



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA
CAMPUS CAMPINA GRANDE
CENTRO DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA SANITÁRIA E AMBIENTAL
CURSO DE ENGENHARIA SANITÁRIA E AMBIENTAL**

PATRÍCIA PINHEIRO DE BARROS

**INDICADORES DE SARS-CoV-2 NA REDE DE ESGOTAMENTO SANITÁRIO NA
CIDADE DE CAMPINA GRANDE – PB**

**CAMPINA GRANDE - PB
2022**

PATRÍCIA PINHEIRO DE BARROS

**INDICADORES DE SARS-CoV-2 NA REDE DE ESGOTAMENTO SANITÁRIO NA
CIDADE DE CAMPINA GRANDE – PB**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Coordenação do Curso de Engenharia Sanitária e Ambiental da Universidade Estadual da Paraíba, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Engenharia Sanitária e Ambiental.

Área de concentração: Tecnologias de Tratamento de Água e Resíduos

Orientador: Prof. Dr. José Tavares de Sousa

**CAMPINA GRANDE - PB
2022**

É expressamente proibido a comercialização deste documento, tanto na forma impressa como eletrônica. Sua reprodução total ou parcial é permitida exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, desde que na reprodução figure a identificação do autor, título, instituição e ano do trabalho.

B277i Barros, Patrícia Pinheiro de.
Indicadores de SARS-CoV-2 na rede de esgotamento
sanitário na cidade de Campina Grande - PB [manuscrito] /
Patricia Pinheiro de Barros. - 2022.
45 p. : il. colorido.

Digitado.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em
Engenharia Sanitária e Ambiental) - Universidade Estadual da
Paraíba, Centro de Ciências e Tecnologia, 2022.

"Orientação : Prof. Dr. José Tavares de Sousa ,
Coordenação do Curso de Engenharia Sanitária e Ambiental -
CCT."

1. Epidemiologia. 2. Esgoto. 3. Coronavírus. 4.
Monitoramento. I. Título

21. ed. CDD 614.4

PATRÍCIA PINHEIRO DE BARROS

**INDICADORES DE SARS-CoV-2 NA REDE DE ESGOTAMENTO SANITÁRIO NA
CIDADE DE CAMPINA GRANDE – PB**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Coordenação do Curso de Engenharia Sanitária e Ambiental da Universidade Estadual da Paraíba, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Engenharia Sanitária e Ambiental.

Área de concentração: Tecnologias de Tratamento de Água e Resíduos

Aprovada em: 23/03/2022.

BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. José Tavares de Sousa (Orientador)
Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)



Prof. Dr. Valderi Duarte Leite
Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)



Dra. Wilza da Silva Lopes
Instituto Nacional do Semiárido (INSA)

A Deus e minha família por serem meu bem
maior, DEDICO

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço ao meu Deus pela sua forte mão que me sustenta todos os dias da minha vida e por me permitir viver essa experiência ímpar.

A minha mãe Mercês por ser meu alicerce, pelo apoio desde a escolha do curso e por sempre acreditar na minha capacidade.

Ao meu irmão Felipe por ser meu porto seguro e incentivador de todos os meus sonhos e nunca medir esforços para me ver bem.

Ao meu noivo Cayo Ismael por todo apoio e companheirismo. Por estar comigo em todos os momentos visando e priorizando minha felicidade.

Ao meu pai Aldo Barros (*in memoriam*).

Aos meus amigos e colegas da turma que fizeram parte da minha caminhada. Em especial a Karyna, Allisson, Hebert, Ayrton, Daniel, Lucas, Rogério, Alicya, Petra e Larissa, por dividir comigo as dificuldades e alegrias.

Ao meu orientador, José Tavares, pelos ensinamentos e por indicar a direção correta que o trabalho deveria tomar de maneira paciente e atenciosa.

A Dra. Wilza, Mateus e Rodrigo por todo conhecimento que me passaram no estágio, me proporcionando uma experiência de valor inestimável.

A todos os Professores do Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental da UEPB que contribuíram para minha formação como profissional de forma competente e singular. Especialmente ao professor Valderi que afetosamente aceitou avaliar este trabalho.

À Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado da Paraíba (FAPESQ) pelo financiamento do projeto, conforme edital n003/2020- Monitoramento do SARS-CoV-2 em águas residuárias produzidas pela população da cidade de Campina Grande – PB: indicadores de mapeamento georreferencial e disseminação da COVID-19.

À Companhia de Água e Esgotos da Paraíba (CAGEPA) pelo apoio nas coletas das amostras. Ao diretor de vigilância epidemiológica de Campina Grande – PB, Miguel Rodrigues Albuquerque Dantas, pelo fornecimento de dados sobre os casos de COVID-19 no município.

