

# Padronização de método de concentração e extração de ácidos nucleicos em amostras de esgoto sanitário: uma ferramenta de baixo custo para ser utilizada na vigilância epidemiológica de SARS-CoV-2

*Standardization of the method of concentration and extraction of nucleic acids in wastewater samples: a low-cost tool to be used in epidemiological surveillance of SARS-CoV-2*

Aline Diniz Cabral<sup>1</sup> , Ieda Carolina Mantovani Claro<sup>1</sup> , Matheus Ribeiro Augusto<sup>1</sup> ,  
Veronica Nikoluk Friolani<sup>1</sup> , Cintia de Espindola Bezerra<sup>1</sup> , Melissa Cristina Pereira Graciosa<sup>1</sup> ,  
Fernando Luiz Affonso Fonseca<sup>2</sup> , Marcia Aparecida Speranca<sup>3</sup> , Rodrigo de Freitas Bueno<sup>1\*</sup> 

## RESUMO

A vigilância da qualidade dos esgotos sanitários pode representar uma ferramenta complementar para monitoramento de doenças infecciosas e prevenção de surtos epidêmicos, especialmente quando a capacidade para testes clínicos é limitada. Dessa maneira, o presente estudo descreve o detalhamento técnico de um método de baixo custo para a concentração e extração de ácidos nucleicos de amostras de esgoto sanitário como etapa prévia para a detecção de vírus e outros agentes patogênicos. Para validar a metodologia proposta, após as etapas de concentração e extração, analisaram-se a presença do ácido ribonucleico do SARS-CoV-2 (COVID-19) nas amostras, por meio de reação em cadeia da polimerase em tempo real. O ácido ribonucleico do vírus foi detectado em 80% das amostras de esgoto sanitário analisadas, comprovando o êxito do procedimento metodológico adotado. A detecção precoce de um patógeno associado ao trabalho de equipes multidisciplinares possibilita a prática da vigilância epidemiológica, que auxilia na tomada de decisões na Saúde Única – união indissociável entre a saúde animal, humana e ambiental.

**Palavras-chave:** saúde única; COVID-19; epidemiologia; esgoto sanitário.

## ABSTRACT

Sewage quality surveillance can represent a complementary tool for monitoring infectious diseases and preventing epidemic outbreaks, especially when the capacity for clinical testing is limited. Thus, the present study describes the technical details of a low-cost method for concentrating and extracting nucleic acids from sewage samples, as a preliminary step for the detection of viruses and other pathogens. To validate the proposed methodology, after the concentration and extraction steps, the presence of the SARS coronavirus-2 (COVID-19) in the samples was analyzed using real-time polymerase chain reaction. The virus' ribonucleic acid was detected in 80% of the sewage samples analyzed, proving the success of the methodological procedure adopted. The early detection of a pathogen associated with the work of multidisciplinary teams allows the practice of epidemiological surveillance, which assists in making decisions about One Health – an inseparable union between animal, human, and environmental health.

**Keywords:** one health; COVID-19; epidemiology; wastewater.

<sup>1</sup>Centro de Engenharia, Modelagem e Ciências Sociais Aplicadas, Universidade Federal do ABC - Santo André (SP), Brasil.

<sup>2</sup>Departamento de Análises Clínicas, Centro Universitário Médico ABC - Santo André (SP), Brasil.

<sup>3</sup>Centro de Ciências Naturais e Humanas, Universidade Federal do ABC Santo André (SP), Brasil.

\*Autor correspondente: rodrigo.bueno@ufabc.edu.br

**Conflitos de interesse:** os autores declaram não haver conflitos de interesse.

**Financiamento:** Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq - Decit/SCITE n° 07/2020 - número do processo: 402432/2020-7).

**Recebido:** 23/10/2020 - **Aceito:** 19/11/2020 - **Reg. ABES:** 20200370

## INTRODUÇÃO

A pandemia da COVID-19 tem como agente etiológico o coronavírus SARS-CoV-2 de origem zoonótica, que tem alta similaridade genética com espécies de coronavírus de morcegos, de forma similar aos coronavírus causadores da Síndrome Respiratória Aguda do Oriente Médio (MERS) e do SARS-CoV-1. A COVID-19, que já resultou em milhares de óbitos em todo o mundo desde sua identificação na China em dezembro de 2019, constitui-se em um exemplo de emergência de uma zoonose decorrente de ação antrópica, de difícil contenção por sua forma de transmissão (humano a humano por via aérea) e características biológicas. Além da variabilidade nos sintomas, como tosse, febre, dificuldade para respirar, dor de garganta, diarreia e pneumonia, há grande quantidade de indivíduos assintomáticos transmissores do vírus, de modo que a detecção da circulação do vírus e a quarentena são fundamentais para o controle de sua disseminação. A presença de ácidos nucleicos do SARS-CoV-2 foi relatada em fezes e urina de indivíduos infectados e por esse motivo vem sendo avaliada também em esgotos sanitários. No entanto, a via fecal-oral não foi confirmada como rota de transmissão do vírus (CHERNICHARO *et al.*, 2020a; FIOCRUZ, 2020; MEDEMA *et al.*, 2020; NEMUDRY *et al.*, 2020; OPAS, 2020; SUN *et al.*, 2020; WU *et al.*, 2020b; XU *et al.*, 2020; ZHANG *et al.*, 2020).

Nesse contexto, a epidemiologia baseada em águas residuárias (*wastewater-based epidemiology* — WBE) é uma abordagem inovadora que permite a obtenção de informações sobre a presença de patógenos em grupos populacionais por meio da análise dos dejetos, sendo uma ferramenta proposta em 2001 e aplicada a partir de 2005 de modo a complementar as técnicas existentes para estimar o uso de drogas em uma dada população (KASPRZYK-HORDERN *et al.*, 2014; LU *et al.*, 2020). Atualmente essa ferramenta está sendo utilizada para a vigilância epidemiológica, servindo como um instrumento para planejamento, organização e operacionalização dos serviços de saúde, bem como para a normatização de atividades técnicas relacionadas, o que permite o monitoramento e a avaliação da situação de saúde no território, além de apoiar as decisões da gestão (BRASIL, 2006; BRASIL, 2009; LU *et al.*, 2020).

