



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Câmpus de São José do Rio Preto

Renan Moura Martins

**Deteccção e vigilância do vírus SARS- CoV- 2 em Estação de
Tratamento de Esgoto (ETE) de São José do Rio Preto.**

São José do Rio Preto

2022

Rena Moura Martins

Deteccção e vigilância do vírus SARS- CoV- 2 em Estação de Tratamento de Esgoto (ETE) de São José do Rio Preto.

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Microbiologia, junto ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de São José do Rio Preto.

Financiadora: CAPES 88887.487494/2020-00

Orientador: Prof^ª. Dr^ª. Marília de Freitas Calmon

Coorientador: Prof^ª. Dr^ª. Paula Rahal

São José do Rio Preto

2022

M386d	Martins, Renan Moura Detecção e vigilância do vírus SARS- CoV- 2 em Estação de Tratamento de Esgoto (ETE) de São José do Rio Preto. / Renan Moura Martins. -- São José do Rio Preto, 2022 62 p. : il., tabs. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto Orientadora: Marília de Freitas Calmon Coorientadora: Paula Rahal 1. SARS-CoV-2. 2. Vigilância epidemiológica. 3. Águas residuais. 4. Quantificação temporal da carga viral. I. Título.
-------	---

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

Renan Moura Martins

Deteção e vigilância do vírus SARS- CoV- 2 em Estação de Tratamento de Esgoto (ETE) de São José do Rio Preto.

Qualificação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Microbiologia, junto ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de São José do Rio Preto.

Financiadora: CAPES 88887.487494/2020-00

Comissão Examinadora

Prof^a. Dr^a. Marília de Freitas Calmon

UNESP – Câmpus de São José do Rio Preto

Orientadora

Dr^a. José Geraldo Nery

UNESP – Câmpus de São José do Rio Preto

Prof. Dr. Adriano Mondini

UNESP – Câmpus de Araraquara

São José do Rio Preto

26 de maio de 2022

Àqueles que apesar de todas as adversidades sempre acreditaram que eu seria capaz de atingir meus objetivos.

AGRADECIMENTOS

Aos professores, alunos e funcionários do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Unesp de São José do Rio Preto, que contribuíram de alguma forma para o meu sucesso acadêmico, e que de alguma forma tenham apoiado meu aprendizado.

Em especial minha Orientadora, Marília de Freitas Calmon, pelo suporte e condução das ideias, pela paciência, compreensão e atenção em todo o tempo da construção deste estudo, além de ser uma mão amiga que sempre estava ao meu lado em diversos momentos, tanto bons como ruins.

Minha coorientadora Profa. Dra. Paula Rahal, que desde o início me encorajou e proporcionou a oportunidade da pesquisa, além de ceder a infraestrutura necessária para os experimentos; além de sempre ser uma ótima companhia para uma boa xícara de café.

À Rafael Nava Micelli, técnico do SEMAE, e a toda equipe técnica, por todo apoio e cooperação, e pela ajuda com os materiais, coleta e processamento das águas; a colaboração com este projeto foi vital para a sua idealização e realização.

Agraço ao Professor Raghuvir Krishnaswamy Arni, e ao Doutor Ricardo Barros Mariutti, que me orientaram nos meus primeiros passos da carreira científica.

À Monika Aparecida Coronado, que sempre viu um enorme potencial em mim e que me ajudou a ser mais focado e objetivo nos meus propósitos.

A toda minha família, em especial minha amada mãe Edilene, que sempre acreditou e me incentivou, e que acreditou em mim quando eu disse que queria ser um Cientista.

À toda equipe atual, e de egressos, do Laboratório de Estudo genômicos: Lenira, Gabi, Ágata, Diego, Cíntia, Dayane, Nicolas, Maria Letícia, Gabriela, Tamara, Nícolas, Paola, Pâmela, Barbara, Nayara, Diego e Guilherme.

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

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelos recursos e equipamentos utilizados nesta investigação.

Para todas as vítimas da pandemia de COVID-19, causada pelo SARS-CoV-2, que pereceram e estão em nossas memórias.

RESUMO

A Organização Mundial de Saúde declarou os casos de Síndrome Respiratória Aguda Grave causada pelo vírus SARS-CoV-2, como uma Emergência de Saúde Pública de Interesse Internacional e o status de pandemia foi oficialmente reconhecido pela OMS em 11 de março de 2020. A Epidemiologia Baseada em Águas Residuais ganhou grande notoriedade uma vez detectada a presença do novo agente ao redor do globo em diversas amostras ambientais, tal técnica já fora anteriormente descrita em trabalhos monitorando outros vírus a nível comunitário, como: Poliovírus, Enterovírus, Adenovírus Rotavírus e Vírus da Hepatite A. Através da detecção de material genético nas águas residuais a técnica atua como uma ferramenta complementar importante de alerta precoce. Nosso objetivo com este trabalho foi avaliar a presença do RNA do SARS-CoV-2 nos efluentes domésticos de São José do Rio Preto- SP/ Brasil, e sua dinâmica durante o período de um ano, e investigar a relação com outros parâmetros ambientais. De 15 de julho de 2020 a 16 de julho de 2021 foram coletadas amostras de esgoto primário provenientes da Estação de Tratamento de Esgoto de São José do Rio Preto. As amostras passaram por uma etapa de concentração viral por ultracentrifugação, seguida por extração do RNA viral e posterior transcrição reversa para a quantificação através de Reação em Cadeia pela Polimerase em tempo real (RT-qPCR). No método de análise (one-step) o RNA de SARS-CoV-2 foi detectado nas 150 amostras em pelo menos um dos alvos, sendo a proporção de 100% para o alvo N1 e de 96,6% para o alvo N2. A quantificação variou de 1×10^3 até 1.3×10^5 cópias de RNA viral por litro de esgoto para o alvo N1, e 0 até 8.6×10^4 cópias de RNA viral por litro de esgoto para o alvo N2. Os dados a carga viral no esgoto doméstico são capazes de prever uma variação do número de infectados na população com um atraso médio de cinco dias. Observamos ainda uma correlação negativa entre a temperatura do esgoto e o sinal viral no esgoto, e o número de casos notificados de infecções por SARS-CoV-2. Observamos uma correlação negativa entre a temperatura do ar e o título viral de SARS-CoV-2. Uma correlação estatística também foi encontrada entre o fluxo médio de esgoto na estação com os títulos virais do alvo N1 do SARS-CoV-2. Também foi observado um número maior de cópias virais, para o alvo N1, nas águas residuais coletadas em dias não chuvosos. Com base nos dados obtidos, propomos que o monitoramento amplo dos efluentes domésticos permite uma visão mais ampla e comunitária da doença, e em combinação com a investigação clínica contribui para um melhor entendimento da dinâmica de circulação do vírus na população, sendo uma estratégia importante para a tomada de decisão das autoridades sanitárias em países pobres ou com renda média, servindo como um sistema de alerta rápido e barato capaz de antecipar futuros surtos de COVID-19, além de poder ser usada em cenários de falta de testes diagnósticos individuais.

Palavras-Chave: SARS-CoV-2. Vigilância epidemiológica. Águas residuais. Quantificação temporal da carga viral.

ABSTRACT

The World Health Organization declared the cases of Severe Acute Respiratory Syndrome caused by the SARS-CoV-2 virus as a Public Health Emergency of International Concern and the pandemic status was officially recognized by the WHO on March 11th, 2020. Epidemiology Based on Wastewater, it gained great notoriety once the presence of the new agent around the globe was detected in several environmental samples, this technique had been previously described in works monitoring other viruses at the community level, such as: Poliovirus, Enterovirus, Adenovirus Rotavirus and Hepatitis A. Through the detection of genetic material in wastewater, the technique acts as an important complementary tool for early warning. Our objective with this work was to evaluate the presence of SARS-CoV-2 RNA in domestic effluents from São José do Rio Preto-SP/ Brazil, and its dynamics during a period of one year, and to investigate the relationship with others environmental parameters. From July 15th, 2020 to July 16th, 2021, samples of primary sewage were collected from the São José do Rio Preto Sewage Treatment Station. The samples underwent a viral concentration step by ultracentrifugation, followed by viral RNA extraction and subsequent reverse transcription for quantification by real-time Polymerase Chain Reaction (RT-qPCR). In the analysis method (one-step) the RNA of SARS-CoV-2 was detected in the 150 samples in at least one of the targets, the proportion being 100% for the N1 target and 96.6% for the N2 target. The quantification ranged from 1×10^3 to 1.3×10^5 copies of viral RNA per liter of sewage for the N1 target, and 0 to 8.6×10^4 copies of viral RNA per liter of sewage for the N2 target. Data on viral load in domestic sewage are able to predict a variation in the number of infected people in the population with an average delay of five days. We also observed a negative correlation between sewer temperature and viral signal in sewer, and the number of reported cases of SARS-CoV-2 infections. We observed a negative correlation between air temperature and SARS-CoV-2 viral titer. A statistical correlation was also found between the mean sewage flow at the station and the viral titers of the SARS-CoV-2 N1 target. A higher number of viral copies for the N1 target was also observed in wastewater collected on non-rainy days. Based on the data obtained, we propose that the broad monitoring of domestic effluents allows a broader and more community-based view of the disease, and in combination with clinical investigation contributes to a better understanding of the dynamics of virus circulation in the population, being an important strategy for decision-making by health authorities in poor or middle-income countries, serving as a quick and inexpensive warning system, capable of anticipating future outbreaks of COVID-19, as well as being able to be used in scenarios where individual diagnostic tests are lacking.

Key words: SARS-CoV-2. Epidemic surveillance. Wastewater. Temporal viral quantification.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema das principais proteínas estruturais dos <i>Coronavirus</i>	13
Figura 2. Estrutura do genoma e replissoma de SARS- CoV- 2.....	14
Figura 3. Estrutura da glicoproteína Spike do SARS- CoV- 2.....	16
Figura 4. Esquema representativo do ciclo replicativo dos <i>Coronavirus</i>	19

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACE2	Angiotensin-converting enzyme 2
CDC	Centers for Disease Control and Prevention
cDNA	Complementary DNA
COVID-19	<i>Coronavirus</i> disease 2019
DEPEC	Dietilpirocarbonato
DNA	Desoxirribonucleic Acid
DQO	Demanda Química de Oxigênio
dsRNA	Double-Stranded RNA
ETE	Estação de Tratamento de Esgoto
HCoV-229E	Human coronavirus 229E
IBV	Infectious bronchitis virus
ICTV	International Committee on Taxonomy of Viruses
MERS	Middle East respiratory syndrome
MERS-CoV	Middle East respiratory syndrome–related coronavirus
mRNA	Messenger RNA
OMS	Organização Mundial da Saúde
PCR	Polymerase Chain Reaction
RBD	Receptor-binding domain
RNA	Ribonucleic Acid
RT-qPCR	Quantitative reverse transcription PCR
SARS	Severe acute respiratory syndrome
SARS-CoV-1	Severe acute respiratory syndrome coronavirus 1
SARS-CoV-2	Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2
ssRNA	Single-stranded RNA
UASB	Upflow Anaerobic Sludge Blanket
WHO	World Health Organization
WWBE	Wastewater Based Epidemiology

LISTA DE SÍMBOLOS

M³	Metro cúbico
kg	Quilograma
s	Segundo
L	Litros
mg	Miligramas
mol	Mol
h	Horas
pH	Potencial Hidrogeniônico
g	Força da Gravidade
°C	Graus Célsius
ml	Mililitros
µm	Micrômetros
µl	Microlitros
nM	Nano Mol
mM	Mili Mol
min	Minutos
CG	Cópias de genoma viral

Sumário

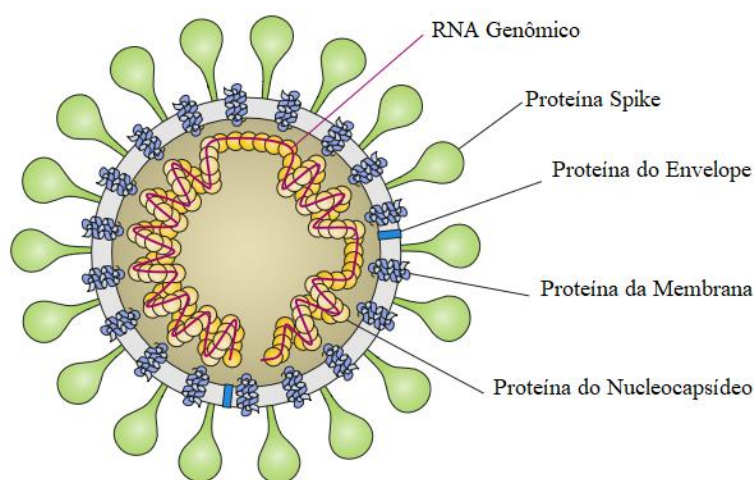
1- CAPÍTULO I CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	13
1.1. Introdução.....	13
1.2. SARS- CoV- 2.....	15
1.3. Aspectos biológicos, epidemiológicos e clínicos.....	18
1.4. Epidemiologia baseada em águas residuais - uma estratégia de vigilância epidemiológica com amplas aplicações.....	20
1.5. Justificativa.....	24
1.6. Objetivos.....	25
1.6.1. Objetivo geral	25
1.6.2. Objetivos específicos.....	26
REFERÊNCIAS.....	27
2 CAPÍTULO II – ARTIGO CIENTÍFICO.....	34
LONG-TERM WASTEWATER SURVEILLANCE FOR SARS-COV-2: ONE YEAR STUDY IN BRAZIL.	35
2.1 Abstract	35
2.2. Graphical abstract	36
2.3. Introduction.....	36
2.3 Methodology.....	37
2.3.1 Sampling	37
2.3.2 RNA extraction and quantitative PCR.....	38
2.3.4 Detection limit and qPCR inhibition control	39
2.4 Data analysis.....	39
2.5 Results and Discussion	40
2.6 Conclusions	43
REFERENCES	44
3 CAPÍTULO III – CONCLUSÃO	50
3.1. Considerações Finais	51
ANEXO A- DADOS PRIMÁRIOS COLETADOS AO LONGO DA PESQUISA.....	55

1- CAPÍTULO I – CONSIDERAÇÕES GERAIS

1.1. Introdução

Os *Coronavírus* compreendem um grupo altamente diverso de vírus envelopados, com material genético de RNA de fita simples, de polaridade positiva e com genoma que varia de 26,4 a 31,7 kilobases; algo pouco comum em um vírus de RNA(WOO et al., 2010). Seu genoma se organiza em genes replicantes e acessórios (FEHR; PERLMAN, 2015), que codificam diferentes tipos de proteínas estruturais do vírion entre as principais temos: a glicoproteína Spike (S) que na forma tetramérica se encontra em toda superfície do vírion (que forma uma estrutura muito semelhante a uma coroa, que em latim se escreve corona, que originou o nome do grupo), a Nucleoproteína (N) que está associada ao RNA genômico, a proteína constituinte da Membrana vira (M) e a proteína pentamérica que constitui o Envelope (E) viral (GORBALENYA et al., 2020a; HOLSHUE et al., 2020; KIM et al., 2020; NEUMAN et al., 2011) conforme pode ser visto na **figura 1**.

