

Synthesis Routes, Environmental Effects and Expectation of Pollution Abatement to Organophosphate Flame Retardants (OPFRs). *International Journal of Molecular Sciences*, 20(12), 2874. doi: 10.3390/ijms20122874

Zhang, L., Song, X., Liu, X., Yang, L., Pan, F., & Lv, J. (2011). Studies on the removal of tetracycline by multi-walled carbon nanotubes. *Chemical Engineering Journal*, 178, 26–33. doi: 10.1016/j.cej.2011.09.127

**VIGIAI - VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA AMBIENTAL INTEGRATIVA
- LABORATÓRIO DE VIROLOGIA APLICADA DA UFSC – BRASIL:
BASES DA FERRAMENTA EPIDEMIOLÓGICA PARA O
MONITORAMENTO VIRAL A PARTIR DO ESGOTO SANITÁRIO**

DOI: 10.56041/9786599841835-4

WACHTER, Julia K.

Laboratório de Virologia Aplicada, Departamento de Microbiologia, Imunologia e
Parasitologia, CCB/UFSC

Laboratório de Biologia Molecular, Microbiologia e Sorologia, Departamento
de Análises Clínicas, CCS/UFSC.

<https://orcid.org/0000-0003-1681-7712>

CADAMURO, Rafael. D.

Laboratório de Virologia Aplicada, Departamento de Microbiologia, Imunologia e
Parasitologia, CCB/UFSC

<https://orcid.org/0000-0002-4096-9022>

SAVI, Beatriz P.

Laboratório de Virologia Aplicada, Departamento de Microbiologia,
Imunologia e Parasitologia, CCB/UFSC

<https://orcid.org/0000-0002-7948-6212>

ELOIS, Mariana A.

Laboratório de Virologia Aplicada, Departamento de Microbiologia, Imunologia e
Parasitologia, CCB/UFSC

<https://orcid.org/0000-0003-2986-6900>

PILATI, Giulia V. T.

Laboratório de Virologia Aplicada, Departamento de Microbiologia, Imunologia e
Parasitologia, CCB/UFSC

<https://orcid.org/0000-0001-9689-0279>

SOUZA, Estêvão B.

Laboratório de Virologia Aplicada, Departamento de Microbiologia, Imunologia e
Parasitologia, CCB/UFSC

<https://orcid.org/0000-0002-9278-4003>

PADILHA, Dayane A.

Laboratório de Virologia Aplicada, Departamento de Microbiologia, Imunologia e
Parasitologia, CCB/UFSC

<https://orcid.org/0000-0002-2082-2883>

RODRIGUES, Vinícius D.

<https://orcid.org/0000-0002-8948-7489>

ROSSI, Eliandra M.

Laboratório de Microbiologia, Departamento de Ciências da Vida e Saúde,
Universidade do Oeste de Santa Catarina- Unoesc, Campus de São Miguel do Oeste-
SC,

<https://orcid.org/0000-0001-6270-9953>

MALUTTA, Simone

Universidade Federal de Santa Catarina, Campus, Joinville-SC.

<https://orcid.org/0000-0002-3369-6601>

SOUZA, Doris S. M.

Laboratório de Virologia Aplicada, Departamento de Microbiologia, Imunologia e
Parasitologia, CCB/UFSC

<https://orcid.org/0000-0001-7854-7661>

BARAZZETTI, Fernando H.

Laboratório de Bioinformática, Departamento de Microbiologia, Imunologia e
Parasitologia, CCB/UFSC

Laboratório de Biologia Molecular, Microbiologia e Sorologia, Departamento
de Análises Clínicas, CCS/UFSC.

<https://orcid.org/0000-0001-6409-3021>

GRISARD, Henrique B. S.

Laboratório de Biologia Molecular, Microbiologia e Sorologia, Departamento
de Análises Clínicas, CCS/UFSC.

<https://orcid.org/0000-0002-7902-9548>

SCHÖRNER, Marcos A.

Laboratório de Biologia Molecular, Microbiologia e Sorologia, Departamento
de Análises Clínicas, CCS/UFSC.

<https://orcid.org/0000-0002-7303-6050>

BAZZO, Maria L.

Laboratório de Biologia Molecular, Microbiologia e Sorologia, Departamento
de Análises Clínicas, CCS/UFSC.

<https://orcid.org/0000-0003-1292-0974>

WAGNER, Glauber

Laboratório de Bioinformática, Departamento de Microbiologia, Imunologia e
Parasitologia, CCB/UFSC

<https://orcid.org/0000-0001-5003-6595>

FONGARO, Gislaine*

Laboratório de Virologia Aplicada, Departamento de Microbiologia, Imunologia e
Parasitologia, CCB/UFSC

<https://orcid.org/0000-0001-5596-3320>

*Autor correspondente: gislainefongaro@gmail.com / gislaine.fongaro@ufsc.br

RESUMO

O surgimento de patógenos ao longo da história evolutiva que utilizam vias ambientais de infecção/contaminação denotou a necessidade das ferramentas de monitoramento. Em meio a pandemia de COVID-19, causada pelo vírus SARS-CoV-2, a detecção do RNA viral no esgoto bruto tornou-se possível e útil como uma ferramenta epidemiológica, já que o vírus é excretado pelas fezes humanas. Métodos focados na detecção do RNA viral (técnicas baseadas em biologia molecular) e de partículas virais infecciosas (por cultura celular) foram utilizados para a detecção do SARS-CoV-2 em amostras de secreção de pacientes infectados. O monitoramento se mostra eficaz para compreender a circulação de vírus que utilizam rota fecal-oral, podendo antecipar futuros surtos em regiões específicas. Além disso, possibilita a observação das mutações e variantes em circulação num dado momento, através do sequenciamento. Este capítulo é um reporte das bases da ferramenta epidemiológica para o monitoramento viral em esgoto sanitário implementada pelo Laboratório de Virologia Aplicada da Universidade Federal de Santa Catarina, denominado “VigEAI” - Vigilância Epidemiológica Ambiental Integrativa.

Palavras-chave: Detecção viral. Monitoramento. Esgotos. Ambiente.

1. INTRODUÇÃO

Ao longo da história evolutiva, diversos seres e partículas desenvolveram-se no nosso planeta, alguns de forma independente, e outros coevoluíram por meio de interações benéficas ou maléficas ao hospedeiro, como patógenos, dependentes de outro organismo para reprodução (Bonneaud & Longdon, 2020).

Os organismos celulares possuem diferentes tipos de organelas, capazes de realizar reações metabólicas envolvidas nos processos de sobrevivência e crescimento (ou multiplicação). Os vírus, por sua vez, organismos acelulares, possuem somente material genético de fita simples ou dupla (RNA/DNA), envolto por uma (ou mais) camada(s) proteica(s) denominada capsídeo e, em alguns casos, um invólucro mais externo chamado envelope, constituído de lipídios (Wagner & Krug, 2020). Quando

possuem envelope, os vírus são chamados de envelopados e têm os receptores celulares ancorados nele. Já quando são desprovidos de envelope são denominados não envelopados, tendo os seus receptores celulares ancorados no capsídeo viral (Figura 1).