Geralmente, a etapa limitante nas análises moleculares para a detecção de vírus e outros agentes patogênicos no esgoto sanitário é a de concentração primária. Esgoto sanitário pode ser considerado como aquele que provém principalmente de residências, estabelecimentos comerciais, instituições ou quaisquer edificações que disponham de instalações de banheiros, lavanderias e cozinhas, sejam elas urbanas ou rurais. Compõe-se essencialmente de água de banho, excretas, sabão, detergentes e águas de lavagens. As urinas e fezes, além de outros compostos que podem ocorrer nos esgotos sanitários, constituem 0,1% das impurezas, sendo o restante (99,9%) essencialmente água. O material genético dos vírus e outros microrganismos encontra-se, portanto, muito diluído nessa matriz (TCHOBANOGLIOUS *et al.*, 2013).

A efetividade da WBE depende da qualidade dos dados de quantificação dos microrganismos patogênicos, que por sua vez depende da qualidade do produto da concentração primária da amostra (LU *et al.*, 2020). No caso de um vírus com genoma constituído de ácido ribonucleico (RNA), como o SARS-CoV-2, uma nanopartícula de fácil degradação nas condições do esgoto sanitário, a recuperação por concentração torna-se ainda mais difícil. Os principais métodos utilizados para a concentração primária de amostras podem ser divididos em três grandes grupos: adsorção (*Viruses Adsorption-ELution* — VIRADEL), ultrafiltração e precipitação/separação de fases.

Os métodos de VIRADEL, baseados na filtração em membranas eletrostaticamente carregadas (eletronegativas e eletropositivas), embora sejam muito utilizados para a concentração primária de amostras, têm apresentado algumas desvantagens quando aplicados às amostras de esgoto sanitário. Os compostos orgânicos dissolvidos nas amostras também sofrem adsorção, promovendo a colmatação prematura das membranas e reduzindo a eficiência de recuperação dos vírus (LU *et al.*, 2020). Ahmed *et al.* (2020) não verificaram a influência negativa da matéria orgânica no pré-tratamento da amostra, mas recomendaram estudos complementares e a adaptação de outros métodos para aumentar a eficiência de recuperação dos vírus.

Os métodos de ultrafiltração já demonstraram adequada eficiência de concentração, especialmente nos equipamentos de fluxo tangencial. No entanto, esses equipamentos são normalmente grandes, imóveis e não se encontram prontamente disponíveis na maioria dos laboratórios de saneamento. Além disso, uma quantidade limitada de estudos demonstrou a aplicabilidade e a viabilidade de tais métodos para a concentração do SARS-CoV-2 (LU *et al.*, 2020).

Os métodos de precipitação, baseados na utilização de polietilenoglicol (PEG), têm demonstrado excelente desempenho na concentração do vírus para amostras de esgoto sanitário, possibilitando excelente recuperação (LU *et al.*, 2020; WU *et al.*, 2020a). Esses métodos ainda oferecem excelente custo-benefício, uma vez que a maioria dos equipamentos e insumos utilizados é normalmente encontrada em laboratórios de saneamento. LU *et al.* (2020), após analisarem 18 relevantes trabalhos sobre detecção de SARS-CoV-2 no esgoto sanitário, recomendaram o método de precipitação com PEG, especialmente para maiores volumes de amostras e maiores níveis de matéria orgânica e turbidez.

Dessa maneira, o presente manuscrito tem por objetivo compartilhar um método de concentração e extração de ácidos nucleicos para amostras de esgoto sanitário, baseado no método de precipitação com PEG, de baixo custo e que permite a detecção e a quantificação de RNA de SARS-CoV-2 por transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase (RT-PCR) em tempo real. O método proposto pode fornecer uma ferramenta complementar à vigilância epidemiológica para o monitoramento de patógenos circulantes e de doenças emergentes/reemergentes.

## METODOLOGIA

### Instrumentação e reagentes

Para a implementação do método de concentração e extração de ácidos nucleicos de amostras de esgoto sanitário, foram necessários equipamentos como cabine de fluxo laminar, centrífuga refrigerada, cabine para RT-PCR, termociclador e equipamento para PCR em tempo real e sistema de eletroforese. Também foram necessários conjuntos de pipetas, ponteiras e reagentes diversos, como agarose, Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético (EDTA), PEG8000 e reagentes para biologia molecular, entre eles a polimerase, didesoxirribonucleotídeos (dNTP) e sondas marcadas com fluorocromo.

### Amostragem

As amostras de esgoto sanitário foram coletadas semanalmente, entre os dias 8 de junho de 2020 e 10 de julho de 2020 (cinco semanas consecutivas), na

estação de tratamento de esgoto do ABC (ETE ABC), região metropolitana de São Paulo/SP. Foram realizadas amostragens compostas, de 24 horas, por meio de um amostrador automático Hach refrigerado (modelo AWRS AS950), com temperatura de coleta de 4°C. Ressaltamos aqui que o plano de amostragem é parte fundamental do sucesso da vigilância epidemiológica baseada em águas residuárias. Neste estudo não abordaremos esse aspecto e recomendamos a leitura da Nota Técnica intitulada “Contribuição para elaboração de planos de monitoramento da ocorrência do novo coronavírus no esgoto”, publicada recentemente pelo Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia — INCT ETEs Sustentáveis (CHERNICHARO *et al.*, 2020b).