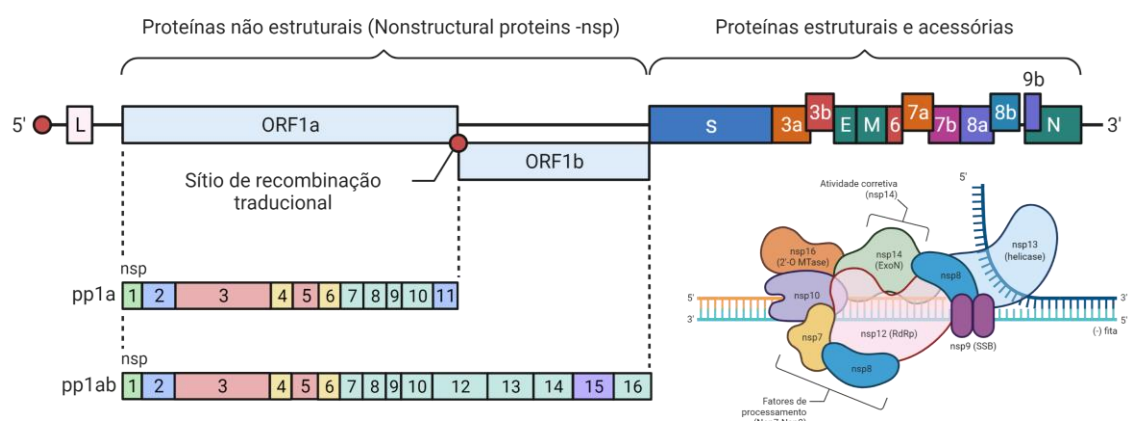
Figura1. Esquema das principais proteínas estruturais dos *Coronavirus*.



Fonte: Adaptado de Kim e colaboradores(2020).

Uma característica notável na família *Coronaviridae* é o tamanho do seu genoma; se comparada a grande maioria das famílias de vírus de RNA este é cerca de três vezes maior; como exemplo o genoma dos vírus da família *Flaviviridae* que possuem por volta de 11 kilobases (HARTENIAN et al., 2020; LINDENBACH et al., 2013). Uma possível hipótese que se levanta para a manutenção de um genoma deste tamanho nesta família em especial seria a capacidade de correção contra erros (proofreading) em decorrência da replicação do material genético durante o ciclo reprodutivo do vírus. Durante a replicação, o vírus SARS-CoV-2 utiliza um complexo multiprotéico denominado replissomo, composto pela RNA polimerase dependente de RNA (nsp12), fatores de processamento (nsp7 e nsp8), uma helicase (nsp13), uma proteína de ligação de fita-simples (nsp9) e uma exonuclease de ação de revisão e correção (nsp14), além de outros co-fatores (como nsp10) e enzimas auxiliares (nsp16) intrínsecas ao processo de replicação (HARTENIAN et al., 2020). Tal replissomo pode ser remanescente de organismos com genomas baseados em DNA, algo que pode explicar essa característica distintiva nos *Coronavirus* (HARTENIAN et al., 2020; KIM et al., 2020). Uma representação esquemática do complexo pode ser vista na **figura 2**.

Figura 2. Estrutura do genoma e replissoma de SARS- CoV- 2.



Fonte: Adaptado de Hartenian e colaboradores (2020) e Kim e colaboradores (2020).

1.2. SARS- CoV- 2

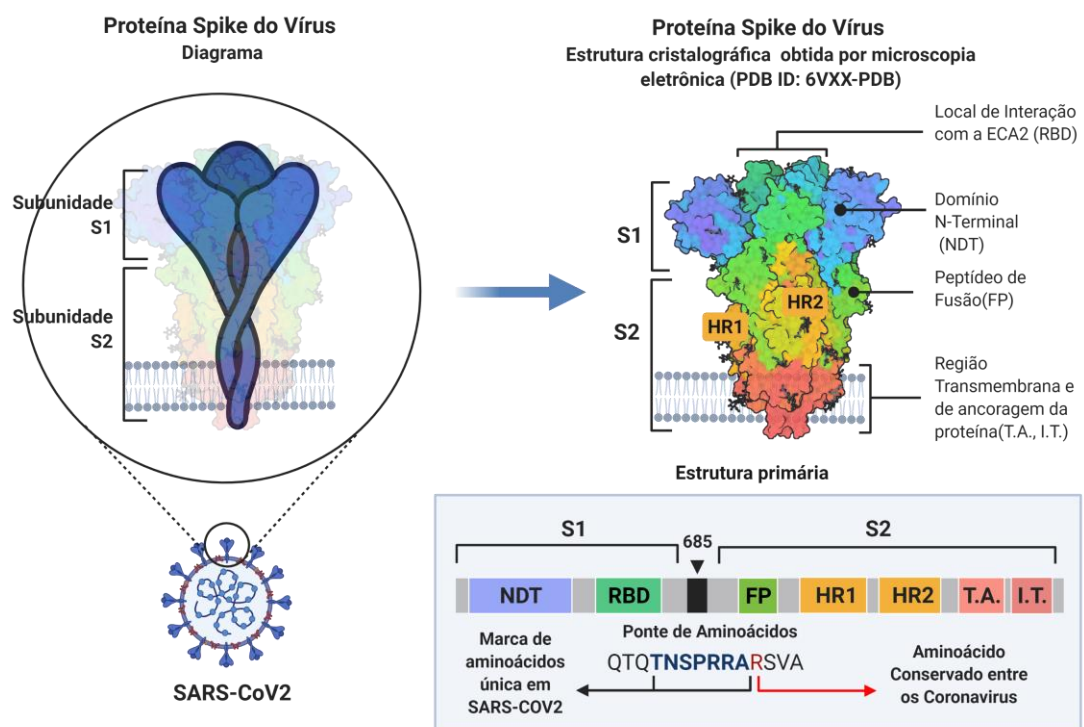
O SARS-CoV-2 é um vírus pertencente ao reino Riboviria, ordem *Nidovirales*, sub-ordem *Cornidovirinae* Família: *Coronaviridae*, Sub-família: *Orthocoronavirinae*. Os agentes infecciosos pertencentes a esse táxon já são conhecidos pela medicina há muitas décadas, entretanto dois gêneros estão descritos como causadores de doenças em humanos: *Alphacoronavirus*, e *Betacoronavirus*. Dentre este último temos dentro o subgênero *Sarbecovirus*, onde estão os vírus relacionados à SARS. Os diferentes vírus dos gêneros supracitados podem ocasionar uma infecção aguda no ser humano, com gravidade que pode variar de um simples resfriado em casos leves, a quadros agudos de síndrome respiratória potencialmente fatais (DE WIT et al., 2016; FEHR; PERLMAN, 2015; HUI; ZUMLA, 2019). Alguns dos vírus que infectam humanos e que pertencem a família *Coronaviridae* são: HCoV- 229E, HCoV- NL63, HCoV- OC43, HCoV- HKU1, SARS-CoV-1, MERS-CoV e SARS-CoV-2. Este último foi descrito em dezembro de 2019, e é o agente etiológico da Síndrome Respiratória Aguda Grave, denominada COVID-19 (do inglês, Coronavirus Disease 2019), uma doença caracterizada por uma pneumonia grave que causava: febre, dificuldade de respirar, tosse e invasão aguda em ambos os pulmões (ALI et al., 2020; DE WIT et al., 2016; FEHR; PERLMAN, 2015; HILGENFELD; PEIRIS, 2013; WONG et al., 2019).

As primeiras manifestações da nova doença foram inicialmente detectadas em um grupo de funcionários de um mercado de animais silvestres em dezembro de 2019, na cidade de Wuhan, na província de Hubei (China). Estes funcionários apresentaram uma forma de pneumonia grave, inicialmente de causas desconhecidas e uma bateria completa de exames moleculares eliminaram vírus comuns como: SARS-CoV-1, MERS-CoV, Influenza A, Influenza B, Adenovirus e outros 61 conhecidos agentes causadores de infecções respiratórias. Foi descrito posteriormente que aquela doença estaria ligada a um agente etiológico novo, um vírus que segundo estudos genômicos este era geneticamente semelhante a outros Coronavirus previamente descritos. Então, o novo agente etiológico foi nomeado como sendo o Vírus da Síndrome Respiratório Aguda Grave 2, em inglês Severe acute respiratory syndrome coronavirus, e catalogado pelo Comité Internacional de Taxonomia Viral (ICTV) com o nome de SARS-CoV-2; após isso este se espalhou

pelo mundo, atingindo um nível pandêmico já em 11 de março de 2020, segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) (GORBALENYA et al., 2020b; WANG et al., 2020a; YANG; GUI; XIONG, 2020; ZHOU et al., 2020).

Se comparado a outros coronavírus o vírus SARS-CoV-2 possui diferenças significativas na constituição das sequências codificantes, sendo uma importante fonte de variação encontrada nos domínios responsáveis pela interação entre o receptor humano, a ACE2 - Angiotensin-converting enzyme 2 (Enzima conversora de Angiotensina 2) encontrada na superfície celular dos mais variados órgãos e a proteína Spike (**figura 3**). De fato, é sabido que as variações na região do domínio de ligação ao receptor, ou região RBD (do inglês, receptor-binding domain) da proteína spike é a parte mais variável de todo genoma dos *Coronavírus* (WANG et al., 2021, 2020b; WU et al., 2020).

Figura 3. Estrutura da glicoproteína Spike do SARS- CoV- 2.



Fonte: Adaptado de "An In-depth Look into the Structure of the SARS-CoV2 Spike Glycoprotein", by BioRender.com (2020). Recuperado de: <https://app.biorender.com/biorender-templates>.

A presença de mutações no novo coronavírus de 2019 sugerem que alterações genéticas ocorridas na natureza levam a uma mudança no padrão de

codificação em seis aminoácidos da proteína spike (L455, F486, Q493, S494, N501 e Y505), modificações tais permitiram interações diferenciais entre a proteína viral e o receptor do hospedeiro ACE2, passando a interagir em humanos, furões, gatos e outras espécies em que existe homologia no receptor celular. Mutações e o contato com vetores zoonóticos possibilitaram a adaptação e seleção de cepas com capacidade de transmissão, haja visto que inserções ou recombinações genéticas são frequentes em outros vírus do mesmo grupo, e que frequentemente tais peculiaridades são correlacionadas com eventos de transbordamento (ABDULJALIL; ABDULJALIL, 2020; ANDERSEN et al., 2020; GE et al., 2013; HOFFMANN et al., 2020; LETKO; MARZI; MUNSTER, 2020; LI et al., 2003; LU et al., 2020; SCHOEMAN; FIELDING, 2019; WANG; TANG; WEI, 2020)

Já a nucleoproteína que o produto do gene N em SARS-CoV-2, é uma molécula mais estável em comparação com outras como a Proteína S, sendo o elemento genético mais estável (CHAN et al., 2020; ZHOU et al., 2020). Esta característica é extremamente importante uma vez que tal alvo molecular é amplamente utilizada como alvo genético em testes moleculares e evolutivos, além da própria molécula protéica ser utilizada em testes que detectam a presença de infecção ativa em pacientes através da detecção deste antígeno(PARK et al., 2020).

Sua função primordial é empacotar o RNA do genoma viral de fita positiva em um complexo ribonucleoprotéico helicoidal (RNP). A nucleoproteína também atua estabilizando o material genético e impedindo que ribonucleoproteínas degradem o material genético do vírus, além de ser importante na proteção da partícula frente à fatores ambientais que possam degradar o material genético viral (CHAN et al., 2020).

Nas últimas etapas do ciclo replicativo de SARS-CoV-2, a proteína do Nucleocapsídeo irá exercer diversas funções em vários pontos durante a montagem do vírion; por meio de suas interações em regiões desordenadas ela favorece uma interação facilitada entre o genoma viral e a proteína de membrana M viral. Ademais esta desempenha outras funções não estruturais como: promover aumento da eficiência da transcrição do RNA viral subgenômico e exercer uma modulação dos fatores celulares até a liberação das partículas virais infecciosas (CHAN et al., 2020; NEUMAN et al., 2011).

1.3. Aspectos biológicos, epidemiológicos e clínicos

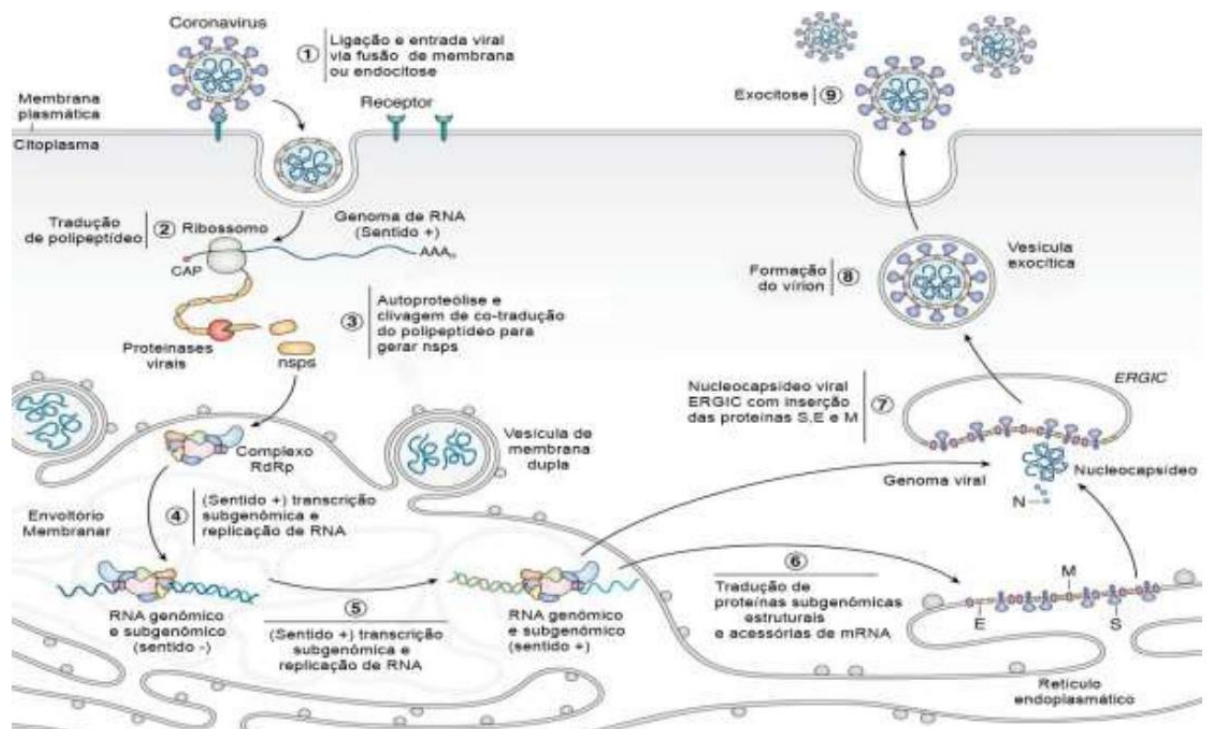
Os dados no presente levaram especialistas a cogitarem uma provável origem a partir de morcegos, visto que estes colecionam alta similaridade genética com coronavírus encontrados em morcegos semelhantes a SARS. O vírus ancestral provavelmente de morcego sofreu alterações genéticas, ao entrar em contato com outros hospedeiros(intermediários), tais como pangolins, serpentes ou civetas, permitiram com que o vírus passasse por alterações, assim possibilitando a transmissão para humanos, e posteriormente, outras mutações permitiram a transmissão comunitária entre os humanos (CUI; LI; SHI, 2019; DHAMA et al., 2020). A linhagem RaTG13, anteriormente isolada de populações de morcegos *Rhinolophus affinis* da província chinesa de Yunnan, é a linhagem conhecida e catalogada nas bases científicas que mais se assemelha ao SARS-CoV-2, com uma similaridade de 90,5% (AHMAD; HUI, 2020; ASHOUR et al., 2020; JIN et al., 2020; LI et al., 2020; MAKARENKOV et al., 2021; S et al., 2021; ZHANG; WU; ZHANG, 2020; ZHOU et al., 2021).

A dispersão viral está relacionada majoritariamente ao contato com pessoas infectadas através da aspiração de gotículas nas quais está presente o vírus, inalação de aerossóis e por fômites (HUI; ZUMLA, 2019; LI et al., 2020; MEDEMA et al., 2020; WONG et al., 2019). Uma vez que o vírus SARS-CoV-2 infecte um hospedeiro susceptível, este tende a dar início a uma infecção aguda típica, e nos casos mais frequentes os achados clínicos apontam tanto para o trato respiratório quanto o digestório como sítios primários da infecção. Assim como anteriormente descrito nas viroses causadas por outros Coronavírus, um dos motivos biológicos para isso seria o fato desses órgãos possuírem receptores ACE2 em abundância, que é a principal porta de estrada para o vírus nas células do hospedeiro (FEHR; PERLMAN, 2015; JIN et al., 2020; METSKY et al., 2020).