“Se enxerguei mais longe, foi porque me apoiei sobre os ombros de gigantes”.
-Isaac Newton

RESUMO

A epidemiologia do esgoto é um método estratégico utilizado há décadas em pesquisas de saneamento e de saúde pública, isso porque a análise das águas residuárias geram informações relevantes sobre a população de uma determinada região, principalmente a respeito da saúde da comunidade. No final de 2019, foi descoberto um novo coronavírus denominado de SARS-CoV-2, o agente causador da doença COVID-19. Diante do cenário pandêmico, foi observado a presença do RNA viral do SARS-CoV-2 na urina e fezes de pacientes infectados, o que justificou a importância de monitorar o SARS-CoV-2 nas águas residuárias de origem doméstica. Nesse contexto, foi realizado o monitoramento do vírus SARS-CoV-2 e verificado o seu potencial de transmissão nos esgotos gerados pelos moradores da cidade de Campina Grande – PB, produzindo informações de maneira dinâmica à população através de uma plataforma online MgeoCov2-CG (<https://mgeocov2cg.herokuapp.com/principal>), que dispõe gráficos, mapas georreferenciados e tabelas que indicam as regiões que estão mais infectadas pela COVID-19. Para tanto, foram selecionados pontos de coleta de esgoto por bacia de esgotamento sanitário: ETE do Glória (Zona 1), Estação Elevatória número 8 de Bodocongó (Zona 2), ETE Catingueira (Zona 3) o Interceptor Leste (Zona 4). Com base nos casos confirmados de COVID-19 fornecido pela Secretaria de Vigilância Epidemiológica da cidade e nos resultados das análises RT-qPCR das amostras, foi possível identificar que o Interceptor Leste foi o ponto que registrou máximas concentrações do novo coronavírus nos esgotos sanitários. Por se tratar do maior problema de saúde pública do mundo atualmente e o surgimento de novas variantes, é relevante o método de monitoramento do novo coronavírus nos esgotos para o combate a disseminação da doença.

Palavras-Chave: Epidemiologia. Esgotos. Coronavírus. Monitoramento.

ABSTRACT

Sewage epidemiology is a strategic method used for decades in sanitation and public health research, because the analysis of wastewater generates relevant information about the population of a given region, especially regarding the health of the community. In late 2019, a new coronavirus called SARS-CoV-2, the causative agent of the disease COVID-19, was discovered. Given the pandemic scenario, the presence of SARS-CoV-2 viral RNA was observed in the urine and feces of infected patients, which justified the importance of monitoring SARS-CoV-2 in wastewater of domestic origin. In this context, the SARS-CoV-2 virus was monitored and its transmission potential was verified in the sewers generated by the residents of the city of Campina Grande – PB, dynamically producing information to the population through an online platform MgeoCov2-CG (<https://mgeocov2cg.herokuapp.com/principal>), which has graphs, georeferenced maps and tables that indicate the regions that are most infected by COVID-19. For this purpose, sewage collection points were selected by sanitary sewage basin: Glória ETE (Zone 1), Bodocongó Lift Station number 8 (Zone 2), ETE Catingueira (Zone 3) the East Interceptor (Zone 4). Based on confirmed cases of COVID-19 provided by the city's Epidemiological Surveillance Secretariat and the results of the RT-qPCR analysis of the samples, it was possible to identify that the Interceptor Leste was the point that recorded maximum concentrations of the new coronavirus in the sanitary sewers. According to the confirmed cases of COVID-19 provided by the city's Epidemiological Surveillance Secretariat and the results of the RT-qPCR analysis of the samples, it was possible to identify that the Interceptor Leste was the point that recorded maximum concentrations of the new coronavirus in the sanitary sewers. Because it is the biggest public health problem in the world currently and the emergence of new variants, the method of monitoring the new coronavirus in sewers is relevant to combat the spread of the disease.

Keywords: Epidemiology. Sewers. Coronavirus. Monitoring.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Esquema de classificação de coronavírus	15
Figura 2 – Diagrama de entidade e relacionamento do banco de dados da plataforma web	19
Figura 3 – Malha de esgotamento sanitário de Campina Grande - PB.....	21
Figura 4 – Mapa georreferencial das regiões urbanas da cidade de Campina Grande – PB para ser monitoradas quanto a presença SARS-CoV-2 nas águas residuárias	23
Figura 5 – Mapas georreferenciais para os casos de 1 a 4	24
Figura 6 – Mapas georreferenciais para os casos de 5 a 8.....	24
Figura 7 – Cabeçalho e logo da plataforma MGeoCoV2-CG	25
Figura 8 – Rodapé da plataforma MGeoCoV2-CG.....	25
Figura 9 – Recursos disponíveis que destacam a região que está mais vulnerável ao novo coronavírus	26
Figura 10 – Recurso de georreferenciamento para indicação de contaminação com zoom.....	27
Figura 11 – Mapa de contaminação por zonas da plataforma (Zona 1)	27
Figura 12 – Mapa de contaminação por zonas da plataforma (Zona 2)	28
Figura 13 – Mapa de contaminação por zonas da plataforma (Zona 3)	28
Figura 14 – Mapa de contaminação por zonas da plataforma (Zona 4)	28
Figura 15 – Tabela do número de casos confirmados em cada bairro	29
Figura 16 – Mapa indicador Georreferencial de contaminação por zonas	29
Figura 17 – Página de Informações gerais sobre a COVID-19 em nível nacional e regional (Painel CONASS).....	30
Figura 18 – Página de Informações gerais sobre a COVID-19 em nível nacional e regional (Painel CONASS).....	30
Figura 19 – Bacias de esgotamento sanitário de Campina Grande - PB	31
Figura 20 – Bairros que integram o Interceptor Leste.....	37
Figura 21 – Número de casos positivos no Interceptor Leste	38
Figura 22 – Estatísticas da plataforma MgeoCov2-CG.....	39

