

MONITORAMENTO DA PRESENÇA DE SARS-COV-2 EM ÁGUAS RESIDUAIS DA ESTAÇÃO RIO VERMELHO EM SALVADOR (BA): UM RECORTE DO SEGUNDO ANO DE PANDEMIA

Matheus Carmo dos Santos¹; Rosângela Fernandes dos Santos²; Carolina de Araújo Rolo³; Bruna Aparecida de Souza Machado⁴

¹ Graduando em Biomedicina; Iniciação científica – SENAI CIMATEC; matheus.carmos@outlook.com;

² Graduanda em Biomedicina; Iniciação científica – SENAI CIMATEC; angelafernandees953@gmail.com

³ Bolsista CNPq; Desenvolvimento Tecnológico Industrial – DTI – B; carolina.rolo@fbter.org.br

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

RESUMO

A epidemiologia baseada em águas residuais refere-se a uma ferramenta tipicamente utilizada em escala populacional para o monitoramento de diferentes vírus, incluindo o SARS-CoV-2. Essa metodologia é uma ferramenta não-invasiva e capaz de adaptar-se a diferentes realidades econômicas. O presente estudo teve como objetivo monitorar a presença do SARS-CoV-2 em águas residuais brutas em uma importante estação de tratamento de Salvador-BA. Foram analisadas amostras concentradas ou não concentradas pela precipitação por PEG 8000. Foi possível detectar o RNA genômico em ambas as condições. Além disso, pôde-se correlacionar o número de cópias aos dados epidemiológicos da COVID-19 que comprovaram a viabilidade da WBE como uma ferramenta complementar para o monitoramento do SARS-CoV-2.

PALAVRAS-CHAVE: Epidemiologia baseada em águas residuais; COVID-19; concentração viral; PEG 8000.

1. INTRODUÇÃO

O SARS-CoV-2 (do inglês, *Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2*) é um vírus respiratório envolto com genoma de RNA causador da doença Coronavírus 2019 (COVID-19).¹ Tipicamente, os infectados apresentam uma gama de sintomas gripais, podendo progredir a manifestações gastrointestinais.^{1,2} A transmissão viral em humanos ocorre sobretudo pelo ar, porém foi possível isolar o SARS-CoV-2 em distintos espécimes clínicos, incluindo amostras fecais de pacientes sintomáticos e assintomáticos.^{1,3,4} O derramamento fecal prolongado do SARS-CoV-2 direcionou a testagem das águas residuais, as quais foram prontamente positivas ao RNA genômico do vírus.⁴ A Epidemiologia Baseada em Águas Residuais (WBE, do inglês *Wastewater-based epidemiology*) é uma metodologia marcada por seu progresso bem sucedido no monitoramento de vírus entéricos,⁵ e atualmente é empregada com êxito na vigilância do SARS-CoV-2 em várias cidades do mundo, no intuito de monitorar e projetar alertas precoces para surtos futuros.^{6,7} Isso só é possível uma vez que as águas residuais fornecem amostras que agregam indivíduos de determinadas áreas, reduzindo os custos de monitoramento, dispondo dados epidemiológicos mais facilmente acessíveis.⁸ Além disso, essa metodologia permite o rastreamento de indivíduos assintomáticos, que normalmente não são detectados pela vigilância clínica.⁹ Nesse sentido, a vigilância de efluentes em países emergentes é especialmente interessante, como no Brasil, onde há alta densidade populacional e a capacidade de testagem clínica é limitada.⁸ Nesse contexto, este estudo teve como objetivo monitorar a presença do SARS-CoV-2 em águas residuais brutas (não tratadas) da Estação de Tratamento de Efluentes (ETE) do Rio Vermelho, Salvador-BA, Brasil. Esta ETE recebe cerca de 70% do esgoto da cidade,¹⁰ com capacidade de processamento de 8,3 mil litros por segundo.¹¹ Dessa forma, torna-a uma forte candidata para o monitoramento, dada sua dimensão e representatividade.

2. METODOLOGIA

2.1 Pré-tratamento de amostras

Um total de 9 amostras de esgoto não tratado da Estação de Tratamento de Efluentes do Rio Vermelho de Salvador (Bahia, Brasil) foram analisadas entre abril de 2021 e janeiro de 2022. As amostras obtidas em parceria com a Empresa Baiana de Água e Saneamento (EMBASA) foram submetidas à inativação térmica e acondicionadas à -80°C até o uso, em laboratório.