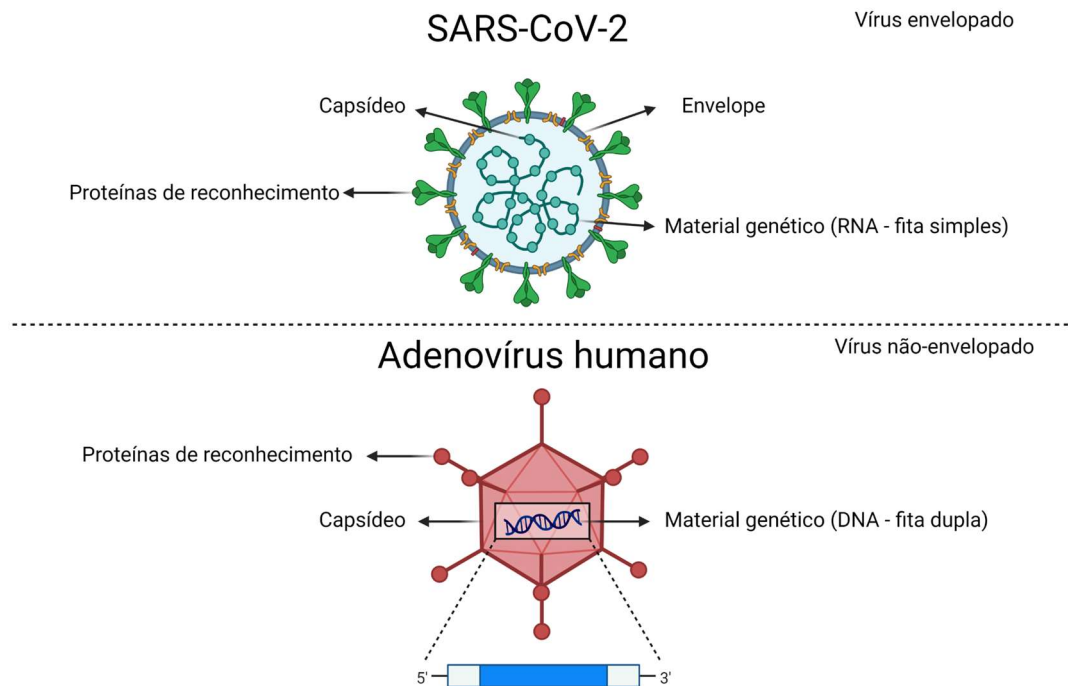


Figura 1 – Estruturas de vírus envelopados e não envelopados (imagem gerada no programa Bio Render®).

Os receptores presentes no envelope ou no capsídeo viral são estruturas constituídas de açúcares. Eles permitem com que os vírus reconheçam e penetrem nas células. Somente quando uma partícula viral adsorve, penetra e infecta uma célula, é que ocorre a propagação viral (multiplicação de partículas virais). Além disso, os vírus não são capazes de se multiplicarem de maneira extracelular, pois dependem de maquinaria celular para isso.

Os vírus não envelopados, anteriormente citados, possuem maior resistência quando expostos às variações de pH, pressão e temperatura, justamente pela maior estabilidade das proteínas, quando comparadas aos lipídios diante dessas variações (Kotwal & Cannon, 2014). Grande parte dos patógenos virais de animais e humanos

veiculados por água e alimentos contaminados (rota ou via fecal-oral), é constituída por vírus não envelopados. Eles são excretados nas fezes ou urina dos infectados e podem permanecer infecciosos no meio ambiente por várias semanas, ou meses, sendo por isso responsáveis por diversos episódios de doenças associadas ao consumo de água ou alimentos contaminados.

Tais vírus de rota fecal-oral podem ser carregados até os mananciais de água e, por consequência, contaminam animais, frutas, verduras e vegetais irrigados com a água contaminada ou cultivadas em ambientes contaminados (Gall et al., 2015; Cadamuro et al., 2021). Alguns destes patógenos são zoonóticos, caracterizados por ultrapassarem a barreira de infecção/replicação entre animais, atingindo humanos por meio de mutações e recombinações. Desta maneira, diversos vírus se perpetuam em nossa sociedade, como o Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV), Influenza Vírus, SARS-CoV-1 (*Severe Acute Respiratory Syndrome*), MERS (*Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus*) e SARS-CoV-2 (*Severe Acute Respiratory Syndrome - 2*). Esta dinâmica denota a importância do tema de saúde única (Kelly et al., 2020; Sikkema & Koopmans, 2021).

Neste sentido, o conceito de Saúde Única foi desenvolvido unindo a relação entre sociedade, animais e ambiente, relacionando propriedades físico-químicas do ambiente, patógenos zoonóticos, resistências bacterianas, assim como vetores de patógenos e hospitalizações/infecções de humanos (Rüegg et al., 2018; Harrison et al., 2019). O conceito visa integrar as rotas que acarretam contaminações ambientais, as quais atingem diretamente outros animais e humanos, perpetuando assim, um ciclo de transmissão de patógenos e contaminação do ambiente.

Os vírus entéricos estão ligados a via fecal-oral e são capazes de se replicar em células presentes no intestino, especificamente nos enterócitos. Tais células são responsáveis pela absorção de água entre outros nutrientes, logo, a replicação viral nessas células acarreta liberação de partículas virais nas fezes em altas quantidades (Todd et al., 2008; Nyenje & Ndip, 2013; Orenstein, 2020). Estima-se que pacientes infectados por protozoários, por exemplo, apresentam em torno de 10^6 - 10^7 (*Giardia* e *Cryptosporidium*) cistos/oocistos por grama de fezes, por outro lado, vírus como Rotavírus e Vírus da Hepatite A são excretados em torno de 10^8 - 10^{12} partículas virais

por grama de fezes (Gerba, 2000) pelos infectados, podendo contaminar o ambiente onde estes dejetos são direcionados. Além dos vírus entéricos, outros patógenos virais podem ser excretados pelas fezes de pacientes e animais contaminados, como observado por pacientes infectados por SARS-CoV-2.

Nessa abordagem, o monitoramento ambiental de vírus em esgotos, sistemas hídricos, em geral e bem como em fezes de humanas e de animais se torna uma importante ferramenta epidemiológica.

2. CORONAVÍRUS

A família *Coronaviridae* é composta por vírus envelopados, com genoma de RNA. O primeiro representante do grupo foi isolado em 1930, identificado como agente etiológico do surto de bronquite em aves. Posteriormente, em 1975, a família *Coronaviridae* foi composta, relacionando a sua morfologia com proteínas de reconhecimento, que apresentavam semelhança a uma coroa ao redor da partícula viral (Tyrrell et al., 1975; Jaiswal & Saxena, 2020).

Os integrantes da família *Coronaviridae* apresentam membrana associada ao envelope, proteínas (capsídeo) que envolvem o genoma de RNA dos vírus e glicoproteínas chamadas *Spike* (“espinho”), responsáveis por realizar o reconhecimento celular (Jaiswal & Saxena, 2020).

Outrossim, nos últimos 19 anos o mundo sofreu três pandemias causadas por representantes dos Coronavírus, sendo a primeira em 2003, ocorrida pelo SARS-CoV-1, a segunda ocorrida em 2012 pelo MERS-CoV e atualmente estamos enfrentando a pandemia causada pelo SARS-CoV-2 (Rossi et al., 2021).

Grande parte dos coronavírus se espalham utilizando a via de infecção respiratória, replicando-se em células epiteliais do pulmão, como, por exemplo, *Human Coronavirus OC43* e “*Porcine respiratory coronavirus*” (“*Coronavírus suíno*”). Ambos se replicam principalmente em células epiteliais do pulmão, causando sintomas respiratórios. Outros representantes, como “*Feline coronavirus*” (“*Coronavírus Felino*”) e SARS-CoV-2 infectam e replicam-se tanto em células epiteliais do pulmão, quanto em células epiteliais do trato gastrointestinal, causando episódios de diarreia,

náuseas e vômito, excretado nas fezes por indivíduos infectados (Forni et al., 2017; Wang et al., 2020b).

O receptor utilizado por alguns coronavírus com replicação em enterócitos são aminopeptidase N, ECA-2 (Enzima Conversora de Angiotensina 2), e DDP4 (Inibidores da Dipeptidil Peptidase 4), sendo todas expressas em enterócitos maduros (Ding & Liang, 2020). O primeiro episódio de surto de SARS-CoV resultou em 76% de pacientes apresentando diarreia dentre as primeiras semanas de infecção (Kwan et al., 2005). No surto de 2012 causado por MERS-CoV também se observou a presença de replicação destes vírus em enterócitos (Zhou et al., 2017). Baseado nisto, com intuito de investigar a possibilidade de SARS-CoV-2 possuir via fecal-oral, uma meta análise foi realizada com um conjunto maior que 4000 pacientes, entre os quais 20% apresentaram sintomas de replicação em enterócitos, encontrado RNA viral em 50% das amostras de fezes (Cheung et al., 2020).