Uma vez que o vírus é adsorvido e penetra o citoplasma, onde começará a replicação viral de SARS-CoV-2. Primeiramente ocorre a ligação da proteína S viral (spike) aos receptores do hospedeiro, neste caso a proteína ACE2, que media o processo de endocitose do vírus na célula hospedeira, culminando na fusão da

membrana do vírus com a membrana endossômica (provavelmente mediada por S2) e o genoma ssRNA (+) é liberado no citoplasma. Uma vez que ocorre a mobilização da maquinaria de síntese da célula hospedeira, se inicia a produção e clivagem proteolítica da poliproteína viral, que gera as proteínas estruturais com base nas informações codificadas por mRNAs subgenômicos, processo mediado pela replicase viral. A célula hospedeira é transformada em fábrica do vírus. Um genoma de dsRNA é sintetizado a partir do ssRNA genômico (+). O genoma de dsRNA é transcrito / replicado, fornecendo assim mRNAs virais / novos genomas de ssRNA (+). Quando todos os elementos estão presentes se inicia o processo de montagem e brotamento nas membranas do retículo endoplasmático (RE), os compartimentos intermediários e / ou complexo de Golgi. O processo se finaliza com a liberação de novos vírions por exocitose que irão se difundir pelo organismo infectando outras células (FEHR; PERLMAN, 2015; KIM et al., 2020). Um resumo desse processo pode ser visto na **figura 4**.

Figura 4. Esquema representativo do ciclo replicativo dos *Coronavirus*.



Fonte: Adaptado de Hartenian e colaboradores(2020)

Com base no atual estado da arte das pesquisas temos que a transmissão comunitária da doença é sustentada através de pessoas que apresentam sintomas que variam de leves a graves, pré-sintomáticos e indivíduos assintomáticos (DEL RIO; MALANI, 2020; HUI; ZUMLA, 2019; JIN et al., 2020; ORAN; TOPOL, 2020).

Nos estágios iniciais da doença são descritos sintomas clínicos de: febre, tosse, dor de garganta, mialgia, dor de cabeça e fadiga. À medida que a infecção avança e ocorre o comprometimento dos sistemas podem ocorrer sintomas no trato digestório como diarreia. Em casos graves quando a infecção se instala no trato respiratório inferior o desenvolvimento do quadro de uma pneumonia grave, com quadros trombóticos é rotineiramente associado à evidências radiológicas onde os pulmões com aspecto de “vidro fosco” torna-se uma importante característica patológica relacionada ao prognóstico da COVID-19 (DEL RIO; MALANI, 2020; HUI; ZUMLA, 2019; YANG; GUI; XIONG, 2020).

A observação da sintomatologia de tais pacientes levou cientistas a cogitarem que os órgãos do trato gastrointestinal seriam sítios de replicação do vírus, e o lançamento de partículas por indivíduos contaminados poderiam ser fatores da doença que possibilitariam outras formas de contaminação, como a oral-fecal, por exemplo (XIAO et al., 2020). Tal via já foi estabelecida para outros vírus da mesma família e já foi isolado uma grande quantidade de partículas virais nas fezes de pacientes (CHEUNG et al., 2020; JONES et al., 2020). Em laboratório, amostras de fezes de pacientes foram capazes de infectar organóides de intestinos, além de ser relatada na literatura casos de disseminação de aerossóis em comunidades residenciais através de sistemas de ventilação e encanamentos defeituosos, como o caso do surto no complexo habitacional Amoy Gardens durante o surto de SARS-CoV de 2003 em Hong Kong, onde 300 moradores foram infectados e 42 morreram (BHOWMICK et al., 2020; JIN et al., 2020; LAMERS et al., 2020; LETKO; MARZI; MUNSTER, 2020; RIGGIONI et al., 2020; WAN et al., 2020; ZANG et al., 2020).

1.4. Epidemiologia baseada em águas residuais - uma estratégia de vigilância epidemiológica com amplas aplicações.

À medida que a população humana cresce e vêm se expandindo para novas áreas geográficas, a terra sofre com mudanças climáticas, aumento do uso indevido da terra, desmatamento e práticas agrícolas intensivas. Ininterruptamente, populações humanas avançam para novos habitats. Como resultado, cada vez mais pessoas vivem próximas, ou juntas com animais selvagens e domésticos, de estimação e na pecuária (AUSTIN, 2021).

O contato próximo fornece mais oportunidades para que doenças passem entre animais e pessoas e o surgimento de patógenos emergentes que atinjam a população humana é uma preocupação permanente na sociedade moderna. Estima-se que a cada ano 5 novas doenças que afetam humanos são descobertas e destas, pelo menos 3 são de origem animal. Anualmente, estima-se que cerca de 2,5 bilhões de pessoas fiquem doentes e que ocorra 2,7 milhões de mortes por zoonoses em todo mundo. (KARESH et al., 2012). A busca de uma saúde humana, animal e ambiental plena é denominada One Health, e faz parte de um movimento de saúde global que têm como objetivo o controle de epidemias e sua prevenção, através da adoção de metodologias que sejam capazes de gerar evidências para as autoridades de saúde pública em um contexto global (CONRAD et al., 2009; LORUSSO et al., 2020; TRAN et al., 2021).

Nas últimas décadas, os surtos recentes de coronavírus humano, vírus Influenza, Ebola e Arboviroses vêm ao encontro do desenvolvimento de técnicas que podem nos alertar para a atual situação do ponto de vista ambiental da presença de patógenos em locais onde existem risco comunitário (JONES et al., 2008; KARESH et al., 2012). No caso da Covid-19 diversas técnicas e abordagens recentes permitem a investigação da presença do patógeno em diversos lugares como ar, água potável, superfícies, efluentes domésticos e corpos de água, entretanto a aplicação e reconhecimento só se tornou notável nos tempos atuais (MOHAN et al., 2021; ONG et al., 2020; REN et al., 2020).

Se a presença de um determinado patógeno no ambiente antes era apenas vista como um problema, atualmente tal presença já é utilizada como uma rica fonte de informação para a saúde humana, ambiental e animal. Mas esse aproveitamento de informações só passou a ser feito recentemente, à medida que novas metodologias foram se popularizando e ganhando um arcabouço de evidências mais

robusto (MARTIN et al., 2020; MICHAEL-KORDATOU; KARAOLIA; FATTAKASSINOS, 2020).

Uma ferramenta que vêm sendo amplamente utilizada como um reforço ao combate desta emergência de saúde pública é a Epidemiologia Baseada em Águas Residuais (Wastewater Based Epidemiology- WBE)(KITAJIMA et al., 2020; MOHAN et al., 2021). Têm como objetivo fornecer um panorama geral da saúde de uma determinada população por meio da análise de moléculas secretadas por indivíduos em um contexto coletivo, permitindo a coleta de informações da real dimensão de determinada doença distribuída em uma população atendida por uma rede de esgotamento sanitário minimamente estruturado (CHOI et al., 2018).

Por volta de 2001, tal estratégia foi inicialmente desenvolvida para traçar o perfil de consumo de drogas de abuso e medicamentos em uma dada população e tal aplicabilidade evoluiu nas últimas décadas para a investigação de moléculas mais complexas como biomarcadores, químicos industriais, toxinas e patógenos variados, incluindo a análise de vírus, tais como o da Pólio, Enterovirus e vírus da Hepatite A (CHOI et al., 2018; SIMS; KASPRZYK-HORDERN, 2020; XAGORARAKI; O'BRIEN, 2020).

Como exemplo, Israel, desde 1988, implantou um programa de monitoramento permanente para o vírus da Pólio e tal sistema é um dos sistemas em contínua operação mais bem consagrados de WBE em todo o mundo, sendo uma ferramenta de alerta antecipado para epidemias de poliomielite da OMS (CLARKE; CHANG, 1959). O sistema teve sua confiabilidade testada em 2013, quando um surto de Pólio foi previsto em Rahat, dias antes do surgimento de casos de infecção na população, tal informação foi vital para a preparação das autoridades e a elaboração de medidas de contingenciamento de um futuro surto, possibilitando diversas estratégias de intervenção, como a campanha massiva de vacinação que ocorreu contra a Pólio no país (MARTIN et al., 2020; SIMS; KASPRZYK-HORDERN, 2020). Foi a utilização para essas doenças que a investigação molecular de esgotos domésticos surgiu como uma ferramenta de resposta antecipada para surtos e epidemias de doenças passíveis de serem rastreadas pelos esgotos.

O uso desta metodologia permite uma vigilância de uma ampla gama de patógenos. Atualmente esta abordagem vêm sendo utilizada para o SARS-CoV-2, fato observado pelo aumento dos trabalhos científicos realizados em diferentes países com aspectos epidemiológicos, econômicos e populacionais distintos (AMPUERO et al., 2020; FONGARO et al., 2021; LA ROSA et al., 2020; PECCIA et al., 2020; RIMOLDI et al., 2020). As possibilidades de investigação em tempo real, ou de cenários retrospectivos, são possibilitados por esta metodologia, estudos como esses podem contribuir para a investigação de cenários epidemiológicos e o comportamento epidemiológico da doença, sendo um referencial complementar aos dados populacionais na formulação de políticas públicas diversas (CHAVARRIA-MIRÓ et al., 2020; LARSEN; WIGGINTON, 2020; UL-RAHMAN et al., 2020).

A metodologia que utiliza o monitoramento do esgoto como uma ferramenta informativa da saúde da comunidade local continua sendo uma saída inovadora para a elucidação de diversas questões técnicas e científicas. Seu poder de análise permite investigar desde doenças endêmicas, até elucidar cenários pandêmicos entre períodos de afrouxamento de medidas sanitárias correlatas a retomada das atividades econômicas em determinada localidade (HART; HALDEN, 2020; HELLMÉR et al., 2014). Ela permite ainda o acompanhamento estimado de potenciais transmissores, pois detecta a presença do RNA viral no momento em que este passa a ser excretado pelas fezes, tanto em indivíduos assintomáticos, pré-sintomáticos e sintomáticos, em um intervalo de tempo de 14 a 21 dias, o que permite um acompanhamento mais preciso da ocorrência de assintomáticos que não buscam atendimento médico mas que estão infectados, pois mesmo não apresentando sintomas estes portadores, em grande parte, têm o vírus detectado em amostras de fezes, e frequentemente não entram nas estatísticas epidemiológicas locais quando não são aplicadas metodologias de testagem randômica na população para averiguar a dinâmica local de assintomáticos (AHMED et al., 2020b; JONES et al., 2020; VASELLI et al., 2021).

Com o monitoramento molecular de esgotos domésticos, juntamente com uma metodologia específica, podemos utilizar as concentrações de cópias genômicas do SARS-CoV-2 como um biomarcador para estimar o espalhamento da doença em tempo real (MAO et al., 2020; SOJOBI; ZAYED, 2022). Em 2020 em um

estudo Australiano conduzido por Ahmed e colaboradores, foi usado um modelo preditivo de infecção com base nos valores das cargas virais dos esgotos encontrados nas análises de RT-qPCR. Foi construído um modelo matemático que avalia as pessoas infectadas, a taxa de vazão do esgoto, com a produção diária de fezes por pessoas, e a carga viral nas fezes. Com os dados mensurados, foi rodada uma simulação segundo o modelo de predição, um número médio de infecções variando de 1.090 em 27/3/2020 a 171 em 1/4/2020 foi observado na região, a prevalência de infecções na localidade era de 0,096%, o que se traduziria em uma prevalência clínica de aproximadamente 450 casos, mas o limite superior do intervalo de confiança de 95% em torno da mediana sugeriria até 764 casos totais – sendo 314 casos não diagnosticados, ou aproximadamente 7 infecções não diagnosticadas para cada 10 infecções diagnosticadas (AHMED et al., 2020a).

A Epidemiologia Baseada em Águas Residuais pode ser útil na coleta de dados importantes da situação epidemiológica em determinada localidade, contribuindo na compreensão de cenários futuros (AHMED et al., 2021). Ao se aliar a detecção do patógeno a técnicas de sequenciamento é possível rastrear o perfil da variabilidade genética do vírus ao longo de uma comunidade, permitindo assim o acompanhamento genômico de mutações de interesse, este rastreamento teria o potencial de antever o surgimento clínico de novas linhagens, mas tende na prática a encontrar desafios para sua realização (IZQUIERDO-LARA et al., 2021; PRADO et al., 2021). Quando bem aplicada, a investigação em águas residuais pode ser um eficiente sistema de alertas; antevendo e dando tempo para as autoridades de saúde obterem os aparatos necessários para a contenção e mitigação, quando em momentos de repentina incidência de casos (CRITS-CHRISTOPH et al., 2021; FARKAS et al., 2020b; NEMUDRYI et al., 2020; PECCIA et al., 2020; WURTZ et al., 2021).

1.5. Justificativa

A emergência do SARS-CoV-2 como um agente etiológico pandêmico em todo o mundo elevou o interesse sobre a temática da epidemiologia baseada em águas residuais, apesar de ser uma técnica já implementada há várias décadas, a metodologia se popularizou com a pandemia causada pelo novo coronavírus.

Aplicada em vários locais no mundo, a ferramenta foi capaz de identificar a presença de COVID-19 na comunidade até uma semana antes dos testes clínicos serem capazes de detectar indivíduos doentes, sendo particularmente útil em comunidades com um aumento exponencial na curva de casos.

A vigilância de águas residuais pode preencher lacunas no conhecimento a respeito da circulação do vírus em nossa população, sendo complementar a investigação epidemiológica tradicional, haja visto que a investigação epidemiológica baseada em testes clínicos subestima a real dimensão da doença pois pacientes precisam estar minimamente doentes para serem testados. As evidências até agora mostram que os achados virológicos nas águas residuais estão correlacionados com as tendências dos números de casos clínicos, tornando-os indicadores importantes da incidência da doença na população, e um sistema de alerta com estimativas para a potencial reemergência de casos de COVID-19.

O elevado número de infectados e mortos em nossa cidade justificaram essa investigação. O município de São José do Rio Preto, maior cidade do noroeste paulista possui uma população de 464.983 habitantes, e contabiliza até o momento (16 de outubro de 2021) 2.801 mortes em decorrência da COVID-19, estando entre os municípios brasileiros com maior incidência per capita da doença (597,01 mortes por 100 mil habitantes); e uma elevada letalidade (isto é, número de mortos em relação ao total de infectados) de 2,93 %- Média nacional: 2,41 %.

As evidências de que dispomos podem contribuir para o debate científico a respeito de diversos temas: variação temporal da carga viral no esgoto, influência de fatores climáticos e a importância de medidas restritivas. Os conhecimentos acumulados podem auxiliar investigações futuras no monitoramento de outros vírus potencialmente emergentes e reemergentes com um vantajoso custo-benefício.

1.6. Objetivos

1.6.1. Objetivo geral

Avaliar a presença de SARS-CoV-2 nos efluentes domésticos de uma estação de tratamento de esgoto em uma cidade de porte médio do estado de São Paulo durante 52 semanas.

1.6.2. Objetivos específicos

- Detectar a presença do RNA do SARS-CoV-2 nas águas residuais de São José do Rio Preto coletadas durante um ano
- Quantificar as cópias de RNA de SARS-CoV-2 nas águas residuais de São José do Rio Preto coletadas durante um ano.
- Analisar a variação temporal na quantidade de RNA de SARS-Cov-2 nas águas residuais de São José do Rio Preto coletadas durante um ano.
- Analisar a correlação entre a quantificação de RNA de SARS-CoV-2 encontrada nas águas residuais com os dados de casos notificados de indivíduos infectados por SAR-CoV-2 durante o mesmo período.
- Analisar a correlação entre a quantificação de RNA de SARS-CoV-2 encontrada nas águas residuais com parâmetros ambientais durante o mesmo período.

