

Padronização de método de concentração e extração de ácidos nucleicos em amostras de esgoto sanitário: Uma ferramenta de baixo custo para ser utilizada na vigilância epidemiológica de SARS-CoV-2

Standardization of the method of concentration and extraction of nucleic acids in wastewater samples: A low-cost tool for use in a surveillance SARS-CoV-2

Aline Diniz Cabral¹, Ieda Carolina Mantovani Claro¹, Matheus Ribeiro Augusto¹, Veronica Nikoluk Friolani¹, Cintia de Espindola Bezerra¹, Melissa Cristina Pereira Graciosa¹, Fernando Luiz Affonso Fonseca³, Marcia Aparecida Speranca² e Rodrigo de Freitas Bueno^{1*}

¹Universidade Federal do ABC. CECS – Centro de Engenharia, Modelagem e Ciências Sociais Aplicada – UFABC.

²Universidade Federal do ABC. CCNH – Centro de Ciências Naturais e Humanas – UFABC.

³Centro Universitário Médico ABC (FMABC), Departamento de Análises Clínicas, Santo André, SP, Brasil.

*Autor correspondente: rodrigo.bueno@ufabc.edu.br

Resumo

A vigilância da qualidade dos esgotos sanitários pode representar uma ferramenta complementar para monitoramento de doenças infecciosas e prevenção de surtos epidêmicos, especialmente quando a capacidade para testes clínicos é limitada. Desta maneira, o presente estudo descreve o detalhamento técnico de um método de baixo custo para concentração e extração de ácidos nucleicos de amostras de esgoto sanitário, como etapa prévia para detecção de vírus e outros agentes patogênicos. Para validar a metodologia proposta, após as etapas de concentração e extração, analisaram-se a presença do RNA do SARS-CoV-2 (COVID-19) nas amostras, através do PCR em tempo real. O RNA do vírus foi detectado em 80% das amostras de esgoto sanitário analisadas, comprovando o êxito do procedimento metodológico adotado. A detecção precoce de um patógeno associado ao trabalho de equipes multidisciplinares possibilita a prática da vigilância epidemiológica, que auxilia na tomada de decisões na Saúde Única – união indissociável entre a saúde animal, humana e ambiental.

Palavras chave: Saúde Única, COVID-19, Epidemiologia, Esgoto Sanitário.

Abstract

Surveillance of the quality of sewage can represent a complementary tool for monitoring infectious diseases and preventing epidemic outbreaks, especially when the capacity for clinical testing is limited. Thus, the present study describes the technical details of a low-cost method for concentrating and extracting nucleic acids from sewage samples, as a preliminary step for the detection of viruses and other pathogens. To validate the proposed methodology, after the concentration and extraction steps, the presence of the SARS coronavirus-2 (COVID-19) in the samples was analyzed using real-time PCR. The virus's RNA was detected in 80% of the sewage samples analyzed, proving the success of the methodological procedure adopted. The early detection of a pathogen associated with the work of multidisciplinary teams allows the practice of epidemiological surveillance, which assists in making decisions about One Health - an inseparable union between animal, human and environmental health.

Keywords: Only health, COVID-19, Epidemiology and Wastewater.

Introdução

A pandemia da COVID-19 tem como agente etiológico o coronavírus SARS-CoV-2 de origem zoonótica, tendo alta similaridade genética com espécies de coronavírus de morcegos, de forma similar aos coronavírus causadores da Síndrome Respiratória Aguda do Oriente Médio (MERS) e do SARS-CoV-1. A COVID-19, que já resultou em milhares de óbitos em todo o mundo desde sua identificação na China, em dezembro de 2019, constitui-se em um exemplo de emergência de uma zoonose decorrente de ação antrópica, de difícil contenção devido a forma de transmissão (humano a humano por via aérea) e características biológicas. Além da variabilidade nos sintomas como tosse, febre, dificuldade para respirar, dor de garganta, diarreia e pneumonia, há uma grande quantidade de indivíduos assintomáticos transmissores do vírus, sendo a detecção da circulação do vírus e a quarentena fundamentais para o controle de sua disseminação. A presença de ácidos nucleicos do SARS-CoV-2 foi relatada em fezes e urina de indivíduos infectados, e por este motivo vem sendo avaliada também em esgotos sanitários. No entanto, a via fecal-oral não foi confirmada como uma rota de transmissão do vírus (CHERNICHARO et al., 2020; FIOCRUZ, 2020; MEDEMA et al., 2020; NEMUDRY et al., 2020; OPAS, 2020; SUN et al., 2020; WU et al, 2020b; XU et al., 2020; ZHANG et al., 2020).

Neste contexto, a epidemiologia baseada em águas residuárias (WBE - Wastewater-Based Epidemiology) é uma abordagem inovadora que permite a obtenção de informações sobre a presença de patógenos em grupos populacionais por meio da análise dos dejetos, sendo

uma ferramenta proposta em 2001 e aplicada a partir de 2005 de modo a complementar as técnicas existentes para estimar o uso de drogas numa dada população (KASPRZYK-HORDERN et al., 2014; LU et al., 2020). Atualmente esta ferramenta está sendo utilizada para a vigilância epidemiológica, servindo como um instrumento para planejamento, organização e operacionalização dos serviços de saúde, bem como para a normatização de atividades técnicas relacionadas, o que permite o monitoramento e a avaliação da situação de saúde no território, além de apoiar as decisões da gestão (BRASIL, 2006, 2009; LU et al., 2020).

Geralmente, a etapa limitante nas análises moleculares para detecção de vírus e outros agentes patogênicos no esgoto sanitário, é a etapa de concentração primária. Esgoto sanitário pode ser considerado como aquele que provém principalmente de residências, estabelecimentos comerciais, instituições ou quaisquer edificações que disponham de instalações de banheiros, lavanderias e cozinhas, sejam elas urbanas ou rurais. Compõe-se essencialmente da água de banho, excretas, sabão, detergentes e águas de lavagens. As urinas e fezes, além de outros compostos que podem ocorrer nos esgotos sanitários, constituem 0,1% das impurezas, sendo o restante (99,9%) essencialmente água. O material genético dos vírus e outros microrganismos encontra-se, portanto, muito diluído nesta matriz (TCHOBANOGLIOUS et al., 2013).

