraction-kits.html> > Acesso em 25 de julho de 2021

TROTTIER, Julie; DARQUES, Regis; AIT MOUHEB, Nassim; PARTIOT, Emma; BAKHACHE, William; DEFFIEU, Maïka S.; GAUDIN, Raphael. **Post-lockdown**

detection of SARS-CoV-2 RNA in the wastewater of Montpellier, France. One Health. [S. l.]: Elsevier BV, dez. 2020. DOI 10.1016/j.onehlt.2020.100157. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.onehlt.2020.100157>.

VIEIRA, D. S., RODRIGUES, S. S.; PICOLI, R.L.; **Gestão ambiental e resíduos hospitalares: uma análise sobre a legislação e a viabilidade de implantação dos ecocentros e ECTE no Distrito** In: 4º CONGRESSO BRASILEIRO DE GESTÃO AMBIENTAL, Salvador, - anais eletrônicos. 2013.

WANG, Wenling; XU, Yanli; GAO, Ruqin; LU, Roujian; HAN, Kai; WU, Guizhen; TAN, Wenjie. **Detection of SARS-CoV-2 in Different Types of Clinical Specimens.** JAMA, 11 mar. 2020. DOI 10.1001/jama.2020.3786. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1001/jama.2020.3786>.

WANG, X.W.; 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.; ... LI, J. **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 Science and Technology, vol. 52, nº 8, p. 213–221, 1 out. 2005. DOI 10.2166/wst.2005.0266. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.2166/wst.2005.0266>.

WANG Y, Wang Y, Luo W, Huang L, Xiao J, Li F, Qin S, Song X, Wu Y, Zeng Q, Jin F, Wang Y (2020) **A comprehensive investigation of the mRNA and protein level of ACE2, the putative receptor of SARS-CoV-2, in human tissues and blood cells.** Int J Med Sci 17(11):1522–1531. <https://doi.org/10.7150/ijms.46695> 21

WARNES, Sarah L.; LITTLE, Zoë R.; KEEVIL, C. William. **Human Coronavirus 229E Remains Infectious on Common Touch Surface Materials.** mBio, vol. 6, nº 6, 31 dez. 2015. DOI 10.1128/mbio.01697-15. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1128/mbio.01697-15>.

WÖLFEL, Roman; CORMAN, Victor M.; GUGGEMOS, Wolfgang; SEILMAIER, Michael; ZANGE, Sabine; MÜLLER, Marcel A.; NIEMEYER, Daniela; JONES, Terry C.; VOLLMAR, Patrick; ROTHE, Camilla; HOELSCHER, Michael; BLEICKER, Tobias; BRÜNINK, Sebastian; SCHNEIDER, Julia; EHMANN, Rosina; ZWIRGLMAIER, Katrin; DROSTEN, Christian; WENDTNER, Clemens. **Virological assessment of hospitalized patients with COVID-2019.** Nature, vol. 581, nº 7809, p. 465–469, 1 abr. 2020. DOI 10.1038/s41586-020-2196-x. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/s41586-020-2196-x>.

WU, Yongjian; GUO, Cheng; TANG, Lantian; HONG, Zhongsi; ZHOU, Jianhui; DONG, Xin; YIN, Huan; XIAO, Qiang; TANG, Yanping; QU, Xiujuan; KUANG, Liangjian; FANG, Xiaomin; MISHRA, Nischay; LU, Jiahai; SHAN, Hong; JIANG, Guanmin; HUANG, Xi. **Prolonged presence of SARS-CoV-2 viral RNA in faecal samples.** The Lancet Gastroenterology & Hepatology, vol. 5, no. 5, p. 434–435, May 2020. DOI 10.1016/s2468-1253(20)30083-2. Available at: [http://dx.doi.org/10.1016/S2468-1253\(20\)30083-2](http://dx.doi.org/10.1016/S2468-1253(20)30083-2).