REFERÊNCIAS

- ABDULJALIL, J. M.; ABDULJALIL, B. M. **Epidemiology, genome, and clinical features of the pandemic SARS-CoV-2: a recent view***New Microbes and New Infections*Elsevier Ltd, ,1 maio 2020.
- AHMAD, T.; HUI, J. One Health approach and Coronavirus Disease 2019. **Human Vaccines and Immunotherapeutics**, v. 16, n. 4, p. 931–932, 2 abr. 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, 1 ago. 2020a.
- 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, 15 out. 2020b.
- 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. **Science of the Total Environment**, v. 761, 20 mar. 2021.
- ALI, M. et al. **SARS-CoV-2 and the Hidden Carriers – Sewage, Feline, and Blood Transfusion***Journal of Medical Virology*, 2020.
- AMPUERO, M. et al. SARS-CoV-2 Detection in Sewage in Santiago, Chile - Preliminary results. **medRxiv**, p. 2020.07.02.20145177, 3 jul. 2020.
- ANDERSEN, K. G. et al. **The proximal origin of SARS-CoV-2***Nature Medicine*Nature Research, , 1 abr. 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/s41591-020-0820-9>>. Acesso em: 24 ago. 2020.
- ASHOUR, H. M. et al. **Insights into the recent 2019 novel coronavirus (Sars-coV-2) in light of past human coronavirus outbreaks***Pathogens*MDPI AG, , 1 mar. 2020.
- Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32143502/>>. Acesso em: 24 ago. 2020
- AUSTIN, K. F. **Degradation and disease: Ecologically unequal exchanges cultivate emerging pandemics***World Development*Pergamon, , 1 jan. 2021.
- BHOWMICK, G. D. et al. **Coronavirus disease 2019 (COVID-19) outbreak: some serious consequences with urban and rural water cyclen***npj Clean Water*, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/s41545-020-0079-1>>. Acesso em: 3 ago. 2020.
- CENTER FOR SYSTEMS SCIENCE AND ENGINEERING. **COVID-19 Map - Johns Hopkins Coronavirus Resource Center**. Disponível em: <<https://coronavirus.jhu.edu/map.html>>. Acesso em: 2 maio. 2022.
- CHAN, J. F. W. et al. Genomic characterization of the 2019 novel human-pathogenic coronavirus isolated from a patient with atypical pneumonia after visiting Wuhan. **Emerging Microbes and Infections**, v. 9, n. 1, p. 221–236, 1 jan. 2020.
- CHAVARRIA-MIRÓ, G. et al. Sentinel surveillance of SARS-CoV-2 in wastewater anticipates the occurrence of COVID-19 cases. **medRxiv**, p. 2020.06.13.20129627, 13 jun. 2020.

CHEUNG, K. S. et al. Gastrointestinal Manifestations of SARS-CoV-2 Infection and Virus Load in Fecal Samples From a Hong Kong Cohort: Systematic Review and Meta-analysis. **Gastroenterology**, v. 159, n. 1, p. 81–95, 1 jul. 2020.

CHOI, P. M. et al. **Wastewater-based epidemiology biomarkers: Past, present and future** **TrAC - Trends in Analytical Chemistry** Elsevier B.V., , 1 ago. 2018.

CLARKE, N. A.; CHANG, S. L. Enteric Viruses in Water. **Journal - American Water Works Association**, v. 51, n. 10, p. 1299–1317, 1959.

CONRAD, P. A. et al. Evolution of a transdisciplinary “One Medicine-One Health” approach to global health education at the University of California, Davis. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 92, n. 4, p. 268–274, 1 dez. 2009.

CRITS-CHRISTOPH, A. et al. Genome sequencing of sewage detects regionally prevalent SARS-CoV-2 variants. **mBio**, v. 12, n. 1, p. 1–9, 2021.

CUI, J.; LI, F.; SHI, Z. L. **Origin and evolution of pathogenic coronaviruses** **Nature Reviews Microbiology** Nature Publishing Group, , 1 mar. 2019.

DE WIT, E. et al. **SARS and MERS: Recent insights into emerging coronaviruses** **Nature Reviews Microbiology** Nature Publishing Group, , 1 ago. 2016. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/nrmicro.2016.81>>. Acesso em: 3 ago. 2020.

DEL RIO, C.; MALANI, P. N. **COVID-19 - New Insights on a Rapidly Changing Epidemic** **JAMA - Journal of the American Medical Association** American Medical Association, , 14 abr. 2020. Disponível em: <<https://jamanetwork.com/>>. Acesso em: 17 ago. 2020.

DHAMA, K. et al. **SARS-CoV-2 jumping the species barrier: Zoonotic lessons from SARS, MERS and recent advances to combat this pandemic virus** **Travel Medicine and Infectious Disease** Elsevier USA, , 1 set. 2020.

FARKAS, K. et al. **Viral indicators for tracking domestic wastewater contamination in the aquatic environment** **Water Research** Elsevier Ltd, , 15 ago. 2020a.

FARKAS, K. et al. **Wastewater and public health: the potential of wastewater surveillance for monitoring COVID-19** **Current Opinion in Environmental Science and Health** Elsevier B.V., , 1 out. 2020b.

FEHR, A. R.; PERLMAN, S. Coronaviruses: An overview of their replication and pathogenesis. In: **Coronaviruses: Methods and Protocols**. [s.l.] Springer New York, 2015. v. 1282p. 1–23.

FONGARO, G. et al. The presence of SARS-CoV-2 RNA in human sewage in Santa Catarina, Brazil, November 2019. **Science of the Total Environment**, v. 778, p. 146198, 15 jul. 2021.

GE, X. Y. et al. Isolation and characterization of a bat SARS-like coronavirus that uses the ACE2 receptor. **Nature**, v. 503, n. 7477, p. 535–538, 2013.

GORBALENYA, A. E. et al. Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus: The species and its viruses – a statement of the Coronavirus Study Group. **bioRxiv**, 2020a.

GORBALENYA, A. E. et al. **The species Severe acute respiratory syndrome-related**

coronavirus: classifying 2019-nCoV and naming it SARS-CoV-2

Nature Microbiology Nature Publishing Group, , 2 mar. 2020b. Disponível em:

<<https://www.nature.com/articles/s41564-020-0695-z>>. Acesso em: 3 ago. 2021.

HART, O. E.; HALDEN, R. U. Computational analysis of SARS-CoV-2/COVID-19 surveillance by wastewater-based epidemiology locally and globally: Feasibility, economy, opportunities and challenges. **Science of the Total Environment**, v. 730, p. 138875, 15 ago. 2020.

HARTENIAN, E. et al. **The molecular virology of coronaviruses** **Journal of Biological Chemistry** J Biol Chem, , 11 set. 2020. Disponível em:

<<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32661197/>>. Acesso em: 11 jan. 2022.

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, 2014.

HILGENFELD, R.; PEIRIS, M. **From SARS to MERS: 10 years of research on highly pathogenic human coronaviruses** **Antiviral Research** Elsevier, , 1 out. 2013.

HOFFMANN, M. et al. SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor. **Cell**, v. 181, n. 2, p. 271- 280.e8, 16 abr. 2020.

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.

HUI, D. S. C.; ZUMLA, A. **Severe Acute Respiratory Syndrome: Historical, Epidemiologic, and Clinical Features** **Infectious Disease Clinics of North America** W.B. Saunders, , 1 dez. 2019.

IZQUIERDO-LARA, R. et al. Monitoring SARS-CoV-2 circulation and diversity through community wastewater sequencing, the netherlands and belgium. **Emerging Infectious Diseases**, v. 27, n. 5, p. 1405–1415, 1 maio 2021.

JIN, Y. et al. **Virology, epidemiology, pathogenesis, and control of covid-19** **Viruses** MDPI AG, , 2020. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32230900/>>. Acesso em: 24 ago. 2020.

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, 20 dez. 2020.

JONES, K. E. et al. Global trends in emerging infectious diseases. **Nature**, v. 451, n. 7181, p. 990–993, 21 fev. 2008.

ARESH, W. B. et al. **Ecology of zoonoses: Natural and unnatural histories** **The Lancet** Elsevier B.V., , 2012.

KIM, D. et al. The Architecture of SARS-CoV-2 Transcriptome. **Cell**, v. 181, n. 4, p. 914-921.e10, 14 maio 2020.

KITAJIMA, M. et al. **SARS-CoV-2 in wastewater: State of the knowledge and research needs** **Science of the Total Environment** Elsevier B.V., , 15 out. 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, 20 set. 2020.

LAMERS, M. M. et al. SARS-CoV-2 productively infects human gut enterocytes. **Science**, v. 369, n. 6499, p. 50–54, 3 jul. 2020.

LARSEN, D. A.; WIGGINTON, K. R. **Tracking COVID-19 with wastewater** *Nature Biotechnology* Nature Research, , 1 out. 2020.

LETKO, M.; MARZI, A.; MUNSTER, V. Functional assessment of cell entry and receptor usage for SARS-CoV-2 and other lineage B betacoronaviruses. **Nature Microbiology**, v. 5, n. 4, p. 562–569, 1 abr. 2020.

LI, Q. et al. Early Transmission Dynamics in Wuhan, China, of Novel Coronavirus–Infected Pneumonia. **New England Journal of Medicine**, v. 382, n. 13, p. 1199–1207, 29 jan. 2020.

LI, W. et al. Angiotensin-converting enzyme 2 is a functional receptor for the SARS coronavirus. **Nature**, v. 426, n. 6965, p. 450–454, 27 nov. 2003.

LINDENBACH, B. et al. **Flaviviridae**. [s.l.] Lippincott Williams and Wilkins, 2013.

LORUSSO, A. et al. A “One-Health” approach for diagnosis and molecular characterization of SARS-CoV-2 in Italy. **One Health**, v. 10, 1 dez. 2020.

LU, R. et al. Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding. **The Lancet**, v. 395, n. 10224, p. 565–574, 22 fev. 2020.

MAKARENKOV, V. et al. Horizontal gene transfer and recombination analysis of SARS-CoV-2 genes helps discover its close relatives and shed light on its origin. **BMC Ecology and Evolution**, v. 21, n. 1, dez. 2021.

MAO, K. et al. **The potential of wastewater-based epidemiology as surveillance and early warning of infectious disease outbreaks** *Current Opinion in Environmental Science and Health* Elsevier B.V., , 1 out. 2020.

MARTIN, J. et al. Tracking SARS-CoV-2 in sewage: Evidence of changes in virus variant predominance during COVID-19 pandemic. **Viruses**, v. 12, n. 10, 1 out. 2020.

MEDEMA, G. et al. Presence of SARS-Coronavirus-2 in sewage. **medRxiv**, p. 2020.03.29.20045880, 25 jul. 2020.

METSKY, H. et al. CRISPR-based surveillance for COVID-19 using genomically-comprehensive machine learning design. **bioRxiv**, p. 2020.02.26.967026, 2 mar. 2020.

MICHAEL-KORDATOU, I.; KARAOLIA, P.; FATTA-KASSINOS, D. Sewage analysis as a tool for the COVID-19 pandemic response and management: The urgent need for optimised protocols for SARS-CoV-2 detection and quantification. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 8, n. 5, 1 out. 2020.

MOHAN, S. V. et al. SARS-CoV-2 in environmental perspective: Occurrence, persistence, surveillance, inactivation and challenges. **Chemical Engineering Journal**, v. 405, p. 126893, 1 fev. 2021.

NEMUDRYI, A. et al. Temporal detection and phylogenetic assessment of SARS-CoV-2 in

municipal wastewater. **medRxiv : the preprint server for health sciences**, p. 2020.04.15.20066746, 5 jul. 2020.

NEUMAN, B. W. et al. A structural analysis of M protein in coronavirus assembly and morphology. **Journal of Structural Biology**, v. 174, n. 1, p. 11–22, abr. 2011.

ONG, S. W. X. et al. **Air, Surface Environmental, and Personal Protective Equipment Contamination by Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) from a Symptomatic Patient** *JAMA - Journal of the American Medical Association* American Medical Association, , 28 abr. 2020.

ORAN, D. P.; TOPOL, E. J. **Prevalence of Asymptomatic SARS-CoV-2 Infection : A Narrative Review** *Annals of internal medicine* NLM (Medline), , 1 set. 2020.

PARK, M. et al. Optimization of primer sets and detection protocols for SARS-CoV-2 of coronavirus disease 2019 (COVID-19) using PCR and real-time PCR. **Experimental and Molecular Medicine**, v. 52, n. 6, p. 963–977, 16 jun. 2020.

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, 1 out. 2020.

PRADO, T. 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**, v. 191, p. 116810, 1 mar. 2021.

REN, S. Y. et al. **Stability and infectivity of coronaviruses in inanimate environments** *World Journal of Clinical Cases* Baishideng Publishing Group Co, , 2020.

RIGGIONI, C. et al. **A compendium answering 150 questions on COVID-19 and SARS-CoV-2** *Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology* Blackwell Publishing Ltd, , 2020. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32535955/>>. Acesso em: 24 ago. 2020.

RIMOLDI, S. G. et al. Presence and infectivity of SARS-CoV-2 virus in wastewaters and rivers. **Science of the Total Environment**, v. 744, p. 140911, 20 nov. 2020.

ROTONDO, J. C. et al. **Sars-cov-2 infection: New molecular, phylogenetic, and pathogenetic insights. efficacy of current vaccines and the potential risk of variants** *Viruses*, 25 ago. 2021. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/1999-4915/13/9/1687>>. Acesso em: 23 set. 2021.

S, W. et al. Evidence for SARS-CoV-2 related coronaviruses circulating in bats and pangolins in Southeast Asia. **Nature communications**, v. 12, n. 1, 1 dez. 2021.

SCHOEMAN, D.; FIELDING, B. C. **Coronavirus envelope protein: Current knowledge** *Virology Journal* BioMed Central Ltd., , 27 maio 2019.

SIMS, N.; KASPRZYK-HORDERN, B. **Future perspectives of wastewater-based epidemiology: Monitoring infectious disease spread and resistance to the community level** *Environment International* Elsevier Ltd, , 1 jun. 2020. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32535955/>>. Acesso em: 9 ago. 2020.

SOJOBI, A. O.; ZAYED, T. **Impact of sewer overflow on public health: A comprehensive scientometric analysis and systematic review** *Environmental Research* Academic Press Inc., , 1 jan. 2022.

TRAN, H. N. et al. SARS-CoV-2 coronavirus in water and wastewater: A critical review about presence and concern. **Environmental Research**, v. 193, p. 110265, 1 fev. 2021.

UL-RAHMAN, A. et al. A comparative phylogenomic analysis of SARS-CoV-2 strains reported from non-human mammalian species and environmental samples. **Molecular Biology Reports**, v. 47, n. 11, p. 9207–9217, 1 nov. 2020.

VASELLI, N. M. et al. Investigation of SARS-CoV-2 faecal shedding in the community: a prospective household cohort study (COVID-LIV) in the UK. **BMC Infectious Diseases**, v. 21, n. 1, p. 1–9, 1 dez. 2021.

WAN, Y. et al. Receptor Recognition by the Novel Coronavirus from Wuhan: an Analysis Based on Decade-Long Structural Studies of SARS Coronavirus. **Journal of Virology**, v. 94, n. 7, 17 mar. 2020.

WANG, D. et al. Clinical Characteristics of 138 Hospitalized Patients with 2019 Novel Coronavirus-Infected Pneumonia in Wuhan, China. **JAMA - Journal of the American Medical Association**, v. 323, n. 11, p. 1061–1069, 17 mar. 2020a.

WANG, P. et al. Increased Resistance of SARS-CoV-2 Variants B.1.351 and B.1.1.7 to Antibody Neutralization. **bioRxiv : the preprint server for biology**, 26 jan. 2021.

WANG, Q. et al. Structural and Functional Basis of SARS-CoV-2 Entry by Using Human ACE2. **Cell**, v. 181, n. 4, p. 894- 904.e9, 14 maio 2020b.

WANG, W.; TANG, J.; WEI, F. Updated understanding of the outbreak of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) in Wuhan, China. **Journal of Medical Virology**, v. 92, n. 4, p. 441–447, 12 abr. 2020.