A efetividade da epidemiologia baseada em águas residuárias (WBE) depende da qualidade dos dados de quantificação dos microrganismos patogênicos, que por sua vez dependem da qualidade do produto da concentração primária da amostra (LU et al., 2020). No caso de um vírus com genoma constituído de RNA, como o SARS-CoV-2, uma nanopartícula de fácil degradação nas condições do esgoto sanitário, a recuperação por concentração torna-se ainda mais difícil. Os principais métodos utilizados para concentração primária de amostras podem ser divididos em três grandes grupos: adsorção (*Viruses Adsorption-ELution – VIRADEL*), ultrafiltração e precipitação/separação de fases.

Os métodos de adsorção (VIRADEL), baseados na filtração em membranas eletrostaticamente carregadas (eletronegativas e eletropositivas), embora sejam muito utilizados para concentração primária de amostras, têm apresentado algumas desvantagens quando aplicados às amostras de esgoto sanitário. Os compostos orgânicos dissolvidos nas amostras também sofrem adsorção, promovendo a colmatação prematura das membranas e reduzindo a eficiência de recuperação dos vírus (LU et al., 2020). Ahmed et al. (2020) não verificaram a influência negativa da matéria orgânica no pré-tratamento da amostra, mas recomendaram estudos complementares e a adaptação de outros métodos para aumentar a eficiência de recuperação dos vírus.

Os métodos de ultrafiltração já demonstraram uma adequada eficiência de concentração, especialmente nos equipamentos de fluxo tangencial. No entanto, estes equipamentos são

normalmente grandes, imóveis e não se encontram prontamente disponíveis na maioria dos laboratórios de saneamento. Além disso, uma quantidade limitada de estudos demonstrou a aplicabilidade e viabilidade destes métodos para a concentração do SARS-CoV-2 (LU et al., 2020).

Os métodos de precipitação, baseados na utilização de polietilenoglicol (PEG), têm demonstrado excelente desempenho na concentração do vírus para amostras de esgoto sanitário, possibilitando excelente recuperação (LU et al., 2020; WU et al., 2020a). Estes métodos ainda oferecem excelente custo-benefício, uma vez que a maioria dos equipamentos e insumos utilizados são normalmente encontrados em laboratórios de saneamento. LU et al. (2020), após analisar dezoito relevantes trabalhos sobre detecção de SARs-CoV-2 no esgoto sanitário, recomendaram o método de precipitação com PEG, especialmente para maiores volumes de amostras e maiores níveis de matéria orgânica e turbidez.

Desta maneira, o presente manuscrito tem por objetivo compartilhar um método de concentração e extração de ácidos nucleicos para amostras de esgoto sanitário, baseado no método de precipitação com PEG, de baixo custo e que permite a detecção e quantificação de RNA de SARS-CoV-2 por RT-PCR em tempo real. O método proposto pode fornecer uma ferramenta complementar à vigilância epidemiológica, para monitoramento de patógenos circulantes e de doenças emergentes/re-emergentes.

Materiais e Métodos

Instrumentação e reagentes

Para implementação do método de concentração e extração de ácidos nucleicos de amostras de esgoto sanitário, foram necessários equipamentos como cabine de fluxo laminar, centrífuga refrigerada, cabine para PCR, termociclador e equipamento para PCR em tempo real e sistema de eletroforese. Também foram necessários conjuntos de pipetas, ponteiros e reagentes diversos, como agarose, Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético (EDTA), PEG8000 e reagentes para biologia molecular, entre eles a polimerase, didesoxirribonucleotídeos (dNTPs) e sondas marcadas com fluorocromo.

Amostragem

As amostras de esgoto sanitário foram coletadas semanalmente, entre os dias 08/06/2020 e 10/07/2020 (5 semanas consecutivas), na estação de tratamento de esgoto do ABC (ETE ABC), região metropolitana de São Paulo/SP. Foram realizadas amostragens compostas,

de 24 horas, através de um amostrador automático Hach refrigerado (modelo AWRS AS950), com temperatura de coleta de 4°C. Ressaltamos aqui, que o plano de amostragem é parte fundamental para o sucesso da vigilância epidemiológica baseada em águas residuárias. Neste estudo não abordaremos este aspecto e recomendamos a leitura da Nota Técnica intitulada “Contribuição para elaboração de planos de monitoramento da ocorrência do novo coronavírus no esgoto” publicada recentemente pelo INCT – ETEs Sustentáveis (CHERNICHARO et al., 2020).

