



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE TECNOLOGIA E GEOCIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA CIVIL
LABORATÓRIO DE SANEAMENTO AMBIENTAL

THIAGO DE MORAIS MARTINS

**MONITORAMENTO VIRAL DE SARS-COV-2 EM ÁGUAS URBANAS E
ESGOTO SANITÁRIO COMO FERRAMENTA DE VIGILÂNCIA
EPIDEMIOLÓGICA**

Recife

2022

THIAGO DE MORAIS MARTINS

**MONITORAMENTO VIRAL DE SARS-COV-2 EM ÁGUAS URBANAS E
ESGOTO SANITÁRIO COMO FERRAMENTA DE VIGILÂNCIA
EPIDEMIOLÓGICA**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado como requisito para
obtenção do título de Bacharel em
Ciências Biológicas pela Universidade
Federal de Pernambuco.

Saneamento Ambiental.

Orientador: Prof. Dr. Fabrício Motteran

Recife
2022

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do programa de geração automática do SIB/UFPE

Martins, Thiago de Moraes.

Monitoramento viral de SARS-CoV-2 em águas urbanas e esgoto
sanitário como ferramenta de vigilância epidemiológica / Thiago de Moraes
Martins. - Recife, 2022.

47 : il., tab.

Orientador(a): Fabrício Motteran

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Federal de
Pernambuco, Centro de Biociências, , 2022.

1. Pandemia. 2. SARS-CoV-2. 3. Vigilância epidemiológica. 4.
Epidemiologia baseada em águas residuárias. 5. Engenharia sanitária. I.
Motteran, Fabrício. (Orientação). II. Título.

570 CDD (22.ed.)

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente aos meus familiares. Aos meus pais que são meus exemplos da vida, que permitiram a minha jornada pela graduação e sem os quais eu não teria as bases para caminhar e conquistar aquilo que alcancei.

Aos meus tios, que serviram de exemplo e que me apoiaram durante toda a minha vida de diversas maneiras. As minhas primas e primo que estiveram ao meu lado desde sempre, em qualquer ocasião.

Agradeço ao meu orientador pela paciência e consideração durante essa breve jornada científica. Agradeço aos meus companheiros de pesquisa que fazem parte dessa produção tanto quanto eu. Aos meus antigos orientadores cujos ensinamentos carregarei para este trabalho.

Agradeço aos meus amigos e colegas de curso que engrandeceram as minhas experiências e me ensinaram tanto quanto a academia. Agradeço a todos aqueles que instigaram minha curiosidade, que me ensinaram sobre respeito, que me fizeram sorrir e me mostraram o verdadeiro significado de aprender.

*“O maior problema deste mundo é que temos
emoções paleolíticas, instituições medievais e
tecnologia divina”*

(Edward Osborn Wilson)

RESUMO

A pandemia causada pela COVID-19 foi decretada pela Organização Mundial da Saúde em 11 março de 2020, com 590 milhões de casos confirmados até Agosto de 2022. Desde o início da pandemia, relatórios clínicos de Wuhan, na China, já detectavam a presença de sintomas gastrointestinais causados pela COVID-19, e essas pesquisas foram seguidas por estudos relatando a presença de RNA viral em fezes de pacientes contaminados. O uso do monitoramento viral em esgoto sanitário já é uma técnica utilizada para diversos patógenos, e foi escolhida pela capacidade de se poder detectar a quantidade de fragmentos virais equivalentes ao nível circulante do vírus na população com o objetivo de acompanhar a dinâmica viral na cidade do Recife durante a pandemia. Os protocolos de detecção viral foram gerados por estudos das metodologias de detecção e quantificação de vírus entéricos, testados e aplicados para vírus envelopados como o SARS-CoV-2. 468 amostras de água foram coletadas por companhias de Saneamento das ETEs Mangueira, Cabanga e Peixinhos e os Canais Urbanos da Várzea, do Ibura, Água Fria e Boa Viagem do Recife e foram transportadas para o laboratório de saneamento ambiental (LSA) da UFPE para as análises virais e físico-químicas entre Maio de 2021 e Julho de 2022. Os resultados da concentração viral foram equivalentes aos resultados de indicadores de contaminação da cidade do Recife, e quando comparados a dados de saúde do município, acompanharam o número de casos suspeitos e testados positivamente, número de leitos ocupados e número de mortes confirmadas divulgados pela Secretaria de Saúde do Recife. Ao observar os dados de saúde, notou-se que os períodos de pico de concentrações virais coincidem com períodos considerados como “ondas de contaminação”, com importante influência do fator social no aumento da contaminação, como observado após as comemorações de fim de ano em 2021 e as de Julho de 2022 e também das chegadas de novas variantes com a expressiva subida de casos em Janeiro de 2022 que, posteriormente seriam atribuídos a recente variante B1.1.529 (Ômicron). Por fim, o material coletado serviu como base para a produção de materiais epidemiológicos auxiliares (Boletim de acompanhamento epidemiológico) publicados e disponíveis na plataforma da Agência Nacional de Águas para a divulgação dos resultados e auxiliar medidas públicas de saúde.

Palavras-chave: COVID-19; Saneamento; Esgoto Sanitário; Epidemiologia Baseada em Águas Residuárias; Vírus; Pandemia.

ABSTRACT

The pandemic caused by COVID-19 was declared by the World Health Organization on March 11, 2020, with 590 million confirmed cases until August 2022. Since the beginning of the pandemic, clinical reports from Wuhan, China, already detected the presence of gastrointestinal symptoms caused by COVID-19, and these surveys were followed by studies reporting the presence of viral RNA in feces of infected patients. The use of viral monitoring by sanitary sewage was chosen for its ability to detect the amount of viral fragments equivalent to the circulating level of the pathogen in the community with the purpose of monitoring the viral dynamics in the city of Recife. The protocols were created by detection and quantification methodology studies for enteric viruses, tested and applied to enveloped viruses such as SARS-CoV-2. 468 samples were collected by sanitation companies from Várzea, Ibura, Água Fria and Boa Viagem sewage treatment plants and were transported to the Environmental Sanitation Laboratory (LSA) of UFPE for viral and physico-chemical testing between May 2021 and July 2022. The viral concentration results were equivalent to the results of contamination indicators in Recife, following the number of suspected and confirmed cases, number of occupied nursing beds and number of confirmed deaths released by public health agencies. Our health data confirms that the periods of peak viral concentrations coincide with the period called as waves of contamination, possibly influenced by social factors as seen after the new year festivities in 2021 and mid year festivities in July 2022, as well as the arrival of new variants with a significant increase in cases, as the one observed in January 2022, caused by the recent B1.1.529 variant (Omicron). Finally, the collected material served as a basis for the production of auxiliary epidemiological materials, published in the National Agency of Water platform that can help in the divulgation of data and management of the pandemic.

Key-words: COVID-19; Sanitation; Sanitary Sewage; Wastewater Based Epidemiology; Virus; Pandemic.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Estrutura do genoma do SARS-CoV-2	12
Figura 2 - Pontos de coleta das amostras ambientais em ETEs e Canais urbanos	18
Figura 3 - Correlação dos índices de Vulnerabilidade Social	19
Figura 4 - Metodologia de Processamento das Amostras	23
Figura 5 - Diluição do Plasmídeo para a Curva Padrão	26
Figura 6 - Dinâmica da Carga viral nas Estações de Tratamento de esgoto.....	28
Figura 7 - Concentração viral em Canais Pluviais	28
Figura 8 - Dados de Saúde	33
Figura 9 - Dados de Matéria Orgânica das Estações de Tratamento de Esgoto	39
Figura 10 - Dados de DQO dos Canais Pluviais	40

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Identificação e Justificativa para os pontos de coleta do trabalho	21
Tabela 2 - Reagentes e volumes utilizados no protocolo de RT-qPCR	26
Tabela 3 - Etapas da RT-qPCR	26

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
2 REFERENCIAL TEÓRICO	12
2.1 VIROLOGIA DO SARS-CoV-2	12
2.2 EPIDEMIOLOGIA BASEADA EM ÁGUAS RESIDUÁRIAS (WBE)	13
3 OBJETIVOS	17
3.1 OBJETIVO GERAL	17
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
4. METODOLOGIA	18
4.1 COLETA DAS AMOSTRAS	18
4.2 CONCENTRAÇÃO DAS AMOSTRAS AMBIENTAIS	21
4.3 EXTRAÇÃO DO RNA VIRAL DAS AMOSTRAS AMBIENTAIS	23
4.3.1 Preparo do Lisado	23
4.3.2 Ligação e Lavagem	24
4.3.3 Eluição	24
4.4 DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO VIRAL POR RT-QPCR	24
4.5 FÍSICO-QUÍMICA DAS AMOSTRAS AMBIENTAIS	26
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	27
5.1 CONCENTRAÇÃO VIRAL ENCONTRADA NO ESGOTO	29
5.2 CARGA VIRAL ENCONTRADA EM 2021	30
5.3 CARGA VIRAL ENCONTRADA EM 2022	31
5.4 COMPARAÇÃO COM DADOS DO SISTEMA DE SAÚDE	32
5.4.1 Evolução dos casos	34
5.4.2 Ocupação dos leitos	35
5.4.3 Dados da vacinação	36
5.5 COMPARAÇÃO COM CAPITAIS DO PROJETO DE MONITORAMENTO	36
5.6 ANÁLISE FÍSICO-QUÍMICA DAS AMOSTRAS	38
6. CONCLUSÃO	42
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	44

1. INTRODUÇÃO

A pandemia do vírus SARS-CoV-2 obteve mais de 590 milhões de casos confirmados mundialmente até Agosto de 2022 (*World Health Organization*, 2022), dentre esses casos o Brasil liderou por muito tempo o número de infectados, com mais de 34 milhões de casos confirmados, atrás apenas dos EUA e da Índia (WHO, 2022). No entanto, o número de casos confirmados no Brasil apresenta inconsistências em seu monitoramento. Segundo a Fundação Oswaldo Cruz (2021), a cobertura de testes no país é realizada com um fraco planejamento, demonstrado pela descentralização da compra de testes, dificultando a demonstração clara de diferenças de indicadores de positividade entre as unidades federativas. Por causa da limitação na quantidade de testes, outra limitação no monitoramento de casos por indicadores de positividade em testes, como o da Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (RT-qPCR) e o “teste rápido”, é que o número de infectados não abrange pacientes assintomáticos ou pré-sintomáticos, provados capazes de excretar o vírus e causar novas infecções, disseminando a doença de forma silenciosa (XI HE, *et al*, 2020).

Vários estudos abordaram a possibilidade de monitorar a disseminação do SARS-CoV-2 por meio da concentração em águas residuárias (Nota técnica, INCT, 2020), baseados na detecção de fragmentos virais em fezes de pacientes infectados. Estudos iniciais já haviam detectado a presença de sintomas gastrointestinais em pacientes de COVID-19 em Wuhan (China), além da presença de RNA viral em fezes de infectados (LIANG, 2020). Em estudo realizado por Zhang *et al* (2021) a detecção de material genético viral em fezes foi comum em 43% dos pacientes, com prevalência nos pacientes acometidos de sintomas gastrointestinais. A persistência da capacidade de disseminação do vírus pela via fecal também se demonstrou longa em relação à disseminação pelas vias respiratórias, com uma diferença de aproximadamente 7,1 dias em média (ZHANG, 2021).

Apesar da capacidade de infecção do coronavírus em águas residuárias ser amplamente debatida a depender das condições físicas e biológicas pela qual é submetido nos sistemas de esgoto (AMOA, 2020), a presença do vírus em fezes humanas foi o ponto de partida para a utilização de técnicas de Epidemiologia Baseada em Águas Residuárias (*Wastewater Based Epidemiology - WBE*) para o monitoramento do SARS-CoV-2 em sistemas de esgoto. O uso de técnicas de monitoramento de patógenos por águas residuárias é amplamente utilizado para a detecção de vírus entéricos (Norovírus, Enterovírus, Adenovírus, Rotavírus e Picovírus) com reconhecida capacidade de sobrevivência em águas de esgoto, e considerando as descobertas sobre uma similar capacidade dos Coronavírus de persistirem sob

estas condições, o uso de WBE foi empregado para o monitoramento de circulação viral a nível de comunidades (FARKAS, 2020).

Com este conhecimento, a Agência Nacional de Águas e Saneamento Básico (ANA) em parceria com o Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Estações Sustentáveis de Tratamento de Esgotos (INCT ETEs Sustentáveis, sediada na UFMG) desenvolveram o Projeto-piloto: *Deteção e quantificação do novo coronavírus em amostras de esgoto nas cidades de Belo Horizonte e Contagem* com o intuito de estabelecer uma rede de monitoramento nacional entre os estados participantes para acompanhar o as flutuações nos níveis de concentração viral de SARS-CoV-2 nos municípios. Os protocolos estabelecidos conjuntamente com o projeto-piloto foram utilizados para o monitoramento epidemiológico da cidade do Recife, utilizando amostras de águas de Estações de Tratamento de Efluentes e Canais Urbanos em pontos específicos da cidade.

