

INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM VIGILÂNCIA SANITÁRIA
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ

Andressa Silva Gonçalves de Brito

**VIGILÂNCIA GENÔMICA AMBIENTAL DE SARS-CoV-2 EM ÁGUAS RESIDUAIS
NO RIO DE JANEIRO**

Rio de Janeiro
2023

Andressa Silva Gonçalves de Brito

**VIGILÂNCIA GENÔMICA AMBIENTAL DE SARS-CoV-2 EM ÁGUAS RESIDUAIS
NO RIO DE JANEIRO**

Dissertação apresentada ao curso de Mestrado Acadêmico do Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, da Fundação Oswaldo Cruz, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Orientadora: Maysa Beatriz Mandetta Clementino
Coorientador: Kayo Cesar Bianco Fernandes

Rio de Janeiro
2023

Catálogo na Fonte
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
Biblioteca

Brito, Andressa Silva Gonçalves de

Vigilância genômica ambiental de SARS-CoV-2 em águas residuais no Rio de Janeiro.
/ Andressa Silva Gonçalves de Brito. - Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ, 2023.

68 f.: il.; tab.

Dissertação (Mestrado Acadêmico em Vigilância Sanitária) - Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2023.

Orientadora: Maysa Beatriz Mandetta Clementino

Coorientador: Kayo Cesar Bianco Fernandes

1. SARS-CoV-2 - patogenicidade. 2. Águas Residuárias - análise. 3. Vigilância Epidemiológica Baseada em Águas Residuárias. 4. Monitoramento Biológico - métodos. I. Título

Environmental genomic surveillance of SARS-CoV-2 in wastewater in Rio de Janeiro.

"O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001."

"This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001."

Andressa Silva Gonçalves de Brito

VIGILÂNCIA GENÔMICA AMBIENTAL DE SARS-CoV-2 EM ÁGUAS RESIDUAIS
NO RIO DE JANEIRO

Dissertação apresentada ao curso de Mestrado Acadêmico do Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, da Fundação Oswaldo Cruz, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Aprovado em: ____ / ____ / ____.

BANCA EXAMINADORA

Dra. Célia Maria Carvalho Pereira Araújo Romão
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde - INCQS / FIOCRUZ

Dr. Alexander Machado Cardoso
Universidade Estadual do Rio de Janeiro – UERJ

Dr. Júlio Cesar de Faria Alvim Wasserman
Universidade Federal Fluminense – UFF

ORIENTADORES

Dra. Maysa Beatriz Mandetta Clementino
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde - INCQS / FIOCRUZ

Dr. Kayo Cesar Fernandes Bianco
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde - INCQS / FIOCRUZ

Dedicado à minha família em especial aos meus pais Andrea Brito e Alexandre Brito, por todo amor, carinho e dedicação.

AGRADECIMENTOS

Agradeço imensamente aos meus pais Andrea e Alexandre, por tudo que fizeram por mim, pela dedicação, educação, amor e por serem meus maiores incentivadores. Vocês são minha inspiração e exemplo;

À minha irmã Alexandra, por sempre estar ao meu lado, pelo amor e parceria;

À minha avó Mariana, por todas as orações, palavras de incentivo e carinho;

Aos meus padrinhos (dindinhos) Adriana e Thomaz, e à minha prima Drieli, que sempre torceram por mim, sou grata por sempre me apoiarem e estarem presentes em minha vida;

À minha orientadora Dra. Maysa Mandetta pela excelente orientação e exemplo de dedicação à ciência e pesquisa. Sou grata pela oportunidade desde a iniciação científica e por confiar no meu trabalho;

Ao meu coorientador Dr. Kayo Bianco pela excelente coorientação. Agradeço pelo apoio incansável e dedicação que sempre me ofereceu durante todo o desenvolvimento desse trabalho;

Aos meus colegas de laboratório, Aline, Ana Carolina, Ana Paula, Beatriz, Claudia Flores, Kaylanne, Maiara, Mariana e Vinícius, por compartilharem suas experiências e conhecimentos comigo e por sempre me fazerem rir nas horas mais difíceis;

À minha amiga de turma, Ana Paula Procópio, por todo apoio e por me acompanhar nesta jornada;

Ao Dr. Ivano de Filippis pelo auxílio na revisão deste trabalho;

Ao Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde e ao Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária que possibilitaram a realização deste estudo;

À CAPES pela concessão da bolsa;

Agradeço a todos que me apoiaram e me incentivaram nessa jornada e a todos que contribuíram na conclusão deste trabalho.

“Cada pessoa deve trabalhar para seu aperfeiçoamento e, ao mesmo tempo, participar da responsabilidade coletiva por toda a humanidade.”

Marie Curie

RESUMO

A doença do coronavírus 2019 (COVID-19) é uma doença infecciosa causada pela síndrome respiratória aguda grave (SARS-CoV-2) e tem como principais sintomas febre, cansaço e tosse seca e problemas gastrointestinais. O RNA do SARS-CoV-2 pode ser detectado em fezes de indivíduos sintomáticos e assintomáticos e pode ser transportado indiretamente para ambientes aquáticos e estações de tratamento de águas residuais. O estudo de vírus em águas residuais é uma ferramenta útil conhecida como *Wastewater Based Epidemiology* (WBE) e tem o potencial de atuar como uma abordagem complementar aos atuais sistemas de vigilância genômica clínica, atuando como uma abordagem promissora capaz de fornecer informações importantes sobre a disseminação e mutações do SARS-CoV-2, além de gerar alerta precoce para identificar novos surtos da doença. O objetivo deste estudo foi avaliar a diversidade genética de SARS-CoV-2 em duas estações de tratamento de águas residuais no município do Rio de Janeiro por meio da vigilância genômica ambiental utilizando a abordagem de WBE. Para isso, foram selecionadas duas estações de tratamento de águas residuais hospitalar (ETAR1) e mista (ETAR2). Durante o período de janeiro a dezembro/2021 foram realizadas coletas semanais, totalizando 152 amostras, 76 da ETAR1 e 76 da ETAR2. As amostras foram submetidas a concentração com PEG8000 e a detecção do RNA do SARS-CoV-2 foi realizada utilizando iniciadores do gene E e N1. Na ETAR1, 47,4% (36/76) das amostras do afluente e efluente apresentaram o gene E. As amostras negativas para o gene E (n=40), foram avaliadas quanto a presença do gene N1, onde 11,6% (13/40) das amostras da ETAR1 apresentaram o gene N1 afluente e efluente. A ETAR2 teve apenas 5,3% (4/76) de amostras positivas onde o gene E e foi o único presente. As amostras semanais da ETAR1 foram agrupadas de acordo com o mês de coleta durante todo o período do estudo. Não foi possível recuperar o genoma completo de nossas amostras, entretanto, análises realizadas em software Viralflo e banco de dados como o Pango, GISAID, Nextclade e OMS, sugerem possíveis variantes do SARS-CoV-2 com base nas mutações características. A detecção de SARS-CoV-2 em águas residuais, pode servir como ferramenta para monitorar a prevalência e a epidemiologia em determinada comunidade, auxiliando a compreensão da disseminação do vírus entre a população. Sendo assim, a vigilância epidemiológica baseada em águas residuais, serve como uma abordagem complementar no monitoramento de sua prevalência, diversidade genética e distribuição geográfica.

Palavras-Chave: Sars-CoV-2; Vigilância Genômica Ambiental; Epidemiologia Baseada em Águas Residuais.

ABSTRACT

Coronavirus disease 2019 (COVID-19) is an infectious disease caused by severe acute respiratory syndrome (SARS-CoV-2), its main symptoms are fever, tiredness and dry cough and gastrointestinal problems. SARS-CoV-2 RNA can be detected in feces of symptomatic and asymptomatic individuals and can be transported indirectly to aquatic environments and wastewater treatment plants. The study of viruses in wastewater is a useful tool known as Wastewater Based Epidemiology (WBE) and has the potential to act as a complementary approach to current clinical genomic surveillance systems, acting as a promising approach capable of providing important information on the spread and mutations of SARS-CoV-2, in addition to generating early warning to identify new outbreaks of the disease. The aim of this study was to evaluate the genetic diversity of SARS-CoV-2 in two wastewater treatment plants in the city of Rio de Janeiro through environmental genomic surveillance using the WBE approach. For this, two hospital (WWTP1) and mixed (WWTP2) wastewater treatment plants were selected. During the period from January to December/2021, weekly collections were carried out, totaling 152 samples, 76 from WWTP1 and 76 from WWTP2. The samples were concentrated with PEG8000 and detection of Sars-CoV-2 RNA was performed using E and N1 gene primers. In WWTP1, 47.4% (36/76) of the influent and effluent samples presented the E gene. The negative samples for the E gene (n=40) were evaluated for the presence of the N1 gene, where 11.6% (13/40) of the WWTP1 samples showed the N1 gene affluent and fluent. ETAR2 had only 5.3% (4/76) of positive samples where the E gene was the only one present. The weekly samples from WWTP1 were grouped according to the month of collection throughout the study period. It was not possible to recover the complete genome of our samples, however, analyzes carried out in Viralflo software and databases as Pango, GISAID, Nextclade and WHO, suggest possible variants of Sars-CoV-2 based on the characteristic mutations. The detection of SARS-CoV-2 in wastewater can serve as a tool to monitor the prevalence and epidemiology in each community, helping to understand the spread of the virus among the population. Being a complementary approach in monitoring its prevalence, genetic diversity and geographic distribution.

Keywords: Sars-CoV-2; Environmental Genomic Surveillance; Wastewater Based Epidemiology.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação esquemática do SARS-CoV-2.....	24
Figura 2. Estrutura genômica do SARS-CoV-2.....	24
Figura 3. Linhagens circulantes no Brasil de Nov-2020 a Jun-2022.....	30
Figura 4. Porcentagem de amostras positivas e negativas na ETAR1.....	43
Figura 5. Detecção de Sars-CoV-2 ao longo do ano de 2021 na ETAR1.....	43

LISTA DE TABELA

Tabela 1. Variantes de preocupação circulantes	27
Tabela 2. Variantes de preocupação circulantes anteriormente.....	28
Tabela 3. Variantes de Interesse circulantes	28
Tabela 4. Estações de Tratamento de Águas Residuais.....	38
Tabela 5. Resultado da análise de sequenciamento.....	45

LISTA DE SIGLAS

2019-nCov	Coronavírus 2019
ANA	Agência Nacional de Águas e Saneamento Básico
COVID-19	Coronavírus 2019
CoVs	Coronavírus
ECA2	Enzima Conservadora da Angiotensina 2
ETAR	Estação de Tratamento de Água Residual
HCoV	Coronavírus Humanos
hCoV-229E	Coronavírus humano 229E
hCoV-HKU1	Coronavírus humano HKU1
hCoV-NL63	Coronavírus humano NL63
hCoV-OC43	Coronavírus humano OC43
INCQS	Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
MBBR	<i>Moving Bed Biofilm Reactor</i>
MERS-CoV	Síndrome Respiratória do Oriente Médio
NaCl	Cloreto de Sódio
NTD	N-terminal
OMS	Organização Mundial da Saúde
ORF	<i>Open-Reading Frames</i>
PBS	Tampão Salina-Fosfato
PEG	Polietilenoglicol
RBD	Domínio C-terminal
RNA	Ácido Ribonucleico
RT-PCR	Reação de Transcriptase Reversa Seguida de Reação em Cadeia da Polimerase

SARS-CoV-1	Síndrome Respiratória Aguda Grave 1
SARS-CoV-2	Síndrome Respiratória Aguda Grave 2
SUS	Sistema Único de Saúde
UNICEF	Fundo das Nações Unidas para a Infância
VISA	Vigilância Sanitária
VSA	Vigilância em Saúde
WBE	<i>Wastewater Based Epidemiology</i> (Epidemiologia Baseada em
Águas Residuais)	
β-CoV	Betacoronavírus

SUMÁRIO

1	Introdução.....	16
1.1	Vigilância em Saúde.....	16
1.2	Águas Residuais.....	17
1.3	Pandemia da COVID-19.....	19
1.4	COVID-19 no Brasil.....	21
1.5	SARS-CoV-2.....	23
1.6	Mutações virais.....	25
1.7	Variantes e linhagens virais.....	26
1.8	Disseminação de variantes no Brasil.....	29
1.9	Vigilância Genômica.....	30
1.10	Epidemiologia baseada em águas residuais (Wastewater Based Epidemiology — WBE).....	31
2	Justificativa.....	35
3	Objetivos.....	37
3.1	Objetivo Geral.....	37
3.2	Objetivos Específicos.....	37
4	Metodologia.....	38
4.1	Locais de Estudo.....	38
4.2	Amostragem.....	38
4.3	Concentração das amostras de águas residuais.....	39
4.4	Extração de RNA viral.....	39
4.4.1	Extração com Trizol.....	39
4.4.2	Extração com RNeasy Power Water Kit (Qiagen).....	40
4.4.3	Extração com Kit Bio Gene Extração de DNA/RNA Viral (Bioclin).....	40
4.4.4	Avaliação da concentração e qualidade do RNA extraído.....	40
4.5	Detecção de SARS-CoV-2 por RT-qPCR.....	40
4.6	Sequenciamento do genoma viral e análise bioinformática.....	41
5	Resultados.....	42
5.1	Otimização da metodologia de concentração das amostras de águas residuais e extração de RNA viral.....	42
5.2	Detecção do RNA viral.....	42

5.3	Sequenciamento de genoma viral.....	43
6	Discussão.....	48
7	Conclusão.....	55
8	Referências	56

1 Introdução

1.1 Vigilância em Saúde

A Vigilância em Saúde é caracterizada por um conjunto de ações no âmbito individual e coletivo que abrange a promoção e a proteção da saúde, a prevenção de agravos, o diagnóstico, o tratamento, a reabilitação e a manutenção da saúde. O conceito de Vigilância em Saúde inclui: a vigilância e o controle de doenças transmissíveis; a vigilância de doenças e agravos não transmissíveis; a vigilância epidemiológica, vigilância ambiental em saúde, vigilância da saúde do trabalhador e a vigilância sanitária (Ministério da Saúde, 2010).

A Lei n. 8080/1990 define a Vigilância Epidemiológica como um conjunto de ações que proporciona o conhecimento, a detecção ou prevenção de qualquer mudança nos fatores determinantes e condicionantes de saúde individual ou coletiva, com a finalidade de recomendar e adotar as medidas de prevenção e controle das doenças ou agravos. Seu principal objetivo é fornecer orientação técnica para os profissionais de saúde, que têm a responsabilidade de decidir sobre a execução de ações de controle de doenças e agravos, tornando disponíveis, para esse fim, informações atualizadas sobre a ocorrência dessas doenças e agravos, bem como dos fatores que a condicionam, numa área geográfica ou população definida (Brasil, 1990).

A Lei Orgânica da Saúde nº 8.080/1990 define também a Vigilância Sanitária (VISA) como um conjunto de ações capaz de eliminar, diminuir ou prevenir riscos à saúde e de intervir nos problemas sanitários decorrentes do meio ambiente, da produção e circulação, abrangendo: 1 - o controle de bens de consumo que, direta ou indiretamente, se relacionem com a saúde, compreendidas todas as etapas de processo, da produção ao consumo; 2 - o controle da prestação de serviços que se relacionam direta ou indiretamente com a saúde (Brasil, 1990).

Já a Vigilância em Saúde Ambiental (VSA) é um conjunto de ações que proporciona o conhecimento e detecção de mudanças nos fatores determinantes e condicionantes do meio ambiente que interferem na saúde humana, com a finalidade de identificar as medidas de prevenção e controle dos fatores de risco ambientais relacionados às doenças ou outros agravos à saúde (Franco Netto et al., 2002). Para o desenvolvimento da VSA, alguns instrumentos e métodos de vigilância e controle

são necessários, como: Epidemiologia ambiental que utiliza os efeitos adversos à saúde relacionados à exposição a fatores de risco ambientais, além da avaliação e gerenciamento de risco; Indicadores de saúde e ambiente; Sistemas de Informação de Vigilância Ambiental em Saúde; e Estudos e pesquisas (Ministério da Saúde, 2002).

1.2 Águas Residuais

A água residual, também conhecida como efluente, é formada pelo conjunto de substâncias químicas, físicas e biológicas, gerado por atividades humanas. O esgotamento sanitário pode ser definido como o conjunto de atividade, infraestruturas e instalações operacionais de coleta, transporte, tratamento e disposição final dos esgotos sanitários, desde as ligações prediais até o seu lançamento final no meio ambiente (BRASIL, 2007).