## Procedimentos metodológicos de concentração e extração

A concentração de partículas presentes no esgoto sanitário foi realizada por modificação da técnica de concentração com PEG apresentada por Wu *et al.* (2020a), detalhada a seguir. Uma alíquota de 40 mL de esgoto bruto homogeneizada foi colocada em um tubo cônico de centrífuga de 50 mL, contendo 4 g de PEG 8000 (8% w/v, Sigma) e 0,9 g de Cloreto de Sódio (Synth). Como controle de precipitação de ácidos nucleicos, foram acrescentados 2 µL de plasmídeo (pET 28<sup>a</sup>, Novagen). A amostra foi homogeneizada até a completa dissolução dos solutos e então foi submetida a centrifugação por 60 min, a 15.000 g

em temperatura de 4°C. Após a centrifugação, toda a água foi descartada e o precipitado foi dissolvido em 0,4 mL de solução tampão salina-fosfato (PBS 0,1M, pH 7,2) e transferido para um microtubo de 1,5 mL. Ao precipitado dissolvido em PBS foi acrescentado 1 mL de fenol ácido (Phoneutria) e, após agitação vigorosa, o composto foi submetido a centrifugação por 10 min a 12.000 g e 4°C. Posteriormente, a fase aquosa contendo macromoléculas solúveis foi transferida para um microtubo de 2 mL, ao qual foram acrescentados 1 mL de trizol *homemade* (38% fenol ácido, 0,8 M Isotiocianato de Guanidina, 0,4 M Tiocianato de Amônio, 0,1 M Acetato de Sódio pH 5, 5% Glicerol) e 200 µL de Clorofórmio (Merck). Em sequência, homogeneizou-se vigorosamente e prosseguiu-se com a centrifugação a 4°C por 10 min e rotação de 12.000 g. A fase aquosa contendo ácidos nucleicos (DNA e RNA) foi transferida para outro microtubo de 2 mL contendo 1,5 mL de etanol absoluto (Merck). O microtubo foi homogeneizado por inversão e submetido à centrifugação refrigerada a 4°C por 10 min, a 12.000 g. Descartou-se o sobrenadante e o precipitado foi lavado com 1 mL de etanol a 70%, homogeneizado por inversão e submetido a centrifugação a 4°C por 10 min, a 12.000 g. O sobrenadante foi descartado e o microtubo foi invertido em papel absorvente, para repousar até a completa secagem por evaporação em temperatura ambiente. Em sequência, foi realizada a dissolução do *pellet* em 40 µL de água ultrapura livre de RNase. O material dissolvido foi armazenado em

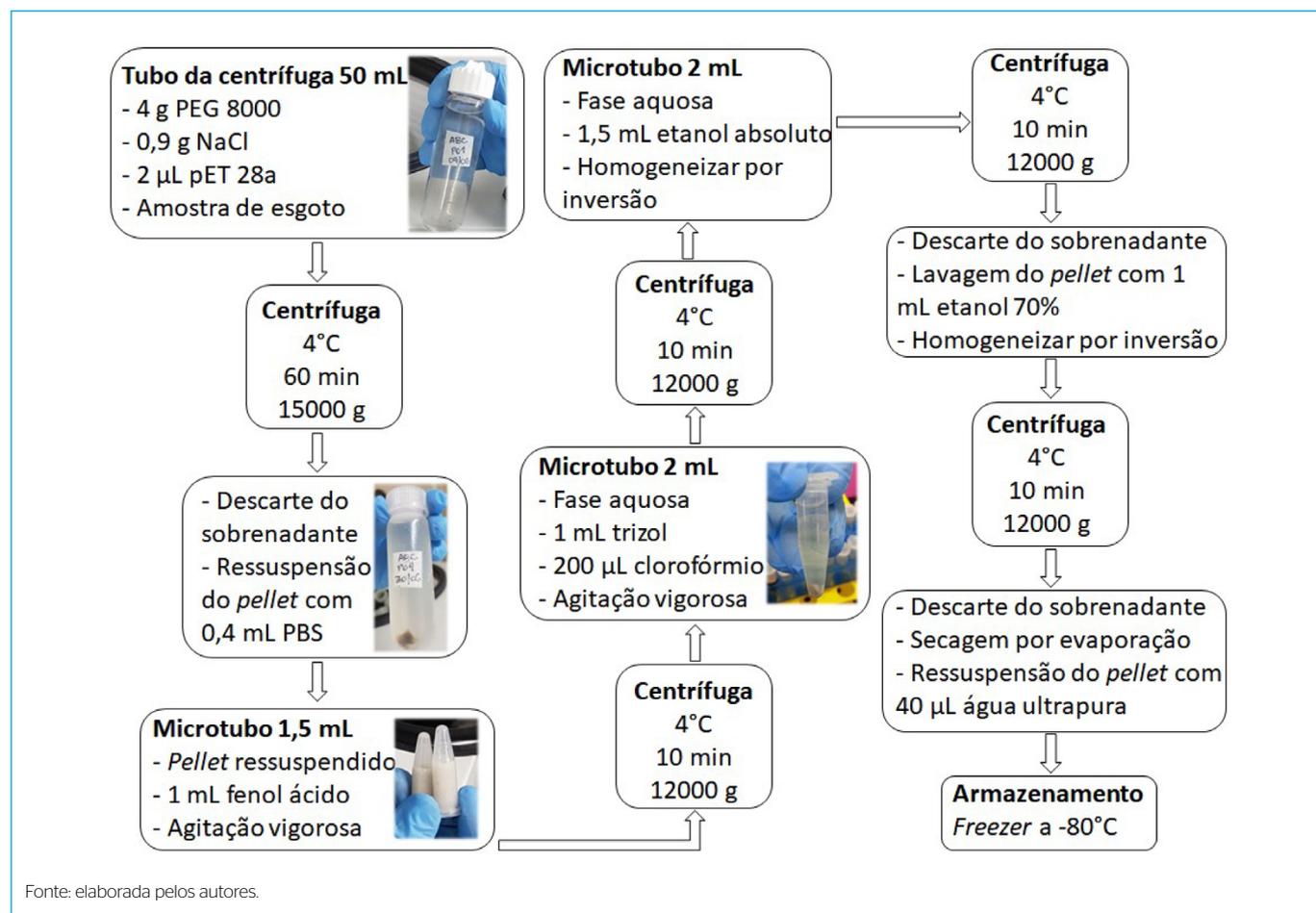


Figura 1 - Etapas do método de concentração e extração de ácidos nucleicos.

ultrafreezer a -80°C até o momento do uso. O resumo da metodologia pode ser visualizado na Figura 1.

### Detecção do ácido ribonucleico viral e do plasmídeo

Após as etapas de concentração e purificação de ácidos nucleicos no esgoto sanitário, procedeu-se à etapa de detecção do RNA do SARS-CoV-2 por RT-PCR em tempo real. Para isso, foi utilizado o *kit* 2019-nCoV TaqMan RT-PCR da Norgen, que detecta o RNA específico para SARS-CoV-2 em uma única etapa de reação, de acordo com as instruções do fabricante. Os alvos de SARS-CoV-2 detectados com o *kit* da Norgen são os fragmentos denominados N1 e N2, correspondentes ao gene que codifica a proteína do nucleocapsídeo viral, e a RNase P corresponde ao gene humano utilizado como controle interno.