Algumas questões acerca de SARS-CoV-2 ainda necessitam de respostas, como a certeza sobre a recuperação de partículas viáveis nas fezes, sobre a capacidade replicativa dessas quando em esgoto, a respeito da relação da persistência da viabilidade da partícula no esgoto após submetido ao tratamento rotineiro aplicado nas estações de esgoto, da possibilidade de infecção de outros animais e capacidade de os tornarem reservatórios virais (Ding & Liang, 2020).

De toda forma, a identificação e monitoramento da circulação de vírus zoonóticos é uma ferramenta essencial para qualquer administração regional/nacional, buscando diminuição de contaminações/infecções, medidas protetivas e eficazes para a garantia de saúde. O monitoramento tem como função avaliar e mensurar patógenos por períodos determinados, identificando padrões e fornecendo dados para medidas.

O monitoramento de SARS-CoV-2 em esgoto é viável pela sua excreção gastroentérica, e é essencial por contribuir fornecendo dados do aumento de partículas virais em circulação, em regiões específicas antes mesmo de surtos declarados em boletins oficiais, excreção de partículas virais por pacientes assintomáticos não diagnosticados e maleabilidade para execução de estratégias eficazes de *“lockdown”* (“fechamento total”) ou medidas restritivas, como gerar uma menor interferência municipal generalizada nas atividades econômicas.

Ainda, o monitoramento ambiental é uma ferramenta que visa facilitar e corroborar dados epidemiológicos de diagnóstico, uma ferramenta complementar ao diagnóstico realizado em pacientes e não substitutiva (Wurtzer et al., 2020; Randazzo et al., 2020).

Tal monitoramento foi realizado em Barcelona, Itália, França, Holanda, Bélgica, Austrália, Turquia e Chile, além do Brasil, ressaltando a utilização desta ferramenta por outras nações (Wurtzer et al., 2020; Randazzo et al., 2020; Rimoldi et al., 2020; La Rosa et al., 2021; Izquierdo-Lara et al., 2021; Ahmed et al., 2020a; Kocamemi et al., 2020; Ampuero et al., 2020; Fongaro et al., 2021).

3. DIAGNÓSTICO LABORATORIAL

Com o início da rápida disseminação da infecção causada pelo SARS-CoV-2, foram emitidas recomendações por parte de instituições de pesquisa e órgãos de saúde governamentais, como a Organização Mundial da Saúde (OMS), o Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC) e o Ministério da Saúde (MS), visando promover ações acerca do diagnóstico da infecção e conseqüentemente de estratégias para conter e diminuir a transmissão.

Testes diagnósticos rápidos e com uma boa acurácia são de suma importância para o controle de pacientes infectados pelo SARS-CoV-2 e para uma vigilância epidemiológica, afetando diretamente políticas de saúde pública. Com isso, a metodologia adotada para a detecção de SARS-CoV-2 foi a mesma utilizada, em outras ocasiões, para outros vírus respiratórios da família *Coronaviridae*, como MERS-CoV e SARS-CoV (Freitas et al., 2020; OMS, 2020; CDC, 2021). Dentre os exames diagnósticos, estão inclusos os imunológicos (direto e indireto) e o diagnóstico molecular. Dentre as técnicas moleculares disponíveis, a RT-qPCR é considerada o padrão-ouro para a detecção do SARS-CoV-2 (La Marca et al., 2020; Premraj et al., 2020) e será explicada a seguir.

Após a coleta de uma amostra clínica ou ambiental, são realizadas algumas etapas de processamento até a interpretação do resultado (Figura 2. 1a, 1b, 2a, 2b). Previamente à realização da RT-qPCR, é realizada a extração, e purificação, do RNA viral (Figura 2. c). Esta é uma etapa essencial, principalmente em amostras ambientais

(por exemplo, o esgoto) pois se trata de uma mistura complexa com materiais que podem interferir na detecção do material genético do vírus (CDC, 2021). Em resumo, na extração o RNA viral é isolado do vírus e separado de restos celulares humanos e de outras estruturas presentes, de modo a obter um material genético de forma pura para utilizá-lo no decorrer da técnica.

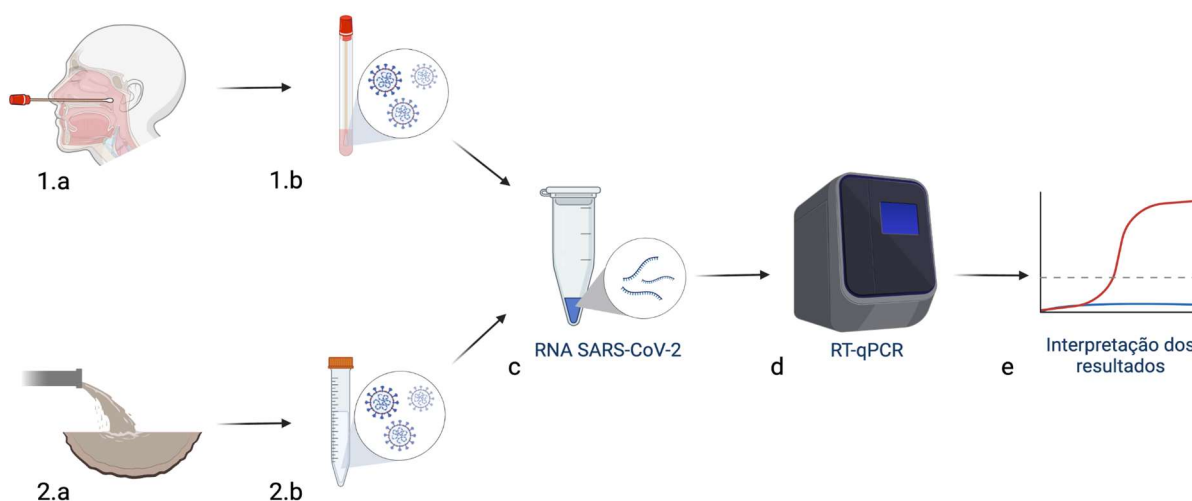


Figura 2 – (1.a) Coleta de amostra de nasofaringe, (1.b) Amostra clínica contendo SARS-CoV-2, (2.a) Esgoto bruto, (2.b) Amostra de esgoto concentrada contendo SARS-CoV-2, (c) Extração do material genético (RNA) do SARS-CoV-2, (d) Reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real por transcriptase reversa (RT-qPCR), (e) Interpretação dos resultados. Imagem gerada no programa Bio Render®.

A primeira etapa da RT-qPCR consiste em formar uma molécula de DNA complementar (cDNA) ao RNA viral utilizando a transcriptase reversa, uma enzima capaz de construir uma fita de DNA a partir de um RNA molde. O cDNA formado será utilizado para amplificação (formação de novas fitas de DNA) de sequências específicas de SARS-CoV-2. A delimitação da região a ser amplificada é demarcada por sequências pequenas de DNA, também conhecidas por *primers* ou iniciadores.

Os iniciadores são complementares e específicos para determinados genes virais. Cinco regiões do genoma de SARS-CoV-2 têm sido mais frequentemente utilizadas

como alvo para detecção por RT-qPCR: gene RdRP (RNA polimerase dependente de RNA), gene S (proteína *spike*), genes que codificam proteínas estruturais E (proteína do envelope) e N (proteína do nucleocapsídeo) e o gene ORF1ab (Corman et al., 2020). De modo a melhorar a sensibilidade e especificidade diagnóstica, os kits comerciais utilizam a detecção de mais de um alvo viral na mesma reação de RT-qPCR. A utilização de múltiplos alvos permite amplificar diferentes regiões do RNA viral em uma mesma amostra, resultando em uma melhor eficiência diagnóstica. Além dos *primers*, estão presentes sondas de hidrólise, as quais são marcadas por um fluoróforo que irá indicar quando a sequência alvo for amplificada, e a enzima DNA polimerase que formará novas fitas de DNA.

O processo de amplificação consiste em ciclos de variação de temperaturas, geradas pelo termociclador (Figura 2. d). A cada ciclo de variação de temperatura, se ali presente a sequência alvo, essa irá se duplicar, e a cada duplicação, a sonda irá emitir fluorescência. Dessa forma, a intensidade do sinal luminoso acusa a presença, e a quantidade, do material genético viral ali presente (Afzal, 2020; Premraj et al., 2020; Weissleder et al., 2020; Mardian et al., 2021).