Procedimentos metodológicos de concentração e extração

A concentração de partículas presentes no esgoto sanitário foi realizada por modificação da técnica de concentração com polietilenoglicol (PEG), apresentada por Wu et al. (2020a), detalhada a seguir. Uma alíquota de 40 mL de esgoto bruto homogeneizada foi colocada em um tubo cônico de centrifuga de 50 mL, contendo 4 g de Polietilenoglicol 8000 (8% w/v, Sigma) e 0,9 g de Cloreto de Sódio (Synth). Como controle de precipitação de ácidos nucleicos, foram acrescentados 2 µL de plasmídeo (pET 28a - Novagen). A amostra foi homogeneizada até completa dissolução dos solutos e então foi submetida à centrifugação por 60 min, a 15.000g em temperatura de 4°C. Após centrifugação, toda a água foi descartada e o precipitado foi dissolvido em 0,4 mL de solução tampão salina-fosfato (PBS 0,1M, pH 7.2) e transferido para um microtubo de 1,5 mL. Ao precipitado dissolvido em PBS foi acrescentado 1 mL de fenol ácido (Phoneutria), e após agitação vigorosa foi submetido à centrifugação por 10 min a 12.000g e 4°C. Posteriormente, a fase aquosa contendo macromoléculas solúveis foi transferida para um microtubo de 2 mL, no qual foram acrescentados 1 mL de trizol *homemade* (38% fenol ácido, 0.8M Isotiocianato de Guanidina, 0.4M Tiocianato de Amônio, 0.1M Acetato de Sódio pH 5, 5% Glicerol) e 200 µL de Clorofórmio (Merck). Em sequência, homogeneizou-se vigorosamente e prosseguiu-se com a centrifugação a 4°C por 10 min e rotação de 12.000g. A fase aquosa contendo ácidos nucleicos (DNA e RNA) foi transferida para outro microtubo de 2 mL contendo 1,5 mL de etanol absoluto (Merck). O microtubo foi homogeneizado por inversão e submetido à centrifugação refrigerada a 4°C por 10 min, a 12.000g. Descartou-se o sobrenadante e o precipitado foi lavado com 1 mL de etanol a 70%, homogeneizado por inversão, e submetido à centrifugação a 4°C por 10 min, a 12.000g. O sobrenadante foi descartado e o microtubo foi invertido em papel absorvente, para repousar até a completa secagem por evaporação em temperatura ambiente. Em sequência foi realizada a dissolução do *pellet* em 40 µL de água ultrapura livre de RNase. O material dissolvido foi armazenado em

ultra freezer a -80°C até o momento do uso. O resumo da metodologia pode ser visualizado na Figura 1.

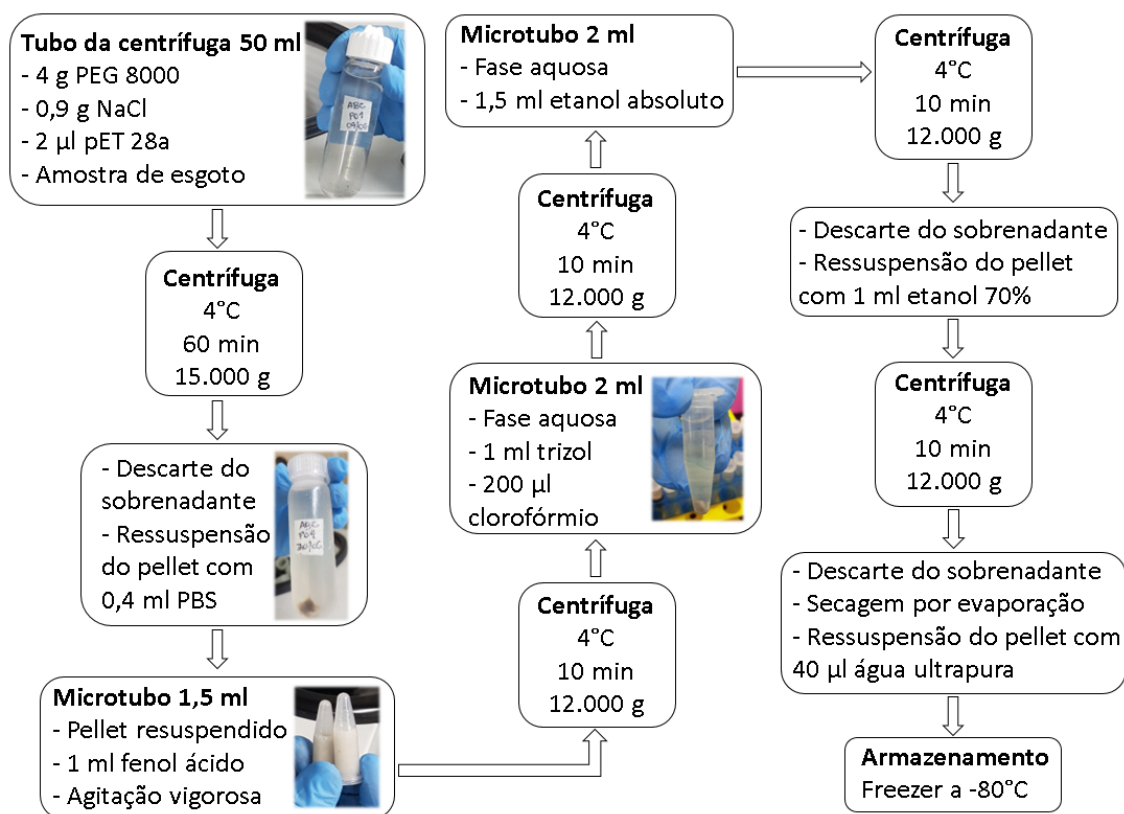


Figura 1 – Etapas do método de concentração e extração de ácidos nucleicos

Deteccção do RNA viral e do plasmídeo

Após as etapas de concentração e purificação de ácidos nucleicos no esgoto sanitário, procedeu-se a etapa de detecccção do RNA do SARS-CoV-2 por RT-PCR em tempo real. Para isso, foi utilizado o kit 2019-nCoV TaqMan RT-PCR da Norgen, que detecta o RNA específico para SARS-CoV-2 em uma única etapa de reação, de acordo com instruções do fabricante. Os alvos de SARS-CoV-2 detectados com o kit da Norgen são os fragmentos denominados N1 e N2 correspondente ao gene que codifica a proteína do nucleocapsídeo viral; e a RNase P corresponde ao gene humano utilizado como controle interno.

O protocolo foi descrito pelo Centro de Controle de Doenças dos Estados Unidos da America (CDC). Resumidamente, para cada reação de RT-PCR em tempo real, com cada um dos três alvos, utilizaram-se 10 µL de *2x One-Step RT-PCR Master Mix*, 1,5 µL de

Primer&Probe Mix, 3,5 µL de água livre de nuclease, reagentes contidos no Kit, e 5 µL de amostra de RNA, totalizando um volume final de 20 µL.