O protocolo foi descrito pelo Centro de Controle de Doenças dos Estados Unidos da América (CDC). Resumidamente, para cada reação de RT-PCR em tempo real, com cada um dos três alvos, utilizaram-se 10 µL de 2 x *One-Step RT-PCR Master Mix*, 1,5 µL de *Primer&Probe Mix*, 3,5 µL de água livre de nuclease, reagentes contidos no *kit* e 5 µL de amostra de RNA, totalizando o volume final de 20 µL.

O *kit* para reação de RT-PCR em tempo real fornece um controle positivo que contém a sequência dos alvos dos genes que codificam o nucleocapsídeo nCoV (N1 e N2) e a RNase P humana com o número de cópias conhecido. Para a quantificação das amostras, foram incluídas em cada reação as diluições seriadas dos genes alvo controle utilizando Rotor-Gene Q (Qiagen) e seguindo o programa: ciclo 1 — 50°C por 30 min; ciclo 2 — 95°C por 3 min; ciclo 3 — 45 x 95°C por 3 s e 55°C por 30 s (adquirindo a fluorescência no filtro verde, pois as sondas contêm a fluorescência FAM). As amostras são processadas em duplicata, assim como as curvas controle padrão, utilizando-se o equipamento Rotor-Gene Q (Qiagen) para RT-PCR.

Para confirmar a concentração e a extração de ácidos nucleicos, 1 µL de plasmídeo (pET 28a) a 100 ng/µL foi adicionado randomicamente em 20% das amostras antes da centrifugação. A detecção do plasmídeo (pET 28<sup>a</sup>, Novagen) foi realizada por meio da PCR convencional (termociclador Applied Biosystems™), sendo empregados oligonucleotídeos direcionados à região T7 (Tabela 1).

Para uma reação de 25 µL de volume final, foi utilizada a seguinte mistura de reagentes: tampão de reação (KCl 50mM; Tris-HCl 10 mM, pH 9,0), 200 µM de cada nucleotídeo (dATP, dTTP, dCTP, dGTP), 0,10 µM de cada oligonucleotídeo, 2 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,5 unidade de Taq DNA polimerase e 2 µL de DNA extraído. Essa mistura foi submetida a uma desnaturação inicial (94°C 3'), seguida de 40 ciclos de desnaturação (94°C 30"), hibridização (60°C 30") e extensão (72°C 45"), finalizando com uma extensão final (72°C 7' e 4°C ∞).

A recuperação do plasmídeo foi obtida por meio de eletroforese em gel de agarose 1%, corado com UniSafe Dye® (20,000 x Uniscience), sendo as bandas (~ 347pb) visualizadas por meio de fotodocumentador UV (L-PIX Loccus).

**Tabela 1** - Sequências de oligonucleotídeos.

Oligonucleotídeos	Sequência
T7_senso	5' TTAATACGACTCACTATAGGGGAATTG 3'
T7_antissenso	5' GCTAGTTATTGCTCAGCGGTGG 3'

Fonte: elaborada pelas autoras.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Concentração e extração das amostras de esgoto sanitário

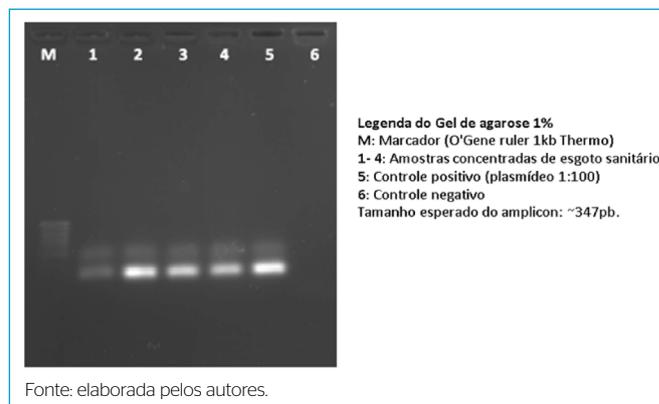
Na Figura 2 está ilustrada a eletroforese em gel de agarose (1%), demonstrando a recuperação do plasmídeo e validando o método de concentração e extração de ácidos nucleicos de amostras de esgoto sanitário descrito no presente trabalho. Além da precipitação com PEG, existem outros métodos de concentração e extração utilizados por diferentes grupos, entre eles o de adsorção-extração por filtração em membrana eletronegativa ou eletropositiva (LUKASIK *et al.*, 2000; BOSH *et al.*, 2011), ultrafiltração (SOULE *et al.*, 2000; RAJAL *et al.*, 2007; HILL *et al.*, 2007), ultracentrifugação (FORMIGA-CRUZ *et al.*, 2005; HE & JIANG 2005; ALBINA-GIMENEZ *et al.*, 2006; SILVA *et al.*, 2011) e diversos protocolos para a extração de ácidos nucleicos como sílica, fenol-clorofórmio, além de vários *kits* comerciais. Assim, o método padronizado, utilizado no presente estudo para a concentração e a extração de ácido nucleico, dispensa o uso de membranas e equipamentos de custo elevado como ultracentrífugas, o que pode ser atrativo para a incorporação em rotinas de laboratório de microbiologia, na detecção de patógenos presentes em amostras de esgoto sanitário.

### Detecção do SARS-CoV-2 em amostras de esgoto sanitário

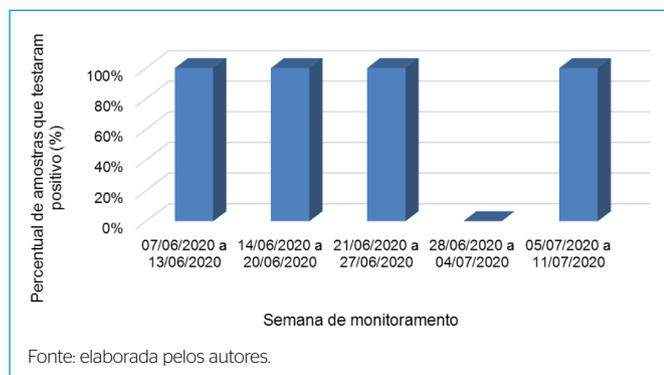
Os resultados da detecção do SARS-CoV-2 nas amostras do esgoto sanitário afluente à ETE ABC estão apresentados na Figura 3.