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Cases para elaboração dos mapas georreferenciados com base no arranjo 2 ⁿ para três pontos de coleta	20
Tabela 2 – Percentual de amostras de esgoto bruto avaliadas que testaram positivo para o RNA do novo coronavírus com cada uma das regiões	35
Tabela 3 – Concentração de SARS-CoV-2 a cada litro coletado na EXTRABES.....	36
Tabela 4 – Carga viral por dia nas águas residuárias da EXTRABES	36

Sumário

1.	INTRODUÇÃO	11
2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	13
	2.1 Vigilância Epidemiológica através dos Esgotos	13
	2.2 Coronavírus relacionado à Síndrome Respiratória Aguda Grave-2	14
3	METODOLOGIA	18
	3.1 Desenvolvimento da Plataforma Web	18
	3.2 Funcionamento da Plataforma Web	25
	3.3 Escolha dos Pontos de Coleta	31
	3.4 Coleta, Armazenamento da amostra e Concentração do vírus	32
	3.5 Extração do vírus e Análise de RT-qPCR	33
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
	4.1 Análise RT-qPCR das amostras de Esgoto	35
	4.2 Dados da Secretaria de Vigilância Epidemiológica de Campina Grande – PB	37
	4.3 Desempenho da plataforma MgeoCov2-CG	38
	4.4 Cenário atual da COVID-19	40
	4.4.1 Brasil	40
	4.4.2 Paraíba	40
5	CONCLUSÕES	41
	REFERÊNCIAS	42

1. INTRODUÇÃO

As águas residuárias possuem uma ampla gama de indicadores químicos e biológicos das atividades humanas, e informações importantes que contribuem no conhecimento das condições de saúde de uma comunidade. Sendo assim, o monitoramento do esgoto é uma ferramenta de vigilância epidemiológica utilizada para uma série de estratégias, envolvendo o monitoramento populacional, a prevenção e o controle da disseminação de doenças.

A epidemiologia baseada em águas residuárias apresenta-se como ferramenta de alerta precoce não invasiva para alertar comunidades de novas infecções virais, e tem o potencial de permitir respostas rápidas e coordenadas a um surto. Poderia, em última análise, reduzir altas taxas de mortalidade, e diminuir a carga sobre os sistemas de saúde (MESSINA, 2020).

No final de 2019 foi confirmado o novo coronavírus denominado de SARS-CoV-2, o agente etiológico da COVID-19. Trata-se de um vírus de RNA envolto e de uma única cadeia, caracterizado por alta infectividade e grande potencial para resultar em sérias complicações de saúde. O SARS-CoV-2 está filogeneticamente associado à síndrome respiratória aguda grave humana (SARS) e síndrome respiratória do Oriente Médio (SS), com capacidade rápida de contágio que ocorre principalmente quando uma pessoa infectada tosse, espirra ou fala, produzindo gotículas que atingem o nariz, a boca ou os olhos de outra pessoa (RUME et al., 2020; WANG et al., 2020; WHO, 2020).

Devido sua alta transmissibilidade, em apenas 3 meses, a doença do novo coronavírus (COVID-19) se espalhou e devastou o mundo a uma velocidade sem precedentes na história moderna. Diante dessa rápida disseminação entre países, a Organização Mundial da Saúde (OMS) declarou pandemia global em 11 de março de 2020 (ADIL et al., 2021; DING e LIANG, 2020).

Foi observado fragmentos do SARS-CoV-2 em fezes e amostras de urina de pacientes infectados pelo novo coronavírus, incluindo casos leves, graves e assintomáticos. O primeiro relatório foi feito por Medema et al. (2020), que detectou o SARS-CoV-2 em amostras de águas residuárias coletadas em 4 de março de 2020 nos Países Baixos. (MAINARDI e BIDOIA, 2021)

Com a descoberta da presença do RNA viral do SARS-CoV-2 em águas residuárias, foi despertado não apenas a possibilidade de transmissão fecal-oral, mas também a importância do monitoramento nos esgotos sanitários para verificar a dinâmica da circulação do novo coronavírus entre grupos populacionais em tempo hábil. Em Paris, França, foi

constatado uma correlação direta entre a quantidade de unidades genômicas de SARS-Cov-2 nos esgotos domésticos e o aumento do número de casos de contaminação (WURTZER et al., 2020).

O aumento da circulação do vírus na população, ocasiona o aumento da carga viral nos sistemas de esgotos das cidades. Dessa forma, o rastreamento do vírus através da análise de amostras coletadas em pontos estratégicos da cidade juntamente com a adaptação da tecnologia e elaboração de um recurso tecnológico, é possível identificar de forma dinâmica a evolução da doença, como aumento do número de infectados em uma região e rastrear surtos em tempo real.