Um relatório produzido pelo Fundo das Nações Unidas para a Infância (UNICEF) e pela Organização Mundial da Saúde (OMS) demonstrou que cerca de 3 bilhões de pessoas não possuem instalações básicas para a higienização pessoal, e 4,2 bilhões de pessoas possuem acesso a serviços de saneamento básico adequado. Os casos de precariedade no saneamento atingem especialmente as pessoas em situação de pobreza, e os avanços são lentos para estas regiões (WHO; UNICEF, 2022). À medida que a infraestrutura urbana aumenta, eleva-se a geração de resíduos sólidos e líquidos, que se não forem tratados de forma adequada, podem impactar a qualidade do meio ambiente além de afetar a saúde da população. O impacto do despejo inadequado de águas residuais nos corpos hídricos é uma questão crítica na maioria dos países que não possui serviços de saneamento básico adequado. Nesse sentido, se faz necessária a busca por tratamentos mais eficientes de águas residuais (Mello et al., 2020). Os processos utilizados para tratamento de água residual levam em conta as características da matriz a ser tratada, bem como o corpo hídrico onde ela será lançada após o tratamento (Carvalho, 2016).

As águas residuais são divididas em 3 grupos: industrial, hospitalar e doméstica. O industrial é proveniente das áreas de processamento industrial, incluindo os originados nos processos de produção, as águas de lavagem de operação de limpeza e outras fontes, que comprovadamente apresentem poluição por produtos utilizados

ou produzidos no estabelecimento industrial. As águas residuais hospitalares caracterizam-se como possíveis veículos de disseminação de inúmeros microrganismos patogênicos como vírus, bactérias, fungos, protozoários, que ocasionam muitas doenças com implicações em saúde pública (Carvalho, 2016). O doméstico é proveniente de residências, estabelecimentos comerciais, instituições ou edifício que dispõe de instalações de banheiros, lavanderias e cozinhas. Compõem-se de água de banho, excretas, papel higiênico, restos de comida, águas de lavagem, sabão e detergente (Funasa, 2018).

Enquanto isso, o processo de tratamento de água residual é classificado em quatro níveis: Preliminar, Primário, Secundário, Terciário. O nível preliminar tem como principal função a separação de sólidos, utilizando gradeamento. O nível primário assim como o preliminar, visa a retirada de partículas sólidas em suspensão por floculação e ação gravitacional, onde é gerado o lodo como produto (Von Sperling et al., 2014). No nível secundário, após os processos físicos dos dois níveis anteriores, ocorre um processo biológico, convertendo a matéria orgânica como em tanques de aeração. Também são utilizados reatores aeróbios com biofilme, com biofiltros aerados ou biodiscos, por fim, os sistemas de lodos ativados, que podem ser convencionais, de aeração prolongada ou de fluxo intermitente (Von Sperling et al., 2014). Algumas estações utilizam o reator biológico de leito móvel – (*Moving Bed Biofilm Reactor* – MBBR) que consiste em uma tecnologia de tratamento que emprega uma cultura de microrganismos retida dentro de um reator na superfície de material inerte. No processo aeróbio do MBBR o meio suporte para desenvolvimento do biofilme é aerado por meio da introdução de ar difuso. O reator MBBR vem ganhando popularidade devido sua estabilidade, tamanho compacto, eficiência na remoção de matéria orgânica, além da baixa produção de lodo (Melchior, 2019). O nível terciário é conduzido principalmente por processos físico-químicos. Nesse nível ocorre a retirada dos sólidos sedimentáveis e do material orgânico, onde visa a retirada de organismos patogênicos por desinfecção do efluente através de processos como cloração, ozonização, radiação ultravioleta e/ou desinfetantes químicos (Von Sperling et al., 2014).

Um processo de tratamento de água residual inadequado pode desencadear uma série de impactos ambientais, como os riscos de contaminação e transmissão de doenças, maus odores, mortalidade de peixes, toxicidade das algas, aumento da

complexidade e custos do tratamento de água. Em função destes impactos, o gerenciamento de águas residuais é um grande desafio (Kalbar et al., 2016).

As águas residuais podem conter diversos microrganismos que se não forem tratados adequadamente, podem entrar em contato de forma direta ou indireta com o ser humano. Entre esses organismos transmitidos pela via hídrica, podemos destacar bactérias e vírus, que por sua vez, podem sobreviver de maneira diferente, em relação as bactérias, quando submetidos ao tratamento em estações de tratamento de água residuais (ETARs) (Zhang et al., 2016). Um estudo realizado por Gundy e colaboradores (2009) investigou a sobrevivência do Sars-CoV-1 em águas residuais e revelou que a presença de sólidos suspensos e a matéria orgânica presentes na água, podem favorecer proteção ao vírus que se adere a estas partículas. O vírus se manteve detectável em águas residuais entre 2 e 3 dias. Alguns pesquisadores levantaram a possibilidade de que os sistemas de esgotamento sanitário podem atuar como vetores de microrganismos patogênicos causadores de coronavírus. No ano de 2003, a OMS emitiu um relatório onde constatou que um defeito na tubulação no sistema de esgotamento sanitário de um condomínio localizado em Hong Kong pode ter facilitado o transporte do SARS-CoV-1 através de encanamentos dos sanitários (Gormley et al., 2020).

1.3 Pandemia da COVID-19

No final de 2019, em Wuhan, na província de Hubei, República Popular da China, frequentadores de um mercado atacadista de animais, deram entrada em um hospital local com sintomas de pneumonia (Achak et al., 2021). Em 31 de dezembro de 2019 as autoridades chinesas enviaram um alerta à Organização Mundial da Saúde (OMS), informando que a pneumonia viral detectada, cuja causa ainda era desconhecida, precisavam de atenção. No dia 3 de janeiro, foram reportados 44 pacientes suspeitos de ter a doença e em 7 de janeiro de 2020, após o resultado do primeiro sequenciamento de genoma completo, foi revelada que o agente causador da doença é um novo coronavírus. Inicialmente, a OMS denominou o novo vírus como 2019-nCov (coronavírus). No dia 12 de fevereiro de 2020 a doença foi oficialmente nomeada como doença coronavírus 2019 (COVID-19). O Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus nomeou o vírus como Síndrome Respiratória Aguda Grave 2

(SARS-CoV-2) com base na taxonomia e filogenia (Farias et al., 2020; Wu, F. et al., 2020a).

A China registrou mais de 9 mil casos confirmados e 213 mortes até o dia 30 de janeiro de 2020. No dia seguinte os países começaram a controlar suas fronteiras e atividades internas. A COVID-19 foi considerada como uma emergência de saúde em escala global pela OMS no final de janeiro de 2020 (Grunig, G. et al., 2020). A disseminação global do SARS-CoV-2 e as milhares de mortes causadas pela COVID-19 levaram a OMS a declarar uma pandemia em 11 de março de 2020, no dia 13 a Europa se tornou o epicentro da doença. Em abril de 2020, o número de casos no mundo ultrapassou os 3 milhões, sendo distribuídos em 185 países (Casaca et al., 2020; Valdes et al., 2020).

A transmissão do SARS-CoV-2 ocorre através do ar, pelo contato direto com secreções como gotículas respiratórias e saliva, ou pelo contato indireto através de superfícies contaminadas (Morawaska et al., 2020). Com o avanço da doença, foi necessário aumentar as medidas de restrições ao redor do mundo como da implementação de práticas recomendadas com o intuito de diminuir o contágio da doença através da implementação de medidas de proteção, como a higiene pessoal, utilização de máscaras faciais, protetores oculares, desinfecção de superfícies e distanciamentos físicos, além da corrida pelo desenvolvimento de testes, tratamentos, vacinas e métodos de controle e rastreamento da doença (Li et al., 2020; Valdes et al., 2020; Ding Z. et al., 2021).

Em junho de 2020, o mundo ultrapassou 10 milhões de casos e 500 mil mortes por coronavírus, onde os Estados Unidos e o Brasil se tornaram os países com mais mortes. A Índia entrou para a lista dos países com um alto número de mortes registradas entre julho e agosto de 2020 (Silva et al., 2020; Gomes et al., 2020). O mundo registrou 33 milhões de casos e 1 milhão de mortes em setembro de 2020. Alguns países já enfrentavam a segunda onda da pandemia, no entanto, a maioria dos países ainda vivia a primeira onda (Leeb et al., 2020; Díaz-Pinzón, 2020). O mundo contabilizou mais de 162 milhões de casos confirmados, incluindo mais de 3 milhões de mortes pela doença em maio de 2021. Os países da América contribuíram com 40% dos casos e 47% das mortes em todo o mundo. Em junho de 2021, o mundo registrou mais mortes por COVID-19 do que todo o ano de 2020, sendo o Brasil e Índia os principais países a terem o maior crescimento nos números de mortes causadas

pela doença (Ribeiro et al., 2021). Até início de outubro de 2021, já havia acumulado cerca de 235 milhões de casos de COVID-19, os três continentes mais afetados foram: as Américas com 90 milhões, Europa com 70 milhões e na Ásia com 43 milhões (Dovbysh et al., 2021; Cardoso et al., 2021).

O avanço da pandemia e o surgimento de novas variantes do SARS-CoV-2 levaram à corrida para o desenvolvimento uma vacina. Em 31 de dezembro de 2020, a vacina desenvolvida pela Pfizer foi autorizada pela OMS para uso emergencial. Em seguida, em 15 fevereiro de 2021, a vacina AstraZeneca/Oxford, em 12 de março 2021 a vacina desenvolvida pela Janssen e em 30 de abril de 2021 a vacina da Moderna (Francis et al., 2022). Em 29 de maio de 2022, mais de 526 milhões de casos confirmados e mais de seis milhões de mortes foram relatadas globalmente. Entretanto, esses dados devem ser interpretados com cautela, pois vários países vêm mudando progressivamente as estratégias de teste de COVID-19, o que resulta em números gerais mais baixos de testes realizados e conseqüentemente menor número de casos detectados (WHO, 2022a). O segundo semestre de 2022(julho-dezembro) contabilizou mais de 111 milhões de casos da COVID-19 em todo o mundo (Mathieu, 2022)

1.4 COVID-19 no Brasil

No dia 26 de fevereiro de 2020, foi confirmado o primeiro caso da COVID-19 no Brasil. Posteriormente, o país apresentou um crescimento no número de casos nos meses subsequentes. Após a confirmação dos primeiros casos da doença no país, o Ministério da Saúde implementou medidas de prevenção e controle de transmissão do coronavírus, incluindo a lavagem das mãos com água e sabão; uso de álcool 70%; uso de máscaras foi implantado em abril de 2020 em locais fechados que logo em seguida foi sugerido o uso em todos os locais; e o distanciamento social (Oliveira et al., 2020). A pandemia provocou diversos desafios aos setores de administração pública nas cidades do Brasil, podendo destacar a manutenção do fornecimento de serviços essenciais à população, os serviços do Sistema Único de Saúde (SUS), telecomunicações, econômico, educação, energia elétrica e os serviços de saneamento (Capodeferro et al., 2020). A disseminação da COVID-19 no Brasil está

relacionada a diversos fatores incluindo a densidade urbana, demora no tempo de implementação de políticas de distanciamento social e baixa disponibilidade de testes (Monteiro de Oliveira et al., 2020).

O Brasil foi considerado o segundo país com o maior número de mortes por COVID-19. O país registou três ondas da doença desde o início da pandemia, a primeira em 2020, associada à linhagem B.1, B.1.1.28 e B.1.1.33, onde o país apresentou um pico entre o número de morte entre os meses de junho e julho, registrando quase 30 mil mortes (Martins-Filho et al., 2022). A segunda onda ocorreu entre março e abril de 2021 devido à disseminação da variante Gama (P.1), totalizando mais de 78 mil mortes. Até 10 de agosto de 2021 foram registradas mais de 564 mil mortes no país (Martins-Filho et al., 2022).

Entre a segunda metade de 2021 e o início de 2022 a variante Delta se disseminou e apesar disso, o país registou uma redução significativa nos números de casos e óbitos após a introdução da campanha de vacinação. A vacinação contra a COVID-19 tem sido uma das principais medidas para combater a pandemia no Brasil. Desde o início da campanha de imunização em janeiro de 2021, o país tem avançado na distribuição das doses para a população (Ministério da Saúde, 2022). De acordo com o Ministério da Saúde, até o momento, mais de 70 milhões de doses de vacinas já foram aplicadas no Brasil (Ministério da Saúde, 2022). Apesar dos avanços, ainda há desafios a serem superados na campanha de vacinação. A falta de confiança da população em relação às vacinas e a desinformação são obstáculos significativos na adoção da vacinação contra a COVID-19 (Domingues et al., 2021).

A terceira onda da pandemia da COVID-19 foi causada pela variante Ômicron no início de 2022, com de cerca de 3.500.000 casos registrados entre e 30 de janeiro a 26 de fevereiro de 2022 (Martins-Filho et al., 2022). Foram registrados mais de 31 milhões casos de COVID-19 com mais de 668 mil óbitos desde 3 de janeiro de 2020 e até o junho de 2022 foram distribuídas cerca de 430 milhões de doses da vacina contra a COVID-19 (WHO, 2022a). Foram contabilizados mais de 3 milhões de casos no país entre junho e dezembro de 2022 (Mathieu, 2022).

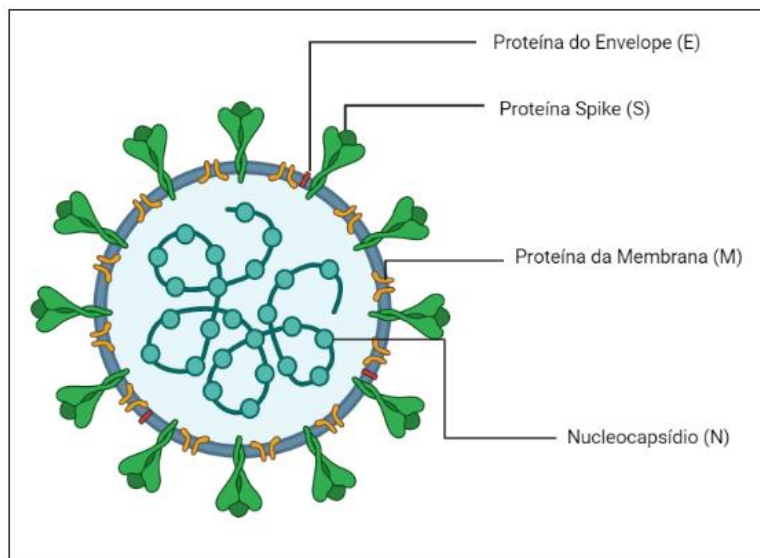
1.5 SARS-CoV-2

O SARS-CoV-2 pertence à família Coronaviridae, subfamília Orthocoronavirinae e gênero Betacoronavirus. Os coronavírus (CoVs) são vírus de ácido ribonucleico (RNA) de fita positiva, envelopados e com um genoma de cadeia única, considerados vírus com o maior genoma viral de RNA variando entre 26-30 kb, e infectam inúmeras espécies de animais, incluindo os humanos (Munster et al., 2020; Mordecai et al., 2020; Naqvi et al., 2020). De acordo com as características do genoma, o coronavírus é dividido em quatro gêneros: Alphacoronavirus, Betacoronavirus, Gamacoronavirus e Deltacoronavirus (Hong et al., 2020).

Existem sete coronavírus humanos (hCoV), incluindo dois alphacoronavirus (hCoV-229E e hCoV-NL63) e cinco betacoronavirus (hCoV-HKU1, hCoV-OC43, SARS-CoV, MERS-CoV e SARS-CoV-2). O SARS-CoV-2 foi recentemente identificado como o sétimo coronavírus a infectar humanos (Yang et al., 2015; Naqvi et al., 2020; Yang et al., 2020). Acredita-se que os coronavírus que infectam humanos surgiram devido ao transbordamento zoonótico a partir do contato direto ou indireto de animais infectados com os seres humanos (Rodriguez-Morales et al., 2020). O sequenciamento do genoma revelou que o novo coronavírus isolado de amostras do trato respiratório inferior de pacientes com COVID-19 pertence ao β -CoV (Betacoronavirus) de linhagem B assim como o SARS-CoV-1 (Naqvi et al., 2020; Yang et al., 2020; Zhu et al., 2020).

O genoma do SARS-CoV-2 possui quatorze fases de leitura aberta (ORF—*open-reading frames*): A ORF1a/b representa dois terços do genoma do SARS-CoV-2, a ORF1a codifica a poliproteína PP1a e a poliproteína PP1ab, que é resultado da tradução sobreposta de ORF1a e ORF1b. Ambas as poliproteínas (PP1a e PP1ab) são clivadas em 16 proteínas não estruturais (NSPs 1 a 16) (Kim et al., 2020; Finkel et al., 2021). As quatro proteínas estruturais principais são: a proteína *Spike* (S), relacionada à ligação ao receptor; proteína da membrana (M), define a forma do envelope viral; proteína do envelope (E), juntamente com a M formam o envelope viral estrutural essencial para patogenicidade e exibe importante função na produção e maturação viral; e a proteína do nucleocapsídeo (N), que é a proteína estrutural que se liga ao genoma viral atuando na formação completa do vírus (Figura 1) (Carvalho et al., 2021; Khailany et al., 2020; Wang, H. et al., 2020; Wu, A. et al., 2020).