2.2 Concentração de SARS-CoV-2

Para a concentração foram utilizados 40mL de amostra de esgoto bruto e adicionados 4g de polietilenoglicol (PEG) 8000, 0,9g cloreto de sódio (NaCl) e 18uL de controle exógeno Lentivírus, contendo a sequência da proteína verde fluorescente (eGFP) para monitoramento das etapas de processamento. Como controle negativo foram utilizados 40mL de PBS 0,01 M, pH 7,2. Para o controle positivo, foram utilizados 40mL de PBS 0,01 M, pH 7,2 acrescidos de 90uL de SARS-CoV-2 e 18uL de controle exógeno. O vírus do

SARS-CoV-2 foi proveniente de amostras de *swab* nasofaríngeo de pacientes positivos para SARS-CoV-2 do Laboratório de Diagnóstico Molecular do Instituto SENAI de Inovação em Saúde CIMATEC. As amostras foram alocadas a 4°C e mantidos em agitação *overnight*. Em sequência, as amostras com PEG foram centrifugadas, o sobrenadante descartado e o precipitado ressuspensão em 1.000uL de PBS 0,01 M, pH 7,2, sendo mantidas refrigeradas para posterior extração de ácidos nucleicos. Amostras não concentradas também foram analisadas, utilizando-se 1.000uL de cada amostra. Controles positivo (CP) e negativo (CN) foram empregados (CP: 1.000uL de PBS 0,01 M, pH 7,2; 90uL SARS-CoV-2 e 18uL de controle exógeno/CN: 1.000uL de PBS 0,01 M, pH 7,2). Também acondicionadas em refrigeração até a posterior etapa de extração.

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 por uma etapa de limpeza para 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 Unidos¹², foram utilizados. Como controle positivo das reações de RT-qPCR foi utilizado o plasmídeo 2019-nCoV_N_Positive Control (IDT, EUA) utilizando os marcadores N1 e N2. As amostras com Ct (cycle threshold) menor que 40 foram consideradas positivas.¹³ 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

Graças ao controle exógeno eGFP foi possível analisar que as amostras detectadas por qPCR estavam livres de inibição. Sendo assim, foram usadas para análise de RT-qPCR sem que fosse necessária a diluição dessas amostras. Os ensaios dos genes N1 e N2 foram analisados para todas as amostras, porém 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 N2.⁸ O material genético do SARS-CoV-2 pôde ser detectado em amostras de esgoto que passaram ou não pela etapa de concentração com PEG 8000. Contudo, as análises com concentração obtiveram melhor resultado. Das amostras concentradas, 86% eram positivas, enquanto nas amostras não concentradas, apenas 57% positivaram (**Figura 1**).

Detecção de RNA do SARS-CoV-2 - Gene N1			
ANO	MÊS	NÃO CONCENTRADA	CONCENTRADA
2021	Abril	Vermelha	Vermelha
	Maio	Vermelha	Azul
	Junho	Vermelha	Azul
	Julho	Vermelha	Vermelha
	Agosto	Cinza	Cinza
	Setembro	Cinza	Azul
	Outubro	Cinza	Vermelha
	Novembro	Cinza	Azul
	Dezembro	Vermelha	Vermelha
2022	Janeiro	Vermelha	Azul

Figura 1. Resultados para detecção do RNA genômico do SARS-CoV-2 para o marcador N1, em amostras de esgoto bruto não concentrado e concentrado (PEG 8000). Marcação azul: RNA do SARS-CoV-2 positivo; marcação vermelha: RNA do SARS-CoV-2 não detectado e marcação cinza: amostra não avaliada.

Mesmo sendo possível detectar o vírus em ambas as condições, a concentração se mostra uma etapa importante para a detecção de SARS-CoV-2 em esgoto bruto. Os dados do monitoramento revelaram alta detecção de SARS-CoV-2 nos meses de maio e junho/2021, bem como no mês de janeiro/2022, que correspondem com o aumento de novos casos de infecção por coronavírus registrados na cidade.¹⁴ Por outro lado, a partir de abril/2021 notou-se uma queda no número de casos, refletindo na diminuição da detecção das cópias de RNA em mesmo período. Essa projeção pode estar associada ao fim da segunda onda de casos de COVID-19 no Brasil, caracterizada principalmente por casos de infecção ou reinfecção pela variante Gama (linhagem P.1) do SARS-CoV-2.¹⁵ Ademais, em janeiro/2022 houve um pico no número de casos, obtendo-se a mais alta detecção do SARS-CoV-2, podendo estar relacionado à disseminação global da

variante preocupante Omicron (linhagem B.1.1.529), já que cerca de 95% dos genomas do SARS-CoV-2 sequenciados em serviços de saúde privados e cidades brasileiras pertencem a essa variante nesse período.¹⁶ Esse pico de detecção também pode ser associado ao fluxo de pessoas na cidade, já que nesse mesmo período registrou-se a maior movimentação de passageiros no aeroporto de Salvador do ano.¹⁷ Assim, de forma geral, o presente estudo reforça a atuação da epidemiologia das águas residuais como método complementar à monitorização epidemiológica do SARS-CoV-2, uma vez que mostra as correlações entre o número de cópias e os dados epidemiológicos da COVID-19.