O saneamento básico, na cidade do Recife, é considerado de forma difusa, uma vez que a cidade possui terreno plano permeado por canais urbanos (total de 99), (Prefeitura do Recife, Notícias, 2019), além de três rios com relevância ambiental (Capibaribe, Beberibe e Tejipió). Este saneamento difuso faz com que a cidade tenha diversas estações de tratamento de esgoto espalhadas na cidade (total de 21), incluindo estações maiores como as estações de Peixinhos, Cabanga e Janga e 18 estações menores com destaque para a estação Mangueira. Em Recife, a prestação dos serviços locais de água e esgotos é realizada de forma associada entre a Companhia Pernambucana de Saneamento (COMPESA) que é a prestadora regional, a Secretaria de Saneamento (SESAN), Autarquia Municipal de Saneamento (SANEAR) e apoiada pelo Fundo Municipal de Saneamento (FMSAN). Segundo Teixeira *et al* (2021), apenas 43,54% da população do Recife eram atendidas pela COMPESA, e do esgoto sanitário gerado na cidade do Recife, menos de 75% destes são direcionados à estações de tratamento de esgoto, sendo assim tratados, enquanto o restante é despejado no solo, em canais pluviais ou outros corpos de água urbanos (de forma inadequada, irregular e clandestina). Pelo fato do Recife possuir o lençol freático raso, decorrente da saturação por água marinha, o sistema de canais fluviais cobre grande parte da cidade, diferentemente de outras cidades, em que os mesmos ficam concentrados em regiões periféricas mais carentes de saneamento, com o objetivo de melhor escoar águas pluviais e diminuir os riscos de alagamento causados pelo transbordo dos rios que cortam a cidade, sendo assim utilizadas nesse trabalho como pontos de coleta.

Um fator regional que interfere nas amostras ambientais na cidade do Recife é o volume de chuvas ao longo do ano (aproximadamente 988 mm), no qual as maiores

precipitações ocorrem entre os meses de maio e agosto (Clima Recife, Climate-data, 2021), o que pode interferir diretamente nas concentrações dos poluentes orgânicos, microrganismos e vírus tanto nos corpos hídricos locais quanto no afluente das ETE. O volume de chuva alcançado nesta época do ano é um fator de interferência na concentração de carga viral encontrado em águas residuárias, diluindo o material que chega, e resultando em detecções mais baixas durante aquele período de tempo.

Assim, a utilização da epidemiologia no monitoramento das águas provenientes dos canais urbanos do Recife assim como das ETEs proporciona ampla cobertura populacional uma vez que os canais urbanos permeiam por diferentes bairros e em todos há a disposição de esgoto doméstico mesmo que de forma irregular.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Virologia do SARS-CoV-2

A Síndrome respiratória aguda grave do novo coronavírus (SARS-CoV-2) teve sua detecção em 2019, na China, sendo a terceira grande disseminação no século XXI, sendo assim considerada como pandemia, logo após o SARS-CoV-1 e a Síndrome respiratória do oriente médio (MERS-CoV), (DING; LIANG, 2020).

O SARS-CoV-2 é um vírus do gênero Betacoronavirus e do subgênero Sarbecovirus. É um vírus de fita única de RNA positivo com 29.9 kb (kilobases) de extensão. Seu genoma é constituído de *Open reading frame* (ORF) 1a/1b, S (*Spike*), 3a/3b, E (Envelope), M (Membrana), 6, 7a/7b, 8, 9b, N (Nucleocapsídeo) e 10, com sobreposição em alguns genes (Figura 1). Os genes S, E, M e N codificam proteínas estruturais, enquanto os demais genes codificam proteínas não estruturais, com funções diversas para regulação do hospedeiro, ou funções acessórias necessárias para evasão do sistema imune hospedeiro ou para replicação (LI, J.; LI, J. Z., 2022).

Figura 1: Estrutura do genoma do SARS-CoV-2. ORF 1a, ORF 1b representando o *Open reading frame*; região do gene S responsável pela proteína estrutural *Spike*; região ORF3a responsável pela codificação de fatores acessórios que contribuem para a patogenicidade e evasão do sistema imune hospedeiro (da mesma forma que as regiões 6, 7a/b, 8, 9b e 10); região E codificadora da proteína estrutural formadora do envelope protéico;

região M codificadora de proteínas estruturais da membrana; e região N contendo o gene codificador de proteínas estruturais do Nucleocapsídeo.



Fonte: SARS-CoV-2 Virology, 2022.

A proteína *Spike*, responsável pela ligação com o hospedeiro, é constituída de duas subunidades, S1 e S2. A subunidade 1 é constituída de um domínio N-terminal e um domínio de ligação ao receptor que medeia a ligação viral com a célula hospedeira, enquanto a subunidade S2 é responsável pela fusão com a membrana celular (possível em vírus envelopados), (LI, J; LI, J. Z., 2022). O vírus do SARS-CoV-2 se liga à enzima conversora de angiotensina 2 (ACE2) e à protease transmembrana, serina II (TMPRSS2) por interação com o domínio de ligação ao receptor. Isso é possível graças a proteína *Spike* que contém um sítio de clivagem especial polibásico entre as sub-regiões S1 e S2 que é reconhecido pela enzima furina, uma protease do hospedeiro, que contribui para a patogenicidade do vírus e adaptação ao hospedeiro. A enzima cliva as sub-regiões S1 e S2 expondo a membrana da célula à região S2, permitindo a fusão e posteriormente infecção pelo material genético do vírus (LI, J; LI, J. Z., 2022).

A conexão inicial entre o vírus da COVID-19 e a célula hospedeira se dá pela interação da proteína *Spike* com o receptor específico. A ligação é acompanhada da clivagem da proteína S que expõe a região de fusão do envelope protéico com a membrana celular hospedeira. Além do trato respiratório, o trato digestivo também possui alta expressão para ACE2 e TMPRSS2. Isso pôde ser observado por análise transcriptômica e pela prevalência de 43% (95% Índice de confiabilidade) de positividade na detecção de SARS-CoV-2 em fezes de pacientes infectados, com prevalência para o que apresentavam sintomas gastrointestinais como diarreia, dor abdominal, náusea ou vômito (ZHANG, 2021).

2.2 Epidemiologia baseada em águas residuárias (WBE)

O uso de águas residuárias para a detecção de vírus é conhecido desde a década de 40, primeiramente utilizado para detectar o vírus da Poliomielite (Picornaviridae), nos EUA. Na época, Paul e Trask, (1941), utilizaram pequenas frações diluídas de resíduos de pacientes de Poliomielite contendo o vírus em experimentos de infecção em macacos-rhesus (*Macaca*

mullata). O estudo já reconhecia a capacidade de detecção desse Enterovírus em esgoto sanitário, assim como sua capacidade de manter sua infectividade por algum período de tempo nesse meio.

Em 1981, Sellwood, Dadswell & Slade isolaram diferentes grupos de vírus e incubaram em culturas celulares diferentes a partir de amostras de esgoto sanitário na Universidade de Cambridge no Reino Unido. Durante três anos de experimentos, os estudos identificaram diferentes linhagens de Enterovírus, Adenovírus e Reovírus, grupos anteriormente identificados em outros Países como os EUA, Suíça e Israel. Com um grande interesse nas novas tecnologias de reciclagem de águas residuárias, o estudo propôs uma metodologia baseada em um “Swab” de amostras de esgoto, purificação e inóculo em cinco tipos celulares, entre células humanas e de macacos-rhesus, para identificação viral. A pesquisa de Sellwood et. al. (1981) identificou variações na quantidade de vírus isolados em períodos de verão e outono, demonstrando a dinâmica previsível de alguns desses vírus, confirmados a partir de casos clínicos confirmados da região de coleta.

Em 2001, Hovi et. al. utilizou-se de novos estudos de isolamento viral de águas residuárias para desenvolver o conceito de vigilância ambiental baseado na observação da dinâmica do vírus a partir da introdução de uma quantidade conhecida do mesmo em um sistema de esgoto para assim avaliar a validação e sensibilidade de duas metodologias escolhidas. Esse estudo utilizou um método padrão do laboratório baseado na separação de duas fases da amostra de esgoto. A primeira fase se baseia na centrifugação da amostra e concentração utilizando dextran-polietileno glicol (PEG) e a segunda utilizando funil de separação. O segundo método se baseia em alta centrifugação, mistura do sobrenadante gelado com dextran-polietileno glicol e incubação pernoite (*overnight*). O precipitado formado é coletado por centrifugação e misturado com tampão. Em ambos os métodos o vírus é inoculado em células embrionárias murinas humanas expressando receptor para o poliovírus. Os resultados demonstraram alta taxa de recuperação, verificando a efetividade e sensibilidade de ambos os métodos para vigilância epidemiológica do vírus a partir da testagem.

O uso da técnica de RT-qPCR para detecção e quantificação de vírus entéricos foi testado por Symonds et. al. (2014), em estudo que possuía como foco avaliar as técnicas de remoção viral em lagoas de estabilização das estações de tratamento de águas residuárias, cuja água dos efluentes tratados eram muitas vezes reutilizada para outros fins, como irrigação de lavouras, sendo então a remoção de patógenos uma prioridade de estudos. A pesquisa buscou

testar o uso da reação em cadeia da polimerase em tempo real para enterovírus não-cultiváveis como norovírus genótipo I, rotavírus humano do grupo A e o Vírus do mosqueado suave do pimentão.

Analisando as concentrações encontradas nas lagoas de estabilização, o estudo foi capaz de contestar antigos trabalhos, observando que a sedimentação de grandes partículas de resíduos não apresentou grande eficiência no processo de remoção dos vírus que poderiam estar protegidos. Isso foi melhor suportado pela testagem de dois métodos de filtragem, em que foram usadas duas membranas de 45 µm e de 180 µm, e que mais partículas virais foram detectadas nas membranas de menor poro, demonstrando provável prevalência do vírus em partículas menores de resíduos (SYMONDS *et al.*, 2014).

Apesar do uso da PCR para concentração viral já ser uma metodologia explorada, seus resultados dependem principalmente da eficiência de recuperação viral das amostras coletadas. Visando essa parte do procedimento, Ahmed *et al.* (2015) propôs o estudo comparativo entre três metodologias de concentração de amostras de esgoto para dois vírus, Adenovírus humano e Poliomavírus de amostras de 1L de água encanada e de águas pluviais. As metodologias testadas foram a metodologia de extração de ácido nucleico direta (A), a metodologia de adsorção/eluição (B) e a metodologia de adsorção/eluição modificada (C) (AHMED *et al.* 2015).

A metodologia “A” consiste de acidificação da amostra coletada até o valor de pH abaixo de 3,5 e filtrada em membrana de mistura de ésteres (HA) com o tamanho de poro de 0,45 µm negativamente carregada por meio de acidificação. A acidificação amostra tem a função de alcançar o ponto isoelétrico do vírus, permitindo que ele fique positivamente carregado e possa se ligar à membrana HA carregada negativamente. As amostras filtradas são encaminhadas para a extração de ácido nucleico pelo kit comercial PowerMax soil DNA isolation kit (MO BIO Laboratories inc.) e por fim eluídos em solução C6 do próprio kit.

A metodologia “B”, por sua vez, consiste na adição de $MgCl_2$ na amostra coletada até a concentração final de 2,5 mM e filtragem por membrana tipo HA com o tamanho de poro de 0,45 µm. As membranas são banhadas com 200 mL de H_2SO_4 0,5 mM para remoção de cátions, e a membrana contendo o material viral é eluída com 10 mL de NaOH 1 mM, agitadas mecanicamente para remoção das partículas virais da membrana e recuperada em 50µL de H_2SO_4 (100 mM) e 100µL de tampão Tris-EDTA 100x para neutralização. O material é então passado por um filtro de ultracentrífuga e segue para a extração de ácido nucleico pelo kit comercial DNeasy blood and tissue (Qiagen®), (AHMED *et al.* 2015).

A metodologia “C”, modificada da adsorção/eluição utiliza a membrana com o material filtrado com adição de 2,5 mM de MgCl_2 mais 200 mL de H_2SO_4 (0,5 mM) e a submete a agitação mecânica em tubo contendo 10 mL de NaOH a 1 mM à temperatura ambiente por cinco minutos para a liberação do vírus da membrana (AHMED *et al.* 2015).

O estudo também verificou informações acerca do nível de inibição para resultados de PCR determinados por cada método a partir de comparação dos valores de *Threshold cycle* (Ct) entre o controle positivo (amostras contendo valores conhecidos DNA de *Oncorhynchus keta* em água livre de DNA/RNA) e as amostras de água encanada e de esgoto enriquecidas com a mesma quantidade de DNA.

Os resultados do estudo de Ahmed *et al.* (2015), demonstraram que o método A (extração direta) obteve melhores valores de concentração do vírus tanto em água encanada quanto de esgoto em dez vezes. Além disso, o método não apresentou presença de inibidores de PCR, diferentemente dos outros dois métodos de adsorção/eluição.

Em 2020, com o início da pandemia do SARS-CoV 2, Ahmed *et al.* (2020) experimentou com sete técnicas de concentração viral para COVID-19, pretendendo testar os resultados das metodologias para vírus envelopados, cujo quais ainda não haviam sido testados. Para testar de forma segura as eficiências de recuperação, foi utilizado o vírus da hepatite Murina (MHV), Betacoronavírus do mesmo gênero do SARS-CoV-2. As metodologias escolhidas por Ahmed *et al.* (2020) podem ser separadas entre métodos derivados de adsorção/eluição (A, B e C), métodos de ultracentrifugação (D, E e G) e método de precipitação por polietilenoglicol (F). Os métodos de adsorção/eluição, comumente utilizados para vírus entéricos em águas residuárias, por vezes dependem de acidificação por HCl ($\text{pH} < 4$), como no caso do método A, ou adição de MgCl_2 a 25mM, como no método C, porém, todos devem ser filtrados por membranas eletronegativas de poros de tamanho 0,45 μm e seguir para a etapa de extração. Os métodos de ultracentrifugação se baseiam em múltiplos passos de centrifugação, iniciado com o uso do equipamento para separar o material particulado de maior granulação e utilizar o sobrenadante em diluição em água livre de DNA/RNA para extração de ácido nucleico. O método de precipitação por polietilenoglicol (PEG), comumente utilizada para concentrar vírus a partir de matrizes de água utiliza de centrifugação prévia para separar o particulado maior, e o *pellet* resultante ser ressuspensão em extrato de carne e glicina (1:5), incubado sob agitação de 120 rpm por trinta minutos. O *pellet* é então centrifugado novamente e neutralizado com HCl. PEG foi adicionado com NaCl, incubado novamente por duas horas e centrifugado. O novo *pellet* foi ressuspensão em trizol e seguiu para o processamento em *bead-beater*.

