**DETECÇÃO DO SARS-COV-2 EM ÁGUAS RESIDUAIS: UMA BREVE ANÁLISE SOBRE ESTAÇÕES DE TRATAMENTO DE PEQUENO PORTE**

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

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

2 Graduando em Biomedicina; Iniciação científica – SENAI CIMATEC; matheus.carmos@outlook.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 (WBE) é uma ferramenta de monitoramento amplamente utilizada no mundo por ser uma metodologia de baixo custo relativo capaz de abranger um grande número de pessoas, além de ser um método não invasivo de análise. Neste estudo, a abordagem WBE foi empregada em águas residuais para detecção do material genético do vírus SARS-CoV-2 em duas estações de tratamento do município de Salvador. Como método de concentração foi empregada a precipitação por PEG 8000 para águas tratadas e não tratadas. A precipitação por PEG 8000 se mostrou um método eficaz para auxiliar na detecção de material genético do SARS-CoV-2. A WBE se mostra como uma importante ferramenta para monitoramento de casos de COVID-19, auxiliando assim nas tomadas de decisão de saúde pública, mas também identificando o surgimento de novas variantes do vírus.

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

**1. INTRODUÇÃO**

 A análise de amostras de águas resíduas é uma ferramenta importante, devido a sua capacidade de identificar diversas doenças de veiculação hídrica, tais como cólera, diarreias e hepatites.1,2,6,7 O monitoramento do esgoto como ferramenta epidemiológica para avaliar os níveis de saúde de uma população já é uma abordagem empregada há muitos anos e atua de forma abrangente, eficaz e tem baixo custo relativo10,8,1,7. A epidemiologia baseada em águas residuais (WBE, do inglês *wastewater based epidemiology*) é suscitada novamente no âmbito da pandemia da COVID-19 como uma ferramenta de valor epidemiológico preditivo que auxilia no surgimento de surtos de doenças como a COVID-193,6,10,9, pois pode anteceder picos dessa doença em até semanas antes do surto, servindo com uma ferramenta auxiliar no manejo clínico e nas tomadas de decisões de saúde pública.8,7,1,9,10 A eliminação de traços do RNA de SARS-CoV-2 através das fezes permite a detecção do material genético viral no esgoto, proveniente de indivíduos infectados, tanto sintomáticos, quanto assintomáticos.2,9,5,10 Nesse contexto, o presente estudo buscou analisar amostras de esgoto não tratado (esgoto bruto) e tratado (efluente final) das Estação de Tratamento de Esgoto (ETE) de pequeno porte do município de Salvador quanto a presença ou ausência de SARS-CoV-2.

**2. METODOLOGIA**

**2.1 Amostras**

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 –80ºC até o uso.

**2.2 Concentração de SARS-CoV-2**

Para a precipitação por PEG 8000 foram utilizados 40mL de amostra (esgoto ou efluente) acrescidos de 4g de PEG e 0,9g cloreto de sódio, sendo também adicionados 18uL de controle exógeno (Lentivírus com plasmídeo pGip, que contém o gene da proteína fluorescente, GFP) como controle de reação. Para os controles positivo e negativo foram utilizados 40mL de PBS 0,01 M, pH 7,2 e diluição 1x, sendo acrescidos 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 ao controle positivo. Os tubos foram alocados a 4°C e mantidos em agitação overnight. Em seguida, as amostras com PEG foram centrifugadas, o sobrenadante descartado e o pellet ressuspenso em 1.000uL de PBS 1x. 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.

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

Para a extração foi utilizado o sistema automatizado KingFisher™ Duo Prime System seguindo o manual do fabricante, sendo empregados como reagentes o kit MagMax™ Viral/Pathogen II. 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) 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**

 A etapa de limpeza das amostras de esgoto é essencial. Isso pois, sua matriz é bastante complexa, sendo composta por diversos microrganismos, tais como vírus entéricos, fungos, bactérias, protozoários e outros compostos.1,2,3,9,10 Diante disso, todas as amostras de RNA oriundas de esgoto bruto e efluente final prosseguiram para a qPCR, após a etapa de limpeza, pois estavam livres de inibição conforme determinado pela análise do controle exógeno eGFP (não ilustrado).

Todas as amostras foram analisadas para os genes N1 e N2, porém apenas o marcador N1 foi considerado, tendo em vista sua maior sensibilidade em comparação com outros marcadores moleculares para o SARS-CoV-2.2 Através do qPCR, foi possível detectar o material genético do SARS-CoV-2 tanto em amostras de esgoto não tratado, quanto tratado, bem como em amostras que passaram ou não pela etapa de concentração com PEG 8000. Sendo assim, independentemente do tipo de amostra ou da presença ou não do método de concentração (uso de PEG 8000), o SARS-CoV-2 foi detectado (figura 1).



