

DETECÇÃO DE SARS-COV-2 EM ÁGUAS RESIDUAIS: ANÁLISE DE METODOLOGIAS DE CONCENTRAÇÃO A PARTIR DE AMOSTRAS COLETADAS DURANTE A PANDEMIA

Carolina de Araújo Rolo¹; Matheus Carmo dos Santos²; Rosângela Fernandes dos Santos³; Bruna Aparecida de Souza Machado⁴

¹ Bolsista CNPq; Desenvolvimento Tecnológico Industrial - DTI – B; carolina.rolo@fbter.org.br;

² Graduando em Biomedicina; Iniciação científica – SENAI CIMATEC; matheus.carmo@fbter.org.br;

³ Graduanda em Biomedicina; Iniciação científica – SENAI CIMATEC; angelafernandees953@gmail.com

⁴ Centro Universitário SENAI CIMATEC; Salvador-BA; brunam@fiieb.org.br

RESUMO

A pandemia causada pelo coronavírus trouxe inúmeros impactos para a saúde, especialmente no que diz respeito a disseminação da doença. A epidemiologia baseada em águas residuais (WBE) representa uma ferramenta importante para monitorar a ocorrência de vírus na população. A concentração do vírus nas amostras é etapa crucial, porém a detecção do SARS-CoV-2 sem a etapa de concentração também deve ser avaliada. O estudo objetivou comparar a eficiência na detecção do vírus em amostras de esgoto bruto e efluente final com e sem concentração por PEG 8000. As amostras foram coletadas nos meses de maio, julho, setembro e novembro de 2021. Foi possível detectar SARS-CoV-2 nas amostras, com e sem concentração. Para esgoto bruto, a ausência de concentração apresentou resultados satisfatórios, enquanto para efluente final detecção a partir da amostra concentrada se mostrou eficaz.

PALAVRAS-CHAVE: Epidemiologia baseada em águas residuais; epidemiologia da COVID-19; PEG 8000.

1. INTRODUÇÃO

A doença coronavírus 19 (COVID-19), causada pelo vírus da síndrome respiratória aguda 2 (do inglês, *severe acute respiratory syndrome 2*, SARS-CoV-2), se mostrou e se mostra como um grande desafio para a saúde pública mundial. Febre e sintomas respiratórios tendem a acometer os pacientes infectados, enquanto sintomas gastrointestinais também são observados¹. Dentro deste contexto, a Epidemiologia Baseada em Águas Residuais (do inglês, *wastewater-based epidemiology*, WBE) é uma ferramenta eficaz para fornecer um panorama acerca da saúde da população analisada, especialmente no que tange a presença de possíveis agentes infecciosos e a presença de substância de interesse especial (como abuso de medicamentos e drogas ilícitas)². Assim, a WBE é considerada uma abordagem não-invasiva para avaliar a prevalência de SARS-CoV-2 em comunidades, uma vez que a testagem massiva ainda não é uma realidade em diversos países por conta dos custos operacionais dos ensaios diagnósticos.³ Apesar da WBE ser uma abordagem eficaz para quantificar o material genético de SARS-CoV-2 e estimar a prevalência do vírus na população, ajustes metodológicos se fazem necessários para sua aplicação.

Um dos grandes desafios da WBE é a baixa quantidade de partículas virais presentes em grandes volumes de águas residuais⁴, e por este motivo a etapa de concentração é empregada. No presente estudo foram analisadas amostras de esgoto bruto e efluente final coletadas em 4 meses intercalados do ano de 2021: maio, julho, setembro e novembro quanto a presença de SARS-CoV-2 para avaliar os métodos de concentração. O recorte temporal estudado pode nos fornecer dados relacionados com os períodos de chuva da região, haja vista que em meses chuvosos há maior volume de águas residuais, sendo mais difícil a detecção do SARS-CoV-2 nas amostras. Em meses sem chuva, a probabilidade de detecção do RNA viral é maior. Dentre os meses analisados, o mês de maio é caracterizado por fortes chuvas, enquanto nos meses de julho, setembro e novembro não há presença de chuvas. Por conta disto, é possível não encontrar SARS-CoV-2 no mês de maio, e sim nos meses subsequentes. Foram empregadas duas metodologias: detecção de SARS-CoV-2 a partir de amostras concentradas e não concentradas, objetivando avaliar o impacto da etapa de concentração nas análises.