Os resultados de Ahmed et al. (2020) demonstraram que o método que obteve as melhores recuperações e concentrações do vírus murino foi o método de adsorção/extração enriquecido com $MgCl_2$ (método C) com 65,7% de eficiência, seguidos pelos outros dois métodos de adsorção/extração (B e A, respectivamente). A adição de $MgCl_2$ como pré-tratamento provavelmente aumentou a adsorção viral à membrana pela ionização do vírus que permitiu a ligação tipo ponte salina, descrita em estudos anteriores. Além disso, o método C apresentou a menor concentração de moléculas inibidoras para Reação de Cadeia da Polimerase (PCR). Os métodos de adsorção/extração também não utilizam centrifugação prévia, permitindo a extração do material viral das partes líquida e sólida da amostra. As metodologias apresentadas foram testadas para volumes de 50 mL de amostra, e é ressaltado que, apesar de haverem estudos utilizando volumes para até 200 mL para os métodos, um aumento do volume de amostra poderia apresentar variação nos resultados devido à co-concentração de inibidores de PCR, a depender da metodologia de extração utilizada.

Para o monitoramento da pandemia de SARS-CoV-2 nas capitais brasileiras, o desenvolvimento do Projeto piloto: Detecção e quantificação do novo coronavírus em amostras de esgoto na cidade de Belo Horizonte e Contagem, no qual a cidade do Recife faz parte, utilizou de estudos anteriores para definir uma metodologia padrão para as capitais participantes do projeto. A metodologia foi descrita na Nota técnica de 2020, disponível na plataforma da Agência Nacional de Águas para o projeto de Monitoramento Covid Esgotos, e se baseou nas técnicas de adsorção-extração com adição de $MgCl_2$ com extração direta, seguido por detecção e quantificação por RT-qPCR. O baixo custo, tempo de execução, eficiência e simplicidade são fatores favoráveis para o processamento de um número grande de amostras.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Monitorar a concentração viral do SARS-CoV-2 em águas urbanas de esgotos sanitários da cidade do Recife (PE) a partir de quantificação de RT-qPCR em regiões de maior cobertura e vulnerabilidade social como ferramenta epidemiológica.

2.2 Objetivos específicos

- Utilizar técnicas de Biologia Molecular de RT-qPCR para quantificar concentrações virais em amostras de águas urbanas.
- Correlacionar as concentrações virais identificadas com outros parâmetros indicadores de poluição, como matéria orgânica (Demanda Bioquímica de Oxigênio - DQO) e coliformes totais e termotolerantes obtidos pelo Laboratório de Saneamento Ambiental (UFPE).
- Correlacionar os dados epidemiológicos oficiais (casos confirmados, óbitos, índices de vulnerabilidade) com as concentrações virais obtidas, a fim de comparar as tendências.
- Elaborar mapas informativos contendo as informações virais encontradas em cada ponto de coleta como forma de material auxiliar para a divulgação pública da dinâmica viral e elaboração de políticas públicas sanitárias.

3. METODOLOGIA

3.1 Coleta das amostras

Durante a definição dos pontos de coleta foram reunidas informações de relatórios de órgãos de vigilância municipal e/ou estadual quanto a incidência de casos confirmados da COVID-19 além de relatórios das companhias de saneamento quanto ao funcionamento, definição das redes de coleta, localização das estações de tratamento e dos poços de visita do município. Foram determinadas três estações de tratamento, as do ETE-Cabanga, ETE-Mangueira e ETE-Peixinhos pelos valores dos indicadores de vazão média de água, Contribuição *per capita* no esgoto e índice de vulnerabilidade social.

Figura 2 - Pontos de coleta das amostras ambientais em ETEs e Canais urbanos



A

B

Recife/ Pernambuco	
Identificação do Ponto	Descrição
PE-CPL-01	Canal de água pluvial com lançamento de esgoto
PE-CPL-02	Canal de água pluvial com lançamento de esgoto
PE-CPL-03	Canal de água pluvial com lançamento de esgoto
PE-CPL-04	Canal de água pluvial com lançamento de esgoto
PE-ETE-01	Estação de Tratamento de Esgotos Peixinhos
PE-ETE-02	Estação de Tratamento de Esgotos Mangueiras
PE-ETE-03	Estação de Tratamento de Esgotos Cabanga
PE-CPL-06	Canal de água pluvial com lançamento de esgoto
PE-CPL-07	Canal de água pluvial com lançamento de esgoto
PE-CPL-05	Canal de água pluvial com lançamento de esgoto

Fonte: Projeto-piloto: Detecção e quantificação do novo coronavírus em amostras de esgoto nas cidades de Belo Horizonte e Contagem, Boletim epidemiológico nº 6. 1A. Identificação espacial dos pontos de coleta. 1B. Identificação nominal dos pontos de coleta.

O Índice de Vulnerabilidade Social considerado na escolha dos pontos de coleta foi baseada em estudo estatístico (realizado em projeto parceiro ao desenvolvido pelo grupo de pesquisa do LSA-UFPE) que levou em consideração a metodologia aplicada para o cálculo do Índice de Desenvolvimento Humano (IDH) do Programa das Nações Unidas para o Desenvolvimento (PNUD). Por meio dessa metodologia, foi possível aplicar o cálculo similar para o índice de vulnerabilidade (Equação 1).

$$IV_i = \frac{(i_{bruto} - i_{mín})}{(i_{máx} - i_{mín})} \text{ (Equação 1)}$$

Onde:

IV: índice de vulnerabilidade

i: indicador considerado

min(i): valor mínimo para a distribuição do indicador

max (i): valor máximo para a distribuição do indicador

bruto (i): Valor médio encontrado entre os indicadores

Figura 3 - Correlação dos Índices de vulnerabilidade social



Fonte: Boletim de acompanhamento - Panorama do monitoramento de SARS-CoV-2 no esgoto da cidade de Recife (Agência Nacional de Águas).

Para o cálculo do índice de vulnerabilidade social foram considerados os parâmetros de percentual de coleta de esgoto, renda *per capita*, densidade demográfica, casos confirmados de COVID-19 e casos de óbitos confirmados para COVID-19. Estes dados foram obtidos durante a primeira onda de casos em Recife entre Fevereiro e Julho de 2020. Por análise de correlação (Figura 3.) foram observados que os parâmetros de casos/óbitos

alinhavam com os índices de vulnerabilidade obtidos para renda *per capita*, cobertura de esgoto e densidade demográfica.

O esgoto sanitário da cidade do Recife, no entanto, atende pouco mais de 43% da população (TEIXEIRA, 2021), fazendo-se necessário escolher pontos auxiliares em canais pluviais, visto que pela falta de cobertura dos sistemas de esgoto o despejo indevido em canais pluviais tornou-se uma opção amplamente utilizada pelos cidadãos e a quantidade de canais pluviais existentes colabora com a cobertura do município. Neste cenário, quatro pontos de coleta em canais urbanos pluviais adicionais foram escolhidos seguindo os parâmetros decididos anteriormente (Tabela 1.)

Identificação do ponto	Descrição	População contribuinte (Nº de habitantes)	Justificativa para a escolha do ponto de monitoramento
PE-CPL-01	Canal de água pluvial com lançamento de esgoto. R. Felício dos Santos, Várzea.	11.123	Canal pluvial com lançamento de esgoto doméstico de população não saneada. Região com índice de vulnerabilidade médio em saneamento e alto em saúde, além de ter apresentado concentrações virais significativas para o monitoramento em 2020.
PE-CPL-02	Canal de água pluvial com lançamento de esgoto. Av. Mal. Juarez Távora, Boa Viagem.	53.173	Canal pluvial com lançamento de esgoto doméstico de população não saneada. Ponto localizado no bairro com o maior número de casos registrados de Covid 19, dentro da região de estudo.
PE-CPL-03	Canal de água pluvial com lançamento de esgoto. R. Santa Leopoldina, Ibura.	26.761	Canal pluvial com lançamento de esgoto doméstico de população não saneada. Região com índice de vulnerabilidade alto em saúde e saneamento, além de ter apresentado concentrações virais significativas para o monitoramento em 2020.
PE-CPL-04	Canal de água pluvial com lançamento de esgoto. R. Córrego do Deodato - Água Fria.	7.626	Canal pluvial com lançamento de esgoto doméstico de população não saneada. Região com índice de vulnerabilidade médio em saúde (casos confirmados e óbitos), além de ter apresentado concentrações virais significativas para o monitoramento em 2020.
PE-ETE-01	Estação de Tratamento de Esgotos Peixinhos	286.000	Ponto correspondente a uma ampla área de esgotamento.
PE-ETE-02	Estação de Tratamento de Esgotos Mangueira	22.000	Ponto correspondente a uma ampla área de esgotamento.
PE-ETE-03	Estação de Tratamento de Esgotos Cabanga	336.000	Ponto correspondente a uma ampla área de esgotamento.
PE-AER-01	Aeroporto Internacional do Recife/Guararapes	Variável	Local com elevada circulação de pessoas, cujos frequentadores representam uma área de abrangência, estadual, nacional e internacional.

Tabela 1 - Identificação e justificativa para os pontos de coleta do projeto. Fonte: Boletim de acompanhamento - Panorama do monitoramento de SARS-CoV-2 no esgoto da cidade do Recife

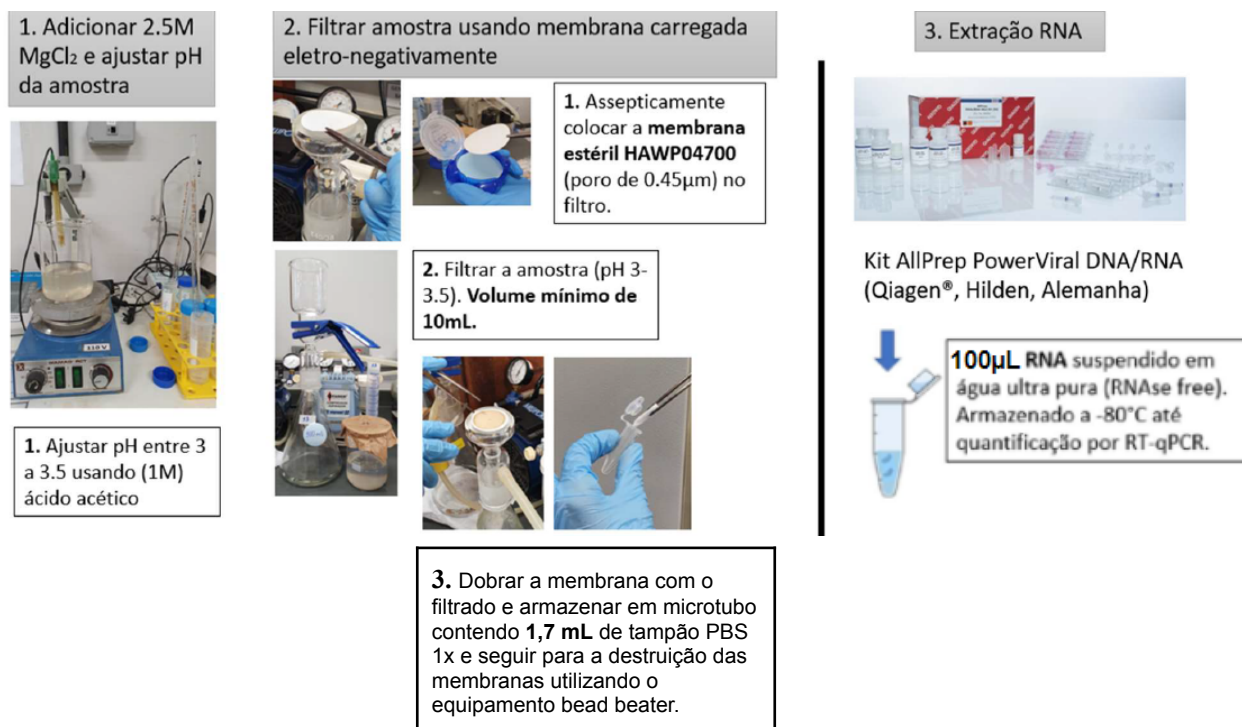
A coleta das amostras de ETE e canais foi realizada pelas empresas COMPESA e BRK Ambiental respectivamente com o auxílio de um amostrador automático. Essas amostras foram então armazenadas em garrafas de propileno estéreis cujo volume era de 250 mL e transportadas a 4°C por meio de caixas térmicas.