O sinal luminoso emitido pelos fluoróforos é captado pelo termociclador, o qual plota isso em um gráfico de amplificação, permitindo assim a leitura e interpretação dos resultados (Figura 2. e). O resultado é considerado somente detectado quando a fluorescência captada ultrapassa o C_q (do inglês *Quantification Cycle*, previamente denominada como C_t , *Threshold Cycle*) sendo o limiar de detecção estabelecido. Ou seja, o valor do C_q representa o ciclo onde a fluorescência ultrapassou o limiar de detecção (Premraj et al., 2020). Este valor de C_q tem uma relação com a quantidade de vírus presente no material analisado, sendo que, quanto menor o valor do C_q , mais cedo a fluorescência foi captada, demonstrando que a amostra possui uma alta quantidade de partículas virais. Enquanto um valor alto de C_q indica uma baixa quantidade de partículas virais. Desta forma, a RT-qPCR também pode ser utilizada para quantificar o RNA de SARS-CoV-2 presente em uma determinada amostra (CDC, 2021).

Para validar a reação, é importante, que sejam incluídos alguns controles, sendo eles: (i) controle negativo (sem a presença do material genético viral), para avaliar se

não houve contaminação da reação; (ii) controle positivo (com o material genético viral presente), e (iii) controle interno, ambos verificando se não houve inibição da reação.

O uso da RT-qPCR no diagnóstico da infecção pelo SARS-CoV-2 tem sido fundamental no combate à pandemia, porém, o seu uso não se restringe à clínica. Em trabalhos que buscam SARS-CoV-2 em amostras ambientais, a RT-qPCR tem sido a técnica utilizada para a identificação, quantificação e monitoramento do vírus em esgoto (Larsen & Wigginton, 2020; Chavarria-Miró et al., 2021; Fongaro et al., 2021; Prado et al., 2021; CDC, 2021). Durante o projeto se realizou a extração e amplificação do RNA viral nas amostras de esgoto, acusando a presença do vírus em amostras contaminadas.

Os dados genômicos obtidos a partir de amostras ambientais permitiram o estudo e comparação de possíveis mutações via sequenciamento genético, comparando-se o genoma de possíveis variantes com o genoma do SARS-CoV-2 primeiramente encontrado em Wuhan em dezembro de 2019.

4. SEQUENCIAMENTO GENÉTICO DE SARS-COV-2 NA CLÍNICA E EM ÁGUAS RESIDUAIS

Após os primeiros relatos oficiais, SARS-CoV-2 foi sequenciado ainda em janeiro de 2020, quando os pesquisadores identificaram a semelhança entre o SARS-CoV-2 com os Betacoronavírus SARS-CoV (isolado em 2003) e o SARS BatCov RaTG13 (isolado de morcego) (Wang et al., 2020a). O seu genoma tem um tamanho de 29,9 Kb e estudos filogenéticos, com base no genoma do SARS-CoV-2, mostram que o vírus compartilha cerca de 79,5% do genoma com SARS-CoV e 50% com o MERS-CoV (Wilde et al., 2018; Lu et al., 2020).

SARS-CoV-2 é caracterizado por quatro proteínas estruturais: Spike (S), responsável pela ligação do vírus à célula do hospedeiro permitindo a fusão da membrana viral; Nucleocapsídeo (N), está envolvida principalmente na proteção do material genético; Membrana (M), capaz de inibir a resposta inflamatória das células hospedeiras e o Envelope (E), envolvido principalmente na patogenicidade viral,

permanência e reprodução viral do vírus (representado na Figura 4) (Wang et al., 2020a; Satarker & Nampoothiri, 2020).

O sequenciamento do SARS-CoV-2 permitiu elaborar hipóteses acerca da origem deste vírus tomando como base a verossimilhança com outros vírus da mesma família. Contudo, ao entendermos a proporção e importância da pandemia que estávamos vivendo no início de 2020, começou a utilizar-se o sequenciamento viral como ferramenta de vigilância genômica capaz de avaliar e acompanhar as modificações genéticas do vírus ao longo do tempo. O genoma viral (Figura 3) é composto por aproximadamente 30.000 nucleotídeos responsáveis pela síntese proteica. A região das ORFs (“*Open Reading Frame*” – “Região Codificante”), não mencionadas anteriormente, são genes acessórios presentes em maior proporção no genoma, quando comparados aos genes estruturais, responsáveis também pelo ciclo viral e pelo mecanismo de entrada do vírus à célula hospedeira (Zehra et al., 2020; Wu et al., 2020b).

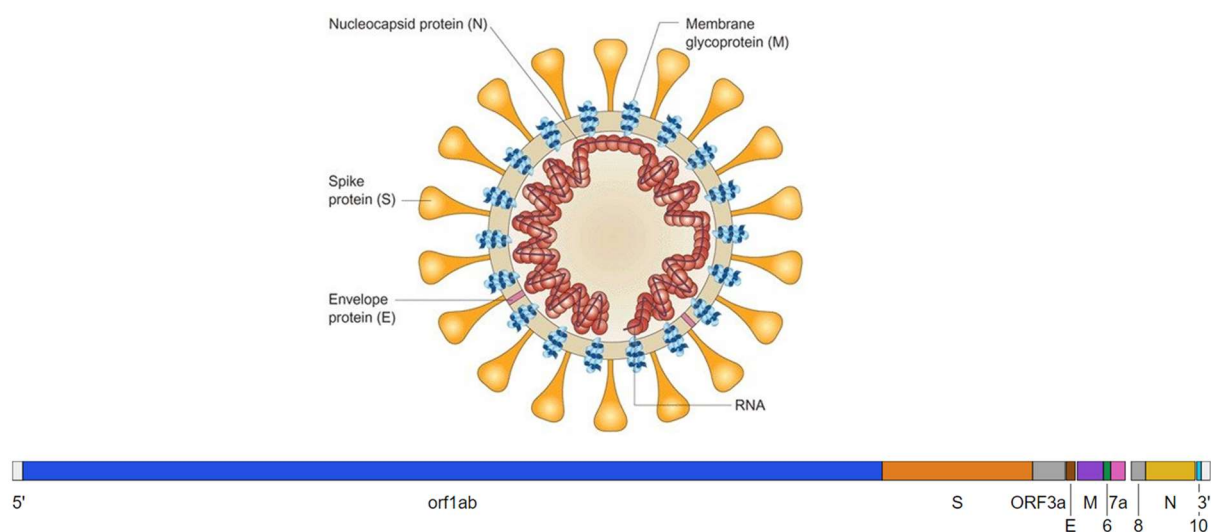


Figura 3 – Representação esquemática da estrutura genômica do SARS-CoV-2 contendo tanto a região genômica responsável pela síntese de proteínas estruturais: S (“*Spike*”), E (Envelope), M (Membrana), N (Nucleocapsídeo), como a região do gene responsável pela síntese de proteínas acessórias, conhecidas como ORFs. Imagem gerada no programa Bio Render®.

Neste contexto, é importante mencionar que os vírus de RNA, tais como o SARS-CoV-2, tem a mutação genética como característica intrínseca de adaptabilidade

ao ambiente (10^4 - 10^6) quando comparados com vírus de DNA (10^6 - 10^8), em função de sua enzima que sintetiza RNA apresentar maior taxa de erros do que a enzima que sintetiza DNA. O sequenciamento é a ferramenta ideal na descoberta de mutações e deleções genômicas, o que nos permite a identificação e classificação das conhecidas variantes virais (Peck & Luring, 2018; Luring & Hodcroft, 2021).