Como controles da reação de RT-PCR em tempo real o kit fornece um controle positivo, contendo a sequência dos alvos dos genes que codificam o nucleocapsídeo nCoV (N1 e N2) e a RNase P humana com número de cópias conhecido. Para quantificação das amostras, foram incluídas em cada reação, as diluições seriadas dos genes alvo controles, utilizando Rotor-Gene Q (Qiagen), seguindo o programa: ciclo 1 - 50°C por 30 minutos; ciclo 2 - 95°C por 3 minutos; ciclo 3 - 45x95°C por 3 segundos e 55°C por 30 segundos (adquirindo a fluorescência no filtro verde, pois as sondas contêm a fluorescência FAM). As amostras são processadas em duplicata assim como as curvas controle padrão, utilizando-se o equipamento Rotor-Gene Q (Qiagen) para qRT-PCR.

Para confirmar a concentração e extração de ácidos nucleicos, 1µL de plasmídeo (pET 28a) a 100ng/µL foi adicionado randomicamente em 20% das amostras antes da centrifugação. A detecção do plasmídeo (pET 28a – Novagen) foi realizada por meio da PCR convencional (termociclador Applied Biosystems™), sendo utilizados oligonucleotídeos direcionados à região T7 (Tabela 1).

Para uma reação de 25µL de volume final foi utilizada a seguinte mistura de reagentes: tampão de reação (KCl 50mM; Tris-HCl 10mM, pH 9,0), 200µM de cada nucleotídeo (dATP, dTTP, dCTP, dGTP), 0,10µM de cada oligonucleotídeo, 2mM de MgCl₂, 0,5 unidade de Taq DNA polimerase e 2µL de DNA extraído. Essa mistura foi submetida a uma desnaturação inicial (94°C 3’), seguida de 40 ciclos de desnaturação (94°C 30’’), hibridização (60°C 30’’) e extensão (72°C 45’’), finalizando com uma extensão final (72°C 7’ e 4°C ∞).

A recuperação do plasmídeo foi obtida por meio de eletroforese em gel de agarose 1%, corado com UniSafe Dye® (20,000x Uniscience), sendo as bandas (~347pb) visualizadas por meio de fotodocumentador UV (L-PIX Loccus).

Tabela 1 – Sequências de oligonucleotídeos.

Oligonucleotídeos	Sequência
T7_senso	5’ TTAATACGACTCACTATAGGGGAATTG 3’
T7_anti-senso	5’ GCTAGTTATTGCTCAGCGGTGG 3’

Resultados e discussão

Concentração e extração das amostras de esgoto sanitário

Na Figura 2 está ilustrada a eletroforese em gel de agarose (1%), demonstrando a recuperação do plasmídeo, validando o método de concentração e extração de ácidos nucleicos de amostras de esgoto sanitário descrito no presente trabalho. Além do método de precipitação com PEG, existem outros métodos de concentração e extração utilizados por diferentes grupos, podendo citar o método de adsorção-extração por filtração em membrana eletronegativa ou eletropositiva (LUKASIK et al., 2000; BOSH et al., 2011), ultrafiltração (SOULE et al., 2000; RAJAL et al., 2007; HILL et al., 2007), ultracentrifugação (FORMIGA-CRUZ et al., 2005; HE; JIANG 2005; ALBINA-GIMENEZ et al., 2006; SILVA et al., 2011) e diversos protocolos para extração de ácidos nucléicos como sílica, fenol-clorofórmio, além de vários kits comerciais. Portanto, as vantagens do método utilizado no presente estudo para concentração e extração de ácido nucléico padronizados, dispensam o uso de membranas e equipamentos de custo elevado como ultracentrífugas, o que pode ser atrativo para incorporação em rotinas de laboratório de microbiologia, na detecção de patógenos presentes em amostras de esgoto sanitário.

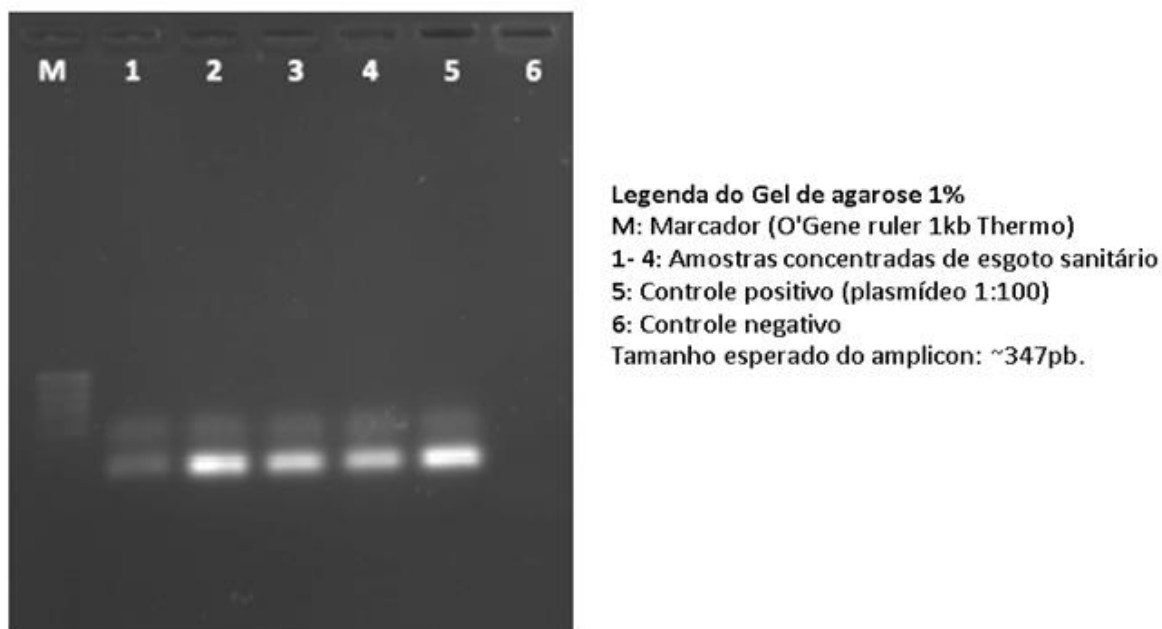


Figura 2 – Amostras de esgoto sanitário concentradas em gel de eletroforese

Detecção do SARS-CoV-2 em amostras de esgoto sanitário

Os resultados da detecção do SARS-CoV-2 nas amostras do esgoto sanitário afluyente à ETE ABC estão apresentados na Figura 3.