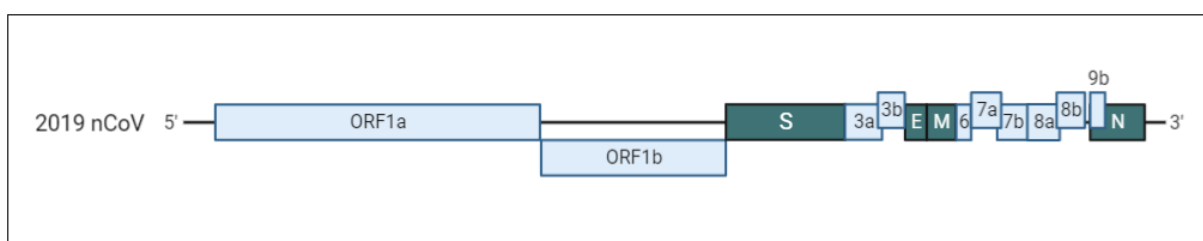
Figura 1. Representação esquemática do SARS-CoV-2



Fonte: Elaborada pela autora, 2022.

Além das proteínas estruturais, o SARS-CoV-2 contém 6 proteínas acessórias, codificadas pelos genes ORF3a/b, ORF6, ORF7a e ORF8, ORF10 e suas funções ainda são pouco exploradas. A maioria das proteínas codificadas por ORF1a e ORF1ab é essencial para a replicação do vírus e para a adaptação do vírus a um novo hospedeiro (Figura 2) (Wu, F. et al 2020).

Figura 2. Estrutura genômica do SARS-CoV-2



Fonte: Adaptada de PALACIOS CRUZ et al., 2021.

Além do Sars-CoV-2, outros dois coronavírus que infectam humanos causaram surtos em país da Ásia; a Síndrome Respiratória Aguda Grave (SARS-CoV-1) surgiu na China e causou mais de 8 mil infecções com mais de 900 mortes em 32 países no período de 2002–2004 (Magro et al., 2020), e a Síndrome Respiratória do Oriente Médio (MERS-CoV) surgiu na Arábia Saudita e causou epidemias em mais de 20

países desde 2012 (Algaissi et al., 2020). Assim como o SARS-CoV-1, o SARS-CoV-2 utiliza a enzima conservadora da angiotensina 2 (ECA2) como receptor para entrada nas células do hospedeiro. Apesar de infectar principalmente as células pulmonares, o vírus pode infectar o trato gastrintestinal, que também possui receptores ECA2 na mucosa intestinal devido a abundante expressão da enzima na superfície em seu endotélio (Xiao et al., 2020; Huang et al., 2020).

Apesar dos principais sintomas da COVID-19 serem caracterizados pela presença de febre, tosse seca, dispneia e perda do olfato, alguns estudos apontam que os pacientes podem apresentar sintomas relacionados ao trato gastrintestinal e relatam a presença do vírus em células epiteliais do trato gastrintestinal além da presença de seu RNA nas fezes que podem ser transportados de forma indireta para ambientes aquáticos e estações de tratamento de águas residuais (Kitajima et al., 2020; Xiao et al., 2020). Em 30 de março de 2020, o SARS-CoV-2 detectado em águas residuais na Holanda (Medema et al., 2020). Nas semanas seguintes, estudos da Austrália, China, Itália e Espanha, relataram a presença de SARS-CoV-2 em águas residuais (Ahmed et al., 2020; La Rosa et al., 2020; Randazzo et al., 2020; Zhang, D. et al., 2020).

1.6 Mutações virais

Desde o início da pandemia, análises genômicas do SARS-CoV-2 realizadas em vários países revelaram que o vírus sofreu diversas mutações. As mutações são eventos naturais da replicação viral, sendo mais frequentes em vírus que possuem o RNA como seu material genético. Isto ocorre em virtude de falhas que são geradas pelo sistema de reparo de erros de síntese da fita de RNA, durante a replicação viral (Fiocruz, 2021). Vírus como o SARS-CoV-2 pode sofrer mutações ao longo do tempo, essas mutações podem causar ou não algum impacto nas propriedades do vírus. Entretanto, algumas mutações podem conferir novas propriedades químicas às proteínas virais, resultando em mudanças na forma como o vírus se comporta nas infecções, além de influenciar a capacidade do vírus se espalhar e a gravidade da doença associada ao vírus, o desempenho de vacinas, e pode afetar também no diagnóstico da doença (Faria et al., 2021; WHO, 2022).

As mutações podem ocorrer em qualquer região do genoma do SARS-CoV-2 (Hirabara et al., 2022), no entanto, o surgimento de novas variantes foi atribuído principalmente as mutações na proteína S, que é proteína responsável pelo reconhecimento do alvo e pela entrada na célula do hospedeiro (Xia et al., 2021; Malik et al., 2021; Huang et al., 2020; Magazine et al., 2022). A proteína S compreende duas subunidades, S1 e S2 que desempenham papéis distintos durante processo de entrada na célula do hospedeiro: a subunidade S1 é responsável pelo reconhecimento e ligação do alvo, enquanto o S2 está envolvido na fusão da membrana. A subunidade S1 contém um domínio N-terminal (NTD) e um domínio C-terminal de ligação ao receptor (RBD). Os NTDs dos coronavírus estão relacionados a capacidade de facilitar a infecção através do reconhecimento de moléculas contendo açúcar, como glicoproteínas, embora o papel exato dessa ligação potencial seja debatido no contexto de SARS-CoV-2. O RBD reconhece e se ligar à ECA2 e é necessário para a fixação do vírus e entrada nas células hospedeiras (Ou et al., 2020; Abdel-Moneim et al., 2021). A subunidade S2 contém um subdomínio de peptídeo de fusão (PF), dois subdomínios de repetição heptada (HR1 e HR2), um subdomínio transmembranar e uma cauda C-terminal (Abdel-Moneim et al., 2021). As mutações na proteína S aumentam a afinidade do vírus pelo receptor celular do hospedeiro ou a quantidade de vírus eliminada durante o curso da infecção que podem estar associadas ao aumento da transmissão do vírus (Volzet al., 2021 Xia et al., 2021).

As variantes que têm recebido maior atenção científica e clínica são as que afetam as regiões da proteína Spike, uma vez que é onde ocorre a ligação aos receptores ACE2 e pode modificar seu impacto clínico, bem como sua capacidade de infecção e a possibilidade de transmissão. O surgimento de variantes, especialmente as que abrigam mutações na região RBD, são de grande preocupação, principalmente quanto à eficácia das vacinas e com a reincidência infecções relatadas e são consideradas variantes de importância clínica, epidemiológica e sanitária (Lauring et al., 2021; Tillett et al., 2021).

1.7 Variantes e linhagens virais

As variantes virais são o resultado de mutações que ocorrem durante a replicação viral. O SARS-CoV-2 sofreu diversas mutações desde sua descoberta

original em 2019 e a alta taxa de mutação está correlacionada com um aumento na capacidade de evolução, virulência aprimorada e sobrevivência, o que proporciona características benéficas para vírus (Corey, L et al. 2021). Os vírus tendem a sofrer mutações de acordo com a forma que se disseminam, podendo mudar suas características iniciais da cepa original. Quando a variante se dissemina rapidamente entre a população e em diferentes territórios, ela se torna uma linhagem, adquirindo novas características que podem torná-la mais infecciosa ou mais resistente às vacinas. Estas características podem aumentar a transmissão e dificultar o controle da doença (Butantan, 2022).

Os sistemas de nomenclatura estabelecidos para nomear e rastrear variantes e linhagens genéticas SARS-CoV-2 é realizada pelo GISAID, OMS, NextStrain e Pango. O surgimento de variantes no final de 2020 representou um alerta para a saúde pública global e levou à caracterização de Variantes de Preocupação (VOCs – sigla em inglês para *Variants of Concern*) e Variantes de Interesse (VOIs –sigla em inglês para *Variants of Interest*), a fim de priorizar o monitoramento e a pesquisa mundial, possibilitando a informar a resposta em andamento à pandemia de COVID-19 (WHO, 2022b).

São consideradas VOCs (Tabela 1 e 2) as variantes que possuem o aumento da transmissibilidade ou mudança prejudicial na epidemiologia do COVID-19; aumento da virulência ou alteração na apresentação clínica da doença; diminuição da eficácia das medidas de saúde pública e sociais ou diagnósticos, vacinas, terapêuticas disponíveis (WHO, 2022b).

Tabela 1. Variantes de preocupação circulantes

Identificação da OMS	Linhagem do Pango	Identificação Nextstrain	Registro mais antigo
Ômicron	B.1.1.529	21K, 21L, 21M, 22A, 22B, 22C, 22D	Vários países nov-2021
Ômicron	BF.7	22B	Jan-2022
Ômicron	BQ.1	22E	Fev-2022
Ômicron	BA.2.75	22D	Dez-2021
Ômicron	XBB	22F	Ago-2022

Fonte: Adaptado de Tracking SARS-CoV-2 Variants. WHO, 2022, disponível em: <https://www.who.int/en/activities/tracking-SARS-CoV-2-variants/>

Tabela 2. Variantes de preocupação circulantes anteriormente

Identificação da OMS	Linhagem do Pango	Identificação Nextstrain	Registro mais antigo
Alfa	B.1.1.7	20I (V1)	Reino Unido, set-2020
Beta	B.1.351	20H (V2)	África do Sul, maio- 2020
Gama	P.1	20J (V3)	Brasil, nov-2020
Delta	B.1.617.2	21A, 21I, 21J	Índia, out-2020

Fonte: Adaptado de Tracking SARS-CoV-2 Variants. WHO, 2022, disponível em: <https://www.who.int/en/activities/tracking-SARS-CoV-2-variants/>

As VOIs (Tabela 3) são variantes que possuem alterações genéticas previstas ou conhecidas por afetarem as características do vírus, como transmissibilidade, gravidade da doença, escape imunológico, escape diagnóstico ou terapêutico; é identificada através da comparação com a variante original, seu genoma possuir mutações que mudem o fenótipo do vírus e se tiver sido identificada como causadora de transmissão comunitária, de múltiplos casos ou de clusters (agrupamentos de casos) de COVID-19 ou tiver sido detectada em vários países, juntamente com o aumento do número de casos ao longo do tempo, ou outros impactos epidemiológicos aparentes que sugerem um risco emergente para a saúde pública global (WHO, 2022).

Tabela 3. Variantes de Interesse circulantes

Identificação da OMS	Linhagem do Pango	Identificação do Nexstrain	Registro mais antigo
Épsilon	B.1.427	21C	EUA, março-2020
	B.1.429		
Zeta	P.2	20 B	Brasil, abril-2020
Eta	B.1.525	21D	Vários países, dez-2020
Iota	B.1.526	21F	EUA, nov-2020
Lambda	C.37	21G	Peru, dez-2020
Mu	B.1.621	21H	Colômbia, jan-2021

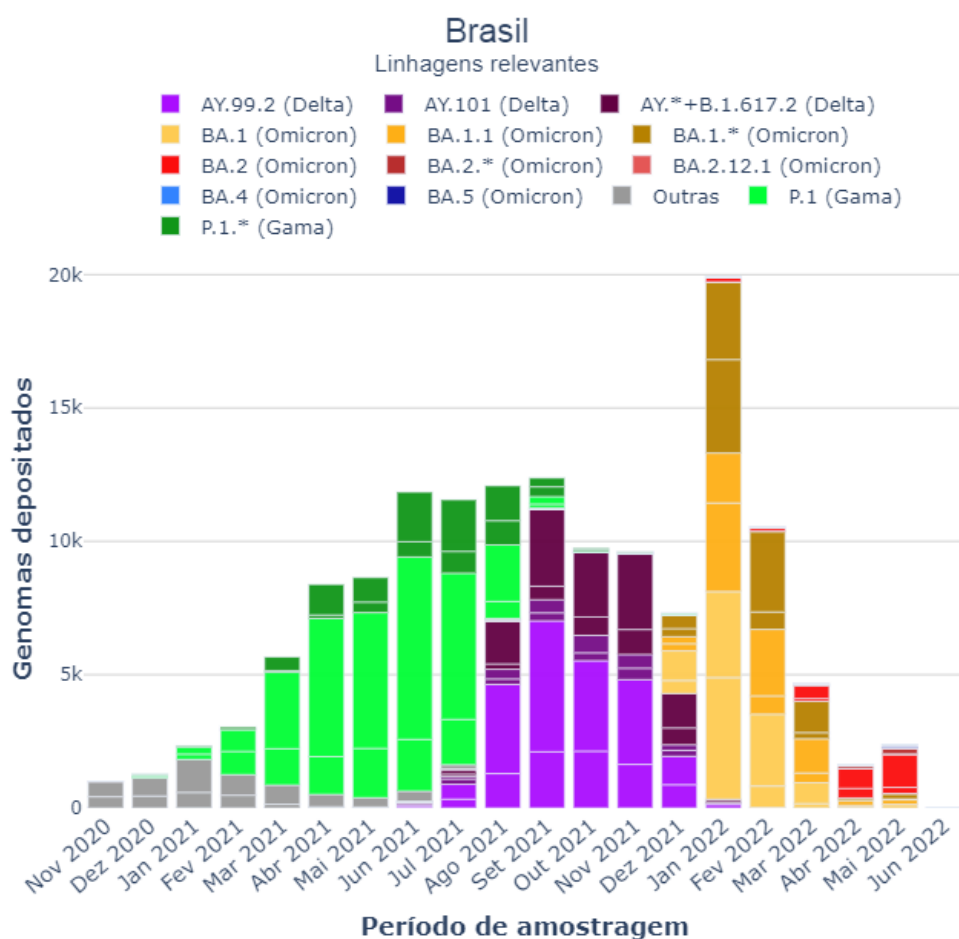
Fonte: Adaptado de Tracking SARS-CoV-2 Variants. WHO, 2022. Disponível em: <https://www.who.int/en/activities/tracking-SARS-CoV-2-variants/>

1.8 Disseminação de variantes no Brasil

O aumento de casos de COVID-19 no final de 2020 fez do Brasil o novo epicentro da pandemia de SARS-CoV-2. Segundo a Rede Genômica Fiocruz, foram registradas mudanças nas linhagens dominantes no Brasil. Inicialmente, a variante B.1 tornou-se a variante mais frequente detectada nos estudos de prevalência durante a primeira onda em 2020, especialmente aquelas que continham a mutação D614G na proteína Spike, principalmente as linhagens B.1.1.28 e B.1.1.33, que se mantiveram em circulação até novembro de 2020 (Candido et al., 2020). Após esse período, destaca-se a circulação de duas variantes de origem nacional, Gama (P.1) e Zeta (P.2), originadas da linhagem B.1.1.28, identificadas pela primeira vez em Manaus e no Rio de Janeiro, respectivamente, têm sido associados a alta as taxas de transmissão no país (Rede Genômica, 2022). Ambas as linhagens evoluíram dentro da linhagem B.1.1.28 carregando a mutação E484K no domínio de ligação ao RBD da proteína Spike. A variante P.1 também abriga as mutações N501Y e K417T na região RBD e ambas as mutações foram encontradas nas variantes preocupantes do Reino Unido (B.1.1.17) e África do Sul (B.1.351) (WHO, 2022; Magazine et al., 2022).

A variante de preocupação Gama também conhecida como P.1 ou GR/501Y.V3, foi identificada no final de 2020 no Brasil e se manteve predominantemente em circulação até julho de 2021. A variante Delta (B.1.617.2) foi registrada inicialmente em junho de 2021 e se manteve predominante até o final de 2021 (Rede Genômica, 2022; Faria et al., 2021). Em dezembro de 2021, a variante Ômicron (B.1) foi registrada pela primeira vez no país e a primeira morte causada pela variante foi relatada no dia 7 de janeiro de 2022 onde houve o aumento significativo no número de casos (Rede Genômica, 2022) (Figura 3).

Figura 3. Linhagens circulantes no Brasil de Nov-2020 a Jun-2022.



Fonte: Rede Genômica Fiocruz, 2022. Disponível: <http://www.genomahcov.fiocruz.br/dashboard/>

1.9 Vigilância Genômica

A Vigilância Genômica serve como uma ferramenta para detectar possíveis surtos epidemiológicos utilizando a determinação da variação genética, melhoramento de vacinas, investigação de gene resistência a antimicrobianos e a detecção de novos agentes patogênicos (Chan et al., 2013). Nos últimos anos foram desenvolvidos diversos estudos voltados a análises genômicas e desenvolvimentos de ferramentas capazes de processar os dados obtidos. No contexto da epidemiologia, a vigilância genômica foi proposta como ferramenta que integra dados genômicos com dados

clínicos e ambientais, capaz de modelar padrões de evolução e dispersão geográfica de agentes etiológicos de interesse (Nunes, 2022).

Com o início da pandemia e o surgimento de variantes do SARS-CoV-2, a comunidade científica passou a realizar o rastreamento e monitoramento de alterações genômicas presentes no vírus através da Vigilância Genômica (Cyranoski D, 2021). A vigilância é importante para intensificação das ações de monitoramento de casos e contatos visando conter a transmissão, bem como apoiar no conhecimento da dinâmica da COVID-19 (Ministério da Saúde, 2021). A implementação da vigilância foi impulsionada principalmente pela urgência em obter informações sobre o avanço da doença, além de compreender o surgimento de novas variantes virais através de estudos genômicos (Hu T. et al., 2021).