A vigilância genômica do SARS-CoV-2 permitiu à OMS classificar ao longo do tempo as variantes de preocupação, também conhecidas como VOC (do inglês “*Variant Of Concern*”) e as variantes de interesse, conhecidas como VOI (do inglês “*Variant Of Interest*”). O sequenciamento genômico tem sido usado desde o início da pandemia como ferramenta para aprofundar os conhecimentos sobre o SARS-CoV-2, dentre eles identificar as VOI e VOC presentes no ambiente. Ainda no final de janeiro de 2020, o sequenciamento permitiu o conhecimento de 42 genomas, tornando possível uma análise filogenética. Essa análise revelou que as amostras estavam relacionadas com cerca de sete mutações com um ancestral comum, mostrando que a primeira infecção ocorrida em seres humanos com a cepa relatada de Wuhan-China (Yi et al., 2020; Chen et al., 2020). Os sequenciamentos não pararam desde então, e em março de 2020, pesquisadores tornaram disponíveis publicamente 410 genomas de SARS-CoV-2.

A utilização do sequenciamento do genoma completo em surtos virais é indispensável para caracterizar o agente infeccioso como também para determinar a sua taxa evolutiva. Ao sequenciar o genoma é possível realizar a identificação de assinaturas de adaptação do hospedeiro, identificar e monitorar alvos de diagnósticos e caracterização de possíveis respostas a vacinas e tratamentos. Os dados gerados pelo sequenciamento, podem ser utilizados para nortear as medidas de controle, mas para isso, devem ser gerados em tempo hábil suficiente para a tomada de decisões (Quick et al., 2016). Além disso, os genomas sequenciados são armazenados em banco de dados, assim pesquisadores do mundo todo podem ter acesso a essas sequências e utilizá-las para estudo.

Uma das tecnologias utilizadas para o sequenciamento do SARS-CoV-2 foram os sequenciamentos abrangidos no “*Next Generation Sequencing*” (NGS – Sequenciamento de Próxima Geração). As plataformas NGSs são caracterizadas por

sua eficiência, precisão e acessibilidade, permitindo o sequenciamento de genes completos de forma rápida e em alta escala, não somente para o sequenciamento de SARS-CoV-2 (objeto principal do atual capítulo), mas também para o sequenciamento necessário no estudo de outras patologias tais como câncer (Bravo-Egana et al., 2021). Apesar da qualidade tecnológica envolvida no uso de NGS, Bravo-Egana et al. (2021) também abordam a necessidade de profissional técnico capacitado para executar os protocolos trabalhosos e exigentes envolvidos no uso destas tecnologias, além da necessidade de investimento inicial de alto custo.

Assim como em diferentes estudos, o RNA do SARS-CoV-2 pode ser extraído de diversas fontes, por exemplo, podemos citar o meio de transporte no qual o “*swab*” de nasofaringe usado no diagnóstico é acondicionado, como também amostras de esgoto utilizadas como um indicador epidemiológico. Cada caso desses possui particularidades que demandam protocolos diferentes para a extração do RNA viral. O objetivo é obter um RNA de alta qualidade, livre de contaminantes químicos e biológicos, sendo esta etapa fundamental para o sucesso do sequenciamento (Metzker, 2010; Ambardar et al., 2016).

Realizar a RT-qPCR de águas residuais torna-se viável para estimar a abundância do vírus em diversas regiões municipais em todo o mundo (PECCIA et al., 2020). Além da RT-qPCR, muitos trabalhos mostraram que o sequenciamento por “*shotgun*” (“sequência alvo”) de efluentes fornece informações sobre muitos vírus de forma simultânea (Bibby & Peccia, 2013) possibilitando a resolução do genoma e também realização de análises filogenéticas (Ng et al., 2012; Nemudryi et al., 2020).

Com o vírus SARS-CoV-2, essa abordagem não difere, Nemudryi et al. (2020) tiveram êxito na montagem de genoma de SARS-CoV-2 obtido do esgoto, conseguindo realizar a análise filogenética da linhagem predominante. Outro estudo, Crists-Christoph et al. (2021), mostrou que o RNA extraído e sequenciado de águas residuais mostrou genótipos diferentes de SARS-CoV-2 em diversas abundâncias conhecidas presentes nas comunidades, e também variantes genotípicas ainda não observadas nos sequenciamentos clínicos locais. Fongaro et al. (2021) também utilizaram o sequenciamento e identificaram a presença do SARS-CoV-2 no esgoto

coletado em Florianópolis – SC, em meados de novembro de 2019, antes mesmo da primeira confirmação clínica diagnosticada na região.

Análise das leituras geradas é uma das últimas etapas do sequenciamento. Para tal, ferramentas de bioinformática são utilizadas, as quais são escolhidas conforme a necessidade e pergunta biológica a ser respondida. Srinivasan et al. (2020) utilizaram a bioinformática para avaliar a identificação genômica e a possível interação proteica entre os vírus SARS-COV-2 ou do vírus com os seus hospedeiros, visando identificar a evolução e modelagem estrutural viral. Diante dos resultados, os autores observaram semelhanças estruturais e genômicas entre SARS-CoV e SARS-CoV-2, sendo possível também diferenciar interações responsáveis pela transmissão e pela replicação viral, conhecimento este que poderá auxiliar na descoberta de potenciais alvos terapêuticos.

Ademais, o uso da ferramenta de sequenciamento em amostras clínicas e águas residuais, não só nos permite avaliar a presença de VOC e VOI de maneira precoce, como também nos possibilita uma representatividade populacional maior. Contudo, quando comparada a testes diagnósticos individuais, ela torna a vigilância genômica mais fácil, de menor custo e acessível.

Por fim, com foco na facilitação da visualização dos dados oriundos do sequenciamento, temos os mapas como antagonistas viáveis, além de exporem os pontos focais da doença, o que tornam os dados mais palatáveis até mesmo a leigos no assunto (Padilha et al., 2022).

5. GEOPROCESSAMENTO EPIDEMIOLÓGICO E BANCO DE DADOS

Mapas são bons aliados para vislumbro do panorama epidemiológico da região em que é realizada vigilância epidemiológica, como já proposto por John Snow em 1855 (Marques, 2020). Esse recurso tecnológico atua por meio de uma base de dados gráficos, auxiliando na distribuição espacial do problema (Ibiapina & Bernardes, 2019). Eles tornam possível o planejamento de enfrentamento ao avanço de doenças infectocontagiosas. Estes dados georreferenciados são conhecidos como Sistema de Informação Geográfica (Lopes et al., 2018).

Ademais, os dados de campo a serem inseridos no gráfico podem ser suplementados pelos existentes em bancos de dados nacionais ou mundiais de confiança, pois vinculados aos sistemas dos governos são atualizados constantemente. Os quais frequentemente são públicos, como, por exemplo, IBGE (IGBE, 2022), SNIS (SNIS, 2021), ANA (ANA, 2022) e LACEN (LACEN, 2022).

6. A VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA AMBIENTAL INTEGRATIVA (VIGEAI) EM SANTA CATARINA COM BASE EM ESGOTO SANITÁRIO

Nesse capítulo, não será abordado resultado dessas vigilâncias e sim, reporta a implementação do projeto que adentra municípios de Santa Catarina, tendo em vista uma ampla rede de atuação pública com: Serviço Intermunicipal de Água e Esgoto (SIMAE), Companhia Catarinense de Águas e Saneamento (CASAN), Consórcio Intermunicipal de Saneamento Ambiental - CISAM Meio-Oeste, Agência Reguladora Intermunicipal de Saneamento (ARIS), Diretoria de Vigilância Epidemiológica (DVE – Itajaí), Serviço Municipal de Água, Saneamento (SEMASA –Itajaí), Universidade do Oeste de Santa Catarina (UNOESC), Universidade do Contestado (UnC), Vigilância Sanitária Municipal – Município de Capinzal (VISA), Universidade Federal de Santa Catarina – Campus Joinville e Curitiba. Para as análises e organização geral do projeto amplo, a equipe coordenada pela Dra. Gislaine Fongaro, envolveu graduandos, mestrandos, doutorandos e demais pesquisadores colaboradores, incluindo os envolvidos na escrita desse documento/autores, sendo: Dayane Azevedo Padilha (Mestre e Doutoranda), Henrique Borges da Silva Grisard (Graduação em Ciências Biológicas), Fernando Hartmann Barazzetti (Biólogo e mestrando), Julia Kinetz Wachter (Graduação em Farmácia), Dr., Marcus Vinícius Duarte Rodrigues (Biólogo), Rafael Dorighello Cadamuro (Biólogo e mestrando); bem como os pesquisadores colaboradores: Dra. Doris Sobral Marques Souza, Dr. Marcos André Schörner, Dra. Aline Viancelli, Dra. Eliandra Mirlei Rossi, Dr. Glauber Wagner, Dra. Maria Luiza Bazzo, Dra. Simone Malutta e Dr. William Michelin, Carlos Langner, Francine Caldart, Marta Cristina Penno e Willian Goetten, Gabriel Ramos Silva, Gisele Rocha Braga e todos que de alguma forma contribuíram.