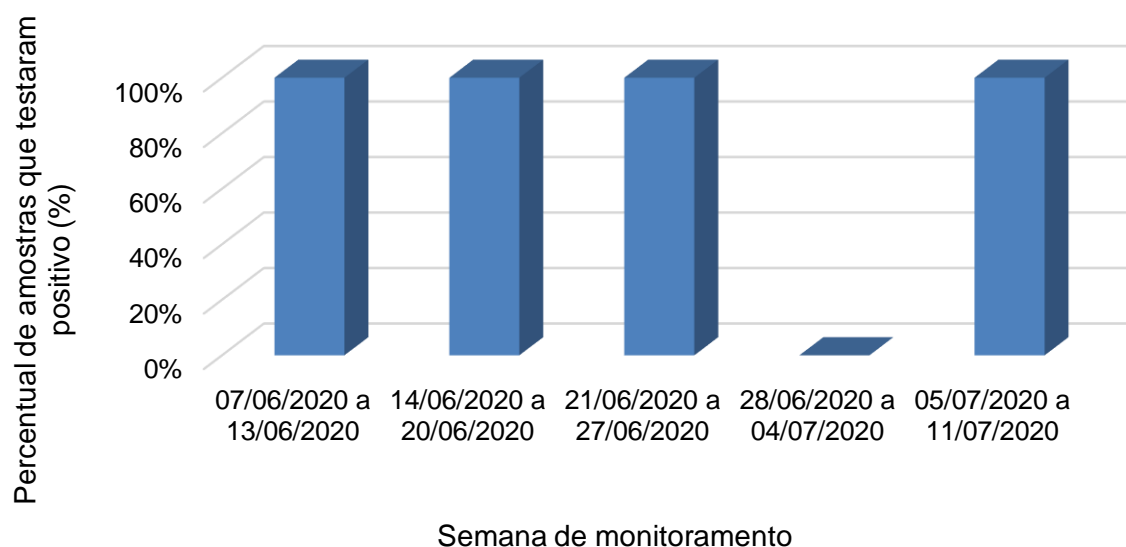


Figura 3 – Percentuais das amostras de esgoto que testaram positivo para ocorrência do novo coronavírus ao longo de 5 semanas consecutivas de monitoramento

O RNA do SARS-CoV-2 foi detectado em 100% das amostras das semanas 1, 2, 3 e 5 de monitoramento. Na semana 4 a concentração do material genético do vírus foi abaixo do nível de detecção na amostra de esgoto. Desta maneira, 80% das amostras analisadas testaram positivas, comprovando a eficácia do procedimento metodológico proposto para concentração, extração e detecção do novo coronavírus em amostras de esgoto sanitário.

Na literatura, encontram-se disponíveis diversos artigos baseados na concentração e detecção viral em amostras de esgoto sanitário, sendo que até o momento não há um protocolo único que seja utilizado como padrão para determinar a concentração viral do SARS-CoV-2 em águas (SYMONDS et al., 2014; AHMED et al., 2015, AHMED et al., 2020a,b, KITAJIMA et al., 2020). Os resultados aqui representados são preliminares e ainda serão correlacionados com a concentração viral bem como números de infectados em publicações futuras do grupo de pesquisa.

Outros grupos de pesquisa também conseguiram detectar a presença do SARS-CoV-2 em amostras de esgoto sanitário, na Holanda (MEDEMA et al., 2020), Espanha (RANDAZZO et al., 2020), Austrália (AHMED et al., 2020), Estados Unidos (WU et al., 2020) e até mesmo no Brasil (CHERNICHARO et al., 2020).

Ahmed et al. (2020), por exemplo, detectaram concentrações do RNA do vírus de 1,9 a 12 cópias/100mL no esgoto sanitário de Brisbane, Austrália. No entanto, somente 22,2% das amostras analisadas apresentaram resultados positivos para o SARS-CoV-2. Os autores ainda verificaram inconsistências em alguns resultados, quando realizaram comparação entre dois métodos de concentração, filtração em membrana eletronegativa e ultrafiltração.

Randazzo et al. (2020), analisando amostras de esgoto sanitário afluyente de ETEs instaladas nas principais cidades da região de Murcia, Espanha, detectaram concentrações do RNA do vírus superiores a 10^4 cópias/100 mL. Wu et al. (2020), também detectaram concentrações desta ordem de magnitude, em Massachusetts, Estados Unidos.

No presente estudo, para ETE ABC foi detectado concentrações de RNA do vírus na faixa de $8,0 \times 10^1$ a $1,3 \times 10^3$ cópias/mL, com valores médios de $2,20 \times 10^2$. Como ainda não existe uma metodologia padronizada para concentração e detecção do vírus, verifica-se grande diferença nos resultados de concentração de RNA entre os diferentes trabalhos.

Considerações importantes sobre aplicações da metodologia proposta

Para a realização de um trabalho epidemiológico, em que se deseja diagnosticar um agente patogênico circulante em esgoto sanitário, é de suma importância estabelecer os pontos de amostragem e qual a população atendida. Após estabelecer a amostragem tem que se atentar ao método de coleta e preservação da amostra até a chegada ao laboratório.