WÖLFEL, R. et al. Virological assessment of hospitalized patients with COVID-2019. **Nature**, v. 581, n. 7809, p. 465–469, 28 maio 2020.

WONG, A. C. P. et al. **Global epidemiology of bat coronaviruses** *Viruses* MDPI AG, , 20 fev. 2019. Disponível em: <<http://www.mdpi.com/1999-4915/11/2/174>>. Acesso em: 4 ago. 2020.

WU, A. et al. Genome Composition and Divergence of the Novel Coronavirus (2019-nCoV) Originating in China. **Cell Host and Microbe**, v. 27, n. 3, p. 325–328, 11 mar. 2020.

WU, F. et al. SARS-CoV-2 RNA concentrations in wastewater foreshadow dynamics and clinical presentation of new COVID-19 cases. **Science of the Total Environment**, v. 805, p. 150121, 20 jan. 2022.

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.
XAGORARAKI, I.; O'BRIEN, E. Wastewater-Based Epidemiology for Early Detection of Viral Outbreaks. In: [s.l.] Springer International Publishing, 2020. p. 75–97.

XIAO, F. et al. Evidence for Gastrointestinal Infection of SARS-CoV-2. **Gastroenterology**, v. 158, n. 6, p. 1831- 1833.e3, 1 maio 2020.

YANG, R.; GUI, X.; XIONG, Y. **Comparison of Clinical Characteristics of Patients with Asymptomatic vs Symptomatic Coronavirus Disease 2019 in Wuhan, China** *JAMA Network Open* American Medical Association, , 27 maio 2020.

ZANG, R. et al. TMPRSS2 and TMPRSS4 promote SARS-CoV-2 infection of human small intestinal enterocytes. **Science Immunology**, v. 5, n. 47, p. 2, 13 maio 2020.

ZHANG, T.; WU, Q.; ZHANG, Z. Pangolin homology associated with 2019-nCoV. **bioRxiv**, 2020.

ZHENG, S. et al. Viral load dynamics and disease severity in patients infected with SARS-CoV-2 in Zhejiang province, China, January-March 2020: Retrospective cohort study. **The BMJ**, v. 369, p. 1443, 21 abr. 2020.

ZHOU, H. et al. Identification of novel bat coronaviruses sheds light on the evolutionary origins of SARS-CoV-2 and related viruses. **Cell**, v. 184, n. 17, p. 4380- 4391.e14, 19 ago. 2021.

ZHOU, P. et al. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. **Nature**, v. 579, n. 7798, p. 270–273, 12 mar. 2020.

2 CAPÍTULO II – Artigo Científico

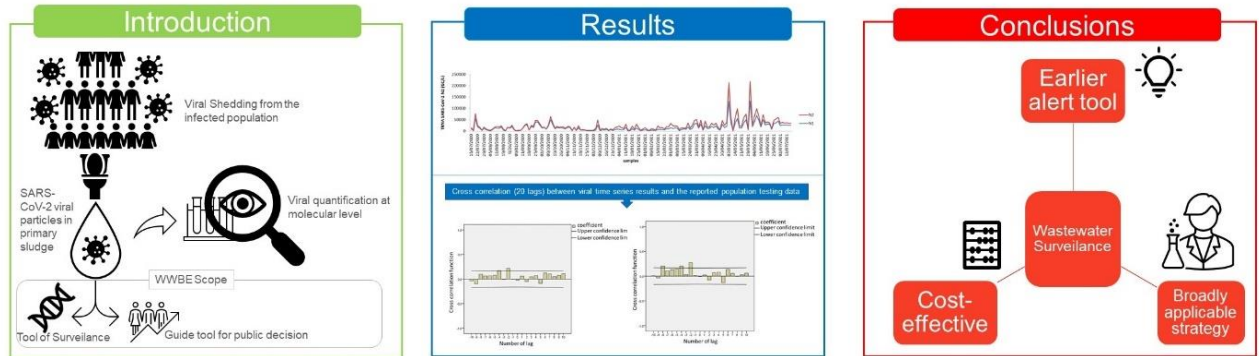
LONG-TERM WASTEWATER SURVEILLANCE FOR SARS-COV-2: ONE YEAR STUDY IN BRAZIL.

2.1 Abstract

Wastewater-based epidemiology (WBE) as a public health surveillance tool involves the screening of wastewater at the community-level and serves as an early warning system. Wastewater monitoring has been a strategy of viral diseases surveillance by the detection of genetic material in the wastewater. Currently, studies have indicated the presence of SARS-CoV-2 in wastewater in multiple geographical regions. The reports of the detection of viral RNA in wastewater highlight the requirement of an effective environmental surveillance. Here, we report the first time-coursing monitoring of SARS-CoV-2 RNA in wastewater samples in São José do Rio Preto-SP/Brazil, 470,000 inhabitants, to describe the dynamic of the presence of SARS-CoV-2 RNA during one year of this pandemic and analyze possible relationships with other environmental parameters. We performed the RNA quantification of SARS-CoV-2 by RT-qPCR using N1 and N2 targets. The percentage of positive samples for each target resulted in 100% and 96.6%, for N1 and N2, respectively. An average lag of -5 days is observed between the wastewater signal and the SARS-CoV-2 positive new cases reported. A negative correlation was found between the air and wastewater temperatures and the SARS-CoV-2 viral titers for N1 and N2 targets. We also observed a negative correlation between SARS-CoV-2 viral titers and media wastewater flow for N1 target. Also, we observed higher viral genome copies in the wastewater samples collected in non-rainy days for N1 target. So, we suggest that based in our results, monitoring raw sludge is a broadly applicable strategy and can contribute to solve the pressing problem of insufficient diagnostic testing and provide a cheap and early warning method for future COVID-19 outbreaks mainly in lower- and middle-income countries.

2.2. Graphical abstract

Long-Term Wastewater Surveillance for SARS-CoV-2: one year study in Brazil
 The 5 days-lag correlation between SARS-CoV-2 infections and environmental parameters and SARS-CoV-2 positive clinical cases are observed during the 52-week period



2.3. Introduction

SARS-CoV-2 pandemic has far-reaching global consequences on public health, economic activities, and societies as a whole. Despite COVID-19 being a respiratory disease, both viable SARS-CoV-2 and viral RNA are shed in bodily excreta, including saliva, sputum, and feces, which are subsequently disposed of in wastewater [1] and the viral shedding can vary among individuals with means of 14-21 days [2,3]. Although it is believed that the major transmission route of this virus is inhalation via person-to-person aerosol/droplet transmission, and fomite to hand contamination, currently available evidence indicates the need for better understanding of the role of wastewater as potential sources of epidemiological data and as a factor in public health risk [4].

Wastewater monitoring has been a strategy of viral diseases surveillance by the detection of genetic material into wastewater [5-7]. Hence, the emergence of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) surveillance in sewage is considered a sensitive tool to monitor the spread of the virus among the population and provide early detection of disease in the community, particularly due to the time lag between the development of symptoms, clinical diagnosis and any action required by health authorities to contain the disease cluster [8].

Currently, studies have indicated the presence of SARS-CoV-2 in wastewater in multiple geographical regions. The reports of the detection of viral RNA in

wastewater highlight the requirement of an effective environmental surveillance. Wastewater-based epidemiology (WBE) as a public health surveillance tool involves the screening of wastewater at the community-level and serves as an early warning system. A cost-effective way to assess the spread of infection by monitoring the viral load in the wastewater, it contains feces excreted from both symptomatic and asymptomatic individuals, and, therefore, overcomes the limitations of clinical surveillance [9,10]

Here, we report the first time-coursing monitoring of SARS-CoV-2 RNA in wastewater samples in São José do Rio Preto-SP/Brazil to describe the dynamic of the presence of SARS-CoV-2 RNA during one year of this pandemic and analyze possible relationship with some environmental parameters.

2.3 Methodology

2.3.1 Sampling

Wastewater (24 hours composite) samples were collected three times per week during one year (from 15 July 2020 to 15 July 2021) and came from the Preliminary Treatment unit of Wastewater Treatment Plant (WWTP) Rio Preto, a plant that processes 98 to 99% of all sewage generated in the municipality. The samples were collected in a HACH Sigma SD900 AWRS refrigerated automatic sampler (HACH Company, USA), with a sampling program adjusted to the input flow, by the collection of 1 sample for every 3000 m³ processed by the plant (equivalent to approx. 36 sampling events / day). Once collected, the samples were kept below 4°C and sent to TSW Rio Preto Laboratories for decantation for 10 minutes followed by vacuum filtration on glass fiber membranes 47mm 1µm (PALL CORPORATION, Ann Harbor, USA) and sent to the São Paulo State University. After filtration, 200 ml of each sample was transported to São Paulo State University in glass flasks on ice on the day of sampling. Upon receipt, the samples were concentrated by high-speed centrifugation at 40 000 x g for 3 h at 4°C using the ultracentrifuge (Beckman Coulter, Indianapolis, USA) and viral pellets were resuspended in 1 mL of DEPC-treated water (Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA) and stored at -150 °C. Samples were processed using Class II biological safety cabinets, and standard precautions were

applied (hand hygiene products and personal protective equipment e.g., gloves, gowns, face and eye protection).

2.3.2 RNA extraction and quantitative PCR

RNA extraction of 200 µL of each sample was performed using Trizol reagent (Thermo Fisher Scientific, USA) according to manufacturer's instructions. RNA was eluted in 30 µL of DEPC water (Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA) and stored at -80 °C.

SARS-CoV-2 RNA was detected and quantified by using qPCRBIO 1-step Go (PCR Biosystems, London, UK) and the RT-qPCR diagnostic panel assays validated by the US Centers for Disease Control and Prevention [11]. The version of the kit with two sets of oligonucleotide primers and probes was used to target two different SARS-CoV-2 regions of the nucleocapsid (N) gene (N1 and N2). The sets of primers and probe (2019-nCoV RUO Kit) as well as the positive control (2019-nCoV_N_Positive Control, 2×10^5 genome copies (gc)/µL) were provided by IDT (Integrated DNA Technologies, Leuven, Belgium). 5 µL of RNA was added to the Reaction mix (15 µL) consisted of 7.5 µL 2X qPCRBIO 1-step Go mix, 0.15 µL RTase Go and 1.13 µL for each sets of primers and probe. The thermal cycling conditions were as RT at 50 °C for 10 min, preheating at 95 °C for 2 min and 40 cycles of amplification at 95 °C for 5 s and 60 °C for 30 s. All amplifications were conducted on a QuantStudio 12 K Flex instrument (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Each RNA was analyzed in triplicate for each primer set and every RT-qPCR assay included negative (nuclease-free water) and positive controls.

Serial ten-fold dilutions of the standard plasmid of SARS-CoV-2, obtained from IDT (Integrated DNA Technologies, Leuven, Belgium), was used to produce standard curves. Molecular biology grade water was used as non-template controls. The amplification efficiencies (E) were calculated based on the equation: $E = 10^{(-1/\text{slope})} - 1$. Molecular biology grade water was used as non-template controls. Negative and positive controls were included in each RT-qPCR run and all RT-qPCR assays were performed in triplicate. Samples were discarded if they did not meet the following conditions: i) standard curves with $R^2 \geq 0.95$, ii)

copies/reaction are in linear dynamic range of the curve and iii) primer efficiency between 90%-130% [12].

2.3.4 Detection limit and qPCR inhibition control

The detection limit for the assay was estimated by spiking serial 10-fold dilutions of SARS-CoV-2 synthetic plasmid in wastewater samples ($n = 5$). After the addition of known concentrations of the virus, the spiked water samples were analyzed by real time RT-qPCR. The lowest concentration of the viruses in the spiked water samples that gave a positive result in the RT-qPCR was taken as an estimate of the detection limit. So, limit of detection of the RT-qPCR assay was determined for N1 and N2 gene regions, by determining the number of copies per reaction which corresponds to a detection rate of $\geq 95\%$ ($<5\%$ false negatives), as recommended by the MIQE guidelines [12].

To check for the presence of inhibitors, all samples testing SARS-CoV-2 N2 negative ($n=5$), twenty samples testing SARS-CoV-2 N1 and N2 positive, as well as sterile water controls (in triplicate), were inoculated in parallel with a known amount (10^5 Genome Copies) of SARS-CoV-2 synthetic plasmid containing N region of SARS-CoV-2 (Integrated DNA Technologies, Leuven, Belgium) and tested using a previously described RT-qPCR assay targeting the N region. The SARS-CoV-2 plasmid was also analyzed by PCR without prior mixing with RNA from the samples. An increase in the threshold cycles (Ct) after addition of the nucleic acid extracts by more than 1 cycle was considered to indicate inhibition. All qPCR reactions were carried out in triplicate on a QuantStudio 12 K Flex instrument (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) [13].

2.4 Data analysis

Data were analyzed using descriptive statistics through measures of central tendency (mean and median) and measures of dispersion (standard deviation). To

test the distribution of variables, the Kolmogorov-Smirnov test was applied. The data did not show a normal distribution, so non-parametric tests were applied for statistical inference. Variables N1 and N2 were normalized with reference to flow, as suggested by Nagarkar et al. (2022) (Nagarkar et al., 2022). To identify the correlation between N1 and N2, SARS-CoV-2 positive clinical cases and hydrological and meteorological data, the instantaneous correlation was initially evaluated (lag=0). The cross-correlation function was also used to assess the correlation between N1 and N2 with SARS-CoV-2 positive clinical for various lags.

To compare N1 and N2 between rainy and non-rainy days, the Mann-Whitney test was applied.

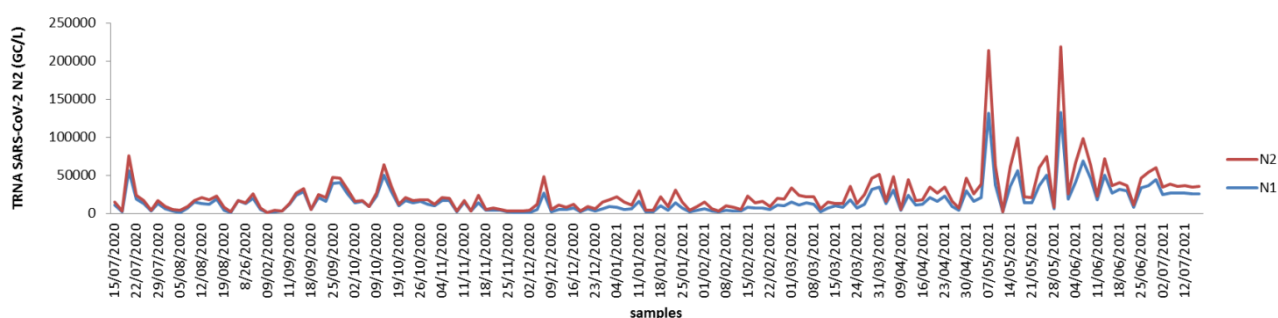
Statistical inference was applied considering a significance level of 5%. The software used for statistical analysis was IBM® SPSS® Statistics Version 24.

2.5 Results and Discussion

We measured SARS-CoV-2 virus RNA by quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (qRT-PCR) using the same N1 and N2 primer sets employed in COVID-19 individual testing. The percentage of positive samples for each target resulted in 100% and 96.6%, for N1 and N2, respectively. Virus RNA copies ranged from 1×10^3 copies/L to 1.3×10^5 copies/L for N1 target of primary sludge and from 0 to 8.6×10^4 copies/L for N2 target of primary sludge. All qRT-PCR concentration threshold (Ct) values were below 40, and 97% of all samples had a Ct value less than 38 for N1 primer and 97.3% for N2 primer. It is noteworthy to mention that despite small differences in terms of positivity frequency, N1 and N2 signals present a similar response trend in wastewater samples (Figure 1) as also observed by a long-term monitoring of wastewater in France [14]. The concentrations of SARS-CoV-2 RNA (1×10^3 - 1.3×10^5 copies/L) in wastewater samples in this study are in agreement with the studies from USA [15-17], South Africa [18] and India [19]. Interestingly, the concentration of SARS-CoV-2 RNA in this study was higher than that reported in Haramoto et al., in Australia [20], Hasan et al., in Arabia Saudita [21] and Ahmed et al., in Australia [9], but two or three orders of magnitude lower than those reported by Balboa et al., in Spain [22]. This could be due to differences in

abundance of SARS-CoV-2 in wastewater due to pandemic level in the community and methodologies for viral RNA detection including virus concentration, RNA extraction, and RT-qPCR assays.