Em março de 2020 foi criada a Rede Genômica Fiocruz, onde reúne especialistas de todas as unidades da Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz) no Brasil e de institutos parceiros. A Rede inclui o Laboratório de Referência Nacional em vírus respiratórios junto ao Ministério da Saúde e de referência para a Organização Mundial da Saúde em COVID-19 nas Américas, está atuando ativamente na vigilância genômica do SARS-CoV-2 no Brasil (Fiocruz, 2020).

A implementação da vigilância genômica de SARS-CoV-2 no Brasil é extremamente necessária para entender a dinâmica de transmissão da COVID-19 no país. O município do Rio de Janeiro possui aproximadamente 6 milhões de habitantes (IBGE, 2022). O primeiro caso da COVID-19 neste município foi registrado no dia 5 de março de 2020 e até o presente momento foram registrados mais de 2 milhões de casos e mais de 74 mil mortes causadas pela doença (Brasil, 2022). Os dados gerados pela vigilância genômica no município do Rio de Janeiro vem avaliando a propagação de novas variantes circulantes e gerando dados valiosos no que se refere o acompanhamento da dinâmica de transmissão e disseminação dessas variantes no Rio de Janeiro.

1.10 Epidemiologia baseada em águas residuais (Wastewater Based Epidemiology — WBE)

O conceito denominado Epidemiologia Baseada em Águas Residuais (*Wastewater Based Epidemiology- WBE*), foi proposto pela primeira vez em 2001 (Daughton et al.,

2001) e foi implementado inicialmente em 2008 para estimar o abuso de drogas na comunidade, analisando a presença e concentração dessas substâncias em águas residuais (Zuccato et al., 2008). A WBE é uma metodologia bem estabelecida utilizada para monitorar vírus como os da hepatite A e E, poliovírus, astrovírus e norovírus (Farkas et al., 2020), e tem sido aplicado com sucesso na vigilância mundial de SARS-CoV-2 realizando o monitoramento de seu material genético presente em amostras de águas residuais (Ahmed et al., 2020; Sherchan et al., 2020).

A epidemiologia convencional depende muito de sintomas, amostras de excreção e do diagnóstico, o que é substancialmente difícil para a detecção de uma doença altamente infecciosa de um grande número indivíduos em tempo hábil, além da capacidade limitada de testes de diagnóstico em alguns locais e infecções assintomáticas que podem prejudicar o rastreamento da disseminação da COVID-19 (Lu et al., 2020). A forma mais comumente utilizada para detecção de SARS-CoV-2 é através da reação em cadeia da polimerase com transcriptase reversa em tempo real (RT-qPCR). Este ensaio tem a capacidade de detectar e quantificar o RNA do vírus em diferentes tipos de amostras (clínica e ambiental) (Ahmed et al., 2022). Entretanto, esta abordagem não fornece dados sobre a infecciosidade do vírus, levando em consideração que presença de fragmentos de RNA viral em águas residuais não implica necessariamente que o vírus está viável e estruturalmente intacto (Foladori, et al., 2022).

Além do monitoramento geral do número de indivíduos infectados pelo SARS-CoV-2 é necessário realizar o monitoramento genômico de variantes que circulam numa determinada comunidade para entender a dinâmica de sua transmissão e tomar as medidas de saúde pública apropriadas, especialmente quando as variantes começam a se espalhar de forma acelerada (Lu et al., 2020; Wurtz et al., 2021). A vigilância de variantes é conduzida principalmente usando sequenciamento do genoma de amostras da nasofaringe de pacientes infectados. Embora eficiente, possui uma problemática, uma vez que apenas genomas de pacientes sintomáticos que foram ao hospital ou a um laboratório para realizar um teste de triagem são analisados (Wurtz et al., 2021).

De acordo com Casanova et al. (2009); Hung (2004) e Leung et al. (2003), a secreção fecal de pacientes infectados pela SARS-CoV-1 levou à persistência do vírus no esgoto. Para esta consideração, uma atenção crescente foi relatada a fim de

destacar a presença e persistência do vírus em ambiente aquático. Pesquisas indicaram que a presença de SARS-CoV-2 em águas residuais foi confirmada por vários estudos em várias regiões (Tai et al., 2020; Green et al., 2020; Sharif et al., 2020). A sobrevivência do SARS-CoV-2 e sua transferência dos sistemas de águas residuais, especialmente unidades de doenças infecciosas, como hospitais, requerem investigação mais aprofundada. Alguns estudos relataram que a sobrevivência do SARS-CoV-2 pode ser influenciada por diferentes parâmetros como temperatura, pH, tempo de retenção, matéria orgânica, exposição à luz e organismos aeróbios, bem como pelas vias utilizadas para quantificação de vírus de RNA (Wang et al., 2005a; Rollemberg et al., 2020).

Devido à presença de SARS-CoV-1 nas fezes e águas residuais no passado (Cheng et al., 2004; Hung et al., 2004; Wang, et al., 2005b) e após o primeiro relato de caso da presença de SARS-CoV-2 nas fezes (Holshue et al., 2020), a comunidade científica começou a investigar a possibilidade de disseminação desse vírus no meio ambiente. A detecção do RNA de SARS-CoV-2 em águas residuais na Holanda, indicou que a vigilância de águas residuais é uma ferramenta sensível para avaliar a circulação do vírus nesses ambientes (Medema, et al., 2020). Apesar do material genético deste vírus ser encontrado em fezes, a via fecal-oral ainda não foi confirmada como uma possível rota de transmissão do vírus (Chernicharo et al., 2021; Ding, et al., 2020; Wu Y. et al, 2020; Zhang et al., 2020). Em resposta, a vigilância sanitária e a vigilância epidemiológica passaram a utilizar a detecção de SARS-CoV-2 em sistema de tratamento de águas residuais para estudar a dinâmica de disseminação deste vírus (Anand et al., 2021; Peccia et al., 2020). O aumento da circulação do vírus na população aumenta a carga viral nos sistemas de esgoto sanitários. É importante coletar informações sobre a ocorrência e o destino desse vírus nas águas residuais para entender se não há risco para os trabalhadores das estações de tratamento de esgoto, mas também para determinar se a vigilância desses efluentes poderia ser usada para monitorar a circulação do SARS-CoV-2 nas comunidades. Estes dados podem complementar a vigilância clínica atual, que se limita aos pacientes com COVID-19. A vigilância em águas residuais também pode servir como alerta precoce de reemergência de COVID-19 nas cidades, assim como a vigilância para poliovírus que tem sido usada para esse fim (Ahmed et al., 2020; Hellmér et al., 2014; Hovi T et al., 2012).

Os dados de vigilância clínica e ambiental podem ser combinados para criar modelos robustos a fim de estudar a dinâmica de infecção por COVID-19 e fornecer um alerta precoce para aumento das internações hospitalares. Portanto, a WBE pode se tornar uma ferramenta extremamente importante no gerenciamento da saúde pública durante e após a pandemia de COVID-19, capaz de obter informações epidemiológicas e sinalizando sobre possíveis fatores de risco para o meio ambiente e saúde pública (Cervantes-Avil et al., 2021).

2 Justificativa

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS) saneamento é o controle de todos os fatores do meio físico dos seres humanos que exercem ou podem exercer efeitos nocivos sobre o bem-estar físico, mental e social, ou seja, é um conjunto de ações sobre o ambiente que visam à salubridade ambiental na prevenção e controle de doenças, promoção de saúde e qualidade de vida (Who, 2018). A Lei Federal nº 11.445 de 2007, chamada de Lei Nacional do Saneamento Básico, estabelece as normas nacionais para a organização dos serviços de saneamento no país. A lei estabelece as diretrizes nacionais para o saneamento básico, tendo como alguns dos seus objetivos a qualidade infraestrutura e instalações operacionais de abastecimento de água, esgotamento sanitário, limpeza urbana, drenagem urbana, manejos de resíduos sólidos e de águas pluviais (Brasil, 2020).

O Projeto de Lei nº 4.162/2019 da Câmara dos Deputados gerou a Lei nº 14.026/2020, que determina as novas regras do novo marco regulatório de saneamento básico. O novo marco legal altera duas leis principais e outras leis correlatas, sendo as duas leis principais voltadas para a alteração do marco legal de saneamento de 2007, a Lei nº 11.445/2007, e a Lei nº 9.984/2000, que agora é atribuída a Agência Nacional de Águas e Saneamento Básico (ANA) (Brasil, 2020). Nos últimos dados sobre o saneamento no Brasil, constatou-se que cerca de 35 milhões de brasileiros não têm acesso ao serviço de abastecimento de água potável e quase 100 milhões de pessoas não possuem rede de esgotamento sanitário (Ministério da Saúde, 2021).

As condições de moradia, especialmente no que se refere a segregação socioespacial das moradias em periferia e nos bairros populares, implicam como um dos principais fatores para aumento de casos da Covid-19 no país, uma vez que a disseminação do vírus pode estar interligada à habitação precária, com uma elevada densidade populacional e às péssimas condições de infraestrutura urbana e sanitária (Macedo et al., 2020). O tratamento adequado de águas residuais é um passo importante para evitar a contaminação da água potável, especialmente em comunidades de baixa renda, onde não há acesso e disponibilidade de saneamento básico e o esgoto muitas vezes é despejado de forma irregular nos corpos hídricos.

Já foi comprovado que o coronavírus pode ser detectado em amostras de fezes e em estações de tratamento de águas residuais, contudo, a transmissibilidade do vírus de forma fecal-oral ainda não foi testada, levantando ainda mais a importância de ter o monitoramento nesses ambientes (Who, 2020; Nogueira et al., 2022).

Além do monitoramento de águas residuais, nenhuma medida específica foi identificada em termos de ampliação de acesso a serviços de esgotamento e instalações sanitárias durante o período de distanciamento social no Brasil. A falta de medidas ativas voltadas ao esgotamento sanitário e instalações, especialmente para aqueles que usam banheiros públicos e compartilhados, podem aumentar o risco de transmissão de doenças (UNICEF, 2020).

O SARS-CoV-2 pode apresentar manifestações graves, como fadiga, febre, tosse seca, mialgia e dispnéia, com sintomas menos comuns como a congestão nasal, dor de cabeça, coriza, dor de garganta, vômito e diarreia (Li et al., 2020). A detecção do RNA viral nas fezes de indivíduos sintomáticos e assintomáticos implica que o SARS-CoV-2 pode ser excretado pelas fezes e outras secreções corporais, e consequentemente transportada de forma indireta para ambientes aquáticos e estações de tratamento de esgoto (Kitajima et al., 2020; Xiao et al., 2020). Por este motivo, muitos cientistas se concentraram em encontrar uma detecção rápida e precisa do SARS-CoV-2 no meio ambiente, notadamente em águas residuais hospitalares, a fim de controlar seu desenvolvimento e determinar suas diferentes formas de transmissão. A detecção de SARS-CoV-2 em águas residuais pode ser um indicador eficiente, rápido e representativo para monitorar o surgimento e disseminação de novas variantes dentro de uma comunidade (Wurtz et al., 2021).

Um estudo recente sugere que pelo menos um terço das infecções por SARS-CoV-2 são assintomáticas, o que dificulta ainda mais a questão do monitoramento de variantes (Oran et al., 2021). A detecção de SARS-CoV-2 em águas residuais pode servir como ferramenta para monitorar a prevalência e a epidemiologia em determinada comunidade, auxiliando a compreensão da disseminação do vírus entre a população. Sendo assim, a vigilância sanitária e a vigilância epidemiológica baseada em águas residuais servem como uma abordagem complementar no rastreamento da circulação do vírus, proporcionando oportunidades de estimar sua prevalência, diversidade genética e distribuição geográfica, fazendo a comparação entre os genomas circulantes (Kitajima et al., 2020).

3 Objetivos

3.1 Objetivo Geral

Avaliar a diversidade genética de SARS-CoV-2 em duas estações de tratamento de águas residuais no município do Rio de Janeiro por meio da vigilância genômica ambiental

3.2 Objetivos Específicos

- Determinar a melhor metodologia de concentração e extração de SARS-CoV-2;
- Pesquisar a presença do RNA de SARS-CoV-2 em afluentes e efluentes de ETARs;
- Determinar as variantes de SARS-CoV-2 por meio do sequenciamento genômico;
- Avaliar a variabilidade genética, bem como, possíveis mutações e ou deleções ao longo do genoma viral.

4 Metodologia

4.1 Locais de Estudo

As coletas foram realizadas em duas Estações de Tratamento de Água Residual (ETAR) através de parceria pré-estabelecida (Tabela 4).

Tabela 4. Estações de Tratamento de Águas Residuais

ETAR	Localização	Tipo de Água Residual	Ponto de coleta	Período
ETAR1	Rio de Janeiro	Hospitalar	Entrada e Saída	Jan à Dez/ 2021
ETAR2		Mista		

A ETAR1 está localizada em um centro hospitalar na cidade o Rio de Janeiro. A estação possui um fluxo médio diário de efluentes brutos composto por água residual hospitalar. Possui um sistema de tratamento terciário, com tratamento biológico pelo processo *Moving Bed Biofilm Reactors* (MBBR) seguido por desinfecção com hipoclorito de sódio. Possui as seguintes unidades: gradeamento, tanque retentor de sólidos, reator MBBR, decantador secundário e desinfecção.

A ETAR2 está localizada em uma instituição de pesquisa na cidade do Rio de Janeiro. A estação possui um fluxo médio diário de efluentes brutos composto por uma mistura de águas residuais de laboratório e domésticas. A estação conta com o sistema de tratamento biológico a nível secundário com o processo de lodos ativados, variante aeração prolongada e possui as seguintes unidades: gradeamento, elevatória de esgoto bruto, desarenador, tanque de aeração, decantador secundário, elevatória de recirculação de lodo, tanque digestor e leitos de secagem.

4.2 Amostragem

Foram realizadas coletas semanais em duas ETARs, entre os meses de janeiro a dezembro/2021, onde foram coletados 500mL de cada ponto das estações (afluente e efluente), por meio de amostragem composta por alíquotas

de 50mL a cada 1 hora. As amostras foram transportadas sob refrigeração para o Setor de Archaea do Laboratório de Microrganismos de Referência do Departamento de Microbiologia no Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS) onde foram processadas em menos de 24 horas.

4.3 Concentração das amostras de águas residuais

Foram utilizadas duas metodologias de concentração viral: **Metodologia A** (membrana eletronegativa), onde as amostras foram filtradas e concentradas em membranas eletronegativas de porosidade 0,45 μ m e armazenadas em tubos de 1,5mL com adição 1mL de tampão salina-fosfato (PBS 0,1M, pH 7,2) (Ahmed, 2020b). **Metodologia B** (polietilenoglicol 8000), amostras foram filtradas em membrana de 0,22 μ m (Wu, 2020). Foi utilizada uma alíquota de 40mL do filtrado, onde foi adicionado 4g de PEG 8000 (8% w/v, Sigma) e 0,9g de Cloreto de Sódio (NaCl). As amostras foram homogeneizadas para dissolução dos solutos e então submetidas à centrifugação à 15.000G por 2 horas à 4°C. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o sedimento foi ressuspensão em 1mL de solução tampão salina-fosfato (PBS 0,1M, pH 7,2) (LU, 2020; WU, 2020).

4.4 Extração de RNA viral

4.4.1 Extração com Trizol

O RNA foi extraído utilizando Trizol seguindo será utilizado o protocolo descrito previamente por Huanca (2018), com modificações. Foi utilizado 200 μ L do produto da concentração com PEG 8000 e uma membrana eletronegativa. Em um tudo de 15mL foi adicionado 1,5mL de Trizol e homogeneizado vigorosamente por pelo menos 45 segundos. O conteúdo ressuspensão foi dividido em duas porções iguais e transferidos para microtubos. Foi adicionado 300 μ L de clorofórmio e o conteúdo foi homogeneizado e centrifugado em 12.000G por 15 min em 4°C. Após a centrifugação a fase aquosa foi retirada dos tubos e foram reunidas em um único tubo. Foi adicionado 600 μ L de isopropanol na fase aquosa e o tubo foi homogeneizado. As amostras foram incubadas em

temperatura ambiente por 15 minutos e centrifugadas à 12.000G por 10 minutos em 4°C. O sobrenadante foi descartado e foi adicionado 1mL de etanol 75% para lavar o pellet. Essa lavagem foi realizada mais uma vez após a centrifugação à 12.000G por 3 minutos em 4°C. O sobrenadante foi descartado e passou por secagem entre 5-10 minutos com tubo inclinado para retirar o excesso de etanol. Após essa etapa o pellet foi ressuspensão em 30µL água nuclease-free e deixar descansar em temperatura ambiente por 5 minutos antes de realizar etapas seguintes.