Nesse contexto, a plataforma online MGeoCoV2-CG foi desenvolvida com a finalidade de monitorar o vírus SARS-CoV-2 em tempo real na cidade de Campina Grande – PB e fornecer informações disponibilizadas pela Secretaria de Vigilância Epidemiológica do município, e resultados obtidos através de amostras de esgoto analisadas, permitindo o mapeamento georreferenciado de regiões vulneráveis à presença do novo coronavírus. Tornando possível a tomada de decisões e intervenção estratégica para minimizar a propagação da doença na cidade.

Portanto, o presente trabalho teve como objetivo monitorar a presença da carga viral da SARS-CoV-2 nos esgotos gerados pela população da cidade de Campina Grande-PB, bem como, avaliar a plataforma MGeoCoV2-CG como ferramenta analítica para monitoramento de SARS-CoV-2 nos esgotos.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Vigilância Epidemiológica através dos Esgotos

Os esgotos sanitários possuem uma diversidade de constituintes que podem fornecer informações qualitativas ou quantitativas importantes sobre a atividade dos habitantes dentro de uma determinada área de esgotamento sanitário georreferenciada.

A epidemiologia baseada em águas residuárias vem sendo empregada há décadas como uma ferramenta para fornecer informações de maneira empírica, não invasiva e em tempo real ou quase-real sobre o consumo de drogas legais e ilegais pela população, exposição a certas substâncias de uso humano a exemplo de produtos farmacêuticos, químicos, contaminantes exógenos, bem como determinação de algumas consequências do estilo de vida das populações investigadas (LORENZO e PICÓ, 2019).

Através do monitoramento de águas residuárias também é possível que pesquisadores rastreem patógenos infecciosos, pois de acordo com Hellmér et al. (2014), o esgoto contém vírus entéricos excretados de pessoas doentes, bem como de casos de infecção subclínica, o que reflete a real magnitude do vírus circulante na comunidade. Além disso, o vírus pode ser detectado antes de ocorrer um surto, uma vez que o vírus pode ser excretado em fezes antes do início dos sintomas.

A maioria dos vírus transmitidos pela via feco-oral são altamente resistentes no ambiente hídrico, onde podem persistir em altos níveis. Alguns já conhecidos pela epidemiologia do esgoto, como norovírus, enterovírus, vírus Aichi, parechovírus, vírus hepatite A e E (HAV e HEV, respectivamente), astrovírus, rotavírus e adenovírus. Esses vírus causam surtos ou casos esporádicos com uma ampla gama de sintomas, tais como gastroenterite, meningite, doença respiratória, conjuntivite, paralisia ou hepatite (HELLMÉR et al., 2014).

O médico John Snow foi pioneiro no uso de metodologias modernas de pesquisa epidemiológica, quando em 1854 começou a investigar o surto de cólera que ocorreu em Londres. Preocupado com a grande mortalidade em decorrência dessa doença, decidiu estudar seu comportamento epidemiológico. Através do seu estudo de caso, Snow verificou uma correlação entre a doença e a qualidade da água consumida pelos habitantes, que era retirada de pequenos afluentes do rio Tâmsa, lugar onde as águas estavam altamente poluídas, ou obtendo-a de numerosas bombas de água para uso público. Investigando essas bombas, foi comprovado que a 20 pés de profundidade, um cano de esgoto com vazamentos passava a uma curta distância

da fonte de água da bomba. Snow fez um mapa do setor, no qual ele marcou os pontos correspondentes às mortes por cólera e as diferentes bombas de água potável existentes, demonstrando graficamente a relação espacial entre as mortes por cólera e a vazão das bombas de água (CERDA e VALDIVIA, 2007).

Comprovado historicamente sua relevância, a epidemiologia do esgoto tem sido utilizado efetivamente para monitorar a circulação de patógenos virais em populações específicas. Em princípio, foi definido como uma ferramenta não intrusiva para medir biomarcadores de efeito em nível comunitário. Embora essa abordagem tenha sido amplamente utilizada para estimar o uso e o abuso de substâncias, ela foi recentemente estendida para incluir biomarcadores de saúde pública. Até o momento, desempenhou um papel fundamental no desenvolvimento de sistemas de alerta precoce para uma série de vírus entéricos, incluindo poliovírus, norovírus e hepatite A. (JOHNSON et al., 2021)