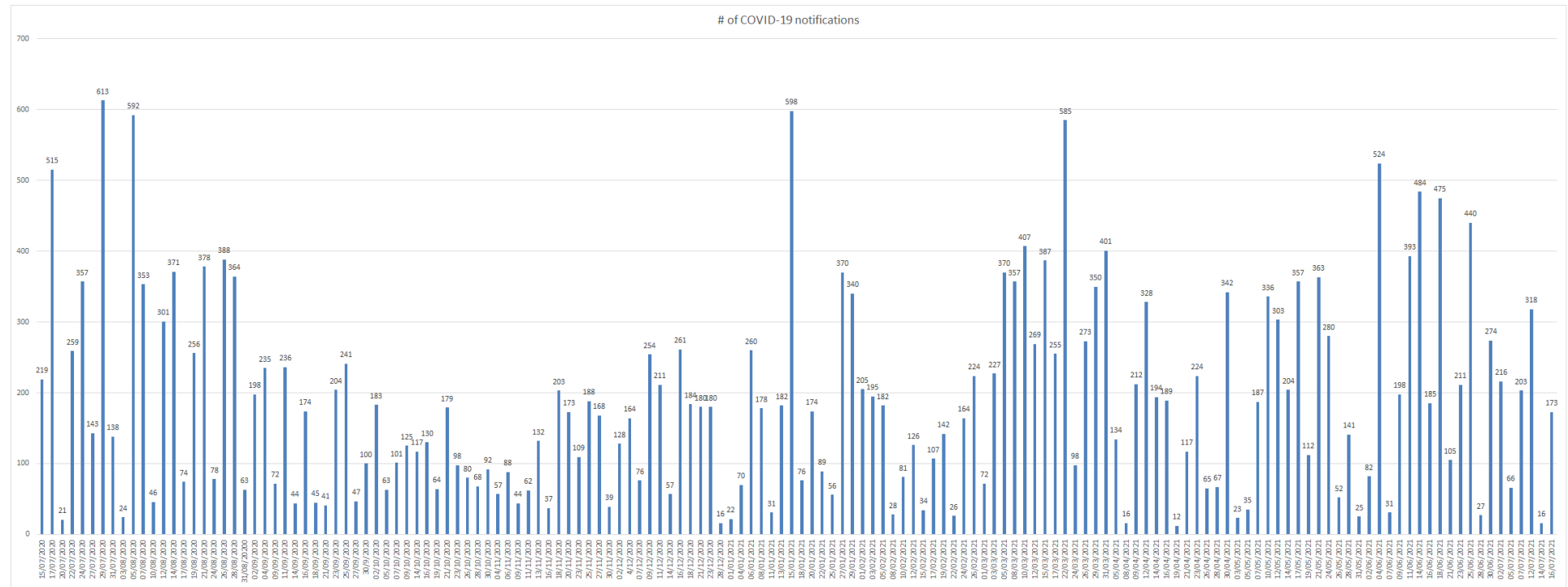
Figure 1: SARS-CoV-2 RNA quantification in the wastewater samples in São José do Rio Preto during one year using N1 target (blue line) and N2 target (red line).



The vitro transcribed viral RNA was detected to a limit of detection (LOD) of 10 copies/reaction in both N1 and N2 RT-qPCR assays and the standard curves demonstrate good linearity for RT-qPCR in a range between 10 to 10^5 copies/reaction for N1 and N2 primers. The LOD is generally used to describe the smallest concentration of target molecules that can be reliably detected and quantified via the assay and in this study the LOD was lower than that observed by Randazzo et al. for the primers N1 and N2 [23]. The linearity and the LOD are important parameters according to MIGE guidelines [12] and although RT-qPCR is a sensitive and specific technique for the quantification of nucleic acid targets, the data reproducibility and reliability are critical parameters and must be established for each assay.

All 150 measures traced the rise and fall of SARS-CoV-2 infections during the 52-week period studied and we analyzed the instant correlation between SARS-CoV-2 and environmental parameters and SARS-CoV-2 positive clinical cases (Figure 2).

Figure 2: Data of COVID-19 positive cases in São José do Rio Preto notified during one year, following same day samples collection.



The time-course monitoring of viral load in wastewater displayed two peaks: one in 05/07/2021 and one in 05/31/2021 for both primers followed by decrease (1-log reduction in average). However, the sludge results showed that these SARS-CoV-2 RNA peaks was not observed in the reported population testing data. We did not observe a significant relation of viral titers with SARS-CoV-2 positive clinical cases when we applied instant correlation. We also tested the correlation of viral titers with SARS-CoV-2 positive clinical cases, applying a cross correlation of 20 lags allowed an estimation of relationships between viral time series results and the reported population testing data (Figures 3 and 4).

Figure 3: Modeling time delay between clinical case reporting and wastewater data changes over the course of the pandemic using SARS-CoV-2 N1 target (at 95% confidence level).

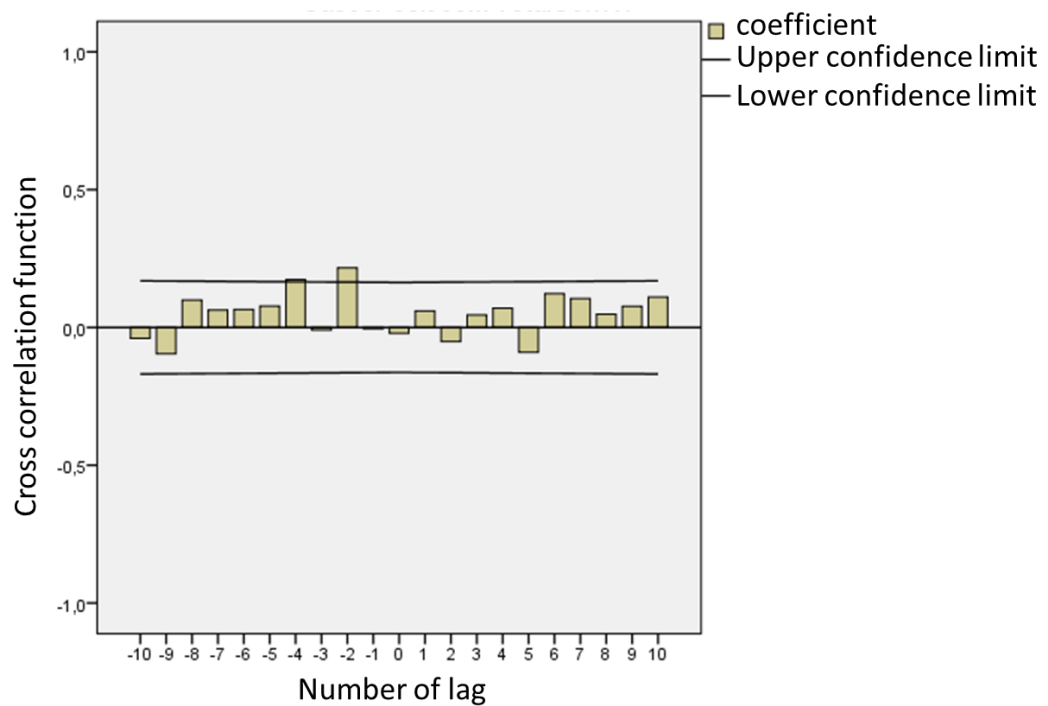
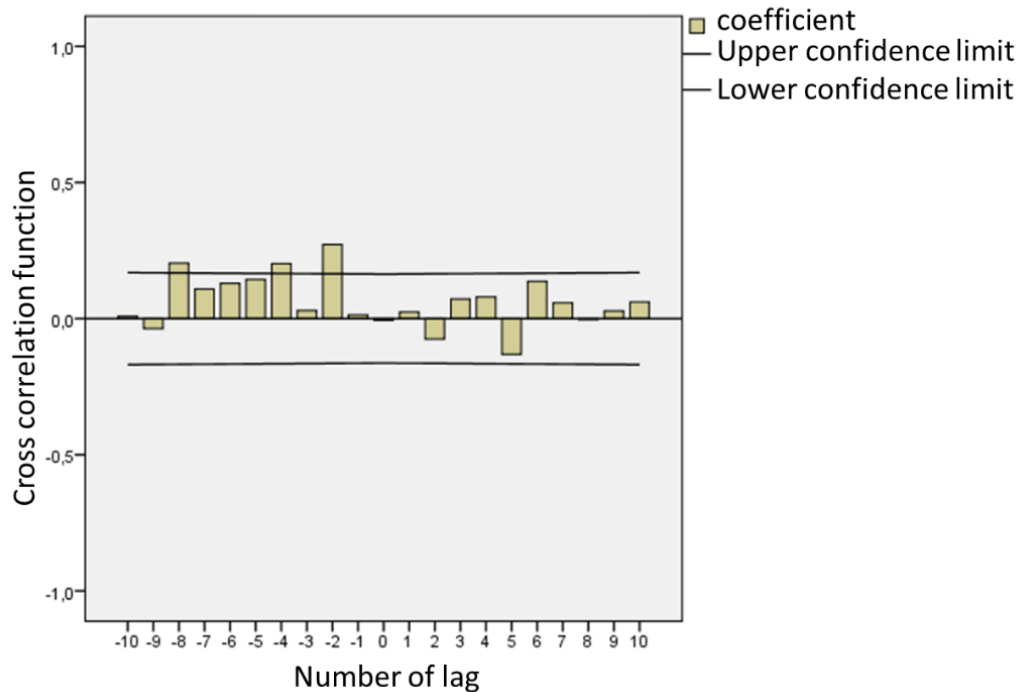


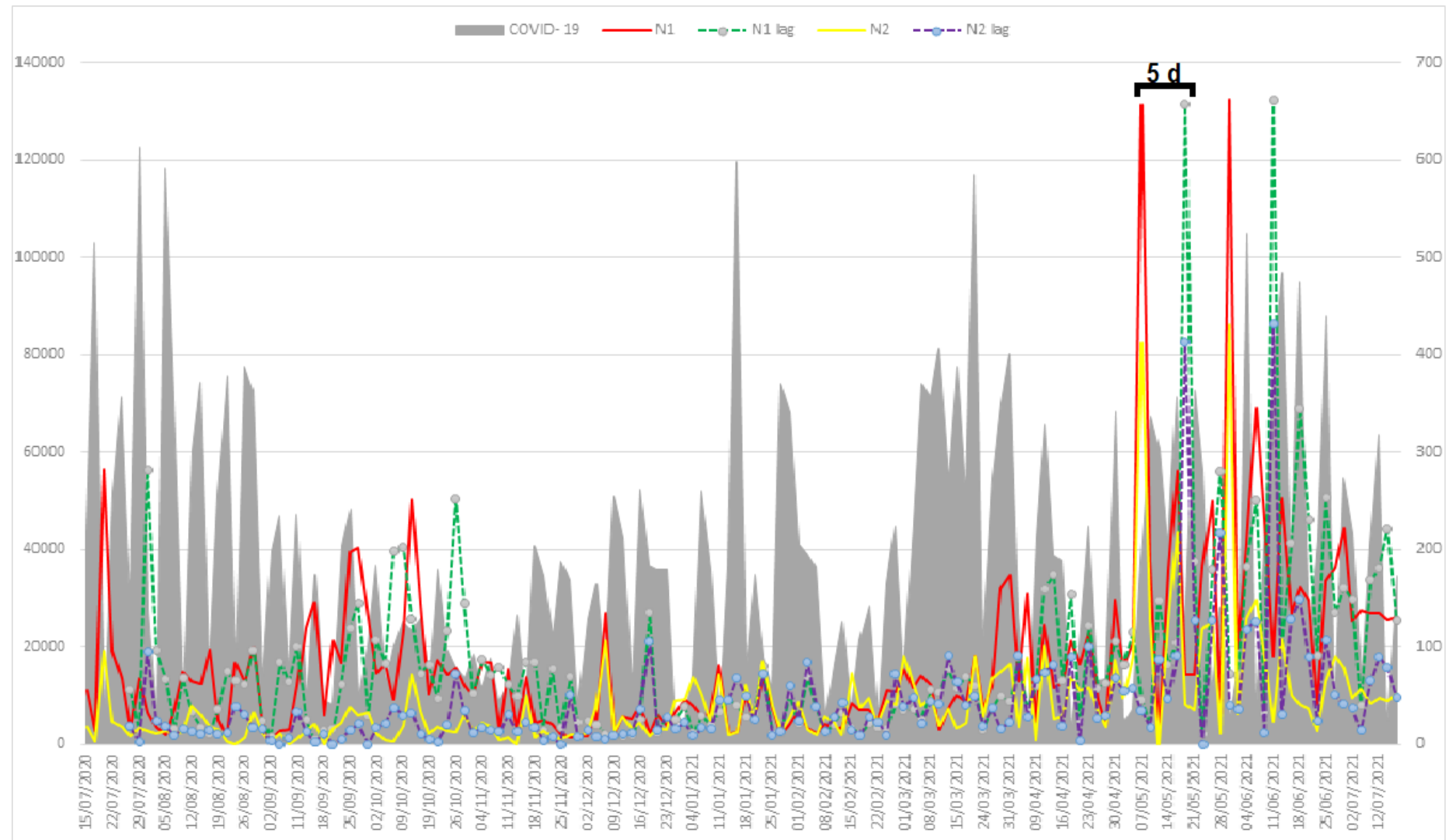
Figure 4: Modeling time delay between clinical case reporting and wastewater data changes over the course of the pandemic using SARS-CoV-2 N2 target (at 95% confidence level).



Here, we used the wastewater sample date as a reference and determined the lag time of clinical cases in relation to the wastewater SARS-CoV-2 RNA concentration. For example, a negative lag in clinical cases would mean wastewater concentrations increased before clinical cases. Negative lag means that the wastewater signal was observed before the SARS-CoV-2 positive cases, and positive number indicates that wastewater follow the incidence rate (i.e. change after). An average lag of -5 days is observed between the wastewater signal and the SARS-CoV-2 positive new cases reported (Figure 5). This result corroborates a study from USA that observed a lag of 7-9 days between SARS-CoV-2 RNA concentration and SARS-CoV-2 positive cases reported [24]. Besides, in literature there is experimental evidence of identifying SARS-CoV-2 in wastewater earlier than medical reporting by several days, e.g., 2 days in Ottawa, Canada [25] and 2–4 days in the USA [26]. Interestingly, Kumar et al. realized the severity of the pandemic situation in the municipal territory of Gandhinagar in India, 1–2 weeks prior to the official reports by the regulatory body based on clinical tests [27] and these time lags between the wastewater signal and clinically reported cases is consistent with the typical 4-5 day incubation period from SARS-CoV-2 infection to symptom onset. On the other hand, a study from Greece, applied numerous machine learning models to determine

the association between RNA concentrations in sewage and 7 days cumulative cases data based on the date of sampling and found no clear evidence that wastewater measurements can foreshadow reported cases at all [28]. Such differences are observed because wastewater based epidemiology as an early warning system depends on both the viral shedding dynamics relative to symptom onset and the discrepancies between wastewater based epidemiology and clinical data reporting [29].

Figure 5: Modeling 5 days lag delay between clinical case reporting and wastewater data changes over the course of the pandemic using SARS-CoV-2 N1 and N2 targets.



Environmental conditions can have a strong effect on viral viability, including seasonal or temperature variations, turbidity, extent of river, exposition to chemicals, rain frequency, etc. Temperature has been identified as a significant environmental variable controlling microbial decay and can impact the persistence of viruses in environmental systems, that is, the survival period of coronavirus in water environments strongly depends on temperature, property of water, concentration of suspended solids and organic matter, solution pH, and dose of disinfectant used. Wastewater temperature varies seasonally, and its modulation over the course of a year differs around the world. Besides, seasonal changes in air and soil temperature affect the transfer of heat between wastewater and the surrounding environment[30].