4.4.2 Extração com RNeasy Power Water Kit (Qiagen).

A membrana 0,45µm e 200µL do concentrado PEG foram utilizados para extração de RNA utilizando RNeasy Power Water Kit (Qiagen) de acordo com o fabricante (Ahmed et al., 2020; Lu, 2020; Wu, 2020).

4.4.3 Extração com Kit Bio Gene Extração de DNA/RNA Viral (Bioclin)

Foi utilizado 200µL do concentrado de PEG para realização da extração de RNA utilizando o kit Bio Gene Extração de DNA/RNA Viral (Bioclin). A extração foi realizada em um fluxo de 5 passos: 1. lise celular; 2. precipitação; 3. ligação; 4. lavagem e 5. Eluição; conforme o protocolo descrito pelo fabricante.

4.4.4 Avaliação da concentração e qualidade do RNA extraído

A concentração e a pureza do RNA extraído foram avaliadas no equipamento NanoDrop (NanoDrop Technologies, Inc., Wilmington, DE). Foram consideradas adequadas as concentrações de RNA acima de 30ng/µL com grau de pureza acima de 1,8 (Peccia et al., 2020).

4.5 Detecção de SARS-CoV-2 por RT-qPCR

Para a detecção de SARS-CoV-2 através da RT-qPCR foi utilizado o kit molecular SARS-CoV-2 (Biomanguinhos) para detecção do gene E utilizando os

iniciadores E_Sarbeco_F (5' - ACAGGTACGTTAATAGTTAATAGCGT - 3') e E_Sarbeco_R (5'- ATATTGCAGCAGTACGCACACA - 3') e a sonda E_Sarbeco_P1 (5' - FAM-ACACTAGCCATCCTTACTGCGCTTCG-BBQ - 3') (Corman et al., 2020). Amostras negativas para o gene E foram submetidas a RT-qPCR para amplificação do gene N1 utilizando iniciadores 2019-nCoV_N1 (5' GACCCCAAATCAGCGAAAT 3') e 2019-nCoV_N1-R (5' TCTGGTTACTGCCAGTTGAATCTG 3'), e sonda 2019-nCov_N1-P (FAM-ACCCCGCAT/ZEN/TACGTTTGGTGGACC-3IABkFQ) (CDC, 2020).

4.6 Sequenciamento do genoma viral e análise bioinformática

O genoma foi sequenciado na plataforma MiSeq no Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS) utilizando três protocolos: protocolo de sequenciamento genoma de SARS-CoV-2 estabelecido pelo Laboratório de Vírus Respiratórios e Sarampo do Instituto Oswaldo Cruz (Resende et al., 2020); Protocolo de sequenciamento QIAseq SARS-CoV-2; e CovidSeq (Illumina) (Bhojar et al., 2021). Os kits comerciais foram utilizados conforme descrito pelos fabricantes. As bibliotecas foram sequenciadas em cartucho do tipo V2-300 ciclos de acordo com os protocolos dos kits.

Após o sequenciamento, as sequências obtidas foram analisadas e anotadas utilizando o software Viralflow e Genome Detective 1.126. (Dezordi et al., 2022; Cleemput et al., 2020). Para a classificação da linhagem, o arquivo FASTA foi submetido a análise no NextClade (<https://clades.nextstrain.org>) e Pangolin (Phylogenetic Atribuição de Linhagens de Surtos Globais Nomeados) (<https://github.com/cov-lineages/pangolin>) (Rambaut et al., 2020; Cleemput et al., 2020). Para comparação de mutações encontradas nas amostras sequenciadas com as mutações características das variantes depositadas nos bancos de dados, foi utilizado o site (<https://outbreak.info/>) utilizado e recomendado pela OMS (WHO, 2022).

5 Resultados

5.1 Otimização da metodologia de concentração das amostras de águas residuais e extração de RNA viral

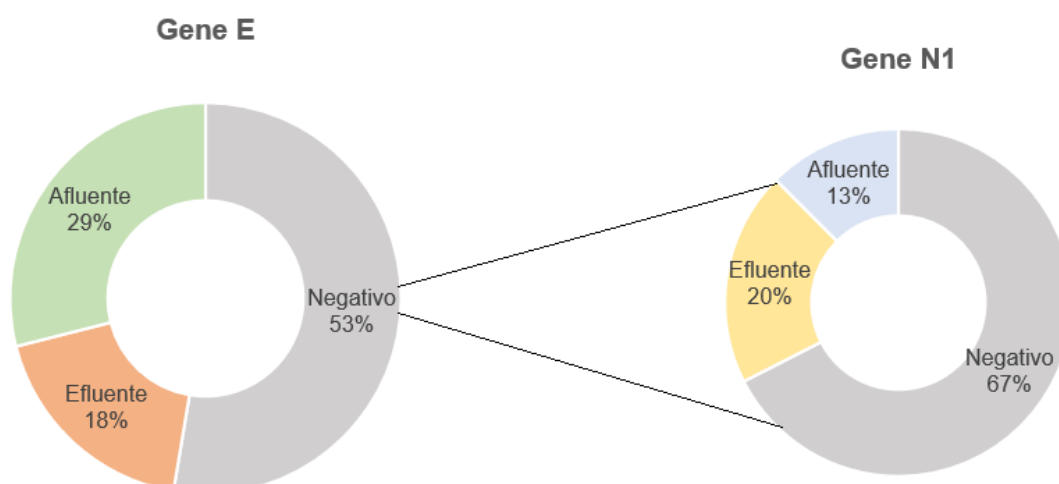
Durante o período de janeiro a dezembro/2021 foram realizadas coletas semanais, totalizando 152 amostras, 76 da ETAR1 (38 no afluente e 38 no efluente) e 76 (38 no afluente e 38 no efluente) da ETAR2. **A metodologia A**, foi utilizada de janeiro a junho/2021 e apresentou baixas concentrações e ou qualidade de RNA em todas as amostras analisadas, sendo assim, foi considerada insatisfatória para detecção do RNA viral. **A metodologia B** foi utilizada tanto nas amostras de janeiro a junho/2021, como nas amostras coletadas até dezembro/2021, apresentando resultados satisfatórios na concentração de RNA nas amostras. O kit Bio Gene Extração de DNA/RNA Viral (Bioclin) foi considerado o melhor kit de extração de RNA e apresentou o melhor desempenho.

5.2 Detecção do RNA viral

Na ETAR1, 47,4% (36/76) das amostras apresentaram o gene E (22 no afluente e 14 no efluente). As amostras negativas para o gene E (n=40), foram avaliadas quanto à presença do gene N1, onde 11,6% (13/40) das amostras da ETAR1 apresentaram o gene N1 (5 no afluente e 8 no efluente) (Figura 4).

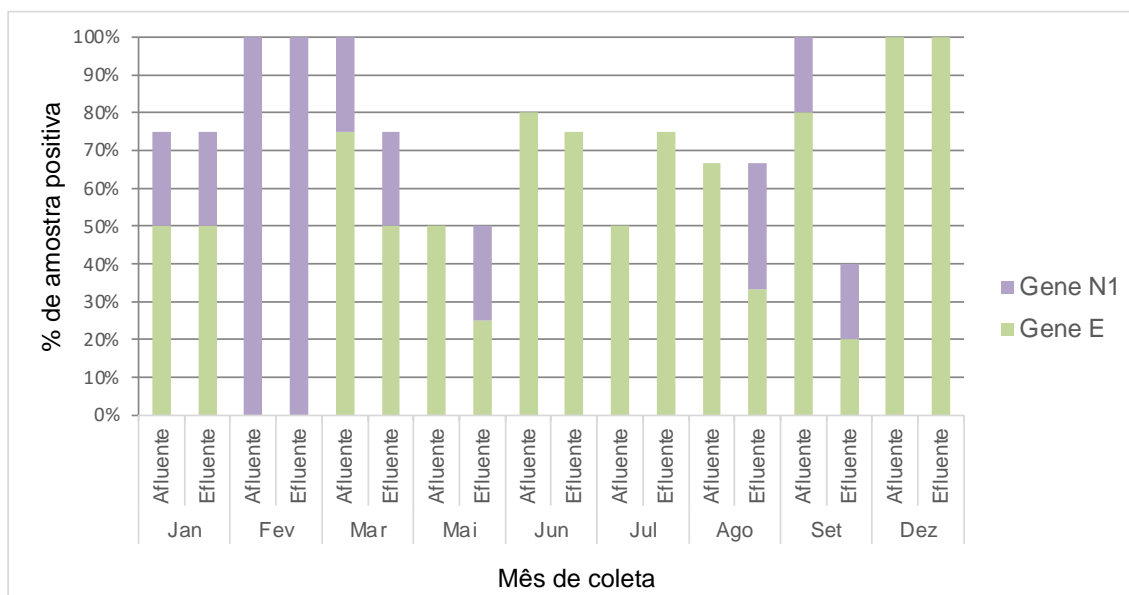
Já na ETAR2 apenas 5,3% (4/76) das amostras apresentaram o gene E de SARS-CoV-2. Por outro lado, nenhuma amostra apresentou o gene N1.

Figura 4. Porcentagem de amostras positivas e negativas na ETAR1.



Após a avaliação da presença de SARS-CoV-2, as amostras semanais da ETAR1 foram agrupadas de acordo com o mês de coleta. O SARS-CoV-2 foi detectado na entrada e na saída da ETAR1 durante todo o período do estudo (Figura 5).

Figura 5. Detecção de SARS-CoV-2 ao longo do ano de 2021 na ETAR1.



5.3 Sequenciamento de genoma viral

As 18 amostras mensais que apresentaram o gene E ou N1 foram sequenciadas e analisadas nos bancos de dados propostos. Não foi possível

recuperar nenhum genoma completo, entretanto foi possível identificar possíveis variantes presentes nas amostras por meio de análise de mutações em fragmentos de genomas de SARS-CoV-2 (Tabela 5).

Tabela 5. Resultado da análise de sequenciamento

Mês da coleta	Ponto de coleta	Variante sugerida pelos bancos de dados	Gene/Mutação
Janeiro	afluente	B XK B.1.1.176 B.1.1.228	ORF1a:M3269S, ORF1a:A3270T, ORF1a:F3271L, ORF1a:S3273D, ORF1a:V3388L ORF1b:A854R, ORF1b:Y954A ORF1a:G3002F, ORF1a:R3003T N:G137S, N:A138I, N:N140K, N:A156P, N:I157L, N:V158A, N:L159Q, N:L161R, N:Q163F, N:T165E, ORF9b:S50R, ORF9b:P51A, ORF9b:L52Q, ORF9b:S53G, ORF9b:L54P, ORF9b:N55Q, ORF9b:D66H
Fevereiro	afluente	B	N:A220K, N:L221
Março	afluente	P.1 (gama)	ORF1a:G3846P, ORF1a:G3848V
		B.1.402	ORF1a:L1457V, ORF1a:N1458L, ORF1a:L1459E, ORF1a:S1666G, ORF1a:I1667T, ORF1a:K1668G
		B.1.630	N:R185L, N:S187E, N:R191I
		B.1.618	N:A119S, ORF9b:Y42N
		XBJ (BA.2.3.20 e BA.5.2)	ORF1a:A1708S, ORF1a:N1709P, ORF1a:F1710A, ORF1a:C1711L
		AY.34.1.1 (Delta)	ORF1a: T609V, ORF1a: Q611P, ORF1a: W612S, ORF1a: L613K, ORF1a: T614K
		AY.22 (Delta)	ORF3a:G224C, ORF3a:S253P
Março	afluente	B	E:V24L, E:V47T, E:V49P, E:S50R, E:V52S, E:P54S, E:S55T, E:S67R, E:S68Q, E:R69G, E:V70Q, E:P71T, E:D72I, E:L74M, E:*76T
		XA (B.1.1.7 e B.1.177)	ORF1b:D249N, ORF1b:P314L, ORF1b:L379S, ORF1b:L380N
Março	efluente	B.1.561	S:V16G
Maio	afluente	B.1.22	ORF1a:A3610C, ORF1a:F3611V, ORF1a:L3612R, ORF1a:P3613G
		BF.24 (Ômicron)	ORF1a:D629L, ORF1a:W630G, ORF1a:E632L, ORF1a:K636A, ORF1a:E637*, ORF1a:G638V, ORF1a:V639G, ORF1a:E640Q

		XD (Delta + BA.1)	ORF1b:M592K, ORF1b:L593S, ORF1b:K594E, ORF1b:T595S, ORF1b:Y597*, ORF1b:D599S , ORF1b:E601V
		B.1.621 (M u)	S:E484K, S:N501Y
		B.1.409	ORF1a:S2433T, ORF1a:V2453G, ORF1a:N2454S, ORF1a:E2585D
Junho	afluente	B.1.619	ORF1a:K1529N, ORF1a:R1530F, ORF1a:G1531N
		B.1.469	ORF1b:K2557R
		P.1	ORF3a:S253P
		B.1.409	ORF1a:N2439G, ORF1a:G2440S, ORF1a:G2441C, ORF1a:K2442D, ORF1a:G2443T, ORF1a:C2452A, ORF1a:V2453G, ORF1a:N2454S
Junho	efluente	B	ORF1a:D4218G
Agosto	afluente	XBA (BA.2 + AY.45)	ORF7a:A106L, ORF7a:I107G, ORF7a:V108N, ORF7a:F109A, ORF7a:I110P, ORF7a:T111S, ORF7a:C113A, ORF7a:F114P, ORF7a:T115R, ORF7b:L6R, ORF7b:T40I
		AY.99 (Delta)	ORF1b:G662S
		B.1.1.413	ORF1b:Q1837*
		AY.32 (Delta)	ORF1a:V2930L
		AY.99.2 (Delta)	ORF1a:F1642*, ORF1a:L1643M, ORF1a:N1662S, ORF1a:G1663P, ORF1a:L1664V
Setembro	afluente	XD (Delta + BA.1)	N:D63G, ORF9b:T60A
Dezembro	afluente	XD (Delta + BA.1)	N:D63G, ORF9b:T60A, ORF8:S69L
		B	S:A1025D, S:A1026I, S:T1027S, S:K1028H, S:S1030Q, S:I1169V, S:S1170T, S:G1171*
		B.1.617.2	ORF1a:Y4227R, ORF1a:Y4229C, ORF1a:I4231*, ORF1a:K4232V, ORF1a:G4233*, ORF1a:L4234N
		XAA (BA.1+BA.2)	ORF1a:K856R, ORF1a:A903V
		BF.24 (Ômicron)	ORF1a:D629L, ORF1a:W630G, ORF1a:E632L, ORF1a:K636A, ORF1a:E637*, ORF1a:G638V, ORF1a:V639G, ORF1a:E640Q, ORF1a:V774S, ORF1a:E775T, ORF1a:P777S

XAW (BA.2 + AY.122)	ORF1a:A1306S
A.28	ORF3a:S171L, ORF3a:T170K
A.2.5	ORF1b:I623F, ORF1b:A625R, ORF1b:L627F, ORF1b:T634P, ORF1b:C636F, ORF1b:S638F, ORF1b:L639R, ORF1b:S640H, ORF1b:H641K, ORF1b:R642N
XBA (BA.2 + AY.45)	M:I82T
BA.5.2.41 (Ômicron)	ORF1a:S2661H, ORF1a:D2662L
B.1.398	ORF1a:Y3822*, ORF1a:M3823*, ORF1a:N3824F, ORF1a:V3870A
AY.33.1 (Delta)	ORF1b:H1807R, ORF1b:F1764L

Genes/Mutações marcadas em vermelho representam mutações características de variantes depositadas em bancos de dados (<https://outbreak.info/>); Variantes de Preocupação (marcadas em amarelo); Variante de Interesse (marca em azul).

6 Discussão

Durante a pandemia de COVID-19, a epidemiologia baseada em águas residuais (WBE) tornou-se uma ferramenta eficaz no monitoramento de SARS-CoV-2, levando em consideração que o RNA do SARSCoV-2 pode ser detectado em fezes de indivíduos sintomáticos e assintomáticos. Desta forma, o vírus pode atingir as redes de esgotamento sanitário e pode ser posteriormente detectado em estações de águas residuais (Sherchan et al., 2020; Kitajima et al., 2020). WBE pode promover dados de forma rápida e econômica com sensibilidade para detectar o RNA do SARS-CoV-2, além de fornecer informações precoces e atuar como um sistema de alerta sobre a circulação da COVID-19 em uma comunidade, permitindo que as autoridades locais possam monitorar a disseminação da doença e tomar medidas de saúde pública eficazes para gerenciar possíveis surtos (Ahmed et al., 2022; Dzinamarira et al., 2022). Para isso, é necessário o desenvolvimento e aplicação de métodos eficazes na concentração e detecção de SARS-CoV-2 de águas residuais, que é identificado como uma necessidade chave na pesquisa da WBE (Ahmed et al., 2020).