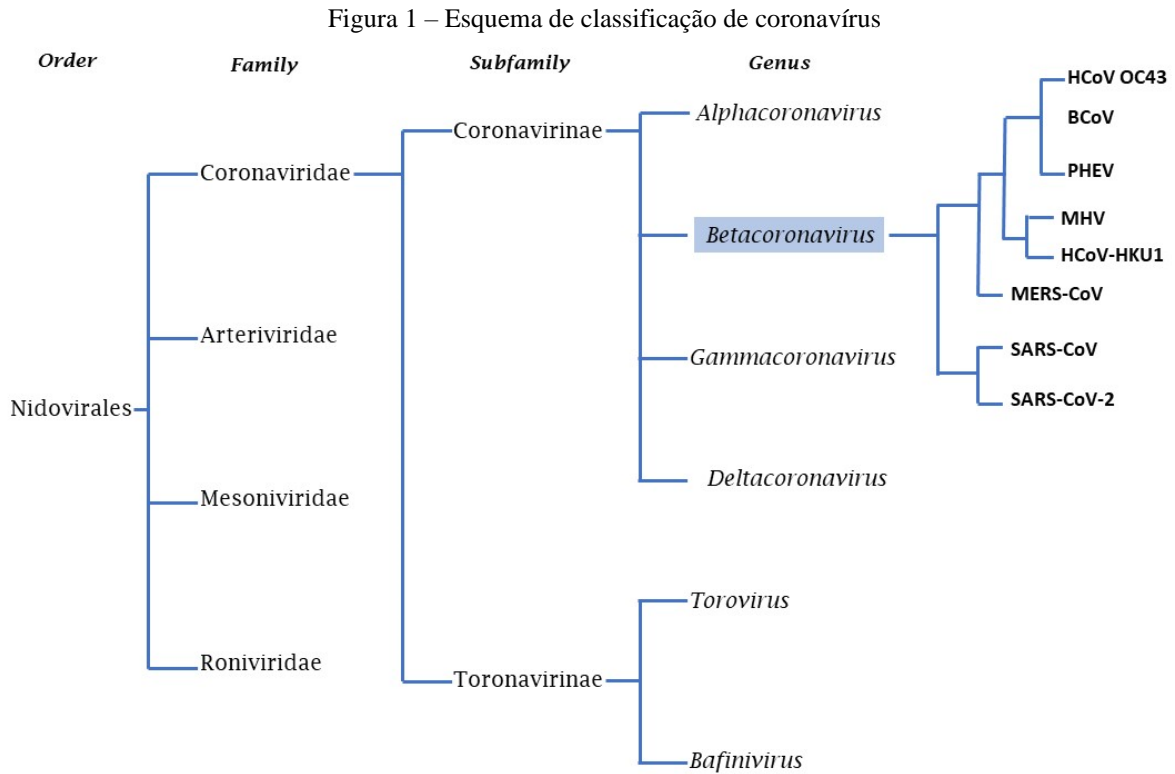
Segundo Polo et al. (2020), a análise de apenas amostras clínicas não pode prever surtos em tempo hábil ou capturar facilmente portadores assintomáticos. Portanto, a vigilância em escala comunitária, incluindo a epidemiologia baseada em águas residuárias, pode fazer a ponte entre a comunidade e a clínica mais ampla, tornando-se uma valiosa ferramenta de previsão epidemiológica indireta para vírus pandêmicos.

2.2 Coronavírus relacionado à Síndrome Respiratória Aguda Grave-2

Em dezembro de 2019, foi confirmado um surto de doença do trato respiratório inferior com etiologia desconhecida na cidade de Wuhan, localizada na província de Hubei na China. Posteriormente em fevereiro de 2020, a Organização Mundial da Saúde (OMS) nomeou a doença como Doença Coronavírus 2019 (COVID-19). O Coronavirus Study Group (CSG) do Comitê Internacional de Taxonomia dos Vírus (ICTV) reconheceu e designou esse vírus como síndrome respiratória aguda grave coronavírus 2 (SARS-CoV-2) (LAUXMANN et al., 2020).

Os Coronavírus (CoVs) podem ser divididos em 4 gêneros: alfa, beta, gama e deltacoronavírus, como mostra a divisão na Figura 1. Filogeneticamente, SARS-CoV-2 está dentro do subgênero Sarbecovirus do gênero Betacoronavirus, que é um dos quatro gêneros de CoVs pertencentes à subfamília Coronavirinae (FOLADORI et al., 2020). Seis CoVs foram identificados como vírus suscetíveis a humanos, entre os quais quatro foram considerados de baixo risco patogênico por levarem a sintomas respiratórios leves, sendo dois do gênero alfa (HCoV-229E e HCoV-NL63); e dois do gênero beta (HCoV-HKU1 e HCoV-OC43). Os outros,

pertencem à família β -CoV (SARS-CoV e MERS-CoV) foram considerados de alto risco patogênico por serem mais graves, com infecções potencialmente fatais do trato respiratório (DOURADO et al., 2020).



Fonte: Adaptado de Khan, 2020.

Segundo CHEN et al. (2020), os CoVs causaram danos significativos nas últimas décadas: a síndrome respiratória aguda grave (SARS) após seu primeiro surgimento no sul da China no final de 2002, e uma década mais tarde, em 2012, outro surto de infecção por coronavírus relatado na Arábia Saudita, que é conhecida como síndrome respiratória do Oriente Médio (MERS-CoV). No entanto, o novo coronavírus demonstrou uma infectividade e patogenicidade maior, sendo responsável pela pandemia mais devastadora do século XXI.