3.2 Concentração das amostras ambientais

As amostras passaram pelo processo de concentração do material viral a partir do método modificado de filtração por membranas negativamente carregadas (SYMONDS *et al*, 2014; AHMED *et al.*, 2015; AHMED *et al.*, 2020a) utilizadas para concentração de vírus entéricos em esgoto. Esse método foi escolhido por ser rápido, de baixo custo e com alta eficiência de recuperação de RNA viral para uso de rotina (AHMED *et al.*, 2015). O método consiste na adição de 2,5 M de Cloreto de Magnésio ($MgCl_2$) em cada amostra (250 mL), seguido de acidificação utilizando ácido acético 10 M (CH_3COOH) até o valor entre 3,5 – 3,0 de pH (AHMED *et al*, 2020a).

Foram utilizadas membranas eletronegativas, HAWP04700 de éster de celulose, com poros de 0,45 μm , diâmetro de 47 mm (Millipore) embebidas em ácido acético (CH_3COOH) 10 M. A membrana contendo o material concentrado após a filtração foi armazenada em tubo *ependorf* de fundo redondo e foi adicionado o volume de 1,7 mL de tampão fosfato-salino (PBS) e 0,3 g de *glass beads* para a rompimento da membrana em *bead-beater*. Após a desintegração da membrana para a liberação do material filtrado contendo o material viral no microtubo, o mesmo foi centrifugado à 7000 rpm por 10 minutos, a temperatura ambiente para a deposição do material particulado. O sobrenadante contendo o material viral foi então transferido para microtubos de armazenamento por pipetagem para armazenamento do material à -20°C e seguiu para a extração do material genético.

Figura 4 - Metodologia de processamento das amostras



Fonte: Nota técnica, 2020 (INCT ETEs sustentáveis).

3.3 Extração do RNA viral das amostras ambientais

O processo de extração foi realizado segundo o kit de preparo comercial Allprep PowerViral DNA/RNA do fabricante Quiagen®. Primeiramente foi preparado o Mix do Carreador de RNA para melhorar a ligação e recuperação do RNA viral. Uma solução de estoque foi preparada, segundo o protocolo do fabricante, adicionando água RNA *Free* na proporção de 1 mL/1µg. Calcular o volume do *Lysis Buffer*/RNA Carreador necessário para processar o número desejado de amostras simultaneamente, por meio da Equação 2.

$$\frac{N \times 0,21 \text{ mL (volume de Lysis Buffer)}}{\text{Carrier RNA (stock)}} = A \text{ mL} \quad (\text{Equação 2})$$

$$A \text{ mL} \times 28 \text{ µL/mL} = B \text{ µL}$$

N = número de amostras;

A = volume calculado de Lysis Buffer (L22);

B = volume calculado de 1 µg/1 µL da solução Carrier RNA Stock para adicionar no Lysis Buffer (L22).

3.3.1 Preparo do Lisado

Foi adicionado o volume da solução estoque de *Carrier RNA* (B) para o volume do *Lysis buffer* (A) em um tubo estéril e misturado gentilmente com o auxílio de uma pipeta. Para cada microtubo de 200 μL amostra foram adicionados 25 μL de Proteinase K e 200 μL de *Lysis Buffer* misturados utilizando agitação mecânica por 15 segundos. As amostras são, então, postas em banho maria por 15 minutos a 56°C. Os microtubos são então brevemente centrifugados para remover as possíveis gotas nas bordas superiores.

3.3.2 Ligação e Lavagem

Foi adicionado o volume de etanol 96-100% para se obter a concentração final de etanol de 37%, misturado utilizando agitação mecânica. Após 5 minutos à temperatura ambiente, o lisado foi centrifugado para remover as gotas nas superfícies. A solução foi transferida ($\sim 675 \mu\text{L}$) para o tubo *Viral Spin Column* e centrifugada a 6800 g por 1 minuto. O tubo de coleta (inferior) com o líquido foi então descartado. O tubo *Spin Column* foi colocado em um tubo de coleta estéril e então foi adicionado tampão de lavagem (*Wash Buffer*) no volume de 500 μL para nova centrifugação. Mais uma vez o tubo de coleta contendo o líquido foi descartado e substituído por um novo. Mais uma vez foi adicionado o tampão de lavagem (500 μL) para uma nova centrifugação a 6800 g por 1 minuto. O tubo de coleta foi novamente descartado e substituído a nova centrifugação a 10000 g a fim de secar a membrana.

3.3.3 Eluição

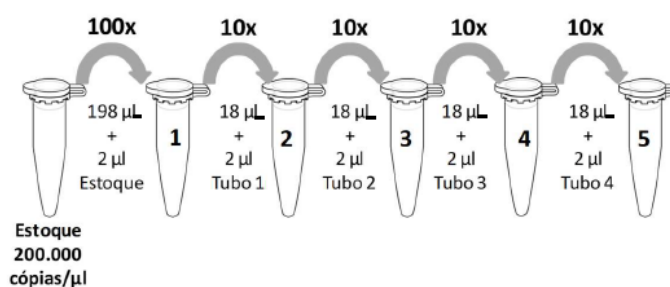
O processo inicia com a substituição do tubo de coleta do *Spin column* por um *Recovery tube* do *Kit*, adicionando 50 μL de água RNase free para o centro da membrana e incubando por 1 minuto a temperatura ambiente. O tubo foi então centrifugado por 1 minuto a 1000 g. O *Spin column* foi descartado e o tubo de coleta contendo a solução com os ácidos nucleicos virais está purificado. Posteriormente o conteúdo foi levado para quantificação da concentração do material genético extraído e mensurado a qualidade dos ácidos nucleicos em espectrofotômetro (Nanodrop - 2000, Thermo-Fisher Scientific®).

3.4 Detecção e Quantificação viral por RT-qPCR

A quantificação do material viral foi realizada segundo o protocolo do *Center for Disease Control and Prevention* (CDC) de 2019. Foi utilizada a técnica da Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real com Transcrição Reversa (RT-qPCR) para a detecção e quantificação do SARS-CoV-2, reconhecida pela OMS como a técnica mais indicada para detecção do novo coronavírus. A técnica consiste na transcrição do RNA purificado das amostras de esgoto para cDNA com posterior amplificação do mesmo. Os primers e as sondas foram escolhidos a partir de regiões do gene N (N1 e N2) do nucleocapsídeo viral. As reações foram realizadas em duplicata, tanto para os controles negativos, quanto para as regiões N1 e N2, utilizando o *Kit* comercial GoTaq Probe 1-Step RT-qPCR (PROMEGA®) e os *primers* e as sondas desenvolvidas pela *Integrated DNA Technologies* (IDT). O controle de qualidade das curvas de monitoramento foi realizado preparando a cada dois meses uma curva padrão (controles positivos) utilizando plasmídeo (2019-nCoV_N, para os genes N1 e N2) de concentração conhecida (200.000 cópias/ μ L) que foi gradualmente diluído em cinco concentrações, variando de 10^5 até 5 cópias/ μ L, com volume final de cada reação igual a 20 μ L (Figura 5).

Uma vez montadas as placas de RT-qPCR foram submetidas ao termociclador do modelo QuantStudio 3 (Thermo Fisher®) utilizando as configurações de ciclos apresentadas conforme as tabelas abaixo (Tabelas 2 e 3).

Figura 5. Diluição do plasmídeo para curva padrão.



Fonte: Nota técnica, 2020 (INCT ETes sustentáveis)

Tabela 2. Reagente e volumes utilizados na RT-qPCR.

Reagente	Volume (μ L por reação)
Água livre de RNAses	3,0
Primers e sondas	1,5
Transcriptase reversa	0,5

Master mix One Step Kit	10,0
Amostra/controles	5,0
Total	20

Fonte: Autor

Tabela 3. Etapas da RT-qPCR.

Etapas	Temperatura	Tempo
Incubação para transcrição reversa (RT)	45 °C	15 min
Ativação da enzima	95 °C	2 min
Amplificação em duas etapas (x45)	95 °C	3 s
	55 °C	30 s

Fonte: Autor

Para a reação foi distribuído 15 µL da mistura dos reagentes contendo os *primers* e a transcriptase Taqman em cada poço da microplaca de 96 poços. O controle negativo foi preparado utilizando 5 µL de água livre de nucleases em cada reação. Primeiramente, em bancada separada, distribuir 5 µL das amostras/controles em cada poço contendo a reação. Cada laboratório deve padronizar a distribuição das amostras e controles na microplaca.

Após a montagem da placa, a mesma foi vedada com selante óptico (MicroAmp Optical adhesive Film PCR) apresentado no *Kit*, e centrifugada brevemente para remover possíveis bolhas. Para a configuração da reação de RT-qPCR no termociclador são utilizadas as seguintes temperaturas, representadas na tabela acima (Tabela 3).

O resultado da quantidade de cópias de RNA (cDNA) obtidas por reação foi alcançado utilizando a equação da reta obtida a partir da curva padrão. Os resultados foram obtidos nas unidades de números de cópias por mL de amostra segundo a equação:

$$f = \frac{\frac{E}{r}}{V} \quad \text{Equação (1)}$$

Onde:

V = Volume filtrado (250mL);

E = Volume de eluição após a extração (50µL);

r = Volume de amostra usado na reação da RT-qPCR (5µL);

f = Fator de diluição.

A exportação da planilha Excel gerada no *software* do equipamento, *QuantStudio Design Analysis Software*, contém os resultados com os valores por reação, sendo necessário apenas padronizar o fator de conversão para as amostras.

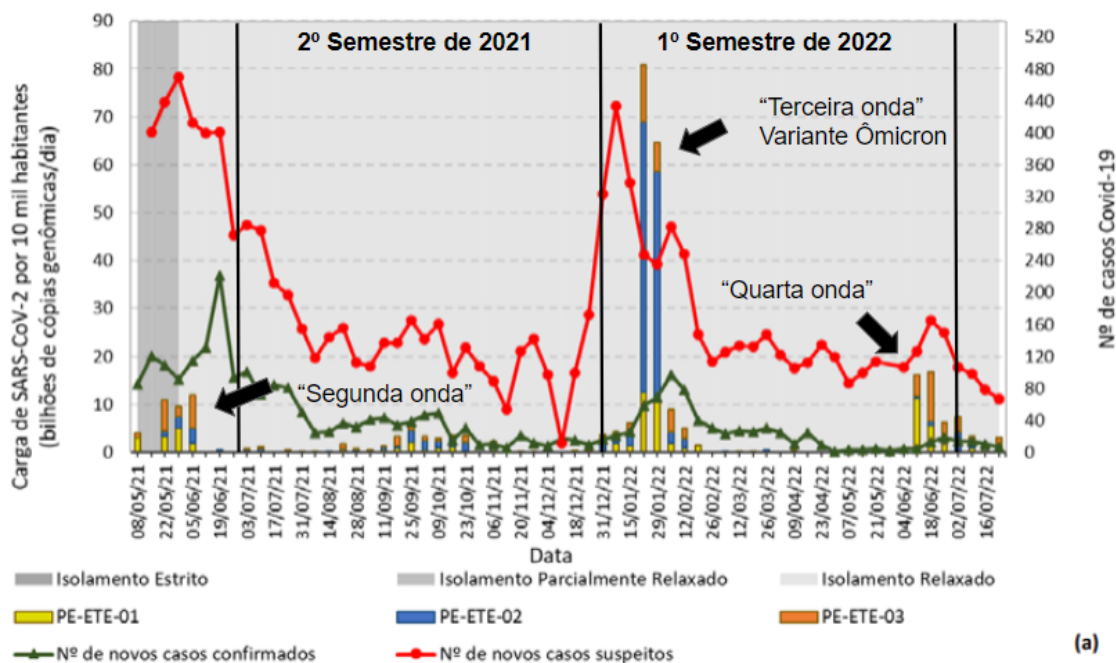
3.5 Físico-Química das amostras ambientais

Foram determinadas as concentrações de matéria orgânica com base na demanda química de oxigênio (DQO - SM 5220 D) e Amônia ($\text{NH}_4^+\text{-N}$ - SM 4500 N-NH₃ C), seguindo as recomendações do *Standard Methods* (APHA, 2012). Esses parâmetros são indicativos de variações de caracterização do esgoto durante todo o monitoramento decorrentes de intercorrências no sistema e diluições no período chuvoso. Adicionalmente também foram avaliados os indicadores patogênicos coliformes totais e *Escherichia coli*. A concentração de coliformes totais e *E. coli* foi determinada pela metodologia Colilert-18/Quanti-Tray® (IDEXX) (ISO 9308-2:2012), seguindo o protocolo do fabricante.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste estudo, foram coletadas e processadas 468 amostras, considerando os pontos de coleta das ETE-Cabanga, ETE-Mangueira e ETE-Peixinhos, assim como os canais fluviais da Várzea, Boa viagem, Ibura e Água Fria. Das amostras processadas, 148 (31,62%) não apresentaram concentração detectável para as regiões N1 e N2 do SARS-CoV-2. Na Figura 6 é possível observar a variação da carga viral nas ETEs em número de cópias por 10 mil habitantes.