WU, FQ; XIAO, A; ZHANG, JB; GU, XQ; LEE, WL; KAUFFMAN, K; HANAGE, WP; MATUS, M; GHAEI, N; ENDO, N; DUVALLET, C; MONIZ, K; ERICKSON, TB; CHAI, PR; THOMPSON, J; ALM, EJ. **SARS-CoV-2 titers in wastewater are higher than expected from clinically confirmed cases.** [S. l.]: Cold Spring Harbor Laboratory, 7 abr. 2020. DOI 10.1101/2020.04.05.20051540. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1101/2020.04.05.20051540>.

WURTZER, S; MARECHAL, V; MOUCHEL, JM; MADAY, Y; TEYSSOU, R; RICHARD, E; ALMAYRAC, JL; MOULIN, L. **Evaluation of lockdown effect on SARS-CoV-2 dynamics through viral genome quantification in waste water, Greater Paris, France, 5 March to 23 April 2020.** Eurosurveillance. [S. l.]: European Centre for Disease Control and Prevention (ECDC), 17 dez. 2020. DOI 10.2807/1560-7917.es.2020.25.50.2000776. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.2807/1560-7917.es.2020.25.50.2000776>.

WYN-JONES, A.P.; SELLWOOD, J. **Enteric viruses in the aquatic environment.** Journal of Applied Microbiology, vol. 91, nº 6, p. 945–962, dez. 2001. DOI 10.1046/j.1365-2672.2001.01470.x. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-2672.2001.01470.x>.

XAGORARAKI, Irene; O'BRIEN, Evan. **Wastewater-Based Epidemiology for Early Detection of Viral Outbreaks.** Women in Water Quality. [S. l.]: Springer International Publishing, 2019. p. 75–97. DOI 10.1007/978-3-030-17819-2_5. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1007/978-3-030-17819-2_5.

XIAO, Fei; TANG, Meiwen; ZHENG, Xiaobin; LIU, Ye; LI, Xiaofeng; SHAN, Hong. **Evidence for Gastrointestinal Infection of SARS-CoV-2.** Gastroenterology, vol. 158, nº 6, p. 1831-1833.e3, maio 2020. DOI 10.1053/j.gastro.2020.02.055. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1053/j.gastro.2020.02.055>. (a)

XIAO, Fei; SUN, Jing; XU, Yonghao; LI, Fang; HUANG, Xiaofang; LI, Heying; ZHAO, Jingxian; HUANG, Jicheng; ZHAO, Jincun. **Infectious SARS-CoV-2 in Feces of Patient with Severe COVID-19.** Emerging Infectious Diseases, vol. 26, nº 8, p. 1920–1922, ago. 2020. DOI 10.3201/eid2608.200681. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.3201/eid2608.200681> (b)

XU, Yi; LI, Xufang; ZHU, Bing; LIANG, Huiying; FANG, Chunxiao; GONG, Yu; GUO, Qiaozhi; SUN, Xin; ZHAO, Danyang; SHEN, Jun; ZHANG, Huayan; LIU, Hongsheng; XIA, Huimin; TANG, Jinling; ZHANG, Kang; GONG, Sitang. **Characteristics of pediatric SARS-CoV-2 infection and potential evidence for persistent fecal viral shedding.** Nature Medicine, vol. 26, no. 4, p. 502–505, 13 Mar. 2020. DOI 10.1038/s41591-020-0817-4. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/s41591-020-0817-4>.

YAN, Renhong; ZHANG, Yuanyuan; LI, Yaning; XIA, Lu; GUO, Yingying; ZHOU, Qiang. **Structural basis for the recognition of SARS-CoV-2 by full-length human ACE2.** Science, vol. 367, nº 6485, p. 1444–1448, 4 mar. 2020. DOI 10.1126/science.abb2762. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1126/science.abb2762>.

ZIEGLER, Carly G.K.; ALLON, Samuel J.; NYQUIST, Sarah K.; MBANO, Ian M.; MIAO, Vincent N.; TZOUANAS, Constantine N.; CAO, Yuming; YOUSIF, Ashraf S.; BALS, Julia; HAUSER, Blake M.; FELDMAN, Jared; MUUS, Christoph; WADSWORTH, Marc H., II; KAZER, Samuel W.; HUGHES, Travis K.; DORAN, Benjamin; GATTER, G. James; VUKOVIC, Marko; TALIAFERRO, Faith; ... ZHANG, Kun. **SARS-CoV-2 Receptor ACE2 Is an Interferon-Stimulated Gene in Human Airway Epithelial Cells and Is Detected in Specific Cell Subsets across Tissues.** *Cell*, vol. 181, nº 5, p. 1016-1035.e19, maio 2020. DOI 10.1016/j.cell.2020.04.035. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2020.04.035>.