O RNA do SARS-CoV-2 foi detectado em 100% das amostras das semanas 1, 2, 3 e 5 de monitoramento. Na semana 4, a concentração do material genético do vírus foi abaixo do nível de detecção na amostra de esgoto. Dessa maneira, 80% das amostras analisadas testaram positivo, comprovando a eficácia do procedimento metodológico proposto para a concentração, extração e detecção do novo coronavírus em amostras de esgoto sanitário.

Na literatura, encontram-se disponíveis diversos artigos baseados na concentração e detecção viral em amostras de esgoto sanitário, e até o momento não há um protocolo único que seja utilizado como padrão para determinar a concentração viral do SARS-CoV-2 em águas (SYMONDS *et al.*, 2014; AHMED *et al.*, 2015, AHMED *et al.*, 2020a,b, KITAJIMA *et al.*, 2020). Os resultados aqui representados são preliminares e ainda serão correlacionados com



**Figura 2** - Amostras de esgoto sanitário concentradas em gel de eletroforese.



**Figura 3** - Percentuais das amostras de esgoto que testaram positivo para a ocorrência do novo coronavírus ao longo de cinco semanas consecutivas de monitoramento.

a concentração viral, bem como com números de infectados em publicações futuras do grupo de pesquisa.

Outros grupos de pesquisa também conseguiram detectar a presença do SARS-CoV-2 em amostras de esgoto sanitário na Holanda (MEDEMA *et al.*, 2020), Espanha (RANDAZZO *et al.*, 2020), Austrália (AHMED *et al.*, 2020), nos Estados Unidos (WU *et al.*, 2020) e até mesmo no Brasil (CHERNICHARO *et al.*, 2020a).

Ahmed *et al.* (2020), por exemplo, detectaram concentrações do RNA do vírus de 1,9 a 12 cópias/100 mL no esgoto sanitário de Brisbane, Austrália. No entanto, somente 22,2% das amostras analisadas apresentaram resultados positivos para o SARS-CoV-2. Os autores ainda verificaram inconsistências em alguns resultados quando realizaram comparação entre dois métodos de concentração, filtração em membrana eletronegativa e ultrafiltração.

Randazzo *et al.* (2020), analisando amostras de esgoto sanitário afluente de ETE instaladas nas principais cidades da região de Murcia, Espanha, detectaram concentrações do RNA do vírus superiores a  $10^4$  cópias/100 mL. Wu *et al.* (2020) também detectaram concentrações dessa ordem de magnitude em Massachusetts, Estados Unidos.

No presente estudo, para a ETE ABC foram detectadas concentrações de RNA do vírus na faixa de  $8,0 \times 10^1$  a  $1,3 \times 10^3$  cópias/mL, com valores médios de  $2,20 \times 10^2$ . Como ainda não existe uma metodologia padronizada para a concentração e detecção do vírus, verifica-se grande diferença nos resultados de concentração de RNA entre os diferentes trabalhos.

### Considerações importantes sobre aplicações da metodologia proposta

Para a realização de um trabalho epidemiológico, em que se deseje diagnosticar um agente patogênico circulante em esgoto sanitário, é de suma importância estabelecer os pontos de amostragem e qual a população atendida. Após estabelecer a amostragem, é preciso atentar-se ao método de coleta e preservação da amostra até a chegada ao laboratório.

É importante ressaltar que no esgoto sanitário não existe apenas a presença de dejetos humanos, mas também de animais sinantrópicos (roedores, marsupiais, morcegos, pombos e outras aves) e animais de estimação, que podem ser carregados pelas águas pluviais e de lavagem de pisos até os sistemas de esgotamento sanitário.

Na maior parte dos municípios brasileiros, os sistemas de esgotamento sanitário são do tipo separador absoluto (esgoto sanitário e águas pluviais são transportados por diferentes tubulações), porém os agentes patogênicos alcançam as correntes de esgoto sanitário em razão da existência de ligações clandestinas e ocupações irregulares (BERTOLINO *et al.*, 2018).

O método adotado no laboratório para testar SARS-CoV-2 em esgoto sanitário deve ser simples, acessível e confiável e, tendo em vista a implantação de um programa de vigilância epidemiológico, deve se atentar à capacidade do laboratório e à viabilidade econômica. Em suma, a colaboração entre os grupos de pesquisa neste momento terá um papel importante no desenvolvimento e compartilhamento de protocolos e resultados comparáveis entre regiões geográficas e escalas temporais semelhantes. Uma abordagem multidisciplinar em escala regional é necessária para que resultados oportunos e de alto impacto guiem a comunidade científica e tecnológica e tenham impacto direto na sociedade.

## CONCLUSÃO

Os resultados deste trabalho demonstram que foi possível adaptar e desenvolver um método para a concentração de esgoto sanitário e a recuperação do RNA viral (SARS-CoV-2) de forma eficaz e acessível. Os resultados ainda mostram que foi possível detectar a presença do novo coronavírus em amostras de esgoto na região do ABC por meio de PCR em tempo real. Essa metodologia pode integrar-se às ferramentas de vigilância epidemiológica de patógenos e pode ser utilizada como uma opção promissora no enfrentamento da COVID-19.

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Universidade Federal do ABC o apoio à pesquisa (Edital UFABC nº 41/2020 — REIT — 11/01). Agradecemos ao INCT ETEs Sustentáveis a parceria em pesquisas em rede. Agradecemos diretamente os recursos financeiros disponibilizados pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), em parceria com o Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações (MCTIC) e o Ministério da Saúde (MS), por meio do Departamento de Ciência e Tecnologia da Secretaria de Ciência, Tecnologia, Inovação e Insumos Estratégicos em Saúde (Decit/SCTIE nº 07/2020 — pesquisas para enfrentamento da COVID-19, suas consequências e outras síndromes respiratórias agudas graves — número do processo: 402432/2020-7).