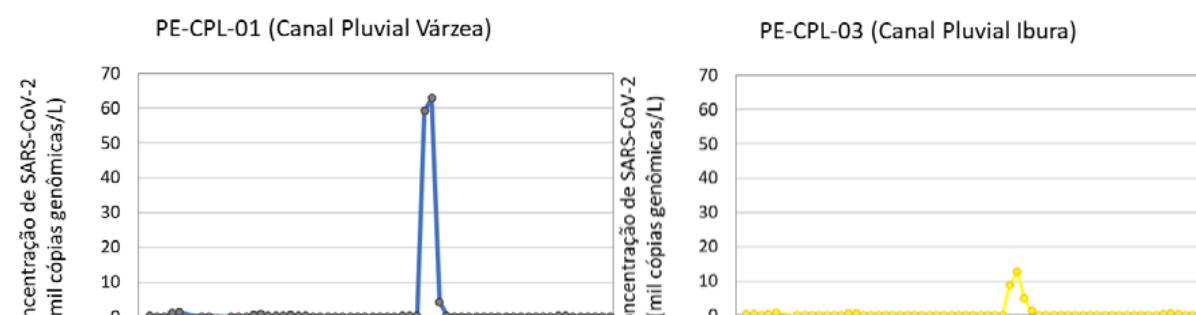
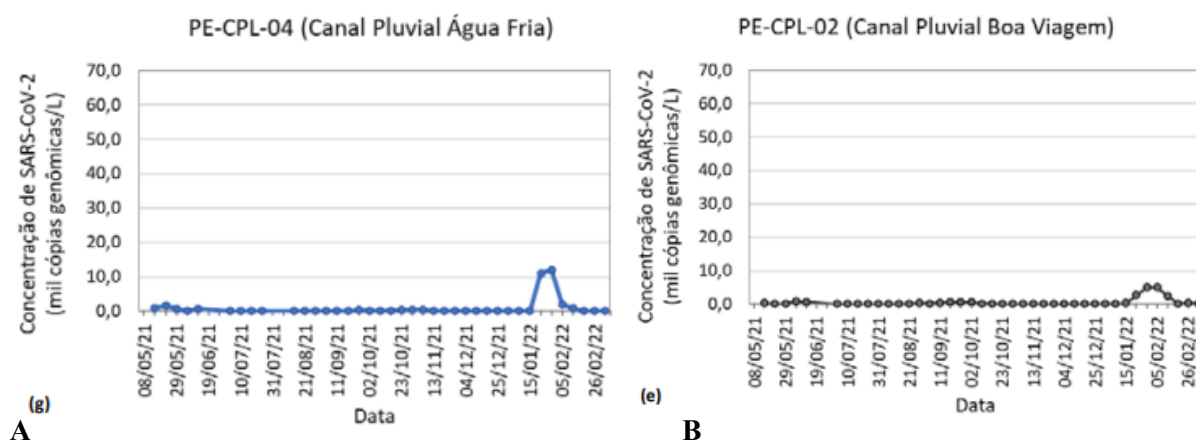
Figura 6 - Dinâmica da carga viral nas Estações de Tratamento de esgoto



Fonte: Nota de alerta Nº 17 modificado, 2022, Agência Nacional de Águas e Saneamento Básico. “Ondas” de COVID-19 se referem aos picos no número de casos de pacientes infectados confirmados.

Os dados obtidos no monitoramento das ETE são acompanhados pelos valores de vazão registrados no dia da coleta, permitindo que os resultados possam ser interpretados em termos de carga viral (Figura 6.)

Figura 7 - Concentração viral em Canais Pluviais



C

D

Fonte: A e B - Evolução temporal da concentração viral nas águas de Água Fria e Boa viagem: Nota de alerta Nº 12, 2022, Agência Nacional de Águas e Saneamento Básico. Fonte: C e D - Evolução temporal da concentração viral nas águas dos Canais da Várzea e do Ibura.: Nota de alerta Nº 17, 2022, Agência Nacional de Águas e Saneamento Básico.

4.1 Concentração viral encontrada em esgoto

Diferentemente dos resultados apresentados para as ETE, existe uma limitação para apresentação dos resultados obtidos nos pontos de canais urbanos em termos de carga viral. Essa limitação foi decorrente de uma série de interferências para o cálculo preciso da vazão de contribuição, como por exemplo, a interferência direta das chuvas na diluição do esgoto, o número de habitantes que lançam esgotos na bacia de contribuição de cada respectivo ponto de coleta, entre outras incertezas que necessitam de modelagem mais detalhada. Diante disso, os resultados podem ser visualizados em termos de concentração viral conforme ilustrado na Figuras 7 (a, b, c e d).

Pela margem gráfica utilizada, necessária para cobrir o aumento excepcional da concentração viral observada nas primeiras semanas epidemiológicas de Janeiro de 2022, os valores nos outros meses observados acabaram baixos em sua maioria, para fins de comparação. Devido a renovação do projeto e diferença na destinação dos recursos financeiros a partir de Março de 2022, os dados de concentração referentes aos Canais de Água Fria e Boa Viagem foram descontinuados no projeto a partir do mesmo período.

4.2 Carga viral encontrada em 2021

Para os resultados obtidos em 2021, foi possível perceber que os maiores picos de carga viral identificados em todos os canais ocorreram entre os períodos de 15 de Maio a 12 de Junho, período respectivo às semanas epidemiológicas de 19 à 23. Ao observar a Figura 6 nota-se que esse período coincide com o período final da “Segunda onda de contaminação”,

que se estendeu até a semana epidemiológica 21 (23 até 29 de Maio), quando a partir desse ponto o número de casos começa a decrescer até o mês de Janeiro de 2022, quando a carga viral volta a subir.

A baixa carga observada no período inicial deste projeto, a partir do mês de agosto, pode ser atribuída à maior vazão de água derivada do final do período das chuvas, com uma breve subida nos meses de Setembro a Outubro em razão da estiagem, enquanto que a vacinação avançava progressivamente. Entre Setembro e Dezembro houve o aumento da porcentagem de vacinação da população, com a primeira dose avançando de 67,86% para 82,27%, enquanto a segunda dose avançou de aproximadamente 37,21% para 78,78%, representado, provavelmente, pela baixa carga viral encontrada nos meses de Novembro e Dezembro (Figura 8c).

Segundo Bueno et al. (2022), os dados de concentração viral nas regiões do ABC Paulista (São Paulo) e Foz do Iguaçu (Paraná) apresentaram um pico, em Junho, entre as semanas epidemiológicas 24 e 26, ou aproximadamente uma semana após um pico de carga em canais encontrada em Recife (semana epidemiológica 23), representando uma clara diferença regional nas extensões das “ondas de contaminação”. Em Goiânia (Goiás) e no Distrito Federal, no Centro-Oeste brasileiro, ocorreram picos de concentração na semana epidemiológica 30 (25 a 31 de Julho), enquanto no Recife, um breve aumento ocorreu apenas em 25 de Setembro. Após ambos os picos, foi relatado que em Setembro de 2021 na região do ABC Paulista, e em Outubro em Goiânia e Novembro em Foz do Iguaçu e no Distrito Federal, os casos de casos confirmados e hospitalizações caem para um número de 10 novos casos para cada 100,000 habitantes, sendo também relacionada pelo estudo ao avanço da imunização.

O estudo também associou os casos de diminuição dos casos confirmados e aumento da carga viral encontrada em esgoto sanitário com o aumento da taxa de vacinação, “Reduzir a severidade da doença tende a aumentar a subnotificação, tornando difícil determinar a eficiências das estratégias de vacinação”, (BUENO et al., 2022, tradução nossa). Durante as últimas semanas do estudo, a variante ômicron foi responsabilizada pelos picos existentes nos quatro município assim como Recife, colaborando para a definição da chamada “Terceira onda” da Covid-19 no Brasil, alcançando valores maiores que 107 cópias genômicas/L em Goiânia.

4.3 Carga viral encontrada em 2022

O início do ano de 2022 foi marcado pelo crescimento exorbitante na carga viral encontrada, em 80,77 bilhões de cópias/dia para cada 10 mil habitantes, valor superior a todos observados durante o período de monitoramento somados. Os dados de saúde do período confirmaram que a variante B1.1.529 (Ômicron) foi a responsável por esse aumento repentino no número de casos. Segundo o boletim epidemiológico da Rede Alerta de Variantes do instituto Butantan, na terceira semana epidemiológica (16 à 22 de Janeiro), a nova variante Ômicron já correspondia a 99,7% dos casos confirmados de COVID-19 em São Paulo, sendo considerada a variante causadora da nova onda da Pandemia.

Os casos voltam a cair após a contaminação generalizada pela variante B1.1.529 a partir da semana epidemiológica 5 (30 de Janeiro a 05 de fevereiro) com os valores permanecendo baixos com o avanço da vacinação e o cancelamento das festividades de Carnaval organizados pelo Governo do Estado. Novo aumento da carga só foi detectado a partir do início do mês de Junho, após o período de intensa precipitação para a média pluviométrica da região. Os meses de Maio, Junho e Julho, receberam, em média, o volume de 682,74 mm, 490,3 mm e 218,75 mm respectivamente, segundo o Serviço de Monitoramento pluviométrico mensal da Agência Pernambucana de Águas e Clima (APAC), com os dois primeiros meses, em especial o mês de Maio, superando a média histórica de precipitação. Apesar do acumulado de chuvas, o aumento do valor das cargas foi detectado, indicando a presença de material viral nos corpos hídricos urbanos apesar da intensa diluição causada pelas chuvas. Os valores das cargas durante o período de chuvas aumentaram até 16,83 bilhões de cópias/dia a cada 10 mil habitantes (18 de Junho), e este cenário foi compreendido como a “Quarta onda” do SARS-CoV-2 no Brasil (Figura 6.).

O período de inverno foi marcado pelo aumento no número de casos de doenças respiratórias, como a gripe, que podem ter auxiliado na transmissão do novo coronavírus a partir das gotículas respiratórias. Além disso, segundo Gwenzi (2021), a possibilidade de infecção por vias feco-orais não pode ser descartada. Essa possibilidade foi debatida devido ao período de sobrevivência por “*shedding*”, ou proteção, em amostras de esgoto sanitário que, segundo (GWENZI, 2021), pode variar entre 2 e 14 dias a depender das condições ambientais. Além disso, segundo Fears *et al.* (2020), citado por Gwenzi (2021) há a possibilidade de contato por aerossóis de esgoto sanitário em regiões aglomeradas em torno de águas urbanas sem tratamento, presente em países em desenvolvimento, como o Brasil, e vias de transmissão alternativas, como contaminação de alimentos por água contaminada, inclusive de origem marinha pelo despejo indevido de esgoto em cidades costeiras (emissários submarinos), e vetores intermediários como roedores, moscas e baratas (GWENZI, 2021).

Contudo, a hipótese de contaminação via feco-oral ainda é debatida, e conhecimento acerca da infectividade do vírus mesmo após o seu período médio de sobrevivência e a variabilidade das condições necessárias para tal ainda não estão totalmente esclarecidas.

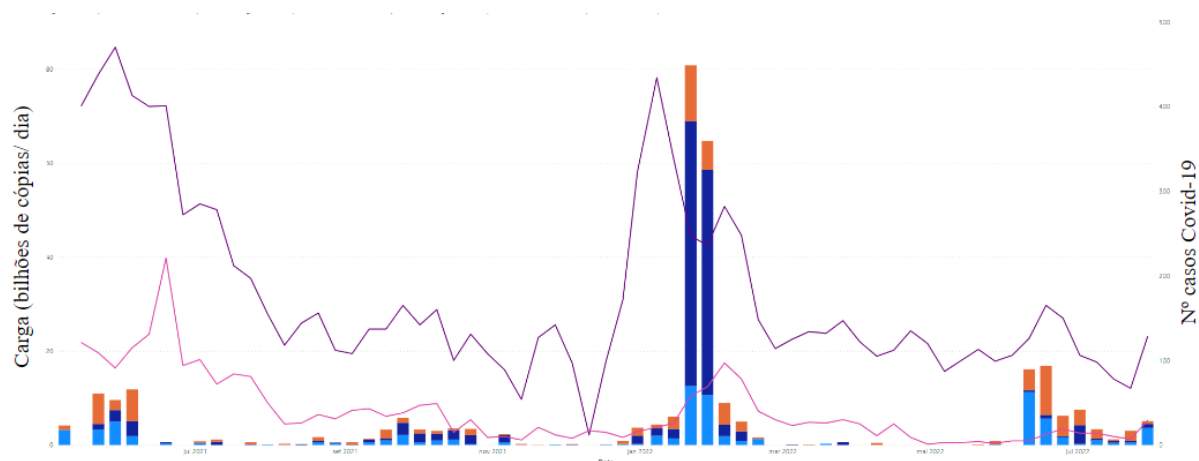
Além das implicações causadas pelo período de chuvas e pelo aumento no número de casos confirmados do novo coronavírus, o mês de Julho também foi celebrado as festividades do São João, adiado devido ao aumento da COVID-19 na cidade do Recife, do dia 23 e 24 de Junho para o período de 1º à 15 de Julho referentes às semanas epidemiológicas 27 e 28 (2022). A partir da semana epidemiológica 29 foi possível verificar um leve aumento da carga viral de 1,23 bilhões de cópias/dia para 3,04 bilhões de cópias/dia (147%), e para 5,09 bilhões de cópias/dia na semana epidemiológica 30 (313%), antes de voltar a ter novo declínio. Além das festividades de São João, semanas antes do crescimento no número de cópias detectado, a semana epidemiológica 30 coincidiu com o fim do recesso escolar decretado pela Secretaria de Educação e Esportes de Pernambuco, retornando as aulas presenciais e aumentando a possibilidade de transmissão do vírus.

4.4 Comparação com dados do Sistema de saúde

As informações utilizadas para a correlação com os dados de saúde foram o número de casos suspeitos e confirmados de pacientes com Síndrome Respiratória Aguda Grave (SRAG) causada pela COVID-19 (Figura 8a). Além desses dados, o número de leitos e a ocupação dos mesmos foram investigados para as Unidades de Tratamento Intensivo (UTI) e enfermaria (Figura 8b.). Os referidos dados foram obtidos por meio de boletins diários emitidos pela Secretaria de Saúde de Recife (SESAU-Recife) disponibilizados no endereço eletrônico: <https://novocoronavirus.recife.pe.gov.br/boletim/>.