A negative correlation was found between the air and wastewater temperatures and the SARS-CoV-2 viral titers for N1 ($R=-0.361$; $p<0.01$) and N2 ($R=-0.3000$; $p<0.01$) primers. Our results corroborate a mixed model effect that observed that temperature levels were significant correlated with SARS-CoV-2 gene recovery [31]. Bivins et al. (2020) showed that at 50 °C and 70 °C, SARS-CoV-2 T_{90} values in wastewater were 15 and 2 minutes, respectively, whereas at room temperature (20 °C), SARS-CoV-2 T_{90} was 1.6 day, for the same matrix [32]. It is known that with increasing temperature in most of the studied cities, the prevalence of the disease has decreased. The study by Chin et al. reported that coronavirus often tends to be rapidly inactivated at high temperatures (i.e., 20 °C) rather than at low temperatures (i.e., 4 °C) [33]. Another study by Kampf et al. conducted in 26 regions in China showed that with a 1°C increase of the minimum ambient air temperature, the cumulative number of cases decreases by 0.86%. Also, at ambient temperatures of 30 °C and above, the duration of SARS-CoV-2 is reduced [34]. Some studies have suggested that a temperature of 56 °C for 90 min or a temperature of 67°C for 60 min can inactivate SARS-CoV-2 [35]. So, the persistence of the virus is insignificant and mostly gets destroyed in the high ambient and water temperatures.

We also observed a negative correlation between SARS-CoV-2 viral titers and media wastewater flow for N1 primer ($R=-0.298$; $p<0.01$). The SARS-CoV-2 genetic signal can potentially be affected by sample location, sample type, and time of collection. For example, the signal may change depending on whether the sample is

collected upstream in a sewershed, in the influent to a wastewater treatment facility, or in the primary clarifier effluent, primarily due to differing compositions, dilutions, and dispersion effects. The signal may also depend on whether the sample is a grab versus composite, the type of composite (e.g., time-proportional vs. flow-proportional), and the time of day when it is collected [36]. Conceptually it is clear that a time-proportional sampling mode will systematically under- or overestimate pollutant loads when the flow varies, and when flow and concentration are positively or negatively correlated and similar fact occurs with viral quantification [37].

Besides, there is a significant difference in the SARS-CoV-2 viral titers when compared rainy days (n=40) with non-rainy days (n=110) ($U=1595.00$; $p=0.010$), i.e. there is a higher viral genome copies in the wastewater samples collected in non-rainy days for N1 primer ($Md_{rain}=5855.00$; $Md_{non-rain}=13603.00$). Lazuka et al., observed that SARS-CoV-2 RNA quantification appeared highly affected by high rainfall events once SARS-CoV-2 RNA quantification decreased in rainy days but, it doesn't mean that the virus suddenly stopped circulating in the population and the main message from this observation is that a decrease in concentration or absence of detection has to be considered with caution when rain events are concomitant [14].

2.6 Conclusions

In conclusion, the SARS-CoV-2 RNA concentrations in primary sewage sludge were tracked throughout a COVID-19 epidemic during one year and compared with environmental and populational parameters. Monitoring primary sludge is a broadly applicable strategy and can contribute to solve the pressing problem of insufficient diagnostic testing and provide a cheap and early warning method for future COVID-19 outbreaks mainly in lower- and middle-income countries. Besides, Wastewater based epidemiology can also be used as a tool for the decision of the post-isolation phase (restarting activities and finishing the isolation if the population), reinstatement of isolation facing a rebound or seasonal re-emergence, as earlier alert-tool without random-diagnostic testing.

REFERENCES

1. Cheung KS, Hung IFN, Chan PPY, Lung KC, Tso E, et al. (2020) Gastrointestinal Manifestations of SARS-CoV-2 Infection and Virus Load in Fecal Samples From a Hong Kong Cohort: Systematic Review and Meta-analysis. *Gastroenterology* 159: 81-95.
2. Wu Y, Guo C, Tang L, Hong Z, Zhou J, et al. (2020) Prolonged presence of SARS-CoV-2 viral RNA in faecal samples. *Lancet Gastroenterol Hepatol* 5: 434-435.
3. Xu Y, Li X, Zhu B, Liang H, Fang C, et al. (2020) Characteristics of pediatric SARS-CoV-2 infection and potential evidence for persistent fecal viral shedding. *Nat Med* 26: 502-505.
4. Westhaus S, Weber FA, Schiwy S, Linnemann V, Brinkmann M, et al. (2021) Detection of SARS-CoV-2 in raw and treated wastewater in Germany - Suitability for COVID-19 surveillance and potential transmission risks. *Sci Total Environ* 751: 141750.
5. Santiso-Bellon C, Randazzo W, Perez-Cataluna A, Vila-Vicent S, Gozalbo-Rovira R, et al. (2020) Epidemiological Surveillance of Norovirus and Rotavirus in Sewage (2016-2017) in Valencia (Spain). *Microorganisms* 8.
6. Cuevas-Ferrando E, Randazzo W, Perez-Cataluna A, Sanchez G (2019) HEV Occurrence in Waste and Drinking Water Treatment Plants. *Front Microbiol* 10: 2937.
7. Asghar H, Diop OM, Weldegebriel G, Malik F, Shetty S, et al. (2014) Environmental surveillance for polioviruses in the Global Polio Eradication Initiative. *J Infect Dis* 210 Suppl 1: S294-303.
8. Zahedi A, Monis P, Deere D, Ryan U (2021) Wastewater-based epidemiology-surveillance and early detection of waterborne pathogens with a focus on SARS-CoV-2, *Cryptosporidium* and *Giardia*. *Parasitol Res* 120: 4167-4188.
9. Ahmed W, Angel N, Edson J, Bibby K, Bivins A, et al. (2020) 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. *Sci Total Environ* 728: 138764.
10. Kumar M, Patel AK, Shah AV, Raval J, Rajpara N, et al. (2020) First proof of the capability of wastewater surveillance for COVID-19 in India through detection of genetic material of SARS-CoV-2. *Sci Total Environ* 746: 141326.
11. CDC (2020) Research Use Only 2019-Novel Coronavirus (2019-nCoV) Real-time RT-PCR Primers and Probes
12. Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, et al. (2009) The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem* 55: 611-622.

13. Hamza IA, Jurzik L, Stang A, Sure K, Uberla K, et al. (2009) Detection of human viruses in rivers of a densely-populated area in Germany using a virus adsorption elution method optimized for PCR analyses. *Water Res* 43: 2657-2668.
14. Lazuka A, Arnal C, Soyeux E, Sampson M, Lepeuple AS, et al. (2021) COVID-19 wastewater based epidemiology: long-term monitoring of 10 WWTP in France reveals the importance of the sampling context. *Water Sci Technol* 84: 1997-2013.
15. Wu F, Xiao A, Zhang J, Moniz K, Endo N, et al. (2021) Wastewater surveillance of SARS-CoV-2 across 40 U.S. states from February to June 2020. *Water Res* 202: 117400.
16. Weidhaas J, Aanderud ZT, Roper DK, VanDerslice J, Gaddis EB, et al. (2021) Correlation of SARS-CoV-2 RNA in wastewater with COVID-19 disease burden in sewersheds. *Sci Total Environ* 775: 145790.
17. Melvin RG, Chaudhry N, Georgewill O, Freese R, Simmons GE (2021) Predictive power of SARS-CoV-2 wastewater surveillance for diverse populations across a large geographical range. *medRxiv*.
18. Johnson R, Muller CJF, Ghoor S, Louw J, Archer E, et al. (2021) Qualitative and quantitative detection of SARS-CoV-2 RNA in untreated wastewater in Western Cape Province, South Africa. *S Afr Med J* 111: 198-202.
19. Kopperi H, Tharak A, Hemalatha M, Kiran U, Gokulan CG, et al. (2021) Defining the methodological approach for wastewater-based epidemiological studies- Surveillance of SARS-CoV-2. *Environ Technol Innov* 23: 101696.
20. Haramoto E, Malla B, Thakali O, Kitajima M (2020) First environmental surveillance for the presence of SARS-CoV-2 RNA in wastewater and river water in Japan. *Sci Total Environ* 737: 140405.
21. Hasan SW, Ibrahim Y, Daou M, Kannout H, Jan N, et al. (2021) Detection and quantification of SARS-CoV-2 RNA in wastewater and treated effluents: Surveillance of COVID-19 epidemic in the United Arab Emirates. *Sci Total Environ* 764: 142929.
22. Balboa S, Mauricio-Iglesias M, Rodriguez S, Martinez-Lamas L, Vasallo FJ, et al. (2021) The fate of SARS-COV-2 in WWTPS points out the sludge line as a suitable spot for detection of COVID-19. *Sci Total Environ* 772: 145268.
23. Randazzo W, Truchado P, Cuevas-Ferrando E, Simon P, Allende A, et al. (2020) SARS-CoV-2 RNA in wastewater anticipated COVID-19 occurrence in a low prevalence area. *Water Res* 181: 115942.
24. Cavany S, , Bivins A, , Wu Z, et al. (2022) Inferring SARS-CoV-2 RNA shedding into wastewater relative to time of infection. *Epidemiology & Infection*.
25. D'Aoust PM, Mercier E, Montpetit D, Jia JJ, Alexandrov I, et al. (2021) Quantitative analysis of SARS-CoV-2 RNA from wastewater solids in

- communities with low COVID-19 incidence and prevalence. *Water Res* 188: 116560.
26. Nemudryi A, Nemudraia A, Wiegand T, Surya K, Buyukyoruk M, et al. (2020) Temporal Detection and Phylogenetic Assessment of SARS-CoV-2 in Municipal Wastewater. *Cell Rep Med* 1: 100098.
 27. Kumar M, Joshi M, Patel AK, Joshi CG (2021) Unravelling the early warning capability of wastewater surveillance for COVID-19: A temporal study on SARS-CoV-2 RNA detection and need for the escalation. *Environ Res* 196: 110946.
 28. Koureas M, Amoutzias GD, Vontas A, Kyritsi M, Pinaka O, et al. (2021) Wastewater monitoring as a supplementary surveillance tool for capturing SARS-COV-2 community spread. A case study in two Greek municipalities. *Environ Res* 200: 111749.
 29. Petala M, Kostoglou M, Karapantsios T, Dovas CI, Lytras T, et al. (2022) Relating SARS-CoV-2 shedding rate in wastewater to daily positive tests data: A consistent model based approach. *Sci Total Environ* 807: 150838.
 30. Hart OE, Halden RU (2020) Modeling wastewater temperature and attenuation of sewage-borne biomarkers globally. *Water Res* 172: 115473.
 31. Kevill JL, Pellett C, Farkas K, Brown MR, Bassano I, et al. (2022) A comparison of precipitation and filtration-based SARS-CoV-2 recovery methods and the influence of temperature, turbidity, and surfactant load in urban wastewater. *Sci Total Environ* 808: 151916.
 32. Aaron Bivins JG, #Robert Fischer, Kwe Claude Yinda, Warish Ahmed, Masaaki Kitajima,, Vincent J. Munster aKB (2020) Persistence of SARS-CoV-2 in Water and Wastewater. *Environ Sci Technol Lett* 7.
 33. Tran HN, Le GT, Nguyen DT, Juang RS, Rinklebe J, et al. (2021) SARS-CoV-2 coronavirus in water and wastewater: A critical review about presence and concern. *Environ Res* 193: 110265.
 34. Kampf G, Todt D, Pfaender S, Steinmann E (2020) Persistence of coronaviruses on inanimate surfaces and their inactivation with biocidal agents. *J Hosp Infect* 104: 246-251.
 35. Henwood AF (2020) Coronavirus disinfection in histopathology. *J Histotechnol* 43: 102-104.
 36. Ort C, Lawrence MG, Rieckermann J, Joss A (2010) Sampling for pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) and illicit drugs in wastewater systems: are your conclusions valid? A critical review. *Environ Sci Technol* 44: 6024-6035.
 37. Ort C, Lawrence MG, Reungoat J, Mueller JF (2010) Sampling for PPCPs in wastewater systems: comparison of different sampling modes and optimization strategies. *Environ Sci Technol* 44: 6289-6296.

Supplementary Material

Table 1- Parameters of wastewater samples collected and SARS-CoV-2 RNA quantification using N1 and N2 targets.

Parameters	Minimum	Maximum	Average	Standard Deviation	Median
N1 RNA Copies - Normalized	10,7x10 ¹⁰	1333,2 x10 ¹⁰	169,6 x10 ¹⁰	183,7 x10 ¹⁰	125,9 x10 ¹⁰
N2 RNA copies - Normalized	0,00	837,4 x10 ¹⁰	85,7 x10 ¹⁰	110,6 x10 ¹⁰	54,4 x10 ¹⁰
SARS-CoV-2 Positive cases	12,00	613,00	188 ,34	140,11	174
Environment Temperature	0,00	34,30	24,41	3,70	24,5
Average Flow	1019,00	1394,00	1169,55	71,62	1162
Total flow	87876,00	121542,00	100826,41	6150,29	100067
pH	7,04	7,81	7,51	0,11	7,5
Sludge Temperature	18,00	30,80	26,03	2,37	26,4
Chemical oxygen demand	411,00	2039,00	725,60	283,56	622,5

Table 2- Spearman non-parametric correlation of environmental and wastewater parameters and SARS-CoV-2 N1 and N2 targets.

		N1	N2
SARS-CoV-2 Postive cases	Correlation coefficient	-0.033	0.000
	Sig. (bilateral)	0,69	0,999
	N	150	150
Environment Temperature	Correlation coefficient	-0.361**	-0.300**
	Sig. (bilateral)	0	0
	N	150	150
pH	Correlation Coefficient	0.215**	0.281**
	Sig. (bilateral)	0.008	0,001
	N	150	150
Sludge Temperature	Correlation Coeficcient	-0.375**	-0.185*
	Sig. (bilateral)	0	0,024
	N	150	150
Average Flow	Correlation Coefficient	-0.298**	0.063
	Sig. (bilateral)	0.000	0.447
	N	150	150

Table 3: Rainfall frequency in São José do Rio Preto during the period of on year.

Rain					
		Frequency	Percentage	Valid Percentage	Cumulative Percentage
Valid	0	110	73,3	73,3	73,3
	1	40	26,7	26,7	100,0
	Total	150	100,0	100,0	

Yes=1; No=0

3 CAPÍTULO III – CONCLUSÃO

3.1. Considerações Finais

Nosso trabalho utilizando metodologias já validadas em outros estudos demonstra que é possível isolar fragmentos do SARS-CoV-2 do esgoto primário através de técnicas de ultracentrifugação, para posterior análise do material genético pela metodologia de Reação em Cadeia de Polimerase em Tempo Real, com isso se obteve resultados positivos para todas as amostras de esgoto bruto processadas, em pelo menos um dos alvos para o novo Coronavírus (N1 e N2-Protocolo CDC). Ainda, os dados da carga viral observados reforçam o que já é visto na literatura por outros autores em outras localidades em que estudos de Epidemiologia de Águas Residuais foram conduzidos.

Em relação a variação temporal da carga viral no esgoto, podemos observar que esta varia em função da situação epidemiológica da comunidade, como um reflexo adiantado da real situação epidemiológica em termos populacionais, o que demonstra que tal ferramenta de monitoramento pode ser utilizada como um sistema de alerta antecipado do risco de surgimento de novos surtos, permitindo uma mobilização antecipada e precoce de decisões do poder público que permitam a aplicação de estratégias de mitigação e redução de casos.

Por fim mais estudos sobre a aplicação da Epidemiologia Baseada em Água Residuais (WWBE) serão necessários, principalmente entre as fases de restrição e abertura das atividades econômicas, e afrouxamento das medidas sanitárias. Entretanto, há um crescente consenso de que o monitoramento de águas residuais é uma ferramenta poderosa e de bom custo-eficácia em diferentes realidades socioeconômicas.