É importante ressaltar, que no esgoto sanitário não existe apenas a presença de dejetos humanos, mas também de animais sinantrópicos (roedores, marsupiais, morcegos, pombos e outras aves) e animais de estimação, que podem ser carreados pelas águas pluviais e de lavagem de pisos, até os sistemas de esgotamento sanitário.

Na maior parte dos municípios brasileiros, os sistemas de esgotamento sanitários são do tipo separador absoluto (esgoto sanitário e águas pluviais são transportados por diferentes tubulações), porém, os agentes patogênicos alcançam as correntes de esgoto sanitário devido a existência de ligações clandestinas e ocupações irregulares (BERTOLINO et al., 2018).

O Método adotado no laboratório para testar Sars-CoV-2 em esgoto sanitário deve ser simples, acessível e confiável, tendo em vista a implantação de um programa de vigilância epidemiológico, deve se atentar a capacidade do laboratório e a viabilidade econômica. Em suma, a colaboração entre os grupos de pesquisa neste momento, terá um papel importante no desenvolvimento e compartilhamento de protocolos e resultados comparáveis entre regiões geográficas e escalas temporais semelhantes. Uma abordagem multidisciplinar em escala

regional é necessária para que resultados oportunos e de alto impacto guiem a comunidade científica e tecnológica e tenham impacto direto na sociedade.

Conclusão

Os resultados deste trabalho demonstraram que foi possível adaptar e desenvolver um método para concentração de esgoto sanitário e recuperação do RNA viral (SARS-CoV-2) de forma eficaz e acessível. Os resultados ainda demonstraram que foi possível detectar a presença do novo coronavírus em amostras de esgoto na região do ABC por meio de PCR em tempo real. Esta metodologia pode integrar às ferramentas de vigilância epidemiológica de patógenos e pode ser utilizada como uma opção promissora ao enfrentamento da COVID-19.

Agradecimentos

Os autores agradecem à Universidade Federal do ABC pelo apoio a pesquisa - EDITAL-UFABC. Nº 41/2020 - REIT - 11.01. Agradecemos ao INCT ETS's Sustentáveis pela parceria em pesquisas em Rede. Agradecemos diretamente pelos recursos financeiros disponibilizados pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq, em parceria com o Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações – MCTIC, e o Ministério da Saúde – MS, por meio do Departamento de Ciência e Tecnologia da Secretaria de Ciência, Tecnologia, Inovação e Insumos Estratégicos em Saúde – Decit/SCTIE Nº 07/2020 - Pesquisas para enfrentamento da COVID-19, suas consequências e outras síndromes respiratórias agudas graves - Número do Processo: 402432/2020-7.

Referências

AHMED, W.; HARWOOD, V.J.; GYAWALI, P.; SIDHU, J. P. S.; TOZE, S. Comparison of concentration methods for quantitative detection of sewage-associated viral markers in environmental waters. *Applied and Environmental Microbiology*, v.81, n. 6, 2015, p. 2042-2049.

AHMED, W.; ANGEL, N.; EDSON, J.; BIBBY, K.; BIVINS, A.; O'BRIEN, J. W.; CHOI, P. M.; KITAJIMA, M.; SIMPSON, S. L.; LI, J.; TSCHARKE, B.; VERHAGEN, R.; SMITH, W. J. M.; ZAUGG, J.; DIERENS, L.; HUGENHOLTZ, P.; THOMAS, K. V.; MUELLER, J. F.

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, 2020a, p. 138764.

AHMED, W.; BERTSCH, P.M.; BIVINS, A.; BIBBY, K.; FARKAS, K.; GATHERCOLE, A.; HARAMOTO, E.; GYAWALI, P.; KORAJKIC, A.; MCMINN, B. R.; MUELLER, J. F.; SIMPSON, S. L.; SMITH, W. J. M.; SYMONDS, E. M.; THOMAS, K. V.; VERHAGEN, R.; KITAJIMA, M. 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, 2020b, p. 139960.

ALBINANA-GIMENEZ, N.; CLEMENTE-CASARES, P.; BOFILL-MAS, S.; HUNDESA, A.; RIBAS, F.; GIRONES, R. Distribution of human polyomaviruses, adenoviruses, and hepatitis E virus in the environment and in a drinking-water treatment plant. *Environmental Science & Technology*, v. 40, 2006, p. 7416-7422.

ARAGÃO, G. C.; OLIVEIRA, D. S.; SANTOS, M. C.; MASCARENHAS, J. P.; OLIVEIRA, C. S.; LINHARES, A. C.; GABBAY, Y. B. Molecular characterization of norovirus, sapovirus and astrovirus in children with acute gastroenteritis from Belém, Pará, Brazil. *Rev Pan-Amaz Saúde*, v. 1, n. 1, 2010, p. 149-158.

BARRELLA, K. M. Pesquisa de vírus entéricos humanos em lodos de esgoto originários de duas ETEs do Estado de São Paulo: estabelecimento e avaliação de metodologia para recuperação e detecção viral. São Paulo, SP: USP, 2008. Originalmente apresentada como tese de doutorado, Universidade de São Paulo, 2008.

BERTOLINO, M.; KONDAGESKI, J. H.; WEINSCHUTZ, R. Água de chuva domiciliar no esgoto separador absoluto. *Revista DAE*, v. 66, n. 213, 2018, p. 100-108.

BOSCH, A., SANCHEZ, G.; ABBASZADEGAN, M., CARDUCCI, A., GUIX, S., LE GUYADER, F.S. et al. Analytical methods for virus detection in water and food. *Food Anal. Methods.*, v. 4, 2011, p. 4-12.

BRASIL. Guia de vigilância epidemiológica. 7. ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2009. 816 p.

BRASIL. Guia de vigilância em saúde. 3. ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2019. 740 p.