2. METODOLOGIA

2.1 Amostras

Para o estudo foram utilizadas amostras recebidas nos meses de maio, julho, setembro e novembro de 2021, totalizando 25 amostras, sendo 14 de efluente final e 11 de esgoto bruto, oriundas de 12 estações de tratamento distribuídas na cidade de Salvador (BA). As amostras, tanto de esgoto bruto quanto de efluente final, foram obtidas em parceria com a Empresa Baiana de Água e Saneamento (EMBASA). As amostras foram submetidas à inativação térmica e alocadas à -80°C até o uso.

2.2 Concentração de SARS-CoV-2

ISSN 0805-2010 – Anuário de resumos expandidos apresentados no VIII SAPCT - SENAI CIMATEC, 2023

Para a concentração foram utilizados 40mL de amostra (esgoto ou efluente) e adicionados 4g de PEG 8000, 0,9g cloreto de sódio e 18uL de controle exógeno (Lentivírus com plasmídeo pGip, que contém o *gene da proteína fluorescente*, GFP). Como controle negativo foram utilizados 40mL de PBS 0,01 M, pH 7,2 e diluição 1x, e como controle positivo foram utilizados 40mL de PBS 1x acrescidos de 90uL de SARS-CoV-2 inativado (proveniente de amostras de *swab* nasofaríngeo de pacientes positivos para SARS-CoV-2 no Laboratório de Diagnóstico Molecular do Instituto SENAI de Inovação em Saúde CIMATEC), e 18uL de controle exógeno GFP. Os tubos foram alocados a 4°C e mantidos em agitação *overnight*. Decorrido o tempo, as amostras com PEG foram centrifugadas, o sobrenadante descartado e o pellet ressuspensão em 1.000uL de PBS 1x, sendo armazenado em geladeira para posterior extração de ácidos nucleicos. Para analisar a amostra não concentrada, foram utilizados 1.000uL de cada amostra. Como controle positivo e negativo foi empregado 1.000uL de PBS 1x, sendo ao controle positivo adicionado 90uL SARS-CoV-2 e 18uL de controle exógeno GFP. Em seguida as amostras concentradas e não concentradas foram submetidas ao processo de extração de RNA viral.

2.3 Extração do RNA viral, Limpeza de inibidores e RT-qPCR de SARS-CoV-2

As amostras foram submetidas a extração do RNA viral usando o kit MagMax™ Viral/Pathogen II no sistema automatizado KingFisher™ Duo Prime System seguindo o manual do fabricante. Após a extração, as amostras passaram pela remoção de inibidores utilizando o kit OneStep PCR inhibitor removal. Para a RT-qPCR, iniciadores e sondas específicas para SARS-CoV-2 (N1 e N2), conforme estabelecido pelo Centro de Controle e Prevenção de Doenças dos Estados Unidos⁵, foram utilizados. O plasmídeo 2019-nCoV_N_Positive Control (IDT, EUA) também foi empregado como controle positivo para as reações de RT-qPCR utilizando os marcadores N1 e N2. Para a detecção de eGFP (controle exógeno) foram utilizados os iniciadores desenhados para este estudo.

2.4 Análise de dados

A curva padrão e os dados de *threshold* foram analisados no QuantStudio™ Design and Analysis Software v1.5.1. O presente estudo buscou dados qualitativos, sendo assim foi avaliada somente a presença ou ausência de SARS-CoV-2.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Todas as amostras de RNA utilizadas para a detecção por qPCR estavam livres de inibição conforme determinado pela análise do controle exógeno GFP e, portanto, foram usadas para análise de RT-qPCR sem que fosse necessária a diluição dessas amostras. Os resultados obtidos com o marcador N1 foram considerados devido à sua maior sensibilidade em comparação com outros marcadores moleculares SARS-CoV-2, incluindo marcador N2, como foi apresentado por Ahmed e colaboradores⁶.

O material genético do SARS-CoV-2 pôde ser detectado tanto em amostras de esgoto e efluente, bem como em amostras que passaram ou não pela etapa de concentração com PEG 8000, conforme apresentado no Quadro 1. Diante da análise das amostras de esgoto bruto, foi possível detectar o SARS-CoV-2 em 82% das amostras não concentradas, enquanto apenas 73% das amostras concentradas apresentaram resultado positivo. Observou-se ainda que, para a análise de esgoto bruto, a ausência de concentração forneceu um melhor resultado quando comparado ao resultado com concentração. No que diz respeito às amostras de efluente final, 71% das amostras concentradas foram positivas, enquanto a detecção de SARS-CoV-2 em amostras não concentradas foi de apenas 50%. Os dados reforçam a importância da etapa de concentração no processamento de amostras de efluente. Além disso, é esperado que o efluente final tenha uma carga viral menor ou não tenha SARS-CoV-2, considerando os procedimentos de tratamento empregados. A partir dos resultados obtidos é possível perceber que o tratamento aplicado ao esgoto não elimina o vírus, pois este ainda está presente no efluente final.