Muitas técnicas utilizadas para monitoramento de vírus em ambientes aquáticos foram desenvolvidas para a concentração de vírus entéricos não envelopados, cuja fisiologia e estruturas virais se diferem significativamente dos vírus respiratórios envelopados, como o SARS-CoV-2 (Philo et al., 2021). Anteriormente, Cashdollar e Wymer (2013) avaliaram que métodos de absorção e eluição, incluindo a filtração em membrana eletronegativa foram eficazes na concentração de vírus não envelopados, no entanto, não foram eficientes na recuperação de vírus envelopados. No presente estudo, a concentração com PEG8000 apresentou resultados superiores em relação à filtração em membrana eletronegativa na concentração e detecção de SARS-CoV-2, em conformidade com outros estudos, onde essa concentração também foi eficaz na recuperação de vírus envelopados em amostras de águas residuais (Ahamed et al., 2020; Kumar et al., 2020; Torii et al., 2021). Além disso, Hata e colaboradores (2021) também revelaram alta eficiência na recuperação de partículas virais sinalizando a ausência de perda substancial de SARS-CoV-2 durante a precipitação de PEG8000.

O desenvolvimento e aplicação de métodos de concentração de vírus contribuíram significativamente para a detecção viral a partir de cultura de células e ou ensaios moleculares (Torii et al., 2021). O avanço de abordagens moleculares, como a transcriptase reversa seguida pela reação em cadeia da polimerase (RT-qPCR) permitiu obter informações sobre a presença de vírus em diferentes ambientes, incluindo águas residuais (Haramoto et al., 2018). É importante ressaltar que muitos ensaios foram desenvolvidos para amostras clínicas e desta forma, podem apresentar resultados falso negativos quando realizados em efluentes, pois estes ambientes podem conter inibidores além serem enriquecidos com muitos outros vírus (Ahamed et al., 2022). Apesar de não haver um consenso sobre os melhores alvos para a RT-qPCR, a detecção de SARS-CoV-2 vem sendo realizada a partir dos genes N, E, ORF, M e S, de acordo com iniciadores e especificações propostos pelo CDC da China e dos EUA e do Charité Institute of Virology, Universitätsmedizin Berlin (Vogels et al., 2020; Corman et al., 2020, CDC 2020).

No presente estudo, a presença de SARS-CoV-2 foi detectada pela busca dos genes E e N1. Embora o gene E tenha sido detectado em número maior de amostras, não é possível afirmar que o gene N1 foi menos eficiente, uma vez que foi testado apenas nas amostras negativas para o gene E (Figura 4). O ensaio sugerido pelo CDC/ EUA utilizando a detecção do gene N1 superou o ensaio proposto pelo Instituto Charité de Berlin que utiliza o gene M em ensaios direcionados da detecção de SARS-CoV-2 de águas residuais na Espanha (Kim et al, 2020; Perez-Catalunset al., 2021). Por outro lado, um outro estudo realizado por Corman e colaboradores (2020) relatou que as análises utilizando o gene E foram superiores as análises utilizando o gene N. Os resultados do estudo de Zhang e colaboradores (2020) em amostras clínicas sugeriram que o principal fragmento positivo foi o gene N, e a proporção daqueles positivos para a ORF1ab foi relativamente baixa. Durante o processo de monitoramento viral, foi observado que a detecção dos genes ORF1ab e N poderia ser substituída apenas pela detecção do gene N. Os resultados do último teste positivo de ácido nucleico foram os mesmos em todos os pacientes que preencheram os critérios de alta (Zhang et al.,2020). Recentemente, Wang e colaboradores (2020) relataram que a variação de nucleotídeos foi mais frequente em ORF1ab do que no gene N. Além disso, as variações de nucleotídeos entre as sequências de iniciador/sonda publicadas e as sequências de referência também foram mais

frequentes em ORF1ab do que em N (Wang et al., 2020). Assim, o fato de o gene N ter menos variação de nucleotídeos que o ORF1ab pode tornar a detecção do gene N mais estável do que a do ORF1ab, o que poderia explicar em parte porque o gene N, em vez do ORF1ab, foi detectado com mais frequência nos resultados do último teste positivo (Wang C. et al., 2020; Zhang X. et al., 2020). Sendo assim, diferentes autores relatam a importância de analisar o desempenho da RT-qPCR utilizando diferentes alvos, podendo minimizar o potencial de resultados ambíguos e a falha na detecção do RNA viral (Corman et al., 2020; Albastaki et al., 2021; Bivins et al., 2021).

Um aspecto relevante em relação à concentração viral presente nas nossas amostras de águas residuais, pode estar relacionada aos diferentes processos de tratamento utilizados nas ETARS. No presente estudo, foi possível detectar SARS-CoV-2 na ETAR1 durante todos os meses analisados de 2021 (Figura 5). Esta estação recebe descarga unicamente de água residual hospitalar e realiza tratamento terciário utilizando MBBR seguido por desinfecção com hipoclorito de sódio. Embora o tratamento utilizando MBBR seja considerado um procedimento eficiente na redução do RNA do SARSCoV-2, ele não garante que remoção completa dos fragmentos do RNA viral, o que possibilita sua detecção (Kostytsia et al., 2022). Já a ETAR2, que apresentou SARS-CoV-2 somente no mês de janeiro/2021 recebe esgoto sanitário misto e tratamento secundário, onde há formação de lodo, podendo levar a baixa concentração do RNA na parte líquida e alta concentração na parte sólida. Westhaus e colaboradores (2021), revelaram que o RNA do SARS-CoV-2 foi detectado no lodo, enquanto a fase aquosa foi negativa, sugerindo que uma possível adesão de partículas virais aos sólidos decantados. É importante ressaltar que a detecção do vírus está correlacionada com a prevalência do número de casos de infecção pela COVID-19 em determinado local (Medema et al, 2020). Esses aspectos associados ao decreto do “lockdown” em 2021 e início da vacinação contra COVID-19, provavelmente contribuíram para a acentuada redução de detecção de SARS-CoV-2 nas amostras da ETAR2.

Os efeitos da diluição do RNA viral em águas residuais, em grande parte devido à mistura com outros fluxos de águas residuais, infiltração de águas pluviais, variação no tempo do sistema de coleta da amostra, também podem afetar a probabilidade de detectar o RNA do SARS-CoV-2 (Ahmed et al., 2020). Além disso, apesar de vírus possuir a capacidade de se manter no ambiente aquático ao se aderirem a sólidos

suspensos no ambiente, fatores como temperatura, alteração de pH e presença de outros microrganismos, também podem afetar a detecção viral (Rollemberg et al., 2020). Foram realizadas diferentes abordagens de concentração e extração de RNA das nossas amostras, onde foi necessário realizar descongelamentos sucessivos, o que pode ter interferido na integridade do material genético das nossas amostras. Um estudo realizado por Steele e colaboradores (2021), revelaram que o armazenamento de amostras de águas residuais em temperaturas de congelamento e descongelamento pode levar à degradação do RNA do SARS-CoV-2, influenciando na possibilidade de erros e possíveis falso-negativos na RT-qPCR. Além disso, um estudo relatou a perda de aproximadamente 90% da concentração de RNA do SARS-CoV-2 após armazenamento a -80 °C por uma semana, sugerindo que as condições de armazenamento são importantes e contribuí na qualidade da concentração do RNA presente nas amostras (Weidhaas et al., 2020; Ahmed et al., 2022).

A genética e a evolução viral têm sido os principais temas investigados desde o primeiro genoma do Sars-CoV-2 publicado, o que impulsionou a investigação do genoma viral por meio de sequenciamento (Zhu et al., 2020). Os dados gerados a partir do sequenciamento genômico das amostras da ETAR1, não resultaram na recuperação de genomas completos. No entanto, foi possível identificar algumas mutações características de diferentes variantes de SARS-CoV-2 a partir de análises em banco dados (Tabela 5). É necessário considerar que o RNA do SARS-CoV-2 presente em águas residuais pode estar inserido à um conjunto complexo de RNA genômico das variantes circulantes em uma determinada comunidade. Esse RNA pode estar presente em capsídeo viral intacto ou fragmentado no ambiente, podendo inviabilizar a recuperação dos genomas (Wurtzer et al., 2021; Robinson et al., 2022). Por outro lado, uma amostra clínica pode conter numerosas cópias do RNA de uma determinada variante do SARS-CoV-2. Devido à complexidade do RNA do SARS-CoV-2 de águas residuais, a presença de uma única mutação característica nesses ambientes, pode não indicar definitivamente que uma variante está presente, considerando que uma variante pode ser definida pela presença de múltiplas mutações em um único genoma. Desse modo, a detecção de mutações características de uma variante específica em águas residuais nos permite apenas sugerir a presença da variante, considerando que essas mutações podem ter origem em genomas diferentes (Wolfe et al., 2022).

No presente estudo, foi possível detectar mutações sugestivas das variantes VOCs Delta, Gama e Ômicron. A variante P1 (Gama) foi detectada em genomas de amostras clínicas de dezembro de 2020 a agosto de 2021 (Fiocruz, 2021). No entanto, essa variante só foi detectada na ETAR1 nos meses de março e junho de 2021, período em que foi verificado o aumento no número de depósito de genomas clínicos na Rede Genômica da Fiocruz (Fiocruz, 2021). A variante AY.99.2 (Delta) foi revelada em agosto de 2021 (Tabela 5), e no período em que foi observado um aumento de depósito de genomas de amostras clínicas na rede genômica da Fiocruz (Rede Genômica, 2022). Lamarca e colaboradores (2022) revelou que mais 98% das sequências de genomas clínicos do estado do Rio de Janeiro originaram-se de um único evento introdutório da linhagem AY.99, que divergiu em linhagens AY.99.1 e AY.99.2, entre maio e junho de 2021. Ambas as linhagens se espalharam pelo estado a partir deste ponto, com AY.99.2 sendo dominante. A linhagem foi predominante, principalmente entre os meses de julho e agosto de 2021 (Lamarca et al., 2022). Uma outra variante Delta, AY.32 detectada em água residual, em agosto apresentou a mutação ORF1a:V2930L, descrita como mutação característica pela OMS (WHO, 2022). Além da variante Delta AY.32, outras variantes Delta, Mu, B.1.618, B.1.469, XD (variante recombinante Delta + BA.1) e XBA (Tabela 5) também apresentaram mutações características de variantes definidas pela OMS.

Um outro dado significativo foi a detecção de uma possível variante B.1.621 (Mu) contendo mutações características descritas pela OMS (S:E484K, S:N501Y) na entrada da ETAR1, em maio de 2021. Em junho de 2021, uma variante B.1.621, com as mesmas mutações, recuperada de amostra clínica teve seu genoma depositado no banco de dados GISAID. É importante ressaltar que a amostra da ETAR1 é oriunda do mesmo hospital onde foi detectada a variante B.1.621 depositada do GISAID. Estes dados nos permitem sugerir que essa variante estava presente nas águas residuais um mês antes de ser detectada na amostra clínica. Assim como no presente estudo, Karthikeyan e colaboradores (2022) detectaram a variante B.1.621 por meio da vigilância genômica de águas residuais aproximadamente 4 semanas antes de sua primeira detecção por meio da vigilância genômica clínica. Foi possível detectar mutações sugestivas da variante Ômicron em maio/2021 em nossas amostras de águas residuais, a variante em questão só foi detectada em amostras clínicas no Brasil em dezembro de 2021 (Butantan, 2021).

A evolução contínua do SARS-CoV-2 e o aparecimento de variantes preocupantes (VOC), como a Ômicron VOC destacam a importância de se manter uma vigilância ativa para o surgimento de novas variantes inesperadas (Martin et al., 2021; Callaway et al., 2021). O fato das origens e a disseminação inicial das VOCs Alpha e Ômicron não terem sido observadas justifica os esforços para detecção e monitoramento de novas variantes (Herold et al., 2021). No entanto, conforme dito anteriormente, o sequenciamento completo do genoma do SARS CoV-2 RNA isolado de águas residuais geralmente sofre de baixa profundidade de cobertura de sequenciamento em áreas epidemiologicamente relevantes do genoma, como o domínio de ligação do receptor Spike (RBD) (Swift et al., 2021; Fontenele et al., 2021). Além disso, como as águas residuais podem conter uma mistura de linhagens virais e o sequenciamento completo do genoma depende do sequenciamento de pequenos fragmentos do genoma, estratégias computacionais para identificar variantes com mutações ligadas muitas vezes falham em identificar linhagens presentes em baixas concentrações (Baaijens et al., 2021). Para resolver essas questões, pesquisadores desenvolveram uma abordagem de sequenciamento “direcionada” que amplifica e sequênci a região RBD da proteína Spike do genoma do SARS-CoV-2 como um único fragmento (Smyth et al., 2022; Gregory et al., 2021). A região RBD é relevante para a infecciosidade, transmissão e neutralização mediada por anticorpos do SARS-CoV-2, com isso, a aplicação dessa abordagem pode garantir que o RBD receba alta cobertura de sequenciamento. Um estudo recente descreveu um conjunto de linhagens desconhecidas de vários locais nos Estados Unidos. Enquanto as águas residuais apresentam suas próprias linhagens, o estudo apresentou evidências de que algumas linhagens poderiam compartilhar o mesmo ancestral comum (Gregory et al., 2022). É importante ressaltar que no presente estudo também foram reveladas linhagens desconhecidas não relatadas em amostras ambientais e ou clínicas em banco de dados globais, apesar de algumas dificuldades e limitações na anotação e interpretação dos genomas de SARS-CoV-2. Um outro estudo, também utilizando essa mesma abordagem, demonstrou que as frequências de variantes nessas águas residuais, acompanharam de perto as estimativas de frequência de VOCs a partir de amostragem clínica nas mesmas áreas (Gregory et al., 2021; Smyth et al., 2022). Porém, em alguns locais, foi demonstrada a presença de linhagens desconhecidas não observados em amostras clínicas em qualquer parte do mundo. Várias dessas

linhagens continham substituições de aminoácidos raramente relatadas em bancos de dados globais, como GISAID (por exemplo, N460K, Q493K, Q498Y e N501S) (Smyth et al., 2022). Alterações na circulação de VOCs de SARS-CoV-2 podem exigir mudanças nas respostas da saúde pública à pandemia de COVID-19, pois têm o potencial de escapar de vacinas e intervenções farmacêuticas e podem ser mais transmissivas do que outras variantes do SARS-CoV-2. Como tal, é essencial rastrear e prevenir sua propagação em comunidades suscetíveis (Wurtz et al., 2021).

Os dados obtidos no presente estudo nos permitem sugerir que a vigilância genômica de Sars-CoV-2, por meio da epidemiologia baseada em águas residuais, pode ser considerada uma abordagem promissora e inovadora capaz de fornecer informações importantes sobre a persistência do vírus em amostras ambientais, além de possibilitar a investigação do surgimento e circulação de variantes antes mesmo da revelação das mesmas em pacientes infectados pela COVID-19.

7 Conclusão

Os dados obtidos no presente estudo nos permitiram concluir que:

- Dentre as abordagens adotadas para precipitação e recuperação de RNA viral, a que se baseia na utilização de polietilenoglicol (PEG8000) demonstrou melhor desempenho na concentração do vírus nas amostras de esgoto sanitário das ETARs analisadas.
- Com base nos resultados obtidos na detecção do RNA de SARS-CoV-2 concluímos ser recomendável analisar o desempenho da RT-qPCR utilizando diferentes alvos, com objetivo de minimizar o potencial de resultados ambíguos e a falha na detecção do RNA viral.
- A detecção de uma possível variante B.1.621 (Mu) um mês antes mesma variante ser recuperada de amostra clínica, demonstra a importância dessa ferramenta na investigação do surgimento e circulação de variantes antes mesmo da revelação das mesmas em pacientes infectados pela COVID-19.
- A vigilância genômica de águas residuais ainda é tecnicamente desafiadora, considerando baixas cargas virais, RNA altamente fragmentado e inibidores de PCR em amostras ambientais complexas que dificultam o sequenciamento. Além disso, ferramentas para classificação de variantes de SARS-CoV-2 nos bancos de dados, foram projetadas para amostras clínicas e o que dificulta a estimativa de abundâncias relativas das variantes em amostras mistas, como águas residuais.
- A epidemiologia baseada em águas residuais, pode ser considerada uma abordagem promissora e inovadora capaz de fornecer informações relevantes sobre o monitoramento de vírus em amostras ambientais, além de possibilitar a investigação do surgimento e circulação de variantes antes mesmo da revelação das mesmas em pacientes infectados pela COVID-19.

8 Referências

ABDEL-MONEIM, A. S.; ABDELWHAB, E. M.; MEMISH, Z. A. Insights into SARS-CoV-2 evolution, potential antivirals, and vaccines. **Virology**, v. 558, p. 1–12, jun. 2021.

ACHAK, M. et al. SARS-CoV-2 in hospital wastewater during outbreak of COVID-19: A review on detection, survival and disinfection technologies. **Science of The Total Environment**, v. 761, p. 143192, mar. 2021.

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, p. 139960, out. 2020.

AHMED, W. et al. 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, p. 138764, ago. 2020.