BRASIL. Vigilância e controle da qualidade da água para consumo humano. 1. ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2006. 212 p.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION - CDC (2016). *One Health: history*. Disponível em <https://www.cdc.gov/onehealth/basics/history/index.html>

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION - CDC (2017). *One Health: zoonotic diseases*. Disponível em <https://www.cdc.gov/onehealth/basics/zoonotic-diseases.html>

CHERNICHARO, C. A. L.; ARAÚJO, J. C.; MOTA FILHO, C. R.; BRESSANI-RIBEIRO, T; CHAMHUM-SILVA, L. A.; LEAL, C.D.; LEROY, D.; MACHADO, E.; CORDERO, M. F. E.; AZEVEDO, L. S.; FERNANDES, L.; LEÃO, T.; LAGUARDIA, F.; REIS, M. T. P.; MELO, M. C.; AYRIMORAES, S. R. 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*, 2020.

CHERNICHARO, C. A. L.; MOTA FILHO, C. R.; CAVALCANTI, D. L.; ARAÚJO, J. C.; LOBATO, L. C. S.; CHAMHUM-SILVA, L. A.; FUCKNER, M. A.; REIS, M. T. P.; AYRIMORAES, S. R.; BRESSANI-RIBEIRO, T. Contribuição para a elaboração de planos de monitoramento da ocorrência do novo coronavírus no esgoto. INCT ETES Sustentáveis/UFMG; Agência Nacional de Águas; Companhia de Saneamento de Minas Gerais, 2020.

DE PAULA, V. S.; DINIZ-MENDES, L.; VILLAR, L. M.; LUZ, S. L. B.; SILVA, L. A.; JESUS, M. S.; DA SILVA, N. M. V. S.; GASPAR, A. M. C. Hepatitis A virus in environmental water samples from the Amazon Basin. *Water Research*, v. 41, n. 6, 2007, p.1169-1176.

FORMIGA-CRUZ, M.; HUNDESA, A.; CLEMENTE-CASARES, P.; ALBIÑANAGIMENEZ, N.; ALLARD, A.; GIRONES, R. Nested multiplex PCR assay for detection of human enteric viruses in shellfish and sewage. *Journal of Virological Methods*, v. 125, n. 2, 2005, p. 111-118.

FUMIAN, T. M.; GUIMARÃES, F. R.; VAZ, B. J. P. et al. Molecular detection, quantification and characterization of human polyomavirus JC from waste water in Rio De Janeiro, Brazil. *Journal of Water & Health*, v. 8, n. 3, 2010, p. 438-445.

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ – FIOCRUZ (2020). Fiocruz divulga estudo sobre a presença do novo coronavírus em esgotos sanitários. Disponível em <http://portal.fiocruz.br/noticia/fiocruz-divulga-estudo-sobre-presenca-do-novo-coronavirus-em-esgotos-sanitarios>

GARRAFA, P. Avaliação da qualidade virológica do efluente doméstico tratado e disponibilizado para reuso na cidade de São Paulo. São Paulo, SP: USP, 2009. Originalmente apresentada como tese de doutorado, Universidade de São Paulo, 2009.

GUIMARÃES, F. R.; FERREIRA, F. F. M.; VIEIRA, C. B. B.; FUMIAN, T. M.; SHUBO, T.; LEITE, J. P. G. MIAGOSTOVICH, M. P. Molecular detection of human astrovirus in an urban sewage treatment plant in Rio de Janeiro, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 103, n. 8, 2008, p. 819-823.

HE, J.; JIANG, S. Quantification of Enterococci and Human Adenoviruses in Environmental Samples by Real-Time PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 71, n. 5, 2005, p. 2250-2255.

HILL, V. R.; KAHLER, A. M.; JOTHIKUMAR, N.; JOHNSON, T. B.; HAHN, D.; CROMEANS, T. L. Multistate evaluation of an ultrafiltration-based procedure for simultaneous recovery of enteric microbes in 100-liter tap water samples. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 73, n. 13, 2007, p. 4218-4225.

KASPRZYK-HORDERN, B.; BIJLSMA, L.; CASTIGLIONI, S.; COVACI, A.; VOOGT, P.; EMKE, E.; HERNÁNDEZ, F.; ORT, C.; REID, M.; VAN NUJIS, A. L. N.; THOMAS, K. V. Wastewater-based epidemiology for public health monitoring. *Water and Sewerage Journal*, v. 4, 2014, p. 25-26.

KITAJIMA M., AHMED W., BIBBY K., CARDUCCI A. L., GERBA C. P., HAMILTON K. A., HARAMOTO E., ROSE J. B. SARS-CoV-2 in wastewater: State of the knowledge and research needs. *Science of the Total Environment*, v. 739, 2020, p. 139076.

LU, D.; HUANG, Z.; LUO, J.; ZHANG, X.; SHA, S. 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, 2020, p. 141245.

LUKASIK L.; SCOTT, T. M.; ANDRYSHAK, D.; FARRAH, S. R. Influence of Salts on Virus Adsorption to Microporous Filters. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 66, n. 7, 2000, p. 2914-2920.

MEDEMA G, HEIJNEN L, ELSINGA G, ITALIAANDER R, BROUWER A. 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, 2020, p. 511-516.

MORESCO, V.; DAMAZO, N. A.; BARARDI, C. R. M. Thermal and temporal stability on the enteric viruses infectivity in surface freshwater. *Water Supply*, v. 16, n. 3, 2016, p. 620-627.

ORGANIZAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS – ONU (2017). Agenda 2030. Disponível em <https://nacoesunidas.org/pos2015/agenda2030/>

NEMUDRYI, A.; NEMUDRAIA, A.; WIEGAND, T.; SURYA, K.; BUYUKYORUK, M.; CICHA, C.; VANDERWOOD, K. K.; WILKINSON, R.; WIEDENHEFT, B. Temporal Detection and Phylogenetic Assessment of SARS-CoV-2 in Municipal Wastewater. *Cell Reports Medicine*, v. 1, n. 6, 2020, p. 100098.