ANEXO A- DADOS PRIMÁRIOS COLETADOS AO LONGO DA PESQUISA.

Amostra	Data de chegada	CG/L (N1)	CG/L (N2)	Número de casos positivos para COVID19	Temperatura média (8h do dia anterior, até 7h da data da chegada)	Vazão média(l/s)	Vazão total diária(m³/dia)	pH	Temperatura da água(°C)	DQO (mg/L)	Chuvas
E1	15/07/2020	11050	3620	219	24.3°	1149	98909	7,59	23,1	486	Não
E2	17/07/2020	2722,4	431,6	515	23.4°	1139	98031	7,64	23,5	622	Não
E3	20/07/2020	56380,968	19005,84	21	21.0°	1063	91357	7,69	24,2	627	Não
E4	22/07/2020	19136,88	4697,28	259	22°	1115	96490	7,66	22,3	588	Não
E5	24/07/2020	13330,8	3626,28	357	22.9°	1139	101449	7,63	23	500	Não
E6	27/07/2020	2958,48	1650,6	143	23.6°	1053	90349	7,64	25	767	Não
E7	29/07/2020	13472	3200	613	23.5°	1137	97864	7,61	24,3	536	Não
E8	31/07/2020	6584	2650	138	20.3°	1122	96380	7,69	22,7	499	Não
E9	03/08/2020	3474	2136	24	21.6°	1054	91344	7,39	24,5	939	Não
E10	05/08/2020	1900	2768	592	21.3°	1106	96462	7,38	22,3	658	Não
E11	07/08/2020	7250,4	2096,68	353	21.5°	1103	95565	7,36	22,4	702	Não
E12	10/08/2020	14842,12	2353,2	46	22.7°	1019	87876	7,42	24,6	524	Não
E13	12/08/2020	13018	7666	301	23.8°	1152	98027	7,46	23,6	591	Não
E14	14/08/2020	12336	5938	371	26.4°	1188	102121	7,56	23,3	985	Não
E15	17/08/2020	19298	3374	74	22.6°	1055	91360	7,41	26	1087	Não
E16	19/08/2020	4802	3008	256	25.1°	1156	101150	7,51	25,3	1049	Não
E17	21/08/2020	1582	620	378	19.1°	1155	99423	7,48	24,6	546	Não
E18	24/08/2020	16790	0	78	19,5°	1026	88964	7,54	21,8	957	Não
A19	26/08/2020	12740	1274	388	21°	1157	99005	7,7	24	944	Não
E20	28/08/2020	19934	6456	364	24°	1209	98310	7,44	22,2	871	Não
E21	31/08/2020	4898	2446	63	27.4°	1069	94116	7,41	25,4	867	Não
E22	02/09/2020	1076	500	198	26.6°	1155	99657	7,41	23,7	1017	Não
E23	04/09/2020	2690	2148	235	26.5°	1168	100939	7,04	25,5	1023	Não
E24	09/09/2020	2960	0	72	29°	1188	102694	7,29	25,9	808	Não
E25	11/09/2020	12174	1040	236	29.3°	1164	100617	7,34	25,7	999	Não
E26	14/09/2020	23868	2696	44	27.9°	1092	94404	7,44	27,9	839	Não
E27	16/09/2020	28988	4092	174	26.7°	1159	99957	7,57	26,5	1037	Não

E28	18/09/2020	5830	0	45	28.8°	1149	98745	7,36	27,4	1053	Não
E29	21/09/2020	21260	3286	41	21.2°	1070	91892	7,33	26,9	426	Sim
E30	23/09/2020	16598	4226	204	20.1°	1135	94790	7,4	25,5	1032	Sim
E31	25/09/2020	39608	7452	241	26.4°	1166	99798	7,48	25,3	705	Não
E32	27/09/2020	40422	5780	47	29.9°	1231	100087	7,44	27,1	680	Não
E33	30/9/2020	25706	6406	100	31.8°	1166	100927	7,42	*	996	Não
E34	02/10/2020	14414	2104	183	32.8°	1170	103833	7,71	28,4	597	Não
E35	05/10/2020	16354	930	63	29.4°	1076	98766	7,4	28,6	936	Não
E36	07/10/2020	9190	406	101	33.8°	1143	98398	7,32	29,8	926	Não
E37	09/10/2020	23338	3876	125	30.3°	1131	104683	7,41	28,5	603	Não
E38	14/10/2020	50254	14270	117	30.7°	1138	99572	7,69	29,9	787	Não
E39	16/10/2020	28800	6784	130	21.7°	1169	98486	7,53	28,1	731	Sim
E40	19/10/2020	10332	2262	64	27.1°	1086	93714	7,58	29,4	1028	Não
E41	21/10/2020	17282	3450	179	22.3°	1107	95538	7,43	26	828	Sim
E42	23/10/2020	14196	2750	98	25°	1098	94297	7,54	27,5	806	Sim
E43	26/10/2020	15680	2536	80	26.3°	1073	92779	7,57	27,8	542	Não
E44	28/10/2020	12224	5930	68	25°	1143	100022	7,47	27,7	503	Não
E45	30/10/2020	9848	2626	92	24.6°	1186,71	101865	7,51	28,6	556	Sim
E46	04/11/2020	16854	4360	57	24,2°	1173	101246	7,49	24	1039	Não
E47	06/11/2020	16692	3404	88	25,5°	1155	100531	7,57	24,8	543	Não
E48	09/11/2020	2852	702	44	30,9°	1179	93446	7,58	30,5	865	Não
E49	11/11/2020	15336	1480	62	25,6°	1134	99497	7,42	28	789	Sim
E50	13/11/2020	3260	0	132	27,9°	1200	103446	7,35	29	1062	Não
E51	16/11/2020	13834	10070	37	27,1°	1095	95371	7,45	29,7	515	Sim
E52	18/11/2020	4344	1352	203	26,7°	1215	104393	7,41	29,7	566	Sim
E53	20/11/2020	4720	2706	173	22,1°	1351	116076	7,52	25,7	552	Sim
E54	23/11/2020	3914	1586	109	26,2°	1117,4	95528	7,48	27,3	454	Não
E55	25/11/2020	2124	1074	188	26,9°	1194	102167	7,5	28,2	525	Não
E56	27/11/2020	1400	1846	168	34,3°	1124	98717	7,37	29,6	528	Sim
E57	30/11/2020	1520	1918	39	29,1°	1124	100325	7,42	30,8	500	Não
E58	02/12/2020	1740	2286	128	27,8°	1230	106011	7,29	28,8	614	Não

E59	4/12/2020	4930	7144	164	23,7°	1168	100611	7,37	28,3	541	Sim
E60	07/12/2020	26948	21114	76	24,5°	1158	101152	7,35	27,3	568	Sim
E61	09/12/2020	2334	2774	254	24,9°	1279	110242	7,43	28,1	424	Sim
E62	11/12/2020	5768	5602	211	23,7°	1100	94280	7,56	28	536	Sim
E63	14/12/2020	4998	3192	57	25,2°	1130	107954	7,4	27,5	548	Sim
E64	16/12/2020	7764	4370	261	26,6°	1120	96300	7,51	27,4	827	Sim
E65	18/12/2020	2166	1642	184	25,9°	1155	98938	7,43	30,3	543	Sim
E66	21/12/2020	5910	3312	180	27,5°	1084	92660	7,49	28,3	526	Sim
E67	23/12/2020	3782	2966	180	25,5°	1155	99539	7,44	27,8	507	Sim
E68	28/12/2020	6486	9002	16	22,2°	1175	111638	7,37	26,1	515	Sim
E69	01/01/2021	9194	9106	22	24,8°	1388	120384	7,5	27,2	448	Não
E70	04/01/2021	7902	13614	70	25,2°	1177	99230	7,44	27,8	1074	Não
E71	06/01/2021	5532	9830	260	26,7°	1234	106096	7,5	28	882	Não
E72	08/01/2021	6328	4902	178	25,5°	1237	105335	7,69	28,8	603	Sim
E73	11/01/2021	15996	14246	31	26,3°	1178	101618	7,54	28	454	Não
E74	13/01/2021	2164	1784	182	25,5°	1346	116602	7,24	24,8	591	Sim
E75	15/01/2021	2378	2442	598	24,4°	1394	121542	7,57	27,4	472	Sim
E76	18/01/2021	10160	12018	76	23,6°	1376	117844	7,55	26,1	557	Sim
E77	20/01/2021	4214	4716	174	25°	1297	111724	7,43	26,6	467	Sim
E78	22/01/2021	13734	16796	89	28°	1275	110129	7,48	27,9	689	Não
E79	25/01/2021	7294	7714	56	26,6°	1181,18	101724	7,49	28,9	584	Não
E80	27/01/2021	2228	2604	370	26,3°	1269,8	109900	7,48	28,2	717	Não
E81	29/01/2021	3926	5484	340	26,6°	1230,92	106281	7,4	28,1	474	Não
E82	01/02/2021	6324	8594	205	26°	1197	100054	7,46	29,1	595	Não
E83	03/02/2021	3316	2900	195	26,1°	1272	113560	7,48	28,8	710	Sim
E84	05/02/2021	2118	1760	182	25,9°	1367	117827	7,48	27,4	528	Sim
E85	08/02/2021	4164	5606	28	24,4°	1174	98099	7,32	27,6	557	Não
E86	10/02/2021	3366	4470	81	25,4°	1238	106874	7,63	27,3	742	Não
E87	12/02/2021	3104	1778	126	22,5°	1205	105169	7,56	27	757	Não
E88	15/02/2021	8216	14486	34	23,6°	1136	100354	7,57	27,4	832	Sim
E89	17/02/2021	6956	7568	107	26,6°	1226	104253	7,55	28,8	723	Sim

E90	19/02/2021	7034	9450	142	25,7°	1251	106122	7,48	28,3	685	Não
E91	22/02/2021	5052	4230	26	27,8°	1173	102322	7,54	27,8	822	Não
E92	24/02/2021	11096	8760	164	27,9°	1243	107163	7,58	28,2	871	Não
E93	26/02/2021	10628	8164	224	25,3°	1252	110172	7,81	27,9	603	Sim
E94	01/03/2021	15382	18086	72	22,4°	1122	96982	7,66	28,2	476	Sim
E95	03/03/2021	11436	12744	227	23,7°	1230	105231	7,63	28,5	1283	Sim
E96	05/03/2021	13876	7824	370	23,2°	1247	106248	7,73	26,4	629	Sim
E97	08/03/2021	12004	9690	357	22°	1243	106610	7,74	27	411	Sim
E98	10/03/2021	2840	3698	407	23,6°	1195	103851	7,57	26,4	623	sim
E99	12/03/2021	7362	7320	269	26,6°	1239	108116	7,66	26,7	489	Não
E100	15/03/2021	9916	3102	387	24,8°	1200	103129	7,48	27,4	994	Não
E101	17/03/2021	8602	4328	255	27,1°	1218	104445	7,57	27,2	489	Não
E102	22/03/2021	17872	18086	585	27,4°	1122	96941	7,52	27	560	Não
E103	24/03/2021	7170	5558	98	28,1°	1171	101324	7,54	26,4	493	Não
E104	26/03/2021	11934	13388	273	28,8°	1201	103749	7,69	27,8	500	Não
E105	29/03/2021	31884	14748	350	27,8°	1131	96846	7,57	27,2	411	Não
E106	31/03/2021	34740	16294	401	26,6°	1217	103987	7,52	26,4	473	Não
E107	05/04/2021	12980	3510	134	25°	1112	96994	7,54	28,2	450	Não
E108	08/04/2021	30876	17746	16	24,8°	1230	102049	7,52	26,3	471	Sim
E109	09/04/2021	4608	802	212	25,1°	1214	103811	7,6	25	459	Não
E110	12/04/2021	24356	20098	328	24,7°	1157	100080	7,63	24,4	974	Não
E111	14/04/2021	11504	5162	194	24,9°	1199	104319	7,45	26,2	903	Não
E112	16/04/2021	12602	5748	189	24,4°	1314	103166	7,5	25,2	1025	Sim
E113	19/04/2021	21158	13688	12	22,1°	1241	106604	7,63	26,6	993	Não
E114	21/04/2021	16374	10914	117	21,5°	1250	105347	7,6	24,8	1481	Não
E115	23/04/2021	22992	11554	224	21,2°	1243	105256	7,5	25,6	1474	Não
E116	26/04/2021	9034	6762	65	25,2°	1172	100933	7,57	25,4	1590	Não
E117	28/04/2021	3894	3404	67	22,5°	1261	108872	7,57	26,5	1676	Não
E118	30/04/2021	29554	17200	342	20,7°	1244	105738	7,63	27,1	1628	Não
E119	03/05/2021	16182	9294	23	23,1°	1139	97946	7,47	24,5	529	Não
E120	05/05/2021	20854	18052	35	23,8°	1159	100021	7,49	25	549	Não

E121	07/05/2021	131470	82576	187	23,5°	1188	101406	7,65	25	575	Não
E122	10/05/2021	37370	25518	336	23,1°	1076	92444	7,61	24,8	504	Não
E123	12/05/2021	2058	0	303	23,9°	1262	108971	7,63	24,9	1388	Não
E124	14/05/2021	35828	25346	204	20,4°	1177	100517	7,6	24,7	634	Não
E125	17/05/2021	56108	43424	357	23,2°	1068	91978	7,5	24,5	470	Não
E126	19/05/2021	14372	8004	112	22,6°	1153	99101	7,48	24,3	540	Não
E127	21/05/2021	14148	7106	363	23,3°	1157	100423	7,55	24,3	625	Não
E128	24/05/2021	36542	23572	280	18,2°	1150	99521	7,56	23,6	704	Sim
E129	26/05/2021	49998	25170	52	21,4°	1150	98958	7,5	21,9	892	Não
E130	28/05/2021	6206	2284	141	24,4°	1189	101434	7,48	22,9	674	Não
E131	31/05/2021	132348	86292	25	23,3°	1093	95089	7,44	25,1	436	Não
E132	02/06/2021	19526	6148	82	22,2°	1123	98271	7,42	23,6	557	Não
E133	04/06/2021	41316	25694	524	24,5°	1119	98132	7,52	23	436	Não
E134	07/06/2021	69048	29654	31	23,4°	1064	90837	7,51	24,3	678	Não
E135	09/06/2021	46076	17830	198	20,1°	1132	95598	7,51	22,9	684	Não
E136	11/06/2021	18058	4594	393	18,3°	1168	99651	7,3	24	826	Sim
E137	14/06/2021	50638	21366	484	19°	1067	91849	7,53	25,2	664	Não
E138	16/06/2021	26968	9970	185	20,6°	1173	101058	7,41	23,1	990	Não
E139	18/06/2021	32168	8182	475	19,6°	1120	96653	7,54	23,3	588	Não
E140	21/06/2021	29600	7330	105	20°	1082	93308	7,59	24,1	481	Não
E141	23/06/2021	8040	2714	211	22,6°	1179	101130	7,57	23,8	616	Não
E142	25/06/2021	33650	13024	440	23,2°	1112	96038	7,56	24,4	824	Não
E143	28/06/2021	36274	17872	27	21,3°	1173	102583	7,49	24,5	2039	Não
E144	30/06/2021	44272	15702	274	0°	1086	93579	7,5	20,4	594	Não
E145	02/07/2021	25332	9494	216	16,7°	1166	99260	7,12	18	1293	Não
E146	05/07/2021	27358	11328	66	20,3°	1065	91700	7,5	20,3	418	Não
E147	07/07/2021	26914	8314	203	19,3°	1116	98375	7,51	24	526	Não
E148	12/07/2021	26954	9474	318	21,1°	1137	97305	7,5	19,9	592	Não
E149	14/07/2021	25548	8880	16	22°	1160	99654	7,67	22,2	578	Não
E150	16/07/2021	25936	10212	173	23°	1193	99086	7,6	23	654	Não