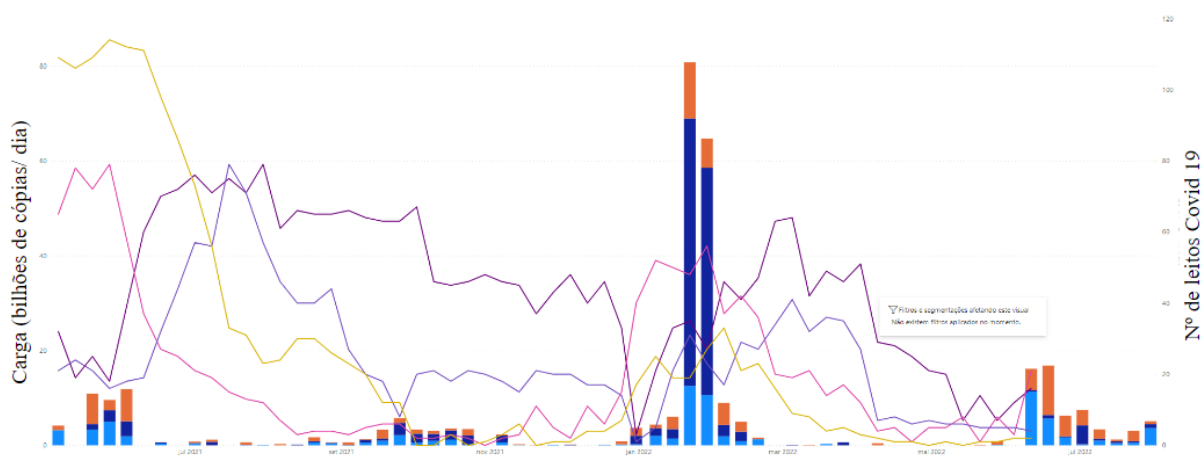
Por último foram coletados os dados referentes à vacinação do público alvo que auxiliam a entender o nível de imunização adquirido durante o período de monitoramento (Figura 8c.). Os dados foram disponibilizados pela prefeitura do Recife (Agosto de 2022) por meio de planilhas eletrônicas abertas ao público contendo o número de pessoas vacinadas e suas respectivas doses, organizados por data de aplicação. Todas as informações encontram-se disponíveis no endereço eletrônico <https://conectarecife.recife.pe.gov.br/vacinometro/>.

Figura 8 .a. Gráfico da evolução temporal das cargas virais no esgoto e dos casos suspeitos e confirmados de COVID-19



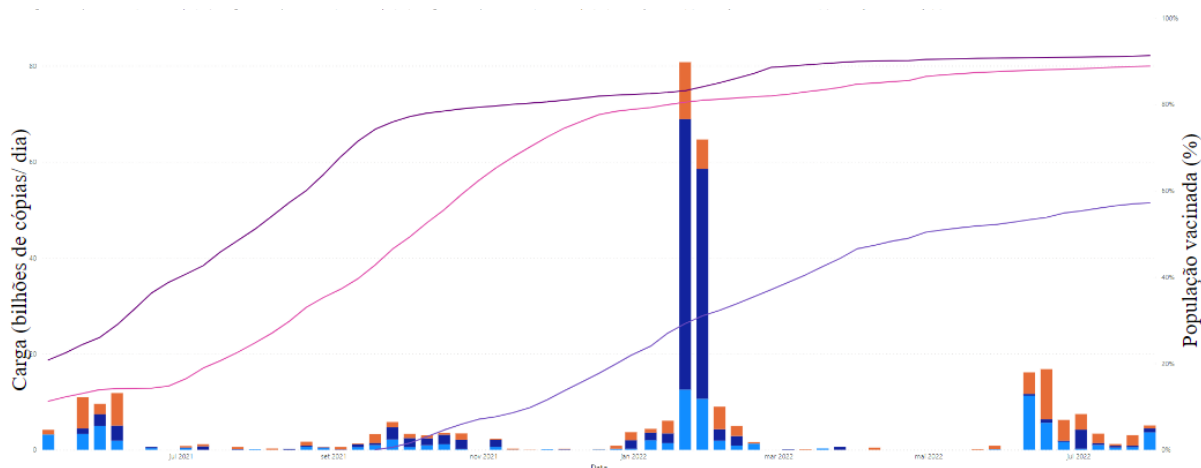
Fonte: Painel do Monitoramento Covid Esgotos, Agência Nacional de Águas e Saneamento Básico. Linha roxa representando o número de casos suspeitos e linha rosa representando número de casos confirmados de SARS-CoV-2. Colunas de carga compostas pela contribuição das cargas de cada Estação de Tratamento utilizada no projeto: ETE Peixinhos (Azul claro), ETE Mangureira (Azul escuro) e ETE Cabanga (Laranja).

Figura 8b. Gráfico da evolução temporal das cargas virais no esgoto e de ocupação dos leitos de UTI e enfermaria.



Fonte: Painel do Monitoramento Covid Esgotos, Agência Nacional de Águas e Saneamento Básico. Linha Roxo-escuro: Número de leitos de enfermaria disponíveis; Linha Rosa: Leitos de enfermaria ocupados; Linha Roxo-claro: Leitos de UTI disponíveis; Linha amarelo-escuro: Leitos de UTI ocupados. Colunas de carga compostas pela contribuição das cargas de cada Estação de Tratamento utilizada no projeto: ETE Peixinhos (Azul claro), ETE Mangureira (Azul escuro) e ETE Cabanga (Laranja).

Figura 8c. Gráfico da evolução temporal das cargas virais no esgoto e do avanço da vacinação em primeira ou segunda dose.



Fonte: Painel do Monitoramento Covid Esgotos, Agência Nacional de Águas e Saneamento Básico. Linha Roxo-escuro: Porcentagem de vacinação da primeira dose; Linha Rosa: Porcentagem de vacinação da segunda dose; Linha Roxo-clara: Porcentagem de vacinação da dose de reforço. Colunas de carga compostas pela contribuição das cargas de cada Estação de Tratamento utilizada no projeto: ETE Peixinhos (Azul claro), ETE Mangueira (Azul escuro) e ETE Cabanga (Laranja).

4.4.1 Evolução dos casos

A evolução das cargas virais acompanhou o número de casos suspeitos e confirmados de COVID-19, com diminuição inicial no número de casos e na carga viral encontrada nos esgotos entre os primeiros meses do projeto. O acompanhamento dos resultados anteriores ao início deste projeto demonstrou que no mês de Junho, um aumento no número de carga viral no dia 05 do mês, 14 dias antes da detecção do aumento no número de casos confirmados (Figura 8.a), corroborando o que muitos pesquisadores têm identificado em diversos países do mundo, como na Espanha onde Randazzo et al. (2020) encontraram amostras positivas para COVID-19 em esgoto com antecedência de 12 a 16 dias antes dos casos de COVID-19 surgirem nas respectivas regiões de coleta. No mês de Janeiro pôde ser observado o aumento expressivo na carga viral encontrada, superior a todos os meses monitorados pelo projeto piloto do INCT ETEs Sustentáveis.

Uma elevação do número de casos suspeitos em Janeiro antes da detecção do aumento equivalente na carga viral não foi totalmente compreendido, podendo estar relacionado com alguma diferença relacionada com aspectos da nova variante Ômicron (B.1.1.529) ou até com a epidemia coexistente de H3N2, apontada pela Organização Panamericana de Saúde (Boletim epidemiológico Influenza da semana 51 e 52) como mais prevalente no Brasil e Uruguai entre toda a América do Sul. Apesar disso, assim como no período denominado de

“Segunda onda”, após o pico da variante B1.1.529 (22 de Janeiro) o ápice dos casos de infecção confirmados (05 de Fevereiro) foram relatados com 14 dias de intervalo.

A dinâmica da ocupação dos leitos permaneceu baixa e constante durante a continuação do primeiro semestre de 2022 (Figura 8c.), com o número de casos suspeitos (Figura 8a.) aumentando significativamente a partir da semana epidemiológica 23 (05 a 11 de Junho), com o pico coincidindo com o maior valor de carga da chamada “Quarta onda” no dia 18 de Junho. Os valores para os casos confirmados não seguiram a mesma dinâmica dos casos suspeitos. Isso pode ser explicado pela presença de outras doenças respiratórias típicas do período de chuvas, com sintomatologia similar, ou pela diminuição na testagem pela decisão da comunidade infectada em um cenário de sintomas atenuados pela proteção gerada pela vacinação. Vale ressaltar o aumento no valor da carga encontrada na semana epidemiológica 30 (24 a 30 de Julho), acompanhado pelo crescimento de casos suspeitos e o maior valor encontrado em casos confirmados (29 casos) desde o final da “Terceira onda” de COVID-19 causada pela variante Ômicron, indicando aumento na circulação do vírus.

4.4.2 Ocupação dos leitos

Após o período de diminuição da carga viral no início do mês de junho de 2021 a quantidade de leitos de enfermagem e UTI disponíveis aumentaram, enquanto o número de leitos ocupados diminuiu até o período do mês de Janeiro quando houve o aumento nos leitos ocupados para COVID-19 de 6 para 56, enquanto os leitos de UTI ocupados aumentaram de 4 para 27 (Figura 8b.). No mês de outubro houve diminuição no número de leitos de UTI disponíveis, ao mesmo tempo que houve pequeno aumento no número da carga viral no Recife, indicando possivelmente aumento repentino de casos mais graves da doença. A quantidade de leitos ocupados sofreu queda após a “Terceira onda” de COVID-19, e permaneceu baixo durante o primeiro semestre de 2022.

Ao longo da segunda semana de Junho de 2022, durante o período de maior precipitação, o número de leitos de enfermagem ocupados aumenta em 600% (21 leitos ocupados), sem aumento aparente na ocupação de leitos de UTI, corroborando com a hipótese de diminuição da testagem (casos confirmados) pela diminuição de casos graves (leitos de UTI ocupados) graças a proteção conferida pela vacinação. A divulgação dos dados relativos à ocupação dos leitos de UTI e Enfermagem não estão disponíveis a partir da semana epidemiológica 24 pelo endereço eletrônico: <https://novocoronavirus.recife.pe.gov.br/boletim/> (Acesso em: 27 de Julho de 2022).

4.4.3 Dados da vacinação

O avanço da vacinação também foi acompanhado pela queda no número de cópias de RNA nas amostras de esgoto. Com o fim do período das chuvas em Julho, a taxa de vacinação da primeira dose aumentou de pouco mais de 51% para aproximadamente 71,5% em Setembro, quando começou a haver leve aumento na quantidade de carga viral no esgoto. No mesmo mês, no entanto, houve o início da aplicação da dose de reforço, que saiu de 0 (zero) até 21,88% no final de Dezembro, enquanto carga viral voltou a diminuir e estabilizou até o final do ano, quando voltou a aumentar, possivelmente em decorrência das festas de fim de ano. Em Janeiro, a porcentagem da vacinação de reforço chegou a aproximadamente 31%, enquanto a segunda dose já havia sido aplicada a aproximadamente 81% da população, próxima à porcentagem da primeira dose. Porém, assim como já foi comentado, a presença da nova variante (Ômicron) aumentou vertiginosamente a carga viral do SARS-CoV-2, apesar dos níveis de vacinação. O gráfico com a dinâmica da vacinação está disponível na plataforma de Painel do Monitoramento COVID Esgotos/ Recife/ Vacinação pelo endereço eletrônico: <https://www.gov.br/ana/pt-br/assuntos/acontece-na-ana/monitoramento-covid-esgotos>

Após a queda na circulação da nova variante do coronavírus, a carga detectada permaneceu baixa a partir da semana epidemiológica 8 (20 a 27 de Fevereiro) enquanto o crescimento da taxa de vacinação da primeira e segunda dose começam a atingir lentamente uma margem estável no limite de 91,26% para a primeira dose e 88,82% para a segunda dose até o fim do período abordado por este relatório. A dose de reforço, utilizada para aumentar a imunização em caso de perda de eficiência das primeiras doses e para aumentar a eficiência contra as novas variantes pela variabilidade das novas vacinas aplicadas aumentou no primeiro semestre para até 57,18%, demonstrando alcançar uma margem estável com menos adesão a população do que as primeiras doses, sugerindo um risco de reinfecção a longo prazo para os não vacinados. Essa menor adesão demonstrada pela curva da dose de reforço ocorre no período de vacinação de jovens acima de 12 anos (a partir do dia 1 de Junho) e pode explicar, junto com a faixa etária mais jovem sem reforço, o leve aumento na carga encontrada na semana epidemiológica 30, período correspondente ao retorno do período letivo decretado pelo Governo do Estado.

5.5 Comparação com capitais do Projeto de Monitoramento

Durante a realização do Projeto Piloto: Detecção e quantificação do novo coronavírus em águas residuárias realizado pelo INCT ETEs sustentáveis, outras capitais apresentaram resultados de carga com dinâmicas comparáveis aos resultados representados pela cidade do Recife.