TIPO DE AMOSTRA	CONCENTRAÇÃO	POSITIVAS	NEGATIVAS
Esgoto bruto	SIM	73%	27%
	NÃO	82%	18%
Efluente final	SIM	71%	29%
	NÃO	50%	50%

Quadro 1. Porcentagem de amostras de esgoto bruto e efluente final positivas para SARS-CoV-2, com as metodologias concentrado e não concentrado.

Como elucidado por Kumblathan e colaboradores⁷, a WBE do SARS-CoV-2 é desafiadora por conta da falta de procedimentos e metodologias padronizados. Uma amostra de água residual deve conter uma carga de vírus moderada a alta para garantir que vírus suficientes sejam concentrados a partir do volume inicial⁴. Sendo assim, ao observar a ausência de SARS-CoV-2 nas amostras, não é possível afirmar que não há RNA viral, mas o método aplicado não foi capaz de detectar por conta da baixa carga viral da amostra. A concentração por PEG 8000 é uma metodologia adotada pela Organização Mundial da Saúde (OMS) como um método padrão para conduzir a vigilância ambiental da circulação do poliovírus⁸, ou seja, a concentração por PEG já é empregada em análises de águas residuais. No que diz respeito aos meses analisados, apesar das chuvas na região, foi possível detectar SARS-CoV-2 nas amostras do mês de maio, assim como nos meses seguintes.

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Ao realizar um estudo de monitoramento de águas residuais é indispensável a adoção de metodologias seguras e confiáveis para análise dos dados, sendo a padronização dessas metodologias um grande desafio. É possível detectar SARS-CoV-2 em amostras de esgoto e efluente concentradas ou não concentradas. A técnica de concentração baseada em PEG se mostra simples e eficiente, pois não requer equipamentos especializados ou de alto custo, sendo possível realizar a WBE nos mais diversos locais do mundo. A ausência da concentração leva a uma maior detecção em amostras de esgoto bruto, enquanto para amostras de efluente final a concentração por PEG 8000 assegurou melhores resultados. A WBE se mostra como uma ferramenta não-invasiva e complementar de monitoramento epidemiológico, podendo contribuir para a expansão do monitoramento de SARS-CoV-2 e outras doenças no município de Salvador/BA.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) que através do edital MCTIC/CNPq/FNDCT/MS/SCTIE/Dedit N° 07/2020 (processo: 402002/2020-2) que direcionou recursos para a realização deste projeto.

5. REFERÊNCIAS

1. ZHOU, Z. *et al.* Effect of Gastrointestinal Symptoms in Patients With COVID-19. *Gastroenterology* **158**, 2294–2297 (2020).
2. MAO, K., ZHANG, H. & YANG, Z. Can a Paper-Based Device Trace COVID-19 Sources with Wastewater-Based Epidemiology? *Environ Sci Technol* *acs.est.0c01174* (2020) doi:10.1021/acs.est.0c01174.
3. IBGE. Saúde - PNAD COVID19 | IBGE 2020. <https://covid19.ibge.gov.br/pnadcovid/saude.php> (acesso em 02/04/23).
4. LU, Dingnan, HUANG, Zhuangrong; LUO, Jiayue; ZHANG, Xiaogi; SHA, Sha. Primary concentration – The critical step in implementing the wastewater based epidemiology for the COVID-19 pandemic: A mini-review. *Sci. Total Environ.* 747 (2020).
5. CDC. CDC 2019-Novel Coronavirus (2019-nCoV) Real-Time RT-PCR Diagnostic Panel For Emergency Use Only Instructions for Use. 2020.
6. AHMED, W. *et al.* SARS-CoV-2 RNA monitoring in wastewater as a potential early warning system for COVID-19 transmission in the community: A temporal case study. *Sci. Total Environ.* 761, (2021)
7. KUMBLATHAN, T. *et al.* Wastewater-Based Epidemiology for Community Monitoring of SARS-CoV-2: Progress and Challenges. *ACS Environmental Au.* 2021. Doi: <https://doi.org/10.1021%2Facsenvironau.1c00015>
8. WORLD HEALTH ORGANIZATION. Guidelines for environmental surveillance of poliovirus circulation. 2003