ORGANIZACAO MUNDIAL DA SAUDE – OMS (2020). Health Topics: Zoonoses Disponível em <https://www.who.int/topics/zoonoses/en/>

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE – OPAS (2020) Folha informativa – COVID-19 – Escritório da OPAS e da OMS no Brasil. Disponível em http://www.paho.org/bra/index.php?option=com_content&view=article&id=6101:covid19&Itemid=875

RAJAL, V. B.; MCSWAIN, B. S.; THOMPSON, D. E.; LEUTENEGGER, C. M.; WUERTZ, S. Molecular quantitative analysis of human viruses in California stormwater. *Water Research*, v. 41, n. 19, 2007, p. 4287-4298.

RANDAZZO, W.; TRUCHADO, P.; CUEVAS-FERRANDO, E.; SIMÓN, P.; ALLENDE, A.; SÁNCHEZ, G. SARS-CoV-2 RNA in Wastewater Anticipated COVID-19 Occurrence in a Low Prevalence Area. *Water Research*, v. 181, 2020, p. 115942

SILVA, H. D.; ANUNCIACÃO, C. E.; SANTOS, S. F. O.; GARCIA-ZAPATA, M. T. A. Análise virológica da qualidade da água: uma revisão das metodologias de concentração e detecção viral. *Revista Brasileira de Biociências*, v. 9, n. 3, 2011, p. 405-415.

SOULE, H.; GENOULZ, O.; GRATACAP-CAVALLIER, B.; CHEVALLIER, P.; LIU J-X. Ultrafiltration and reverse transcription-polymerase chain reaction: an efficient process for poliovirus, rotavirus and hepatitis A virus detection in water. *Water Research*, v. 34, 2000, p. 1063-1067.

SUN, J.; ZHU, A.; LI, H.; ZHENG, K.; ZHUANG, Z.; CHEN, Z.; SHI, Y.; ZHANG, Z.; CHEN, S.; LIU, X.; DAI, J.; LI, X.; HUANG, S.; HUANG, X.; LUO, L.; WEN, L.; ZHUO, J.; LI, Y.; WANG, Y.; ZHANG, L.; ZHANG, Y.; LI, F.; FENG, L.; CHEN, X.; ZHONG, N.; YANG, Z.;

HUANG, J.; ZHAO, J.; LI, Y. Isolation of Infectious SARS-CoV-2 from Urine of a COVID-19 Patient. *Emerging Microbes & Infections*, v. 9, n. 1, 2020, p. 991-993.

SYMONDS, E. M.; VERBYLA, M. E.; LUKASIK, J. O.; KAFLE, R. C.; BREITBART, M.; MIHELICIC, J. R. A case study of enteric virus removal and insights into the associated risk of water reuse for two wastewater treatment pond systems in Bolivia. *Water Research*, v. 65, 2014, p. 257-270.

TCHOBANOGLIOUS, G.; STENSEL, H. D.; TSUCHIHASHI, R.; BURTON, F.; ABU-ORF, M.; BOWDEN, G.; PFRANG, W. *Wastewater Engineering: Treatment and Resource Recovery*. 5. ed. New York: McGraw-Hill, 2013.

UMEDA, L. C. Métodos clássicos e moleculares para avaliação da qualidade virológica de lodo de esgoto e de água de reúso: determinação da eficiência e limites de detecção. São Paulo, SP: USP, 2012. Originalmente apresentada como dissertação de mestrado, Universidade de São Paulo, 2012.

UNITED STATES AGENCY FOR INTERNATIONAL DEVELOPMENT – USAID (2009). USAID launches emerging pandemic threats program. Disponível em <https://2012-2017.usaid.gov/news-information/press-releases/usaids-launches-emerging-pandemic-threats-program>

UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY - USEPA. National Primary Drinking Water Regulations: Long Term 2 Enhanced Surface Water Treatment Rule. 40 CFR, Parts 9, 141 and 142, 2006.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). *Waterborne Zoonoses: Identification, Causes and Control*. London: IWA Publishing, 2004.

WU, F.; XIAU, A.; ZHANG, J.; GU, X.; LEE, W. L.; KAUFFMAN, K.; HANAGE, W.; MATUS, M.; GHAEI, N.; ENDO, N.; DUVALLET, C.; MONIZ, K.; ERICKSON, T.; CHAI, P.; THOMPSON, J.; ALM, E. SARS-CoV-2 titers in wastewater are higher than expected from clinically confirmed cases. *MedRxiv*. 2020a. Disponível em <https://doi.org/10.1101/2020.04.05.20051540>

WU, Y.; GUO, C.; TANG, L.; HONG, Z.; ZHOU, J.; DONG, X.; YIN, H.; XIAO, Q.; TANG, Y.; QU, X.; KUANG, L.; FANG, X.; MISHRA, N.; LU, J.; SHAN, H.; JIANG, G.; HUANG, X. Prolonged presence of SARS-CoV-2 viral RNA in faecal samples. *The Lancet Gastroenterol Hepatology*, v. 5, n. 5, 2020b, p. 434-435.

XU, Y.; LI, X.; ZHU, B.; LIANG, H.; FANG, C.; GONG, Y.; GUO, Q.; SUN, X.; ZHAO, D.; SHEN, J.; ZHANG, H.; LIU, H.; XIA, H.; TANG, J.; ZHANG, K.; GONG, S. Characteristics of pediatric SARS-CoV-2 infection and potential evidence for persistent fecal viral shedding. *Nature Medicine*, v. 26, 2020, p. 502-505.

ZHANG, Y.; CHEN, C.; ZHU, S.; SHU, C.; WANG, D.; SONG, J.; SONG, Y.; ZHEN, W.; FENG, Z.; WU, G.; XU, J.; WENBO, X. Notes from the Field: 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, 2020, p.123-124.

Anexo