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Ao estabelecer um estudo de monitoramento de águas residuais no município de Salvador/BA espera-se estabelecer metodologias seguras e confiáveis para análise dos dados. É possível detectar SARS-CoV-2 em amostras de esgoto bruto 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 menor eficiência na detecção, por isso a etapa de concentração é essencial em amostras de esgoto bruto. A WBE se mostra como uma ferramenta não-invasiva e complementar de monitoramento epidemiológico, podendo contribuir para a expansão do uso de WBE para o controle da SARS-CoV-2 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/Decit Nº 07/2020 (processo: 402002/2020-2) que direcionou recursos para a realização deste projeto.

5. REFERÊNCIAS

- 1 AHMED, W. et al. Minimizing errors in RT-PCR detection and quantification of SARS-CoV-2 RNA for wastewater surveillance. **The Science of the Total Environment**, v. 805, p. 149877, 20 jan. 2022.
- 2 JONES, D. L. et al. Shedding of SARS-CoV-2 in feces and urine and its potential role in person-to-person transmission and the environment-based spread of COVID-19. **Science of The Total Environment**, v. 749, p. 141364, 20 dez. 2020.
- 3 BWIRE, G. M. et al. Detection profile of SARS-CoV-2 using RT-PCR in different types of clinical specimens: A systematic review and meta-analysis. **Journal of Medical Virology**, v. 93, n. 2, p. 719-725, 1 fev. 2021.
- 4 GUERRERO-LATORRE, L. et al. SARS-CoV-2 in river water: Implications in low sanitation countries. **Science of The Total Environment**, v. 743, p. 140832, 15 nov. 2020.
- 5 FARKAS, K. et al. Viral indicators for tracking domestic wastewater contamination in the aquatic environment. **Water Research**, v. 181, p. 115926, 15 ago. 2020.
- 6 MONTEIRO, S. et al. A wastewater-based epidemiology tool for COVID-19 surveillance in Portugal. **Science of The Total Environment**, v. 804, p. 150264, 15 jan. 2022
- 7 ROBOTTO, Angelo et al. Wastewater-based SARS-CoV-2 environmental monitoring for Piedmont, Italy. **Environmental Research**, v. 203, p. 111901, jan. 2022.
- 8 CLARO, Ieda Carolina Mantovani et al. Long-term monitoring of SARS-COV-2 RNA in wastewater in Brazil: A more responsive and economical approach. **Water Research**, v. 203, p. 117534, set. 2021.
- 9 BIVINS, Aaron et al. Wastewater-Based Epidemiology: Global Collaborative to Maximize Contributions in the Fight Against COVID-19. **Environmental Science & Technology**, v. 54, n. 13, p. 7754-7757, 12 jun. 2020.
- 10 CORRÊA, E., 2022. Estação de esgoto é religada e técnicos monitoram praias entre Rio Vermelho e Barra. Metro 1. Disponível em: www.metro1.com.br/noticias/cidade/120105,estacao-de-esgoto-e-religada-e-tecnicos-monitoram-praias-entre-rio-vermelho-e-barra. Acesso em: abril 2023.
- 11 EMBASA, 2022. Esgotamento sanitário. Disponível em: www.embasa.ba.gov.br/index.php/institucional/atuacao-embasa/esgotamento-sanitario. Acesso em: abril 2023.
- 12 CDC. CDC 2019-Novel Coronavirus (2019-nCoV) Real-Time RT-PCR Diagnostic panel for emergency use only instructions for use. 2020
- 13 MEDEMA, Gertjan 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, 20 maio 2020.
- 14 SMS. Indicadores Covid-19. Disponível em: www.saude.salvador.ba.gov.br/covid/indicadorescovid/. Acesso em: abril 2023.
- 15 ZEISER, Felipe André et al. First and second COVID-19 waves in Brazil: A cross-sectional study of patients' characteristics related to hospitalization and in-hospital mortality. **The Lancet Regional Health - Americas**, v. 6, p. 100107, fev. 2022.
- 16 TAYLOR, Luke. Covid-19: Brazil sees omicron cases soar but data blackout obscures true impact. **BMJ**, p. o133, 18 jan. 2022.
- 17 SETUR. Movimentação Passageiros no Aeroporto de Salvador-BA. Disponível em: www.observatorio.turismo.ba.gov.br/indicadores/aeroportos/. Acesso em: abril 2023.