AHMED, W. et al. Minimizing errors in RT-PCR detection and quantification of SARS-CoV-2 RNA for wastewater surveillance. **Science of The Total Environment**, v. 805, p. 149877, jan. 2022.

ALBASTAKI, A. et al. First confirmed detection of SARS-COV-2 in untreated municipal and aircraft wastewater in Dubai, UAE: The use of wastewater based epidemiology as an early warning tool to monitor the prevalence of COVID-19. **Science of The Total Environment**, v. 760, p. 143350, mar. 2021.

ALGAISSI, A. A. et al. Preparedness and response to COVID-19 in Saudi Arabia: Building on MERS experience. **Journal of Infection and Public Health**, v. 13, n. 6, p. 834–838, jun. 2020.

ANAND, U. et al. A review of the presence of SARS-CoV-2 RNA in wastewater and airborne particulates and its use for virus spreading surveillance. **Environmental Research**, v. 196, p. 110929, maio 2021.

BAAIJENS, J. A. et al. **Variant abundance estimation for SARS-CoV-2 in wastewater using RNA-Seq quantification**. *Epidemiology*, 2 set. 2021. Disponível em: <<http://medrxiv.org/lookup/doi/10.1101/2021.08.31.21262938>>. Acesso em: 27 jan. 2023.

BHOYAR, R. C. et al. An optimized, amplicon-based approach for sequencing of SARS-CoV-2 from patient samples using COVIDSeq assay on Illumina MiSeq sequencing platforms. **STAR Protocols**, v. 2, n. 3, p. 100755, set. 2021.

BIVINS, A. et al. Variability in RT-qPCR assay parameters indicates unreliable SARS-CoV-2 RNA quantification for wastewater surveillance. **Water Research**, v. 203, p. 117516, set. 2021.

BRASIL, **Instituto Trata**. Ranking do Saneamento Básico 2021. São Paulo: Go

Associados, 2021. 131 p.

BRASIL. **Coronavírus Brasil**. Disponível em: <<https://covid.saude.gov.br/>>. Acesso em: 10 jun. 2022

BRASIL. **Lei nº 11.445, de 5 de janeiro de 2007**. Estabelece as diretrizes nacionais para o saneamento básico [...]. Brasília, DF: Presidência da República, 2020a. Disponível em: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2007-2010/2007/lei/l11445.htm. Acesso em: 10 mar. 2022.

BRASIL. **Lei nº 14.026, de 15 de julho de 2020**. Atualiza o marco legal do saneamento básico e altera a Lei nº 9.984, de 17 de julho de 2000 [...]. Brasília, DF: Presidência da República, 2020b. Disponível em: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2019-2022/2020/lei/l14026.htm. Acesso em: 19 mar. 2022.

BRASIL. **LEI Nº 8.080, DE 19 DE SETEMBRO DE 1990**. Disponível em: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/leis/l8080.htm. Acesso em: 19 mar. 2022.

BUTANTAN. Como surgem as variantes da Covid-19: entenda a diferença entre linhagens, sublinhagens e recombinantes. **Instituto Butantan**, 2022. Disponível em: <https://butantan.gov.br/covid/butantan-tira-duvida/tira-duvida-noticias/como-surgem-as-variantes-da-covid-19-entenda-a-diferenca-entre-linhagens-sublinhagens-e-recombinantes>. Acesso em: ago. 2022.

CALLAWAY, E. Beyond Omicron: what's next for COVID's viral evolution. **Nature**, v. 600, n. 7888, p. 204–207, 9 dez. 2021.

Candido, D.S.; Claro, I.M.; de Jesus, J.G.; Souza, W.M.; Moreira, F.R.R.; Dellicour, S.; Mellan, T.A.; du Plessis, L.; Pereira, R.H.M.; Sales, F.C.S.; et al. Evolution and Epidemic Spread of SARS-CoV-2 in Brazil. *Science* 2020, 369, 1255–1260.

CAPODEFERRO, M. W.; SMIDERLE, J. J. A resposta do setor de saneamento no Brasil à COVID-19. **Revista de Administração Pública**, v. 54, n. 4, p. 1022–1036, ago. 2020.

CARDOSO, Rosilene Ferreira et al. COVID-19: Um desafio epidemiológico. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 7, p. e32110716313e32110716313, 2021.

CARVALHO, D. O. S. Caracterização do metagenoma e do resistoma microbiano de efluente hospitalar e de suas possíveis implicações na vigilância ambiental em saúde. 2016. 122 f. Tese (Doutorado em Vigilância Sanitária) – **Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, 2016.

CARVALHO, P. P. D. Caracterização da interação dos coronavírus SARS-CoV e SARS-CoV-2 com o receptor ACE2 por meio de um padrão evolutivo conservado de aminoácidos. Mestrado em Física Aplicada à Medicina e Biologia — Ribeirão Preto: **Universidade de São Paulo**, 6 maio 2021.

CASACA, M. C. G. et al. Comparação de dados de infecções e mortes pelo novo Coronavírus de diferentes países do mundo com os dados brasileiros desde o primeiro

infectado até o final da primeira quinzena de abril de 2020. **Brazilian Journal of Health Review**, v. 3, n. 2, p. 3434–3454, 2020.

CASANOVA, L. et al. Survival of surrogate coronaviruses in water. **Water Research**, v. 43, n. 7, p. 1893–1898, abr. 2009.

CASHDOLLAR, J. L.; WYMER, L. Methods for primary concentration of viruses from water samples: a review and meta-analysis of recent studies. **Journal of Applied Microbiology**, v. 115, n. 1, p. 1–11, jul. 2013.

CDC. **Labs**. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/lab/rt-pcr-panel-primer-probes.html>>. Acesso em: 14 ab. 2021.

CERVANTES-AVILÉS, P.; MORENO-ANDRADE, I.; CARRILLO-REYES, J. Approaches applied to detect SARS-CoV-2 in wastewater and perspectives post-COVID-19. **Journal of Water Process Engineering**, v. 40, p. 101947, abr. 2021.

CHAN, J. M.; RABADAN, R. Quantifying Pathogen Surveillance Using Temporal Genomic Data. **mBio**, v. 4, n. 1, p. e00524-12, mar. 2013.

CHENG, P. K. et al. Viral shedding patterns of coronavirus in patients with probable severe acute respiratory syndrome. **The Lancet**, v. 363, n. 9422, p. 1699–1700, maio 2004.

CHERNICHARO, C. A. DE L. et al. 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**, v. 26, n. 4, p. 691–699, ago. 2021.

CLEEMPUT, S. et al. Genome Detective Coronavirus Typing Tool for rapid identification and characterization of novel coronavirus genomes. **Bioinformatics**, v. 36, n. 11, p. 3552–3555, 1 jun. 2020.

COREY, L. et al. SARS-CoV-2 Variants in Patients with Immunosuppression. **New England Journal of Medicine**, v. 385, n. 6, p. 562–566, 5 ago. 2021.

CORMAN, V. M. et al. Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR. **Eurosurveillance**, v. 25, n. 3, 23 jan. 2020.

CYRANOSKI, D. Alarming COVID variants show vital role of genomic surveillance. **Nature**, v. 589, n. 7842, p. 337–338, 21 jan. 2021.

DAUGHTON, C. G. Illicit drugs in municipal sewage. Pharmaceuticals and care products in the environment. **Washington, DC: American Chemical Society**, pp. 348–364. 10.1021/bk-2001-0791.ch020, 2001.

DEZORDI, F. Z. et al. ViralFlow: A Versatile Automated Workflow for SARS-CoV-2 Genome Assembly, Lineage Assignment, Mutations and Intrahost Variant Detection. **Viruses**, v. 14, n. 2, p. 217, 23 jan. 2022.

DÍAZ-PINZÓN, Jorge Enrique. Proyección de la propagación del COVID-19 en Colombia. **Revista Med**, v. 28, n. 1, p. 11-20, 2020.

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**, v. 159, n. 1, p. 53–61, jul. 2020.

DING, Z. et al. Toilets dominate environmental detection of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 in a hospital. **Science of The Total Environment**, v. 753, p. 141710, jan. 2021.

DOMINGUES, C. M. A. S. Desafios para a realização da campanha de vacinação contra a COVID-19 no Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 37, n. 1, p. e00344620, 2021.

DOVBYSH, D. et al. Impact of personality hardiness on anxiety dynamics during the COVID19 outbreak in russia. **European Psychiatry**, v. 64, n. S1, p. S284-S284, 2021.

DZINAMARIRA, T. et al. Utilization of SARS-CoV-2 Wastewater Surveillance in Africa—A Rapid Review. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 19, n. 2, p. 969, 15 jan. 2022.

FARIA, N. R. et al. Genomics and epidemiology of a novel SARS-CoV-2 lineage in Manaus, Brazil. 3 mar. 2021.

FARIAS, H. S. DE. O avanço da Covid-19 e o isolamento social como estratégia para redução da vulnerabilidade. **Espaço e Economia**, n. 17, 7 abr. 2020.

FARKAS, K. et al. Viral indicators for tracking domestic wastewater contamination in the aquatic environment. **Water Research**, v. 181, p. 115926, ago. 2020.

FINKEL, Y. et al. The coding capacity of SARS-CoV-2. **Nature**, v. 589, n. 7840, p. 125–130, 7 jan. 2021.

FIOCRUZ - Fundação Oswaldo Cruz. Fiocruz divulga estudo sobre a presença do novo coronavírus em esgotos sanitários. **Portal FIOCRUZ**, 2020. Disponível em: <http://portal.fiocruz.br/noticia/fiocruz-divulga-estudosobre-presenca-do-novo-coronavirus-em-esgotos-sanitarios>. Acesso em: 12 abr. 2022

FIOCRUZ - Fundação Oswaldo Cruz. **O que são mutações, linhagens, cepas e variantes**. 2021. Disponível em: <https://portal.fiocruz.br/noticia/o-que-sao-mutacoes-linhagens-cepas-e-variantes-1>. Acesso em: 29 ago. 2021.

FOLADORI, P. et al. Coronaviruses and SARS-CoV-2 in sewerage and their removal: Step by step in wastewater treatment plants. **Environmental Research**, v. 207, p. 112204, 1 maio 2022.

FONTENELE, R. S. et al. High-throughput sequencing of SARS-CoV-2 in wastewater provides insights into circulating variants. **Water Research**, v. 205, p. 117710, out. 2021.

FRANCIS, A. I. et al. Review of COVID-19 vaccine subtypes, efficacy and geographical distributions. **Postgraduate Medical Journal**, v. 98, n. 1159, p. 389–394, maio 2022.

FRANCO NETTO, G. et al. Vigilância ambiental em saúde no Brasil. **Ciências Ambientais**, n. 25, p.47-58, 2002.

FUNASA. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. Termo de referência para elaboração de plano municipal de Saneamento Básico / **Ministério da Saúde, Fundação Nacional de Saúde**. – Brasília, 1ª edição - 2018.

GOMES, G. G. C. et al. Perfil epidemiológico da Nova Doença Infecciosa do Coronavírus - COVID-19 (Sars-Cov-2) no mundo: Estudo descritivo, janeiro-junho de 2020. **Brazilian Journal of Health Review**, v. 3, n. 4, p. 7993–8007, 2020.

GORMLEY et al. COVID-19: mitigating transmission via wastewater plumbing systems. **The Lancet Global Health**, [S. l.], v. 8, n. 5, p. 643, 2020.

GREANEY, A. J. et al. Mapping mutations to the SARS-CoV-2 RBD that escape binding by different classes of antibodies. **Nature Communications**, v. 12, n. 1, p. 4196, 7 jul. 2021.

GREEN, H. et al. Quantification of SARS-CoV-2 and cross-assembly phage (crAssphage) from wastewater to monitor coronavirus transmission within communities. **Epidemiology**, 23 maio 2020.

GREGORY, D. A. et al. Monitoring SARS-CoV-2 Populations in Wastewater by Amplicon Sequencing and Using the Novel Program SAM Refiner. **Viruses**, v. 13, n. 8, p. 1647, 19 ago. 2021.

GRUNIG, G.; DURMUS, N.; MARSH, L. New Coronavirus (COVID-19) Pandemic: Complexities Resulting in a Tragedy. **LIFE SCIENCES, Microbiology**, 26 abr. 2020.

GUNDY, P. M.; GERBA, C. P.; PEPPER, I. L. Survival of Coronaviruses in Water and Wastewater. **Food and Environmental Virology**, v. 1, n. 1, p. 10, 2009.

HARAMOTO, E. et al. A review on recent progress in the detection methods and prevalence of human enteric viruses in water. **Water Research**, v. 135, p. 168–186, maio 2018.

HATA, A. et al. Detection of SARS-CoV-2 in wastewater in Japan during a COVID-19 outbreak. **Science of The Total Environment**, v. 758, p. 143578, mar. 2021.

HELLMÉR, M. et al. Detection of Pathogenic Viruses in Sewage Provided Early Warnings of Hepatitis A Virus and Norovirus Outbreaks. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 80, n. 21, p. 6771–6781, nov. 2014.

HEROLD, M. et al. Genome Sequencing of SARS-CoV-2 Allows Monitoring of Variants of Concern through Wastewater. **Water**, v. 13, n. 21, p. 3018, 27 out. 2021.

HIRABARA, S. M. et al. SARS-COV-2 Variants: Differences and Potential of Immune Evasion. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 11, p. 781429, 18 jan. 2022.

HOLSHUE, M. L. et al. First Case of 2019 Novel Coronavirus in the United States. **New England Journal of Medicine**, v. 382, n. 10, p. 929–936, 5 mar. 2020.

HONG, K. H. et al. Guidelines for Laboratory Diagnosis of Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) in Korea. **Annals of Laboratory Medicine**, v. 40, n. 5, p. 351–360, 1 set. 2020.

HOVI, T. et al. Role of environmental poliovirus surveillance in global polio eradication and beyond. **Epidemiology and Infection**, v. 140, n. 1, p. 1–13, jan. 2012.

HU T. et al. Bioinformatics resources for SARS-CoV-2 discovery and surveillance. **Brief Bioinform.** bbaa386, jan. 2021.

HUANG, Y. et al. Structural and functional properties of SARS-CoV-2 spike protein: potential antivirus drug development for COVID-19. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 41, n. 9, p. 1141–1149, set. 2020.

HUNG, I. F. N. et al. Viral Loads in Clinical Specimens and SARS Manifestations. **Emerging Infectious Diseases**, v. 10, n. 9, p. 1550–1557, set. 2004.

IBGE. **Cidade e Estamos**. 2022. Disponível em: <<https://www.ibge.gov.br/cidades-e-estados/rj/rio-de-janeiro.html>>. Acesso em: 10 jun. 2022

KALBAR, P. P., KARMAKAR, S., ASOLEKAR, S. R. Life cycle-based decision support tool for selection of wastewater treatment alternatives. **Journal of Cleaner Production**, v. 117, p. 64-72, 2016.

KARTHIKEYAN, S. et al. Wastewater sequencing reveals early cryptic SARS-CoV-2 variant transmission. **Nature**, v. 609, n. 7925, p. 101–108, 1 set. 2022.

KHAILANY, R. A.; SAFDAR, M.; OZASLAN, M. Genomic characterization of a novel SARS-CoV-2. **Gene Reports**, v. 19, p. 100682, jun. 2020.

KIM, D. et al. The Architecture of SARS-CoV-2 Transcriptome. **Cell**, v. 181, n. 4, p. 914- 921.e10, maio 2020.

KITAJIMA, M. et al. SARS-CoV-2 in wastewater: State of the knowledge and research needs. **Science of The Total Environment**, v. 739, p. 139076, out. 2020.

KOSTRYTSIA, A. et al. Biofilm carrier type affects biogenic sulfur-driven denitrification performance and microbial community dynamics in moving-bed biofilm reactors. **Chemosphere**, v. 287, p. 131975, 1 jan. 2022.

KUMAR, M. et al. First proof of the capability of wastewater surveillance for COVID-19 in India through detection of genetic material of SARS-CoV-2. **Science of The Total Environment**, v. 746, p. 141326, Dez. 2020.

LA ROSA, G. et al. First detection of SARS-CoV-2 in untreated wastewaters in Italy. **Science of The Total Environment**, v. 736, p. 139652, set. 2020.

LAMARCA, A. P. et al. Phylodynamic analysis of SARS-CoV-2 spread in Rio de Janeiro, Brazil, highlights how metropolitan areas act as dispersal hubs for new variants. **Microbial Genomics**, v. 8, n. 9, 15 set. 2022.

LAURING, A. S.; HODCROFT, E. B. Genetic Variants of SARS-CoV-2—What Do They Mean? **JAMA**, v. 325, n. 6, p. 529, 9 fev. 2021.

LEEB, Rebecca T. et al. COVID-19 trends among school-aged children—United States, March 1–September 19, 2020. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, v. 69, n. 39, p. 1410, 2020.

LEUNG, W. K. et al. Enteric involvement of severe acute respiratory syndrome-associated coronavirus infection. **Gastroenterology**, v. 125, n. 4, p. 1011–1017, out. 2003.