## CONTRIBUIÇÕES DOS AUTORES

Cabral, A. D.: conceituação, curadoria de dados, análise formal, metodologia, escrita – primeira redação. Claro, I. C. M.: conceituação, curadoria de dados, análise formal, metodologia, escrita – primeira redação. Augusto, M. R.: curadoria de dados, análise formal, escrita – primeira redação. Friolani, V. N.: metodologia, escrita – revisão e edição. Bezerra, C. E.: metodologia, escrita – revisão e edição. Graciosa, M. C. P.: conceituação, metodologia, escrita – revisão e edição. Fonseca, F. L. A.: conceituação, metodologia, supervisão, escrita – revisão e edição. Speranca, M. A.: conceituação, metodologia, supervisão, escrita – revisão e edição. Bueno, R. F.: conceituação, obtenção de financiamento, metodologia, supervisão, escrita – revisão e edição.

## REFERÊNCIAS

- AHMED, W.; HARWOOD, V. J.; GYAWALI, P.; SIDHU, J. P. S.; TOZE, S. Comparison of concentration methods for quantitative detection of sewage-associated viral markers in environmental waters. *Applied and Environmental Microbiology*, v.81, n. 6, p. 2.042-2.049, 2015. <https://doi.org/10.1128/AEM.03851-14>
- AHMED, W.; ANGEL, N.; EDSON, J.; BIBBY, K.; BIVINS, A.; O'BRIEN, J. W.; CHOI, P. M.; KITAJIMA, M.; SIMPSON, S. L.; LI, J.; TSCHARKE, B.; VERHAGEN, R.; SMITH, W. J. M.; ZAUGG, J.; DIERENS, L.; HUGENHOLTZ, P.; THOMAS, K. V.; MUELLER, J. 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*, v. 728, 2020a. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.138764>
- AHMED, W.; BERTSCH, P. M.; BIVINS, A.; BIBBY, K.; FARKAS, K.; GATHERCOLE, A.; HARAMOTO, E.; GYAWALI, P.; KORAJKIC, A.; MCMINN, B. R.; MUELLER, J. F.; SIMPSON, S. L.; SMITH, W. J. M.; SYMONDS, E. M.; THOMAS, K. V.; VERHAGEN, R.; KITAJIMA, M. 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*, v. 739, 2020b. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.139960>
- ALBINANA-GIMENEZ, N.; CLEMENTE-CASARES, P.; BOFILL-MAS, S.; HUNDESA, A.; RIBAS, F.; GIRONES, R. Distribution of human polyomaviruses, adenoviruses, and hepatitis E virus in the environment and in a drinking-water treatment plant. *Environmental Science & Technology*, v. 40, p. 7416-7422, 2006. <https://doi.org/10.1021/es060343i>
- ARAGÃO, G. C.; OLIVEIRA, D. S.; SANTOS, M. C.; MASCARENHAS, J. P.; OLIVEIRA, C. S.; LINHARES, A. C.; GABBAY, Y. B. Molecular characterization of norovirus, sapovirus and astrovirus in children with acute gastroenteritis from Belém, Pará, Brazil. *Rev Pan-Amaz Saúde*, v. 1, n. 1, p. 149-158, 2010. <http://doi.org/10.5123/S2176-62232010000100021>
- BARRELLA, K. M. *Pesquisa de vírus entéricos humanos em lodos de esgoto originários de duas ETEs do Estado de São Paulo: estabelecimento e avaliação de metodologia para recuperação e detecção viral*. São Paulo, SP: USP, 2008. Originalmente apresentada como tese de doutorado, Universidade de São Paulo, 2008.
- BERTOLINO, M.; KONDAGESKI, J. H.; WEINSCHUTZ, R. Água de chuva domiciliar no esgoto separador absoluto. *Revista DAE*, v. 66, n. 213, p. 100-108, 2018. <https://doi.org/10.4322/dae.2018.035>
- BOSCH, A.; SÁNCHEZ, G.; ABBASZADEGAN, M.; CARDUCCI, A.; GUIX, S.; LE GUYADER, F. S.; NETSHIKWETA, R.; PINTÓ, R. M.; VAN DER POEL, W. H. M.; RUTJES, S.; SANO, D.; TAYLOR, M. B.; VAN ZYL, W. B.; RODRÍGUEZ-LÁZARO, D.; KOVAC, K.; SLEWOOD, J. Analytical methods for virus detection in water and food. *Food Anal. Methods*, v. 4, p. 4-12, 2011. <http://doi.org/10.1007/s12161-010-9161-5>
- BRASIL. *Guia de vigilância epidemiológica*. 7ª ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2009. 816 p.
- BRASIL. *Guia de vigilância em saúde*. 3ª ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2019. 740 p.
- BRASIL. *Vigilância e controle da qualidade da água para consumo humano*. 1ª ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2006. 212 p.
- CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). *One Health: history*. 2016. Disponível em: <https://www.cdc.gov/onehealth/basics/history/index.html>. Acesso em: 30 set. 2021.
- CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). *One Health: zoonotic diseases*. 2017. Disponível em: <https://www.cdc.gov/onehealth/basics/zoonotic-diseases.html>. Acesso em: 30 set. 2021.
- CHERNICHARO, C. A. L.; ARAÚJO, J. C.; MOTA FILHO, C. R.; BRESSANI-RIBEIRO, T.; CHAMHUM-SILVA, L. A.; LEAL, C. D.; LEROY, D.; MACHADO, E.; CORDERO, M. F. E.; AZEVEDO, L. S.; FERNANDES, L.; LEÃO, T.; LAGUARDIA, F.; REIS, M. T. P.; MELO, M. C.; AYRIMORAES, S. R. Monitoramento do esgoto como ferramenta de vigilância epidemiológica para controle da COVID-19: estudo de caso na cidade de Belo Horizonte. *Engenharia Sanitária e Ambiental*, 2020a.
- CHERNICHARO, C. A. L.; MOTA FILHO, C. R.; CAVALCANTI, D. L.; ARAÚJO, J. C.; LOBATO, L. C. S.; CHAMHUM-SILVA, L. A.; FUECKNER, M. A.; REIS, M. T. P.; AYRIMORAES, S. R.; BRESSANI-RIBEIRO, T. Contribuição para a elaboração de planos de monitoramento da ocorrência do novo coronavírus no esgoto. INCT ETEs Sustentáveis/UFMG; Agência Nacional de Águas; *Companhia de Saneamento de Minas Gerais*, 2020b.
- FORMIGA-CRUZ, M.; HUNDESA, A.; CLEMENTE-CASARES, P.; ALBIÑANAGIMENEZ, N.; ALLARD, A.; GIRONES, R. Nested multiplex PCR assay for detection of human enteric viruses in shellfish and sewage. *Journal of Virological Methods*, v. 125, n. 2, p. 111-118, 2005. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2005.01.009>
- FUMIAN, T. M.; GUIMARÃES, F. R.; VAZ, B. J. P.; SILVA, M. T. T.; MUYLAERT, F. F.; BOFILL-MAS, S.; GIRONÉS, R.; LEITE J. P. G.; MIAGOSTOVICH, M. P. Molecular detection, quantification and characterization of human polyomavirus JC from waste water in Rio De Janeiro, Brazil. *Journal of Water & Health*, v. 8, n. 3, p. 438-445, 2010. <https://doi.org/10.2166/wh.2010.090>
- FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ (FIOCRUZ). Fiocruz divulga estudo sobre a presença do novo coronavírus em esgotos sanitários. *Portal FIOCRUZ*, 2020. Disponível em: <http://portal.fiocruz.br/noticia/fiocruz-divulga-estudo-sobre-presenca-do-novo-coronavirus-em-esgotos-sanitarios>. Acesso em: 30 set. 2021.
- GARRAFA, P. *Avaliação da qualidade virológica do efluente doméstico tratado e disponibilizado para reuso na cidade de São Paulo*. São Paulo, SP: USP, 2009. Originalmente apresentada como tese de doutorado, Universidade de São Paulo, 2009.
- GUIMARÃES, F. R.; FERREIRA, F. F. M.; VIEIRA, C. B. B.; FUMIAN, T. M.; SHUBO, T.; LEITE, J. P. G.; MIAGOSTOVICH, M. P. Molecular detection of human astrovirus in an urban sewage treatment plant in Rio de Janeiro, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 103, n. 8, p. 819-823, 2008.
- HE, J.; JIANG, S. Quantification of Enterococci and Human Adenoviruses in Environmental Samples by Real-Time PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 71, n. 5, p. 2.250-2.255, 2005. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.5.2250-2255.2005>
- HILL, V. R.; KAHLER, A. M.; JOTHIKUMAR, N.; JOHNSON, T. B.; HAHN, D.; CROMEANS, T. L. Multistate evaluation of an ultrafiltration-based procedure for simultaneous recovery of enteric microbes in 100-liter tap water samples. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 73, n. 13, p. 4.218-4.225, 2007. <https://doi.org/10.1128/aem.02713-06>
- KASPRZYK-HORDERN, B.; BIJLSMA, L.; CASTIGLIONI, S.; COVACI, A.; VOOGT, P.; EMKE, E.; HERNÁNDEZ, F.; ORT, C.; REID, M.; VAN NUJIS, A. L. N.; THOMAS, K. V. Wastewater-based epidemiology for public health monitoring. *Water and Sewerage Journal*, v. 4, p. 25-26, 2014.