De acordo com WHO (2021) há fortes evidências de que o SARS-CoV-2 teve uma origem zoonótica. Baseado no sequenciamento do genoma do vírus resultados e análises evolutivas, foi sugerido que o SARS-CoV-2 é um coronavírus modificado de origem de morcego. Apesar da investigação epidemiológica inicial sugerir que os casos estavam associados à exposição em um mercado em Wuhan, o relatório da OMS diz que estudos aprofundados mostraram pacientes que começaram a ter sintomas no começo de dezembro, e que não tinham nenhuma ligação com o local.

O principal modo de transmissão do SARS-CoV-2 entre humanos é através de gotículas respiratórias (partículas > 5–10 µm) ou núcleo de gotícula (partículas < 5 µm) e pode ocorrer quando uma pessoa está em contato próximo, em um raio de 1 metro, com uma pessoa infectada. Como também pelo contato, uma vez que as gotículas podem se depositar sobre superfícies, onde o vírus permanece viável durante certo período de tempo (OPAS, 2020). Após contato com o indivíduo, o vírus migra pelas mucosas da nasofaringe e laringe até os pulmões e, finalmente, para o sangue.

A doença pode causar vários níveis de gravidade que vão desde infecção assintomática, até doenças respiratórias graves e fatalidade em 2-3% dos pacientes infectados (OMS, 2021). Pessoas infectadas com SARS-CoV-2 também são infecciosas nos dias anteriores ao surgimento de sintomas.

Os sintomas clínicos típicos desses pacientes infectados são febre, tosse seca, dificuldades respiratórias e dor de cabeça. O início da doença pode resultar em danos alveolares que indicam síndrome do desconforto respiratório agudo (ZHOU et al., 2020). Estes podem progredir para insuficiência respiratória com risco de vida, afetando também os sistemas cardíaco, renal, hepático e nervoso (KEVADIYA et al., 2021).

Novos desafios surgiram em relação à COVID-19, quando alguns estudos relataram a presença de materiais genéticos do novo coronavírus em fezes e amostras de urina de pacientes infectados, o que trouxe a importância da detecção viral em águas residuárias. Por meio da amostragem de esgoto bruto e determinação das concentrações de RNA do SARS-CoV-2, é possível extrair informações valiosas sobre os níveis de infecção de toda a população que contribuem para o esgoto investigado (MOTA et al., 2021).

Segundo Soares et al. (2020), coletar informações sobre a ocorrência e o destino do SARSCoV-2 no esgoto pode permitir que se conheçam áreas com maior presença do vírus, prevenindo possíveis surtos e contribuindo em ações regionalizadas que otimizem as respostas do sistema de saúde.

Os primeiros resultados positivos para a existência de SARS-CoV-2 em amostras de esgoto foram relatados em março de 2020 na Holanda, ao se investigar a presença de fragmentos do RNA viral por RT-qPCR em águas residuárias de sete estações de tratamento de esgotos (ETE) e de um aeroporto (SODRÉ et al., 2020). Logo após, outros países iniciaram as pesquisas rastreando e constatando a ocorrência do novo coronavírus nas redes de esgoto em fevereiro de 2020 na Inglaterra, China e Dinamarca, e em março do mesmo ano nos Estados Unidos, França, Japão, Paquistão, Austrália e Israel.

No Brasil, em 2021 foi criada a Rede Monitoramento Covid Esgotos, coordenada pela Agência Nacional de Águas e Saneamento Básico (ANA) e pelo Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Estações de Tratamento de Esgotos Sustentáveis (INCT ETES Sustentáveis), com apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). Esse projeto tem como objetivo ampliar as informações para o enfrentamento da pandemia de COVID-19 por meio do monitoramento do SARS-CoV-2 nos esgotos de importantes capitais brasileiras (Belo Horizonte - MG, Curitiba - PR, Fortaleza - CE, Recife - PE e Rio de Janeiro - RJ) e também do Distrito Federal. Através de boletins informativos, as informações geradas podem contribuir para a tomada de decisões por parte das autoridades de saúde, incluindo a definição de ações para o combate à pandemia de Covid-19. (ANA, 2021)

3 METODOLOGIA

3.1 Desenvolvimento da Plataforma Web

A plataforma digital MGeoCoV-2CG foi desenvolvida por meio de prestação de serviço da empresa de base tecnológica Alcalitech Automação e Instrumentação Analítica LTDA, em alinhamento as demandas requisitadas pela coordenação do projeto “Monitoramento do SARS-CoV-2 em águas residuárias produzidas pela população da cidade de Campina Grande – PB: Indicadores de mapeamento georreferencial e disseminação da Covid-19”, financiado pela Fundação de Apoio à Pesquisa da Paraíba (FAPESQ-PB) e realizado em parceria entre professores da Universidade Estadual da Paraíba e da Universidade Federal de Campina Grande.