ZOU, Xin; CHEN, Ke; ZOU, Jiawei; HAN, Peiyi; HAO, Jie; HAN, Zeguang. **Single-cell RNA-seq data analysis on the receptor ACE2 expression reveals the potential risk of different human organs vulnerable to 2019-nCoV infection.** *Frontiers of Medicine*, vol. 14, nº 2, p. 185–192, 12 mar. 2020. DOI 10.1007/s11684-020-0754-0. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1007/s11684-020-0754-0>.

ZUCCATO, Ettore; CHIABRANDO, Chiara; CASTIGLIONI, Sara; BAGNATI, Renzo; FANELLI, Roberto. **Estimating Community Drug Abuse by Wastewater Analysis.** *Environmental Health Perspectives*, vol. 116, nº 8, p. 1027–1032, ago. 2008. DOI 10.1289/ehp.11022. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1289/ehp.11022>.

ZHANG, Ning; GONG, Yuhuan; MENG, Fanping; BI, Yuhai; YANG, Penghui; WANG, Fusheng. **Virus shedding patterns in nasopharyngeal and fecal specimens of COVID-19 patients.** [S. l.]: Cold Spring Harbor Laboratory, 30 Mar. 2020. DOI 10.1101/2020.03.28.20043059. Available at: <http://dx.doi.org/10.1101/2020.03.28.20043059>.

ZHANG, Tongqiang; CUI, Xiaojian; ZHAO, Xue; WANG, Jinhu; ZHENG, Jiafeng; ZHENG, Guifen; GUO, Wei; CAI, Chunquan; HE, Sijia; XU, Yongsheng. **Detectable SARS-CoV-2 viral RNA in feces of three children during recovery period of COVID-19 pneumonia.** *Journal of Medical Virology*, vol. 92, nº 7, p. 909–914, 15 abr. 2020. DOI 10.1002/jmv.25795. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1002/jmv.25795>.

ZHANG, Dayi; LING, Haibo; HUANG, Xia; LI, Jing; LI, Weiwei; YI, Chuan; ZHANG, Ting; JIANG, Yongzhong; HE, Yuning; DENG, Songqiang; ZHANG, Xian; WANG, Xinzi; LIU, Yi; LI, Guanghe; QU, Jiahui. **Potential spreading risks and disinfection challenges of medical wastewater by the presence of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) viral RNA in septic tanks of Fangcang Hospital.** *Science of The Total Environment*. [S. l.]: Elsevier BV, nov. 2020. DOI 10.1016/j.scitotenv.2020.140445. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.140445>.

ZHU, Na; ZHANG, Dingyu; WANG, Wenling; LI, Xingwang; YANG, Bo; SONG, Jingdong; ZHAO, Xiang; HUANG, Baoying; SHI, Weifeng; LU, Roujian; NIU, Peihua; ZHAN, Faxian; MA, Xuejun; WANG, Dayan; XU, Wenbo; WU, Guizhen; GAO, George F.; TAN, Wenjie. **A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019.** *New England Journal of Medicine*, vol. 382, nº 8, p. 727–733, 20 fev. 2020. DOI 10.1056/nejmoa2001017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMoa2001017>

ZHUANG, Meng-Wei; CHENG, Yun; ZHANG, Jing; JIANG, Xue-Mei; WANG, Li; DENG, Jian; WANG, Pei-Hui. **Increasing host cellular receptor—angiotensin-converting enzyme 2 expression by coronavirus may facilitate 2019-nCoV (or SARS-CoV-2) infection.** Journal of Medical Virology, vol. 92, nº 11, p. 2693–2701, 2 jul. 2020. DOI 10.1002/jmv.26139. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1002/jmv.26139>.