Em Belo Horizonte (MG) houve um leve crescimento da carga viral (103,3 bi cópias/dia) na semana epidemiológica 21 de 2021 (23 até 29 de Maio) após uma aparente queda causada pelo fim da “Segunda onda” de contaminação, com o número de casos confirmados constantes. Ocorre um aumento na carga no início de Setembro confirmada pelo crescimento de 398% na semana epidemiológica 36 (8 de Setembro), aproximadamente duas semanas antes de um breve crescimento semelhante no Recife. Em Janeiro de 2022, na semana epidemiológica 3 ocorre o maior pico de carga viral (622,15 bi cópias/dia) do período da “Terceira onda”, seguido pelo aumento dos casos suspeitos e pelos casos confirmados (5771 casos confirmados e 50195 casos suspeitos). Os casos sofrem uma pequena queda na semana 10 (4050 casos confirmados e 15167 casos suspeitos), e permanecem estáveis até a semana epidemiológica 15 (8 de Abril), alcançando o maior valor de casos confirmados, especificamente, em todo o estudo (11071) na semana 12, apesar da baixa carga durante o período. O valor das cargas volta progressivamente a subir no final de Abril e atinge seu ápice detectado na semana epidemiológica 21 (24 de Maio) com 707,47 bilhões de cópias/dia, a maior carga encontrada no esgoto durante o período de pesquisa, diferente da dinâmica viral do Recife, que encontrou seu ápice na “Terceira onda”.

A carga viral encontrada na capital do Rio de Janeiro em 2021 obteve os maiores picos durante a maior parte do ano, com sete picos de carga encontrados acima de 1300 bilhões de cópias/ dia entre os meses de Maio a Agosto com o número de casos clínicos estáveis, resultado de uma possível baixa notificação dos casos. O pico do período da “Terceira onda”, apesar de expressivo (1050,13 bilhões de cópias/dia), não superou os maiores valores do ano anterior, porém, apresentou o maior índice de casos suspeitos registrado (aproximadamente 10x mais casos), colaborando para a discussão da maior capacidade de infecção da nova variante e/ou de uma epidemia simultânea de H3N2. Apesar dos valores das cargas não terem sido apresentados no painel de monitoramento do projeto piloto (Acesso em: 28 de Setembro de 2022), o número de casos confirmados e suspeitos apresentados demonstram um aumento nos números entre meados de Maio e a terceira semana de Junho (228% de crescimento de casos suspeitos e 67% de crescimento de casos confirmados em relação ao maiores valores de 2021) superados apenas pelo período da variante B.1.1.529 (Ômicron), simultaneamente aos dois municípios participantes do Projeto piloto discutidos. Os altos valores de carga

encontrados durante o monitoramento no Rio de Janeiro por semana epidemiológica pode ser atribuído à quantidade superior de pontos de coleta de Estações de Tratamento (onze pontos de coleta) comparada a outros municípios do projeto (três do Recife, cinco de Curitiba e dois de Belo Horizonte).

A capital de Curitiba também apresentou seu maior pico de carga viral em 2022 na última semana de Maio, (880,23 bilhões de cópias/dia) (1139,65 bilhões de cópias/dia) em 129% em relação a “Terceira onda”, de forma semelhante a cidade do Recife.

Segundo a Rede de Monitoramento COVID Esgotos de 2022, as capitais de Curitiba, Belo Horizonte e Distrito Federal foram informadas a partir de Notas de Alerta sobre o aumento expressivo observado durante o mês de Maio (Nota de Alerta N° 7, 8 e 9). Durante esse período, o estado de Minas recebeu um volume total de chuvas de 57,3 mm (Instituto Nacional de Meteorologia, Acesso em: 28 de Setembro de 2022), enquanto Curitiba apresentou pluviosidade na margem de 40-60 mm (SIMEPAR, Acesso: 28 de Setembro de 2022), já o Rio de Janeiro apresentou um volume mensal de 22,6 mm (Instituto Nacional de Meteorologia, Acesso em: 28 de Setembro de 2022). Comparados ao acumulado de chuvas em Maio na cidade do Recife (682 mm) e a continuação da precipitação nos dois meses posteriores, é possível interpretar os resultados de carga viral nos meses de Maio, e nas primeiras semanas de Junho como fortemente influenciados pela chuva acumulada, causando uma diluição da carga viral esperada, e seguindo a lógica das capitais apresentadas, comparável à “Terceira onda” causada pela Variante B.1.1.529.

5.6 Análise físico-química das amostras

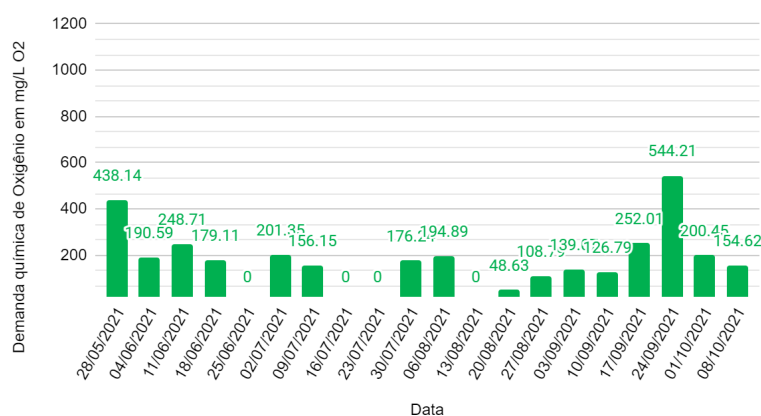
A epidemiologia baseada em águas residuárias por si só possui limitações quanto a interpretação dos resultados do material encontrado. Para analisar os resultados de concentração, deve-se compreender os resultados baseados em variações individuais que podem alterar o padrão de prevalência viral nas águas, como pH, temperatura, vazão de água, quantidade de matéria orgânica, quantidade de efluxo viral, tempo de decaimento do material genético, substâncias inibidoras e outras substâncias químicas (HILLARY, FARKAS, *et al* 2021). Valores como estes são importantes em WBE (Epidemiologia Baseada em Águas Residuárias) pois podem variar segundo fatores ambientais e socioeconômicos.

Para se avaliar os resultados dos diferentes pontos de amostragem, alguns fatores foram escolhidos como parâmetros normalizadores para o objetivo de comparação, sendo

estes a vazão de água, pela sua grande influência na concentração do RNA viral, principalmente em períodos de chuva, demanda química de oxigênio (DQO) frequentemente utilizado como parâmetro normalizador por sua capacidade de avaliar indiretamente a quantidade de matéria orgânica presente no ambiente (MOTA, RIBEIRO, ARAÚJO, *et al*) e quantidade de coliformes fecais, utilizada como fator de determinação de proporção de material fecal presente nos cursos de água.

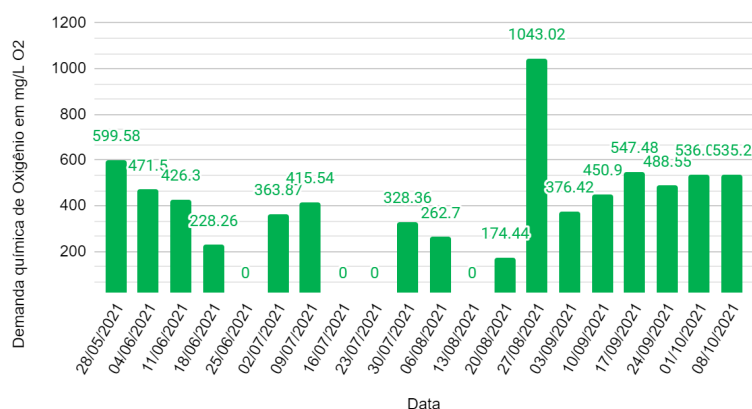
Figura 9 – Matéria orgânica com base na demanda química de oxigênio (DQO) consumida por litro de amostra das Estações de Tratamento de Esgoto (A. Peixinhos, B. Mangueira e C. Cabanga) entre os períodos de Maio e Outubro de 2021.

DQO ETE Peixinhos

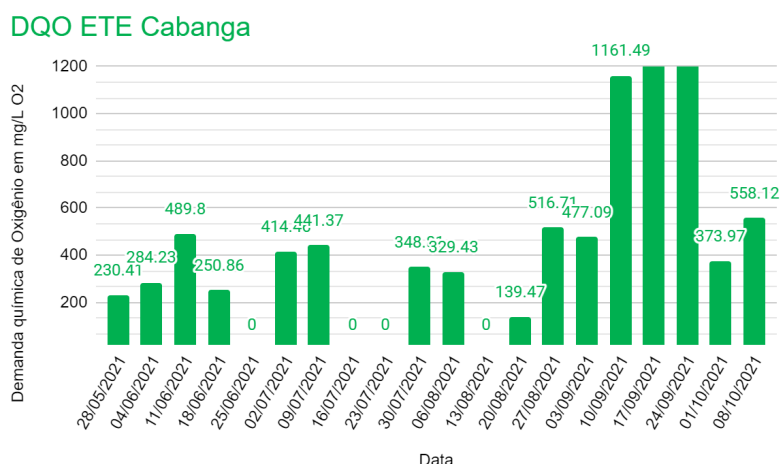


A.

DQO ETE Mangueira



B.



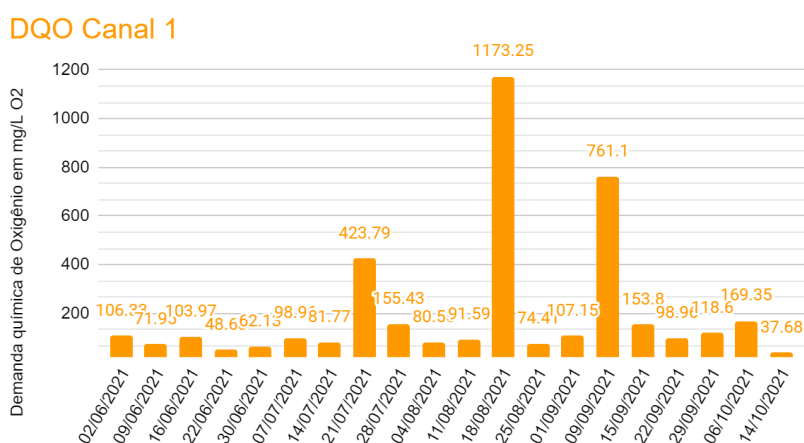
C.

Fonte: Autor.

Os valores obtidos de matérias orgânica detectados nas Estações de tratamento acompanharam, imprecisamente, o período de chuvas, com valores decrescentes entre Maio e Agosto, com exceção da segunda semana de Junho (11/06) das Estações de Peixinhos e Cabanga, no qual houve aumento de efluxo de matéria orgânica, uma semana anterior ao pico do número de casos confirmados no mês de Junho (Figura 6, 19/06).

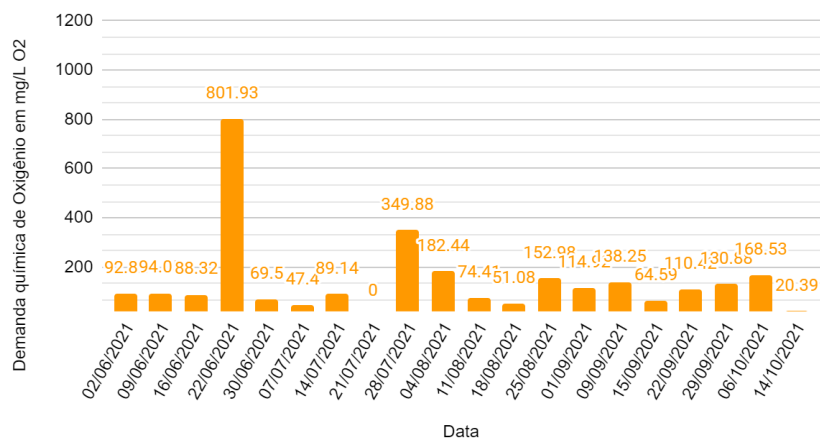
A partir de Agosto, os resultados obtidos voltaram a crescer após a terceira semana (20/08), ponto em que todos os volumes de matéria orgânica obtiveram o maior valor observado, fenômeno esse ainda não totalmente compreendido. A partir da última semana de Agosto até a última semana de Setembro, as ETes de Mangueira (27/08), Peixinhos (10/09) e Cabanga (24/09) obtiveram, respectivamente, um pico de matéria orgânica detectada, ao mesmo tempo que observou-se leve aumento de carga viral obtida (Figura 6), cujo ápice ocorreu no dia 24 de Setembro ($5,8 \times 10^9$ cópias genômicas/dia). Na data de 25/06 não houve experimento devido ao feriado de São João.

Figura 10. Matéria orgânica com base na demanda química de oxigênio (DQO) consumida por litro de amostra dos Canais Pluviais (A. Canal 1, Várzea, B. Canal 2, Boa Viagem, C. Canal 5, Ibura e D. Canal 6, Água Fria) entre os períodos de Maio e Outubro de 2021



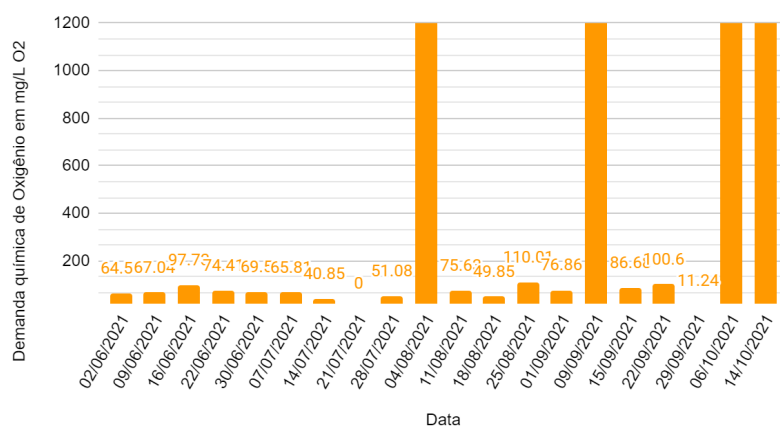
A.