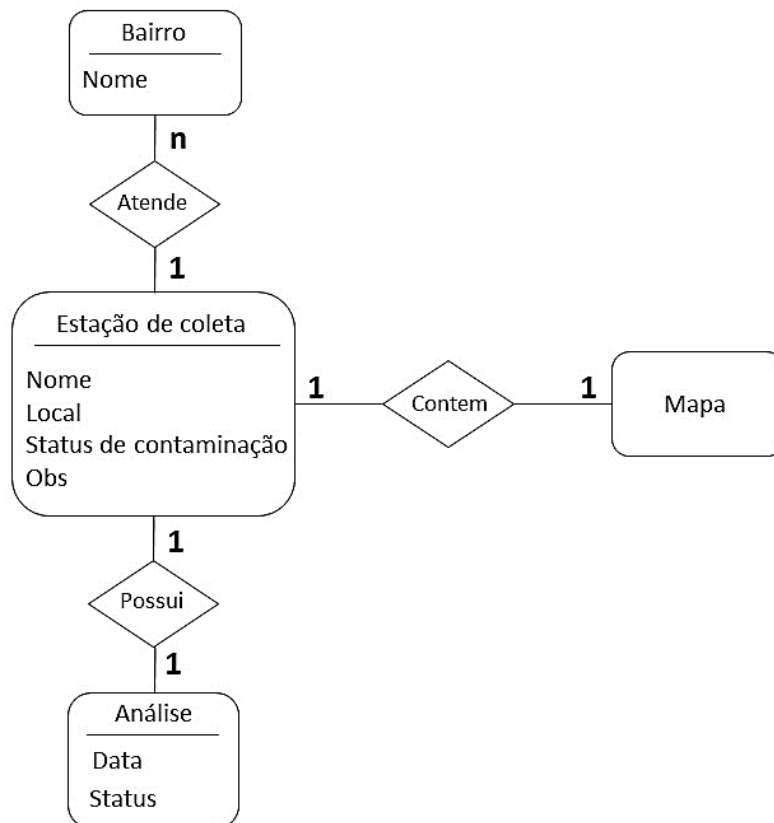
Neste projeto, a plataforma web foi elaborada com objetivo de disponibilizar informações de utilidade pública, através dos dados de monitoramento do novo coronavírus na rede de esgotamento sanitário na cidade de Campina Grande – PB, em tempo real por zonas e bairros da cidade de modo dinâmico.

De acordo com os requisitos da pesquisa, a plataforma foi arquitetada com as seguintes características e funcionalidades:

- Conter um espaço de uso restrito da equipe técnica que desenvolve o projeto, para que seja possível a alimentação e atualização de dados/informações relativas ao monitoramento.
- Dispor de recursos gráficos que auxiliem a leitura de dados e compreensão de informações georreferenciais.
- Dispor de informações gerais acerca do monitoramento da SARS-CoV-2 a nível nacional e regional.

No que concerne a estrutura de persistência de informações, foi realizada a modelagem da funcionalidade principal desta plataforma, conforme apresentado no diagrama da Figura 2.

Figura 2 – Diagrama de entidade e relacionamento do banco de dados da plataforma web



Fonte: Sousa et al., 2021

Conforme o diagrama de entidade e relacionamento cada ponto de coleta de esgoto está relacionado com a listagem de bairros ou ruas que são atendidos por este coletor, interceptor ou estação. Para cada ponto de coleta são persistidas as informações referentes as análises temporais, de modo a se registrar um histórico de monitoramento. Em relação as informações georreferenciais, foram elaborados mapas com indicadores de contaminação, baseados em um arranjo 2^n , em que n é o número de pontos de coletas e o 2 (base do expoente) é o binário de possibilidades para a análise de SARS-CoV-2 (positivo/negativo) (SOUSA et al., 2021). Neste momento inicial em que os pontos de coleta são 3, o número total de cases para elaboração dos mapas foram 8, conforme apresentado na Tabela 1.

Tabela 1 – Cases para elaboração dos mapas georreferenciados com base no arranjo 2ⁿ para três pontos de coleta

Case	Est. Glória (1)	Est. Elev. nº 8 Bodocongó (2)	Interceptor Leste (4)
1	0	0	0
2	0	0	1
3	0	1	0
4	1	0	0
5	0	1	1
6	1	1	0
7	1	0	1
8	1	1	1

*0-Resultado negativo; 1-Resultado positivo.

Fonte: SOUSA et al., 2021

Inicialmente foi estabelecido como pontos de coleta a ETE Catingueira, a EE Bodocongó e a ETE Glória. Contudo, foi constatado que a ETE Catingueira está recebendo despejo de efluentes de fossa séptica oriundos de caminhões com tanque limpa fossa, cuja origem do efluente não pode ser rastreada. Neste sentido, em função desta inadequação operacional, o ponto de coleta ETE Catingueira foi remanejado provisoriamente para o interceptor leste, localizado na rua Consul Joseph Noujaim, BR104, bairro Catolé, nas dependências da Estação Experimental de Tratamento de Águas e Esgotos – EXTRABES.

Para definir os ambientes urbanos que estão relacionados a cada um dos 8 cases descritos na Tabela 1, foi realizado um estudo aprofundado com base no mais recente (agosto/2020) mapa digital de malhas de esgotamento sanitário da cidade de Campina Grande – PB fornecido pela CAGEPA. Através do mapa, apresentado na Figura 3, foi possível identificar com detalhe a confluência dos esgotos que passam por cada um dos quatro pontos de coleta: (1) Estação de tratamento Glória 3; (2) Estação elevatória nº8 Bodocongó e; (3) Estação de tratamento Catingueira e; (4) Interceptor Leste.