**Figura 1.** Resultados para detecção do RNA genômico do SARS-CoV-2 para o marcador N1, em amostras de esgoto bruto e efluente final, não concentrado (N1 TO) e concentrado (N1 T1). Marcação laranja: RNA do SARS-CoV-2 não detectado; marcação verde: RNA do SARS-CoV-2 detectado.

Para as amostras de efluente final, as análises com concentração obtiveram melhor resultado. Dentre as amostras de efluente final concentradas, em 67% foi possível detectar o RNA viral, enquanto apenas 58% das amostras sem concentração foram positivas. Este resultado indica que a concentração é etapa crucial, capaz de assegurar melhores resultados e evitar falsos negativos. Por ser tratado quimicamente, é esperado que o efluente final tenha uma carga viral baixa ou não tenha SARS-CoV-2, o que não foi encontrado nas análises. A quantificação de cópias de SARS-CoV-2 em efluente final apresentou valores entre 1,86x106 e 5,53x107 cópias, e tais valores podem ser comparados ao número de cópias em esgoto bruto (sem tratamento), no qual foram encontradas entre 1,34x106 e 4,93x109 cópias virais. O tratamento empregado para esgoto bruto não se mostra eficaz para eliminar o SARS-CoV-2, haja vista que é possível encontrar o vírus em alta quantidade no efluente final.

**4. CONSIDERAÇÕES FINAIS**

 Foi possível detectar SARS-CoV-2 em amostras de esgoto e efluente concentradas ou não concentradas. A ausência da concentração leva a uma menor eficiência na detecção, por isso a etapa de concentração é essencial em amostras de esgoto bruto e efluente final. Além disso, nossos dados reforçam a importância da aplicação do WBE, tendo em vista sua capacidade não invasiva de complementar o monitoramento epidemiológico, de forma a contribuir no controle do SARS-CoV-2, sobretudo no munícipio de Salvador/BA. Ao estabelecer a vigilância de ETEs de pequeno porte é possível observar que, apesar de atenderem uma faixa restrita da população, essas ETEs possuem significante relevância epidemiológica, pois nos fornecem dados acerca de uma dada população.

**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, Warish *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. **Science of The Total Environment**, v. 761, p. 144216, mar. 2021. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.144216. Acesso em: 12 abr. 2023.
2. 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. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.watres.2021.117534. Acesso em: 11 abr. 2023.
3. BIVINS, Aaron *et al.* Within- and between-Day Variability of SARS-CoV-2 RNA in Municipal Wastewater during Periods of Varying COVID-19 Prevalence and Positivity. **ACS ES&T Water**, v. 1, n. 9, p. 2097-2108, 13 ago. 2021. Disponível em: https://doi.org/10.1021/acsestwater.1c00178. Acesso em: 13 abr. 2023.
4. CERVANTES-AVILÉS, Pabel; MORENO-ANDRADE, Iván; CARRILLO-REYES, Julián. 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. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.jwpe.2021.101947. Acesso em: 13 abr. 2023.
5. DE FREITAS BUENO, Rodrigo *et al.* Wastewater-based epidemiology: A Brazilian SARS-COV-2 surveillance experience. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 10, n. 5, p. 108298, out. 2022. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.jece.2022.108298. Acesso em: 12 abr. 2023.
6. MAO, Kang; ZHANG, Hua; YANG, Zhugen. Can a Paper-Based Device Trace COVID-19 Sources with Wastewater-Based Epidemiology? **Environmental Science & Technology**, v. 54, n. 7, p. 3733-3735, 23 mar. 2020. Disponível em: https://doi.org/10.1021/acs.est.0c01174. Acesso em: 10 abr. 2023.
7. ORIVE, Gorka; LERTXUNDI, Unax; BARCELO, Damia. Early SARS-CoV-2 outbreak detection by sewage-based epidemiology. **Science of The Total Environment**, v. 732, p. 139298, ago. 2020. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.139298. Acesso em: 12 abr. 2023.
8. POLO, David *et al.* Making waves: Wastewater-based epidemiology for COVID-19 – approaches and challenges for surveillance and prediction. **Water Research**, v. 186, p. 116404, nov. 2020. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.watres.2020.116404. Acesso em: 12 abr. 2023.
9. PRADO, Tatiana *et al.* WASTEWATER-BASED EPIDEMIOLOGY AS A USEFUL TOOL TO TRACK SARS-CoV-2 AND SUPPORT PUBLIC HEALTH POLICIES AT MUNICIPAL LEVEL IN BRAZIL. **Water Research**, p. 116810, jan. 2021. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.watres.2021.116810. Acesso em: 12 abr. 2023.
10. ZHOU, Zili et al. Effect of Gastrointestinal Symptoms in Patients With COVID-19. **Gastroenterology**, v. 158, n. 8, p. 2294-2297, jun. 2020. Disponível em: https://doi.org/10.1053/j.gastro.2020.03.020. Acesso em: 11 abr. 2023.