Os resultados gerados podem ser acessados na página do Laboratório de Virologia Aplicada, do Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia do Centro de Ciências Biológicas da UFSC: <https://lvapli.paginas.ufsc.br/vigeai/>

7. PERSPECTIVAS

Como perspectivas deste projeto espera-se atender demandas de municípios e estados brasileiros na vigilância de SARS-CoV-2 e outros vírus excretados em fezes humanas, visando viabilidade epidemiológica dos dados para fins de monitoramento e alerta de circulação viral. Especificamente em Santa Catarina, recomenda-se o monitoramento de cidades estratégicas, que possuem rota de transporte marítimos, aeroportos, indústrias e turismo.

DECLARAÇÕES

Financiamento: Ação de Extensão Sigpex: 201917940, UFSC, coordenação: Dra. Gislaïne Fongaro (MIP/CCB/UFSC).

Conflito de interesse: Os autores declaram-se sem conflito de interesse.

Agradecimentos

Agradecemos as colaborações municipais, públicas, comunitárias e de concessionárias, bem como de voluntários por meio da coleta, transporte de esgoto sanitário para a implementação do projeto.

Serviço Intermunicipal de Água e Esgoto (SIMAE), Companhia Catarinense de Águas e Saneamento (CASAN), Consórcio Intermunicipal de Saneamento Ambiental - CISAM Meio Oeste, Agência Reguladora Intermunicipal de Saneamento (ARIS), Diretoria de Vigilância Epidemiológica (DVE – Itajaí), Serviço Municipal de Água, Saneamento (SEMASA –Itajai), Universidade do Oeste de Santa Catarina (UNOESC), Universidade do Contestado (UnC), Vigilância Sanitária Municipal – Município de Capinzal (VISA), Universidade Federal de Santa Catarina – Campus Joinville e Curitiba. Para as análises e organização geral do projeto amplo, a equipe coordenada pela Dra. Gislaïne Fongaro, envolveu graduandos, mestrandos,

doutorandos e demais pesquisadores colaboradores, incluindo os envolvidos na escrita desse documento/autores, sendo: Dayane Azevedo Padilha (Mestre e Doutoranda), Henrique Borges da Silva Grisard (Graduação em Ciências Biológicas), Fernando Hartmann Barazzetti (Biólogo e mestrando), Julia Kinetz Wachter (Graduação em Farmácia), Dr., Marcus Vinícius Duarte Rodrigues (Biólogo), Rafael Dorighello Cadamuro (Biólogo e mestrando); bem como os pesquisadores colaboradores: Dra. Doris Sobral Marques Souza, Dr. Marcos André Schörner, Dra. Aline Viancelli, Dra. Eliandra Mirlei Rossi, Dr. Glauber Wagner, Dra. Maria Luiza Bazzo, Dra. Simone Malutta e Dr. William Michelin, Carlos Langner, Francine Caldart, Marta Cristina Penno e Willian Goetten, Gabriel Ramos Silva, Gisele Rocha Braga e todos que de alguma forma contribuíram.

REFERÊNCIAS

Afzal, A (2020). Molecular diagnostic technologies for COVID-19: Limitations and challenges. *Journal of Advanced Research*, 26, 149–159. doi:10.1016/j.jare.2020.08.002

Ahmed, W., Angel, N., Edson, J., Bibby, K., Bivins, A., O'Brien, J. W., ... & Mueller, J. F. (2020a). 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*, 728, 138764. doi: 10.1016/j.scitotenv.2020.138764

Ahmed, W., Bertsch, P. M., Bivins, A., Bibby, K., Gathercole, A., Haramoto, E., ... & Kitajima, M. (2020b). 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*, 739, 139960. doi: 10.1016/j.scitotenv.2020.139960

Ambardar, S., Gupta, R., Trakroo, D., Lal, R., & Vakhlu, J. (2016). High Throughput Sequencing: An Overview of Sequencing Chemistry. *Indian Journal of Microbiology*, 56 (4), 394–404.

Ampuero, M., Valenzuela, S., Valiente-Echeverría, F., Soto-Rifo, R., Barriga, G. P., Chnaiderman, J., ... & Gaggero, A. (2020). SARS-CoV-2 Detection in Sewage in Santiago, Chile - Preliminary results. *medRxiv*, 2020.

ANA. Atlas Esgotos - Despoluição das Bacias Hidrográficas. Disponível em: <<http://atlasesgotos.ana.gov.br/>>. Acesso em: 17 jan. 2022.

Bibby, K. & Peccia, J. (2013) Identification of viral pathogen diversity in sewage sludge by metagenome analysis. *Environmental Science and Technology*, 47 (4), 1945–1951.

Bonneaud, C. & Longdon, B. (2020). Emerging pathogen evolution. *EMBO reports*, 21(9), 1–5.

Bravo-Egana, V., Sanders, H., & Chitnis, N. (2021). New challenges, new opportunities: Next generation sequencing and its place in the advancement of HLA typing. *Human Immunology*, 82 (7), 478–487. doi: 10.1016/j.humimm.2021.01.010

Cadamuro, R. D., Viancelli, A., Michelon, W., Fonseca, T. G., Mass, A. P., Krohn, D. M. A., ... & Fongaro, G. (2021). Enteric viruses in lentic and lotic freshwater habitats from Brazil's Midwest and South regions in the Guarani Aquifer area. *Environmental Science and Pollution Research*, 28(24), 31653–31658.

CDC, Centers for Disease Control and Prevention. Wastewater Surveillance Testing Methods Centers for Disease Control and Prevention (2021). Disponível online em: <https://www.cdc.gov/healthywater/surveillance/wastewater-surveillance/testing-methods.html> (Acesso em 23/01/2022).

Chavarria-Miró, G., Anfruns-Estrada, E., Martínez-Velázquez, A., Vázquez-Portero, M., Guix, S., Paraira, M., ... & Bosch, A. (2021). Time Evolution of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) in Wastewater during the First Pandemic Wave of COVID-19 in the Metropolitan Area of Barcelona, Spain. *Applied and Environmental Microbiology*, 87 (7), 1–9.

Chen, Y., Liu, Q., Guo, D. (2020). Emerging coronaviruses: Genome structure, replication, and pathogenesis. *Journal of Medical Virology*, 92(4) 418–423, 2020.

Cheung, K. S., Hung, I. F., Chan, P. P., Lung, K. C., Tso, E., Liu, R., ... & Leung, W. K. (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(1), 81–95, 2020.

CONAMA. Resolução nº 357 de 17 DE MARÇO. 2005, p. 58–63.

CONAMA. Resolução no 375, de 29 de agosto de 2006. 2006, p. 1–32.

CONAMA. Resolução no 430, de 13 de maio de 2011. 2011, p. 89.

Corman, V. M., Landt, O., Kaiser, M., Molenkamp, R., Meijer, A., Chu, D. K., ... & Drosten, C. (2020). Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR. *Eurosurveillance*, 25(3). doi: 10.2807/1560-7917.ES.2020.25.3.2000045

Crits-Christoph, A., Kantor, R. S., Olm, M. R., Whitney, O. N., Al-Shayeb, B., Lou, Y. C., ... & Nelson, K. L. (2021). Genome sequencing of sewage detects regionally prevalent SARS-CoV-2 variants. *mBio*, 12(1), 1–9.