DQO Canal 2



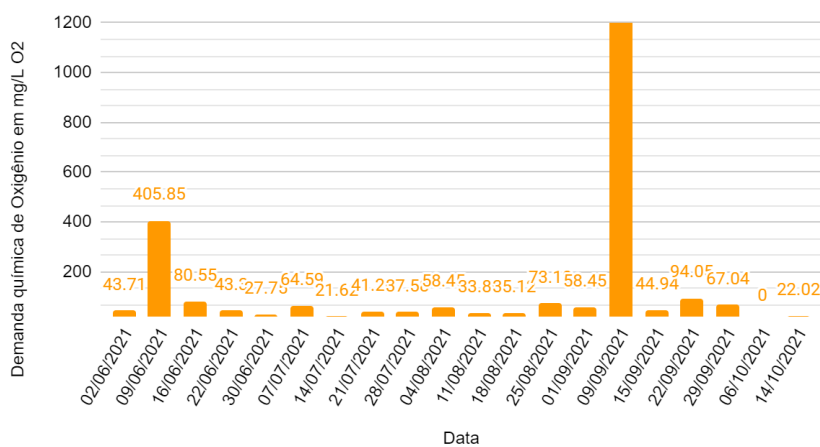
B.

DQO Canal 5



C.

DQO Canal 7



D.

. Fonte: Autor.

Os valores obtidos para matéria orgânica nos canais pluviais seguiram um padrão diferente das Estações de Tratamento. No canal da Várzea (Canal 1) ocorreram picos de efluxo de matéria orgânica na terceira semana de Julho e Agosto, seguido pela primeira semana de Setembro. O maior pico no dia 18 de Agosto ocorreu simultaneamente a um aumento temporário na concentração viral entre os dias 14 e 28 de Agosto (Figura 9a.), podendo estar relacionado com sintomas gastrointestinais e protocolo de isolamento doméstico. No canal pluvial de Boa viagem (Canal 2), o pico observado no dia 22 de Junho ocorreu aproximadamente uma semana após a chamada “Segunda onda” (Figura 6) podendo também estar relacionado com sintomas gastrointestinais, no entanto o aumento progressivo no final de setembro apresentou relação como número de casos confirmados do mesmo período. Os resultados obtidos nos canais do Ibura (Canal 3) e de Água Fria não obtiveram relação aparente com as concentrações virais, porém, ambas compartilharam aumento da matéria orgânica no dia 09 de Setembro, no entanto, nenhuma correlação foi apontada.

Os resultados de matéria orgânica referentes aos meses seguintes de 2021 e para os meses de 2022 não foram realizados devido à interrupção dos experimentos durante a mudança de coordenação da pesquisa. Os resultados dos coliformes foram coletados entre 09 de Junho e 06 de Julho em canais variaram entre $1,0 \times 10^4$ cópias genômicas/dia (Boa viagem, 04/05/22) e $2,4 \times 10^8$ cópias genômicas/dia (Várzea, 02/03/22), no entanto, não foram encontradas correlações entre os valores de coliformes fecais encontrados com a concentração viral de cada mês analisado.

6. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos durante a produção deste projeto demonstraram a capacidade da Epidemiologia Baseada em Águas Residuárias (WBE) em monitorar a dinâmica viral a nível de comunidade, como demonstrado pelo controle das cargas virais encontradas em estações de tratamento durante o avanço da vacinação, assim como na detecção da atividade da nova variante Ômicron no mês de Janeiro. A dinâmica social também foi observada como fator de influência, como nos períodos de festas de fim de ano, período da variante B1.1.529, mas também no período das festividades de São João, que possui forte participação popular no mês de Julho, como esperado. A utilização dos canais pluviais foi fundamental na cobertura

de toda a cidade do Recife, ainda que a comparação entre os fatores normalizantes não obteve a padronização para nível de comparação esperada.

Como destaque para os resultados, observou-se em Maio de 2021 que foi possível identificar que o maior pico de carga viral apresentado pela contribuição conjunta das três ETEs , exatamente duas semanas antes do sistema de saúde identificar a maior alta no número de casos confirmados para SRAG causado por COVID-19 na data 19/06/2021.

Durante o monitoramento, Recife atingiu, na semana epidemiológica 03 de 2022 (22/01/2022), a maior carga de SARS-CoV-2 já registrada desde o início do monitoramento, igual a 81 bilhões de cópias genômicas por dia por 10 mil habitantes, corroborando com boletins de saúde do período, com a chegada da variante Ômicron.

Outra análise pôde ser feita durante o período de intensa precipitação, nos meses de Maio à Julho de 2022, quando foi possível detectar o aumento significativo na carga, apesar da diluição. Fatores como, doenças respiratórias sazonais, feriados e avanço da vacinação de reforço foram abordadas e discutidas a partir dos resultados dos indicadores de saúde obtidos do período.

Apesar do relaxamento das medidas de prevenção ao novo coronavírus, a partir da metodologia baseada em águas residuárias ainda é possível observar a dinâmica do vírus, que ainda se faz presente no Recife e no mundo, e a influência das condições sociais e ambientais para sua circulação e propagação.

Além de tudo, a metodologia de WBE se provou capaz de perceber com antecedência o aumento no número de casos, quando comparada com os índices de positividade como o número de casos confirmados. Esses resultados puderam ser melhor observados durante os picos de carga viral, chamadas de “Ondas de contaminação”, e foram detectados com até duas semanas de antecedência, como previsto por outros estudos.

Para concluir, podemos ver que o uso das técnicas de epidemiologia baseada em águas residuárias conseguiu acompanhar a dinâmica viral do SARS-CoV-2 a nível de comunidade, observadas pelos números de carga observados durante os períodos de onda de contaminação. Os resultados conseguiram uma boa correlação com dados de saúde e se provaram muito úteis na produção de materiais epidemiológicos auxiliares, como os boletins de acompanhamento e o Painel de monitoramento de COVID-19 que podem ajudar na divulgação dos dados de controle da pandemia e servir como guia para a incrementação de novas políticas públicas de saúde.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGÊNCIA NACIONAL DE SANEAMENTO BÁSICO. **Painel do Monitoramento COVID Esgotos**, 2021. Visualizador de dados. Disponível em: <https://app.powerbi.com/view?r=eyJrIjoibmVjZGYtZDVjNy00NTMwLWIwZmItYmQwOWJhNzk3YmU1IiwidCI6Ijc1NmU3MTc4LTA1ZmYtNGVmYy05OTY2LTU2ODFINjE2MjA3MCJ9&pageName=ReportSectiond497bb36400a320db4c7%20>. Acesso em: 12 de fev. de 2022.

APAC. **Monitoramento Pluviométrico**, 2022. Visualização Mensal. Disponível em <http://old.apac.pe.gov.br/meteorologia/monitoramento-pluvio.php>. Acesso em: 27 de ago. de 2022.

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. 2042-2049, 2015.

AHMED, W. et al. Comparison of virus concentration methods for the RT-qPCR-based recovery of murine hepatitis virus, a surrogate for SARS-CoV-2 from untreated wastewater. **Science of the total environment**, v. 739, n. 139960, 2020.

AMOAHA, I. D.; KUMARI, S.; BUX, F. Coronaviruses in wastewater processes: Source, fate and potential risks. **Environment international**, v. 143, 105962, 2020.

BUENO, R., F., et al. Wastewater-based epidemiology: A Brazilian SARS-COV-2 surveillance experience. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 10, n. 5, p. 108298, 2022.

CLIMATE-DATA.ORG. **Clima Recife**, 2021. Disponível em: <https://pt.climate-data.org/america-do-sul/brasil/peernambuco/recife-5069/>. Acesso em 26 de out. de 2022.

CORONAVIRUS DISEASE. **World Health Organization (WHO)**, 2021. Dashboard. Disponível em: <https://covid19.who.int/>. Acesso em 15 de Jan. de 2022.

DING, S.; LIANG, T.J.; Is SARS-CoV-2 Also an Enteric Pathogen with Potential Fecal-Oral Transmission: A COVID-19 Virological and Clinical Review. **Gastroenterology**, 2020.

FARKAS K.; HILLARY, L.S.; MALHAM, S.K.; MCDONALD, J.E.; JONES, D. L., Wastewater and public health: the potential of wastewater surveillance for monitoring COVID-19. **Current Opinion in Environmental Science & Health**, 2020.

GWENZI, W. Leaving no stone unturned in light of the COVID-19 faecal-oral hypothesis? A water, sanitation and hygiene (WASH) perspective targeting low-income countries. **Science of the Total Environment**, v. 753, 141751, 2021.

HE, X.; LAU, E.; WU, P.; DENG, X.; WANG, J.; HAO, X.; LAU, Y. C.; WONG, J. Y.; GUAN, Y.; TAN, X.; MO, X.; CHEN, Y.; LIAO, B.; CHEN, W.; HU, F.; ZHANG, Q.; ZHONG, M.; WU, Y.; ZHAO, L.; ZHANG, F.; LEUNG, G. M. Temporal dynamics in viral shedding and transmissibility of COVID-19. **Nature Medicine**, v. 26(5), p. 672–675, 2020.

HILLARY, L.S.; FARKAS, K.; MAHER, K., H.; LUCACI, A.; THORPE, J.; DISTASO, M., A.; GAZE, W., H.; PATERSON, S.; BURKE, T.; CONNOR, T., R.; MCDONALD, J., E.; MALHAM, S., K.; JONES, D., L. Monitoring SARS-CoV-2 in municipal wastewater to evaluate the success of lockdown measures for controlling COVID-19 in the UK. **Water Research**, V. 200, 117214, 2021.

INFLUENZA SITUATION REPORT. **Pan American Health Organization**, 2022.

Disponível em <https://www.paho.org/en/influenza-situation-report>. Acesso em: 13 de fev. de 2022.

LI, Y.; LI, JONATHAN Z. SARS-CoV-2 Virology. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 36, p. 251-265, 2022.

MAO, K.; ZHANG, H.; PAN, Y.; YANG, Z. *et al.* Biosensors for wastewater-based epidemiology for monitoring public health. **Water Research**, v. 191, 116787, 2021.

MOTA, C. R.; BRESSANI-RIBEIRO, T.; ARAÚJO, J. C.; LEAL, C. D.; LEROY-FREITAS, D.; MACHADO, E. C.; ESPINOSA, M. F.; FERNANDES, L.; LEÃO, T. L.; CHAMHUM-SILVA, L.; AZEVEDO, L.; MORANDI, T.; FREITAS, G.; COSTA, M. S.; CARVALHO, B. O.; REIS, M.; MELO, M. C.; AYRIMORAES, S. R.; & CHERNICHARO, C. Assessing spatial distribution of COVID-19 prevalence in Brazil using decentralised sewage monitoring. **Water Research**, Belo Horizonte, v. 202, 117388, 2021.

PAUL, J. R.; TRASK, J. D. the virus of poliomyelitis in stools and sewage. **The Journal of the American Medical Association**, V. 116(6), P. 493-498, 1941.

PRADO, T. *et al.* Wastewater-based epidemiology as a useful tool to track SARS-CoV-2 and support public health policies at municipal level in Brazil. **Water Research**, v. 191, p. 116810, 2021.

PREFEITURA DO RECIFE. **Prefeitura do Recife inicia novo ciclo de limpeza dos canais da cidade**, 2019. Disponível em:

<https://www2.recife.pe.gov.br/noticias/15/01/2019/prefeitura-do-recife-inicia-novo-ciclo-de-limpeza-dos-canais-da-cidade>. Acesso em: 26 de out. de 2022.

SECRETARIA DE EDUCAÇÃO E ESPORTES. **Calendário Escolar**, 2022. Disponível em: <http://www.educacao.pe.gov.br/porta/?pag=1&men=68>. Acesso em: 29 de ago. de 2022.

SEIS FATOS SOBRE A ÔMICRON, A VARIANTE MAIS TRANSMISSÍVEL DA COVID-19. **Instituto Butantan**, 2022. Disponível em:

<https://butantan.gov.br/noticias/seis-fatos-sobre-a-omicron-a-variante-mais-transmissivel-da-covid-19>. Acesso em: 12 de fev. de 2022.

SELLWOOD, J.; DADSWELL, J. V.; SLADE, J. S. (1981). Viruses in sewage as an indicator of their presence in the community. **Journal of Hygiene**, v. 86(02), p. 217–225, 1986.

TEIXEIRA, S., F.; MELO, G., V.; DA LUZ, G., C., B.; CAMPOS, S., S. Coleta e tratamento de esgoto dos municípios de grande porte da Região Metropolitana do Recife: ameaça à saúde pública. **Brazilian Journal of Health Review**, Curitiba, v. 4, n. 2, p. 4391-4400, 2021.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS. Monitoramento COVID Esgotos. **Nota técnica, de 09 outubro de 2020**. Metodologia para concentração e quantificação do novo coronavírus em amostras de água e esgoto por técnicas moleculares. Instituto Nacional de Ciências e Tecnologia, Belo Horizonte, 2020. Disponível em: https://www.gov.br/ana/pt-br/assuntos/acontece-na-ana/monitoramento-covid-esgotos/colecao-monitoramento-covid-esgotos?b_start:int=0. Acesso em: 02 de Jan. de 2022.

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., FANG, T., WANG, G., QIU, Y., WU, H., CHAO, F., 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 Sci. Technol.**, v. 52, p. 213–221, 2005