LI, H. et al. Coronavirus disease 2019 (COVID-19): current status and future perspectives. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 55, n. 5, p. 105951, maio 2020.

LI, Q. et al. The Impact of Mutations in SARS-CoV-2 Spike on Viral Infectivity and Antigenicity. **Cell**, v. 182, n. 5, p. 1284- 1294.e9, set. 2020.

LU, D. et al. 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, dez. 2020.

MACEDO, Y. M.; ORNELLAS, J. L.; BOMFIM, H. F. DO. COVID – 19 NO BRASIL: o que se espera para população subalternizada? **Revista Encantar**, p. 1–10, 2020.

MAGAZINE, N. et al. Mutations and Evolution of the SARS-CoV-2 Spike Protein. **Viruses**, v. 14, n. 3, p. 640, 19 mar. 2022.

MAGRO, F.; ABREU, C.; RAHIER, J. The daily impact of COVID-19 in gastroenterology. **United European Gastroenterology Journal**, v. 8, n. 5, p. 520–527, jun. 2020.

MALIK, Y. S. et al. SARS-CoV-2 Spike Protein Extrapolation for COVID Diagnosis and Vaccine Development. **Frontiers in Molecular Biosciences**, v. 8, p. 607886, 28 jul. 2021.

MARKT, R. et al. Detection and abundance of SARS-CoV-2 in wastewater in Liechtenstein, and the estimation of prevalence and impact of the B.1.1.7 variant. **Journal of Water and Health**, v. 20, n. 1, p. 114–125, 1 jan. 2022.

MARTIN, D. P. et al. The emergence and ongoing convergent evolution of the SARS-CoV-2 N501Y lineages. **Cell**, v. 184, n. 20, p. 5189- 5200.e7, set. 2021.

MARTINS-FILHO, P. R. et al. The Role of Vaccination in Preventing Deaths During the Omicron-driven Tsunami in Brazil. **Disaster Medicine and Public Health Preparedness**, p. 1–2, 8 jun. 2022.

MEDEMA et al. 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, 14 jul. 2020.

MELCHIORS, E. Avaliação do desenvolvimento de biofilme em meio suporte esponjoso em reator biológico de leito móvel (mbbr) no tratamento de efluente de

indústria de celulose. **Universidade Tecnológica Federal do Paraná Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental**. p. 66-73, dez. 2019.

MELLO, K. DE et al. Multiscale land use impacts on water quality: Assessment, planning, and future perspectives in Brazil. **Journal of Environmental Management**, v. 270, p. 110879, set. 2020.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Fundação Nacional de Saúde. Vigilância ambiental em saúde: Textos de epidemiologia para a Vigilância Ambiental em Saúde. **Brasília: MS/FUNASA**, 2002.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Saúde Brasil 2010: uma análise da situação de saúde e de evidências selecionadas de impacto de ações de vigilância em saúde/Ministério da Saúde. **Secretaria de Vigilância em Saúde**. Departamento de Análise de Situação em Saúde. – Brasília: Ministério da Saúde, 2010.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de vigilância em saúde. Departamento de vigilância em saúde ambiental e saúde do trabalhador. Parecer Técnico no 003, de 11 de janeiro de 2011. **Propostas complementares à Resolução CONAMA 357/2005 e a Resolução CONAMA 397/08**, sobre condições e padrões de lançamento de efluentes. Brasília, DF, 2021.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. Vigilância genômica do vírus SARS-CoV-2 no âmbito da SVS/MS [recurso eletrônico] / **Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde**. – Brasília: Ministério da Saúde, 2021.

MONTEIRO DE OLIVEIRA, M. et al. Controlling the COVID-19 pandemic in Brazil: a challenge of continental proportions. **Nature Medicine**, v. 26, n. 10, p. 1505–1506, out. 2020.

MORAWSKA, L.; CAO, J. Airborne transmission of SARS-CoV-2: The world should face the reality. **Environment International**, v. 139, p. 105730, jun. 2020.

MORDECAI, G. J.; HEWSON, I. Coronaviruses in the Sea. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, p. 1795, 24 jul. 2020.

MUNSTER, V. J. et al. A Novel Coronavirus Emerging in China — Key Questions for Impact Assessment. **New England Journal of Medicine**, v. 382, n. 8, p. 692–694, 20 fev. 2020.

NAQVI, A. A. T. et al. Insights into SARS-CoV-2 genome, structure, evolution, pathogenesis and therapies: Structural genomics approach. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease**, v. 1866, n. 10, p. 165878, out. 2020.

NOGUEIRA, F. et al. Intestinal Shedding of SARS-CoV-2 in Children: No Evidence for Infectious Potential. **Microorganisms**, v. 11, n. 1, p. 33, 22 dez. 2022.

NUNES, A. C. Vigilância Genômica do Sars-Cov-2 em Betim, Minas Gerais. **Universidade Federal De Minas Gerais**. p. 110, 2021.

OLIVEIRA, W. K. DE et al. Como o Brasil pode deter a COVID-19. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 29, n. 0, maio 2020.

ORAN, D. P.; TOPOL, E. J. The Proportion of SARS-CoV-2 Infections That Are Asymptomatic: A Systematic Review. **Annals of Internal Medicine**, v. 174, n. 5, p. 655–662, maio 2021.

OU, X. et al. Characterization of spike glycoprotein of SARS-CoV-2 on virus entry and its immune cross-reactivity with SARS-CoV. **Nature Communications**, v. 11, n. 1, p. 1620, dez. 2020.

PALACIOS CRUZ, M. et al. COVID-19, una emergencia de salud pública mundial. **Revista Clínica Española**, v. 221, n. 1, p. 55–61, jan. 2021.

PECCIA, J. et al. Measurement of SARS-CoV-2 RNA in wastewater tracks community infection dynamics. **Nature Biotechnology**, v. 38, n. 10, p. 1164–1167, out. 2020.

PÉREZ-CATALUÑA, A. et al. Bias of library preparation for virome characterization in untreated and treated wastewaters. **Science of The Total Environment**, v. 767, p. 144589, maio 2021.

PHILO, S. E. et al. A comparison of SARS-CoV-2 wastewater concentration methods for environmental surveillance. **Science of The Total Environment**, v. 760, p. 144215, mar. 2021.

RAMBAUT, A. et al. A dynamic nomenclature proposal for SARS-CoV-2 lineages to assist genomic epidemiology. **Nature Microbiology**, v. 5, n. 11, p. 1403–1407, 15 jul. 2020.

RANDAZZO, W. et al. SARS-CoV-2 RNA in wastewater anticipated COVID-19 occurrence in a low prevalence area. **Water Research**, v. 181, p. 115942, ago. 2020.

REDE GENÔMICA - FIOCRUZ. Vigilância Genômica do Sars-cov-2 no Brasil. **FIOCRUZ - Fundação Oswaldo Cruz**. 2022. Disponível em: <https://www.genomahcov.fiocruz.br/dashboard-pt/>. Acesso em: jun. 2022

RESENDE, P. C. et al. SARS-CoV-2 genomes recovered by long amplicon tiling multiplex approach using nanopore sequencing and applicable to other sequencing platforms. 1 maio 2020.

RIBEIRO, J. A. et al. Unidade de Vigilância Intensiva COVID-19 do Hospital CUF Tejo, fevereiro 2021: Memory Lane. **Gazeta Médica**, 25 ago. 2021.

ROBINSON, C. A. et al. Defining biological and biophysical properties of SARS-CoV-2 genetic material in wastewater. **Science of The Total Environment**, v. 807, p. 150786, fev. 2022.

RODRIGUEZ-MORALES, A. et al. History is repeating itself, a probable zoonotic spillover as a cause of an epidemic: the case of 2019 novel Coronavirus. **Le Infezioni in Medicina**, n. 1, 3-5, jan. 2020.

ROLLEMBERG, S.; BARROS, A. N. DE; LIMA, J. P. M. DE. Avaliação da contaminação, sobrevivência e remoção do coronavírus em sistemas de tratamento de esgoto sanitário. **Revista Tecnologia**, v. 41, n. 1, 30 jun. 2020.

ROLLEMBERG, S.; BARROS, A. N. DE; LIMA, J. P. M. DE. Avaliação da contaminação, sobrevivência e remoção do coronavírus em sistemas de tratamento de esgoto sanitário. **RevistaTecnologia**, v. 41, n. 1, 30 jun. 2020.

SHARIF, S. et al. Detection of SARs-CoV-2 in wastewater, using the existing environmental surveillance network: An epidemiological gateway to an early warning for COVID-19 in communities. 5 jun. 2020.

SHERCHAN, S. P. et al. First detection of SARS-CoV-2 RNA in wastewater in North America: A study in Louisiana, USA. **Science of The Total Environment**, v. 743, p. 140621, nov. 2020.

SILVA, Lena Veiga et al. COVID-19 mortality underreporting in Brazil: analysis of data from government internet portals. **Journal of medical Internet research**, v. 22, n. 8, p. e21413, 2020

SMYTH, D. S. et al. Tracking cryptic SARS-CoV-2 lineages detected in NYC wastewater. **Nature Communications**, v. 13, n. 1, p. 635, 3 fev. 2022.

STEELE, J. A. et al. Sources of variability in methods for processing, storing, and concentrating SARS-CoV-2 in influent from urban wastewater treatment plants. 21 jun. 2021.

SWIFT, C. L. et al. Community-level SARS-CoV-2 sequence diversity revealed by wastewater sampling. **Science of The Total Environment**, v. 801, p. 149691, dez. 2021.

TAI, W. et al. Characterization of the receptor-binding domain (RBD) of 2019 novel coronavirus: implication for development of RBD protein as a viral attachment inhibitor and vaccine. **Cellular & Molecular Immunology**, v. 17, n. 6, p. 613–620, jun. 2020.

TILLET, R. L. et al. Genomic evidence for reinfection with SARS-CoV-2: a case study. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 21, n. 1, p. 52–58, jan. 2021.

TIWARI, A. et al. Detection and quantification of SARS-CoV-2 RNA in wastewater influent in relation to reported COVID-19 incidence in Finland. **Water Research**, v. 215, p. 118220, maio 2022.

TORII, S.; FURUMAI, H.; KATAYAMA, H. Applicability of polyethylene glycol precipitation followed by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction for the detection of SARS-CoV-2 RNA from municipal wastewater. **Science of The Total Environment**, v. 756, p. 143067, fev. 2021.

VALDES, Miguel Ángel Serra. Infección respiratoria aguda por COVID-19: una amenaza evidente. **Rev haban cienc méd, La Habana**, v. 19, n. 1, p. 1-5, fev. 2020.

- VOGELS, C. B. F. et al. Analytical sensitivity and efficiency comparisons of SARS-CoV-2 RT-qPCR primer-probe sets. **Nature Microbiology**, v. 5, n. 10, p. 1299–1305, 10 jul. 2020.
- VOLZ, E. et al. Evaluating the Effects of SARS-CoV-2 Spike Mutation D614G on Transmissibility and Pathogenicity. **Cell**, v. 184, n. 1, p. 64- 75.e11, jan. 2021.
- VON SPERLING. et al. Princípios do tratamento biológico de águas residuárias. Vol. 1. Introdução à qualidade das águas e ao tratamento de esgotos. 4th **Edition**, **EditoraUFMG**, 472 p. 2014.
- WANG, C. et al. The establishment of reference sequence for SARS-CoV-2 and variation analysis. **Journal of Medical Virology**, v. 92, n. 6, p. 667–674, jun. 2020.
- WANG, H. et al. The genetic sequence, origin, and diagnosis of SARS-CoV-2. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 39, n. 9, p. 1629–1635, set. 2020.
- WANG, X. W. et al. Concentration and detection of SARS coronavirus in sewage from Xiao Tang Shan hospital and the 309th Hospital of the Chinese People's Liberation Army. **Water Science and Technology**, v. 52, n. 8, p. 213–221, 1 out. 2005B.
- WANG, X.-W. et al. Study on the resistance of severe acute respiratory syndrome-associated coronavirus. **Journal of Virological Methods**, v. 126, n. 1–2, p. 171–177, jun. 2005a
- WEIDHAAS, J. et al. Correlation of SARS-CoV-2 RNA in wastewater with COVID-19 disease burden in sewersheds. **Science of The Total Environment**, v. 775, p. 145790, jun. 2021.
- WESTHAUS, S. et al. Detection of SARS-CoV-2 in raw and treated wastewater in Germany – Suitability for COVID-19 surveillance and potential transmission risks. **Science of The Total Environment**, v. 751, p. 141750, jan. 2021.
- WHO - World Health Organization - editor. Genomic sequencing of SARS-CoV-2: a guide to implementation for maximum impact on public health. **Geneva**; 94 p. 2021.
- WHO - World Health Organization, 2020. Water, sanitation, hygiene, and waste management for the COVID-19 virus: interim guidance. Disponível em: <https://www.who.int/publications/i/item/water-sanitation-hygiene-and-waste-management-for-covid-19>. Acesso em: 01 mar. 2022.
- WHO - World Health Organization. Tracking SARS-CoV-2 Variants, 2022. Disponível em: <https://www.who.int/en/activities/tracking-SARS-CoV-2-variants/>. Acesso em: 10 Mar. 2022.
- WHO - World Health Organization. Guidelines on sanitation and health. Geneva: World Health Organization; 2018. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.
- WHO - World Health Organization. WHO Coronavirus (COVID-19) Dashboard. 2022a. Disponível em: <https://covid19.who.int/?mapFilter=cases>. Acesso em: 10 Jun. 2022.

WHO, UNICEF, World Bank. State of the world's drinking water: an urgent call to action to accelerate progress on ensuring safe drinking water for all. **Geneva: World Health Organization**; 2022. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.

WOLFE, M. et al. Detection of SARS-CoV-2 Variants Mu, Beta, Gamma, Lambda, Delta, Alpha, and Omicron in Wastewater Settled Solids Using Mutation-Specific Assays Is Associated with Regional Detection of Variants in Clinical Samples. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 88, n. 8, p. e00045-22, 26 abr. 2022.

WU, A. et al. Genome Composition and Divergence of the Novel Coronavirus (2019-nCoV) Originating in China. **Cell Host & Microbe**, v. 27, n. 3, p. 325–328, mar. 2020.

WU, F. et al. A new coronavirus associated with human respiratory disease in China. **Nature**, v. 579, n. 7798, p. 265–269, 12 mar. 2020a.

WU, F. et al. SARS-CoV-2 titers in wastewater are higher than expected from clinically confirmed cases. 7 abr. 2020b.

WU, Y. et al. Prolonged presence of SARS-CoV-2 viral RNA in faecal samples. **The Lancet Gastroenterology & Hepatology**, v. 5, n. 5, p. 434–435, maio 2020.

WURTZ, N. et al. Monitoring the Circulation of SARS-CoV-2 Variants by Genomic Analysis of Wastewater in Marseille, South-East France. **Pathogens**, v. 10, n. 8, p. 1042, 17 ago. 2021.

WURTZER, S. et al. **Evaluation of lockdown impact on SARS-CoV-2 dynamics through viral genome quantification in Paris wastewaters.** [s.l.] *Epidemiology*, 17 abr. 2020. Disponível em: <<http://medrxiv.org/lookup/doi/10.1101/2020.04.12.20062679>>. Acesso em: 17 jan. 2023.

XIA, X. Domains and Functions of Spike Protein in SARS-Cov-2 in the Context of Vaccine Design. **Viruses**, v. 13, n. 1, p. 109, 14 jan. 2021.

XIAO, F. et al. Evidence for Gastrointestinal Infection of SARS-CoV-2. **Gastroenterology**, v. 158, n. 6, p. 1831- 1833.e3, maio 2020.

YANG, C.-L. et al. Coronavirus disease 2019: a clinical review. **European Review for Medical and Pharmacological Sciences**, v. 24, n. 8, p. 4585–4596, abr. 2020.

YANG, D.; LEIBOWITZ, J. L. The structure and functions of coronavirus genomic 3' and 5' ends. **Virus Research**, v. 206, p. 120–133, ago. 2015.

ZHANG, C. M.; et al. Elimination of viruses from domestic wastewater: requirements and technologies. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, [S. l.], v. 32, n. 4, p. 1-9, 2016

ZHANG, D. et al. Potential spreading risks and disinfection challenges of medical wastewater by the presence of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) viral RNA in septic tanks of Fangcang Hospital. **Science of The Total Environment**, v. 741, p. 140445, nov. 2020.

ZHANG, X. et al. The N gene of SARS-CoV-2 was the main positive component in repositive samples from a cohort of COVID-19 patients in Wuhan, China. **Clinica Chimica Acta**, v. 511, p. 291–297, dez. 2020.

ZHANG, Y. et al. 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.

ZHU, N. et al. A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019. **New England Journal of Medicine**, v. 382, n. 8, p. 727–733, 20 fev. 2020.

ZUCCATO, E. et al. Estimating Community Drug Abuse by Wastewater Analysis. **Environmental Health Perspectives**, v. 116, n. 8, p. 1027–1032, ago. 2008.