Ding, S. & Liang, T. J. (2020). Is SARS-CoV-2 Also an Enteric Pathogen With Potential Fecal–Oral Transmission? A COVID-19 Virological and Clinical Review. *Gastroenterology*, 159(1), 53–61. doi:10.1053/j.gastro.2020.04.052

Fongaro, G., Stoco, P. H., Souza, D. S. M., Grisard, E. C., Magri, M. E., Rogovski, P., ... & Rodríguez-Lázaro, D. (2021). The presence of SARS-CoV-2 RNA in human sewage in Santa Catarina, Brazil, November 2019. *Science of the Total Environment*, 778, 1–4.

Forni, D., Cagliani, R., Clerici, M., & Sironi, M. (2017). Molecular Evolution of Human Coronavirus Genomes. *Trends in Microbiology*, 25(1), 35–48. doi: 10.1016/j.tim.2016.09.001

Freitas, A. R. R., Napimoga, M., & Donalisio, M. R. (2020). Análise da gravidade da pandemia de Covid-19. *Epidemiologia e serviços de saúde: revista do Sistema Unico de Saúde do Brasil*, 29 (2) e2020119.

Gall, A. M., Mariñas, B. J., Lu, Y., & Shisler, J. L. (2015). Waterborne Viruses: A Barrier to Safe Drinking Water. *PLoS Pathogens*, 11(6), 1–7. doi: 10.1371/journal.ppat.1004867

Gerba, C. P. (2000). Assessment of enteric pathogen shedding by bathers during recreational activity and its impact on water quality. *Quantitative Microbiology*, 2(1), 55–68. doi: 10.1023/A:1010000230103

Harrison, S., Kivuti-Bitok, L., Macmillan, A., & Priest, P. (2019). EcoHealth and One Health: A theory-focused review in response to calls for convergence. *Environment International*, 132(2), 105058. doi: 10.1016/j.envint.2019.105058

IBGE – Instituto brasileiro de geografia e estatística. Portal do IBGE. <<https://www.ibge.gov.br/>>

Ibiapina, É. & Bernardes, A. (2019). O mapa da saúde e o regime de visibilidade contemporâneo. *Saúde e Sociedade*, 28 (1), 322–336. doi: 10.1590/S0104-12902019170982

Izquierdo-Lara, R., Elsinga, G., Heijnen, L., Munnink, B. B. O., Schapendonk, C. M., Nieuwenhuijse, D., ... & De Graaf, M. (2021). Monitoring SARS-CoV-2 circulation and diversity through community wastewater sequencing, the netherlands and belgium. *Emerging Infectious Diseases*, 27(5), 1405–1415. doi: 10.3201/eid2705.204410

Jaiswal, N. K., & Saxena, S. K. (2020). Classical coronaviruses. In *Coronavirus Disease 2019 (COVID-19)*(pp. 141-150). Springer, Singapore. doi: 10.1007/978-981-15-4814-7_12

Katayama, H., Shimasaki, A., Ohgaki, S. (2002). Development of a virus concentration method and its application to detection of enterovirus and Norwalk virus from coastal

seawater. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(3), 1033–1039. doi: 10.1128/AEM.68.3.1033-1039.2002

Kelly, T. R., Machalaba, C., Karesh, W. B., Crook, P. Z., Gilardi, K., Nziza, J., ... & Mazet, J. A. (2020). Implementing One Health approaches to confront emerging and re-emerging zoonotic disease threats: lessons from PREDICT. *One Health Outlook*, 2(1), 1–7. doi: 10.1186/s42522-019-0007-9

Kocamemi, B. A., Kurt, H., Sait, A., Sarac, F., Saatci, A. M., & Pakdemirli, B. (2020). SARS-CoV-2 detection in Istanbul wastewater treatment plant sludges. medRxiv, n. 7, 2020. doi: 10.1101/2020.05.12.20099358

Kotwal, G., & Cannon, J. L. (2014). Environmental persistence and transfer of enteric viruses. *Current opinion in virology*, 4, 37-43. doi: 10.1016/j.coviro.2013.12.003

Kwan, A. C. P., Chau, T. N., Tong, W. L., Tsang, O. T. Y., Tso, E. Y. K., Chiu, M. C., ... & Lai, T. S. T. (2005). Severe acute respiratory syndrome-related diarrhea. *Journal of gastroenterology and hepatology*, 20(4), 606-610. doi: 10.1111/j.1440-1746.2005.03775.x

LACEN - Laboratório Central de Saúde Pública. <<http://lacen.saude.sc.gov.br/>>

La Marca, A., Capuzzo, M., Paglia, T., Roli, L., Trenti, T., & Nelson, S. M. (2020). Testing for SARS-CoV-2 (COVID-19): a systematic review and clinical guide to molecular and serological in-vitro diagnostic assays. *Reproductive BioMedicine Online*, 41(3) 483–499. doi: 10.1016/j.rbmo.2020.06.001

La Rosa, G., Mancini, P., Ferraro, G. B., Veneri, C., Iaconelli, M., Bonadonna, L., ... & Suffredini, E. (2021). SARS-CoV-2 has been circulating in northern Italy since December 2019: Evidence from environmental monitoring. *Science of the Total Environment*, 750, 141711. doi: 10.1016/j.scitotenv.2020.141711

Larsen, D. A. & Wigginton, K. R. (2020). Tracking COVID-19 with wastewater. *Nature Biotechnology*, 38(10), 1151–1153. doi: 10.1038/s41587-020-0690-1

Lauring, A. S. & Hodcroft, E. B. (2021). Genetic Variants of SARS-CoV-2 - What Do They Mean? *JAMA - Journal of the American Medical Association*, 325(6), 529–531. doi:10.1001/jama.2020.27124

Lewis, D. & Metcalf, T. (1998). Polyethylene Glycol Precipitation for Recovery of Pathogenic Viruses, Including Hepatitis A Virus and Human Rotavirus, from Oyster, Water, and Sediment Samples. *Applied and Environmental Microbiology*, 54(8), 1983–1988. doi: 10.1128/aem.54.8.1983-1988.1988.

Lopes, I. D. C. P., Campos, J. A., de Souza Fraga, M., Aires, U. R. V., & da Silva, D. D. (2018). Caracterização morfométricas da bacia hidrográfica do rio caratinga, sub bacia do rio doce, mg. Juíz de Fora: III simpósio de Recursos Hídricos do Rio Paraíba do Sul, 2018.

Lu, R., Zhao, X., Li, J., Niu, P., Yang, B., Wu, H., ... & Tan, W. (2020). Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding. *The Lancet*, 395(10224), 565–574. doi: 10.1016/S0140-6736(20)30251-8

Lu, Y., Wang, R., Zhang, Y., Su, H., Wang, P., Jenkins, A., ... & Squire, G. (2015). Ecosystem health towards sustainability. *Ecosystem Health and Sustainability*, 1(1), 1–15. doi: 10.1890/EHS14-0013.1

Mardian, Y., Kosasih, H., Karyana, M., Neal, A., & Lau, C. Y. (2021). Review of Current COVID-19 Diagnostics and Opportunities for Further Development. *Frontiers in Medicine*, 8. doi: 10.3389/fmed.2021.615099

Marques, C. (2020). Colocando o coronavírus no mapa: a cartografia a serviço das ciências da saúde. *Café História*. <https://www.cafehistoria.com.br/cartografica-do-covid19/>

Metzker, M. L. (2010). Sequencing technologies the next generation. *Nature Reviews Genetics*, 11(1), 31–46. doi: 10.1038/nrg2626

Nemudryi, A., Nemudraia, A., Wiegand, T., Surya, K., Buyukyoruk, M., Cicha, C., ... & Wiedenheft, B. (2020). Temporal Detection and Phylogenetic Assessment of SARS-CoV-2 in Municipal Wastewater. *Cell Reports Medicine*, 1(6), 100098. doi: 10.1016/j.xcrm.2020.100098

Ng, T. F. F., Marine, R., Wang, C., Simmonds, P., Kapusinszky, B., Bodhidatta, L., ... & Delwart, E. (2012). High Variety of Known and New RNA and DNA Viruses of Diverse Origins in Untreated Sewage. *Journal of Virology*, 86(22), 12161–12175. doi: 10.1128/JVI.00869-12

Nyenje, E. N. & Ndip, R. N. (2013). The challenges of foodborne pathogens and antimicrobial chemotherapy: A global perspective. *African Journal of Microbiology Research*, 7(14), 1158–1172. doi:10.5897/AJMRx12.014

OMS - Organização Mundial da Saúde. Diagnostic testing for SARS-CoV-2, 2020. <https://www.who.int/publications/i/item/diagnostic-testing-for-sars-cov-2>.