- KITAJIMA, M.; AHMED, W.; BIBBY, K.; CARDUCCI, A. L.; GERBA, C. P.; HAMILTON, K. A.; HARAMOTO, E.; ROSE, J. B. SARS-CoV-2 in wastewater: State of the knowledge and research needs. *Science of the Total Environment*, v. 739, p. 139076, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.139076>
- LU, D.; HUANG, Z.; LUO, J.; ZHANG, X.; SHA, S. Primary concentration - The critical step in implementing the wastewater-based epidemiology for the COVID-19 pandemic: A mini-review. *Science of the Total Environment*, v. 747, p. 141245, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.141245>
- LUKASIK, L.; SCOTT, T. M.; ANDRYSHAK, D.; FARRAH, S. R. Influence of Salts on Virus Adsorption to Microporous Filters. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 66, n. 7, p. 2914-2920, 2000. <https://doi.org/10.1128/AEM.66.7.2914-2920.2000>
- MEDEMA, G.; HEIJNEN, L.; ELSINGA, G.; ITALIAANDER, R.; BROUWER, A. 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*, v. 7, n. 7, p. 511-516, 2020. <https://doi.org/10.1021%2Facs.estlett.0c00357>
- MORESCO, V.; DAMAZO, N. A.; BARARDI, C. R. M. Thermal and temporal stability on the enteric viruses infectivity in surface freshwater. *Water Supply*, v. 16, n. 3, p. 620-627, 2016. <https://doi.org/10.2166/ws.2015.171>
- NEMUDRYI, A.; NEMUDRAIA, A.; WIEGAND, T.; SURYA, K.; BUYUKYORUK, M.; CICHA, C.; VANDERWOOD, K. K.; WILKINSON, R.; WIEDENHEFT, B. Temporal Detection and Phylogenetic Assessment of SARS-CoV-2 in Municipal Wastewater. *Cell Reports Medicine*, v. 1, n. 6, p. 100.098, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.xcrm.2020.100098>
- ORGANIZAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS (ONU). *Agenda 2030*. 2017. Disponível em: <https://nacoesunidas.org/pos2015/agenda2030/>. Acesso em: 30 set. 2021.
- ORGANIZACAO MUNDIAL DA SAUDE (OMS). *Health Topics: Zoonoses*. 2020. Disponível em <https://www.who.int/topics/zoonoses/en/>. Acesso em: 30 set. 2021.
- ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE (OPAS). Folha informativa - COVID-19. *Escritório da OPAS e da OMS no Brasil*, 2020. Disponível em: [http://www.paho.org/bra/index.php?option=com\\_content&view=article&id=6101:covid19&Itemid=875](http://www.paho.org/bra/index.php?option=com_content&view=article&id=6101:covid19&Itemid=875). Acesso em: 30 set. 2021.
- RAJAL, V. B.; MCSWAIN, B. S.; THOMPSON, D. E.; LEUTENEGGER, C. M.; WUERTZ, S. Molecular quantitative analysis of human viruses in California stormwater. *Water Research*, v. 41, n. 19, p. 4287-4298, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2007.06.002>
- RANDAZZO, W.; TRUCHADO, P.; CUEVAS-FERRANDO, E.; SIMÓN, P.; ALLENDE, A.; SÁNCHEZ, G. SARS-CoV-2 RNA in Wastewater Anticipated COVID-19 Occurrence in a Low Prevalence Area. *Water Research*, v. 181, p. 115942, 2020. <https://doi.org/10.1016%2Fj.watres.2020.115942>
- SILVA, H. D.; ANUNCIACÃO, C. E.; SANTOS, S. F. O.; GARCIA-ZAPATA, M. T. A. Análise virológica da qualidade da água: uma revisão das metodologias de concentração e detecção viral. *Revista Brasileira de Biociências*, v. 9, n. 3, p. 405-415, 2011.
- SOULE, H.; GENOULZ, O.; GRATACAP-CAVALLIER, B.; CHEVALLIER, P.; LIU, J. X. Ultrafiltration and reverse transcription-polymerase chain reaction: an efficient process for poliovirus, rotavirus and hepatitis A virus detection in water. *Water Research*, v. 34, n. 3, p. 1063-1067, 2000. [http://doi.org/10.1016/S0043-1354\(99\)00197-9](http://doi.org/10.1016/S0043-1354(99)00197-9)
- SUN, J.; ZHU, A.; LI, H.; ZHENG, K.; ZHUANG, Z.; CHEN, Z.; SHI, Y.; ZHANG, Z.; CHEN, S.; LIU, X.; DAI, J.; LI, X.; HUANG, S.; HUANG, X.; LUO, L.; WEN, L.; ZHUO, J.; LI, Y.; WANG, Y.; ZHANG, L.; ZHANG, Y.; LI, F.; FENG, L.; CHEN, X.; ZHONG, N.; YANG, Z.; HUANG, J.; ZHAO, J.; LI, Y. Isolation of Infectious SARS-CoV-2 from Urine of a COVID-19 Patient. *Emerging Microbes & Infections*, v. 9, n. 1, p. 991-993, 2020. <https://doi.org/10.1080/22221751.2020.1760144>
- SYMONDS, E. M.; VERBYLA, M. E.; LUKASIK, J. O.; KAFLE, R. C.; BREITBART, M.; MIHELIC, J. R. A case study of enteric virus removal and insights into the associated risk of water reuse for two wastewater treatment pond systems in Bolivia. *Water Research*, v. 65, p. 257-270, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2014.07.032>
- TCHOBANOGLOUS, G.; STENSEL, H. D.; TSUCHIHASHI, R.; BURTON, F.; ABU-ORF, M.; BOWDEN, G.; PFRANG, W. *Wastewater engineering: treatment and resource recovery*, 5ª ed. New York: McGraw-Hill, 2013.
- UMEDA, L. C. *Métodos clássicos e moleculares para avaliação da qualidade virológica de lodo de esgoto e de água de reúso: determinação da eficiência e limites de detecção*. São Paulo, SP: USP, 2012. Originalmente apresentada como dissertação de mestrado, Universidade de São Paulo, 2012.
- UNITED STATES AGENCY FOR INTERNATIONAL DEVELOPMENT (USAID). *USAID launches emerging pandemic threats program*. 2009. Disponível em: <https://2012-2017.usaid.gov/news-information/press-releases/usaid-launches-emerging-pandemic-threats-program>. Acesso em: 30 set. 2021.
- UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (USEPA). National Primary Drinking Water Regulations. *Long Term 2 Enhanced Surface Water Treatment Rule*, 40 CFR, parts 9, p. 141-142, 2006.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). *Waterborne Zoonoses: Identification, Causes and Control*. London: IWA Publishing, 2004.
- WU, F.; XIAU, A.; ZHANG, J.; GU, X.; LEE, W. L.; KAUFFMAN, K.; HANAGE, W.; MATUS, M.; GHAELI, N.; ENDO, N.; DUVALLET, C.; MONIZ, K.; ERICKSON, T.; CHAI, P.; THOMPSON, J.; ALM, E. SARS-Cov-2 titers in wastewater are higher than expected from clinically confirmed cases. *MedRxiv*, 2020a. <https://doi.org/10.1101/2020.04.05.20051540>
- WU, Y.; GUO, C.; TANG, L.; HONG, Z.; ZHOU, J.; DONG, X.; YIN, H.; XIAO, Q.; TANG, Y.; QU, X.; KUANG, L.; FANG, X.; MISHRA, N.; LU, J.; SHAN, H.; JIANG, G.; HUANG, X. Prolonged presence of SARS-CoV-2 viral RNA in faecal samples. *The Lancet Gastroenterol Hepatology*, v. 5, n. 5, p. 434-435, 2020b. [https://doi.org/10.1016/s2468-1253\(20\)30083-2](https://doi.org/10.1016/s2468-1253(20)30083-2)
- XU, Y.; LI, X.; ZHU, B.; LIANG, H.; FANG, C.; GONG, Y.; GUO, Q.; SUN, X.; ZHAO, D.; SHEN, J.; ZHANG, H.; LIU, H.; XIA, H.; TANG, J.; ZHANG, K.; GONG, S. Characteristics of pediatric SARS-CoV-2 infection and potential evidence for persistent fecal viral shedding. *Nature Medicine*, v. 26, n. 4, p. 502-505, 2020. <https://doi.org/10.1038/s41591-020-0817-4>
- ZHANG, Y.; CHEN, C.; ZHU, S.; SHU, C.; WANG, D.; SONG, J.; SONG, Y.; ZHEN, W.; FENG, Z.; WU, G.; XU, J.; WENBO, X. Notes from the Field: Isolation of 2019-nCoV from a Stool Specimen of a Laboratory-Confirmed Case of the Coronavirus Disease 2019 (COVID-19). *China CDC Weekly*, v. 2, n. 8, p.123-124, 2020. <https://doi.org/10.46234/ccdcw2020.033>