Orenstein, R. (2020). Gastroenteritis, Viral. *Encyclopedia of Gastroenterology*, 652. doi: 10.1016/B978-0-12-801238-3.65973-1

Peccia, J., Zulli, A., Brackney, D. E., Grubaugh, N. D., Kaplan, E. H., Casanovas-Massana, A., ... & Omer, S. B. (2020). Measurement of SARS-CoV-2 RNA in wastewater tracks community infection dynamics. *Nature Biotechnology*, 38(10), 1164-1167. doi: 10.1038/s41587-020-0684-z.

Peck, K. M. & Luring, A. S. Complexities of Viral Mutation Rates. *Journal of Virology*, 92(14), e01031-17. doi: <https://doi.org/10.1128/JVI.01031-17>

Padilha, D. A., Benetti Filho, V., Moreira, R. S., Soratto, T. A. T., Maia, G. A., Christoff, A. P., ... & Wagner, G. (2022). Emergence of Two Distinct SARS-CoV-2 Gamma Variants and the Rapid Spread of P.1-like-II SARS-CoV-2 during the Second Wave of COVID-19 in Santa Catarina, Southern Brazil. *Viruses*, 14(4), 695. doi: 10.3390/v14040695

Prado, T., Fumian, T. M., Mannarino, C. F., Resende, P. C., Motta, F. C., Eppinghaus, A. L. F., ... & Miagostovich, M. P. (2021). Wastewater-based epidemiology as a useful tool to track SARS-CoV-2 and support public health policies at municipal level in Brazil. *Water Research*, 191, 116810. doi: 10.1016/j.watres.2021.116810

Premraj, A., Aleyas, A. G., Nautiyal, B., & Rasool, T. J. (2020). Nucleic acid and immunological diagnostics for SARS-CoV-2: Processes, platforms and pitfalls. *Diagnostics*, 10(11), 866. doi: 10.3390/diagnostics10110866

Quick, J., Loman, N. J., Duraffour, S., Simpson, J. T., Severi, E., Cowley, L., ... & Carroll, M. W. (2016). Real-time, portable genome sequencing for Ebola surveillance. *Nature*, 530(7589), 228–232. doi: 10.1038/nature16996

Randazzo, W., Truchado, P., Cuevas-Ferrando, E., Simón, P., Allende, A., & Sánchez, G. (2020). SARS-CoV-2 RNA in wastewater anticipated COVID-19 occurrence in a low prevalence area. *Water research*, 181, 115942. doi: 10.1016/j.watres.2020.115942

Rimoldi, S. G., Stefani, F., Gigantiello, A., Polesello, S., Comandatore, F., Mileto, D., ... & Salerno, F. (2020). Presence and infectivity of SARS-CoV-2 virus in wastewaters and rivers. *Science of the Total Environment*, 744, 140911. doi: 10.1016/j.scitotenv.2020.140911

Rossi, G., Galosi, L., Gavazza, A., Cerquetella, M., & Mangiaterra, S. (2021). Therapeutic approaches to coronavirus infection according to “One Health” concept. *Research in Veterinary Science*, 136, 81–88. doi: 10.1016/j.rvsc.2021.02.009

Rüegg, S. R., Nielsen, L. R., Buttigieg, S. C., Santa, M., Aragrande, M., Canali, M., ... & Häslér, B. (2018). A systems approach to evaluate One Health initiatives. *Frontiers in Veterinary Science*, 5, 1–18. doi: 10.3389/fvets.2018.00023

Satarker, S. & Nampoothiri, M. (2020). Structural Proteins in Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus-2. *Archives of Medical Research*, 51(6), 482–491. doi: 10.1016/j.arcmed.2020.05.012

Sikkema, R. S. & Koopmans, M. P. G. (2021). Preparing for Emerging Zoonotic Viruses. *Encyclopedia of Virology*, 256–266. doi: 10.1016/B978-0-12-814515-9.00150-8

SNIS - Sistema nacional de informações sobre saneamento. Série Histórica. <<http://app4.mdr.gov.br/serieHistorica/#>>.

- Srinivasan, S., Cui, H., Gao, Z., Liu, M., Lu, S., Mkandawire, W., ... & Korkin, D. (2020). Structural genomics of SARS-CoV-2 indicates evolutionary conserved functional regions of viral proteins. *Viruses*, *12*(4), 360. doi: 10.3390/v12040360
- Todd, E. C., Greig, J. D., Bartleson, C. A., & Michaels, B. S. (2008). Outbreaks where food workers have been implicated in the spread of foodborne disease. Part 4. Infective doses and pathogen carriage. *Journal of Food Protection*, *71*(11) 2339–2373. doi: 10.4315/0362-028X-71.11.2339
- Tyrrell, D. A., Almeida, J. D., Cunningham, C. H., Dowdle, W. R., Hofstad, M. S., McIntosh, K., ... & Bingham, R. W. (1975). Coronaviridae. *Intervirology*, *5*(1-2), 76. doi: 10.1159/000149883
- Wang, M. Y., Zhao, R., Gao, L. J., Gao, X. F., Wang, D. P., & Cao, J. M. (2020a). Structure, Biology, and Structure-Based Therapeutics Development. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, *10*, 1–17. doi: 10.3389/fcimb.2020.587269
- Wang, Y., Li, X., Liu, W., Gan, M., Zhang, L., Wang, J., ... & Zhao, J. (2020b). Discovery of a subgenotype of human coronavirus NL63 associated with severe lower respiratory tract infection in China, 2018. *Emerging Microbes and Infections*, *9*(1), 246–255. doi: 10.1080/22221751.2020.1717999
- Weissleder, R., Lee, H., Ko, J., & Pittet, M. J. (2020). COVID-19 diagnostics in context. *Science Translational Medicine*, *12*(546) 1–6. doi: 10.1126/scitranslmed.abc19
- Wilde, A. H. D., Snijder, E. J., Kikkert, M., & Hemert, M. J. V. (2017). Host factors in coronavirus replication. *Roles of host gene and non-coding RNA expression in virus infection*, 1-42. doi: 10.1007/82_2017_25
- Wu, F., Zhang, J., Xiao, A., Gu, X., Lee, W. L., Armas, F., ... & Alm, E. J. (2020a). SARS-CoV-2 titers in wastewater are higher than expected from clinically confirmed cases. *Msystems*, *5*(4), e00614-20. doi: 10.1128/mSystems.00614-20
- Wu, F., Zhao, S., Yu, B., Chen, Y. M., Wang, W., Song, Z. G., ... & Zhang, Y. Z. (2020b). Author Correction: A new coronavirus associated with human respiratory disease in China. *Nature*, *580*(7803), E7-E7. doi: 10.1038/s41586-020-2202-3
- Wurtzer, S., Marechal, V., Mouchel, J. M., Maday, Y., Teyssou, R., Richard, E., ... & Moulin, L. (2020). Evaluation of lockdown impact on SARS-CoV-2 dynamics through viral genome quantification in Paris wastewaters. *MedRxiv*. doi: 10.1101/2020.04.12.20062679
- Yi, Y., Lagniton, P. N., Ye, S., Li, E., & Xu, R. H. (2020). COVID-19: What has been learned and to be learned about the novel coronavirus disease. *International Journal of Biological Sciences*, *16*(10), 1753–1766. doi: 10.7150/ijbs.45134
- Zehra, Z., Luthra, M., Siddiqui, S. M., Shamsi, A., Gaur, N. A., & Islam, A. (2020). Corona virus versus existence of human on the earth: A computational and biophysical