Figura 3 – Malha de esgotamento sanitário de Campina Grande - PB



Fonte: CAGEPA, 2020

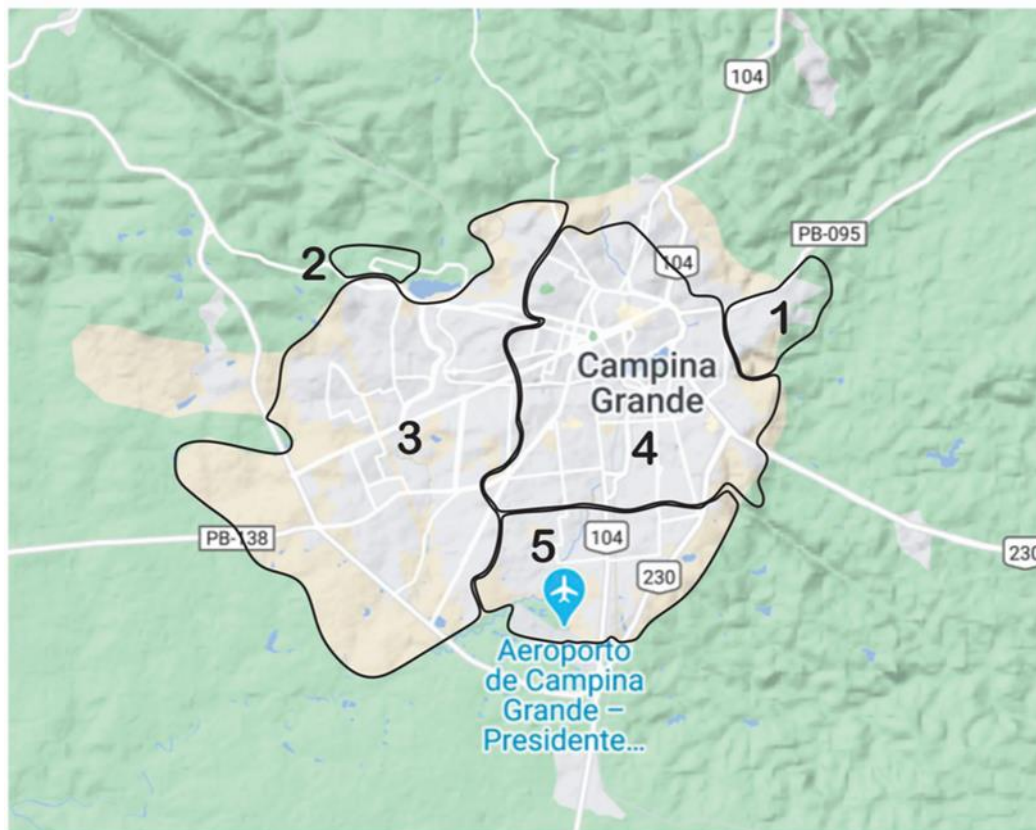
De acordo com dados do mapa digital de malhas de esgotamento sanitário da cidade de Campina Grande – PB, a ETE Glória recebe efluente dos coletores principais E1, E2 e E3, caracterizando a bacia da zone leste, que compreende os bairros Nova Brasília e Monte Castelo, envolvendo também o loteamento Benedita Andrade, além da região do bairro José Pinheiro posicionada a leste da Rua Paraná. A estação elevatória nº8 do Bodocongó recepta coletores principais, que passam pelas ruas Emiliano Rosendo da Silva, Compositor Rosil Cavalcante, Juvêncio Arruda, Manoel G. de Melo e Francisco Afonso, compreendendo toda a região da vila dos teimosos e dos residenciais Naimisharanya, Dona Lindu I e IV, além das sedes da Fundação Parque Tecnológico e FAPESQ. A ETE catingueira recebe efluente da estação elevatória nº16 de uma confluência dos Interceptores Bodocongó e Depuradora. De modo detalhado:

- (I) A estação elevatória nº16 compreende efluentes do conjunto habitacional Pedro Godim do bairro das Cidades, do Condomínio Major Veneziano III e dos bairros Portal Sudoeste, Três Irmãs e Jardim Verdejante, além dos efluentes dos condomínios Serra Ville, Monte Ville, Colinas do Sol e Colinas do entardecer, que compreendem a região sudoeste dos bairros Malvinas e Cinza.

- (II) O Interceptor Bodocongó recebe efluente de diversos emissores que percorrem os bairros Acácio Figueiredo, região leste das Malvinas e Três Irmãs, Presidente Médici e Santa Cruz, região oeste do Cruzeiro, Santa Rosa, Quarenta, Pedregal e Bela Vista e Monte Santo, bem como, as regiões sudestes dos Bairros Universitário e Jeremias. Um aspecto de muita relevância deste interceptor é o recebimento de efluentes do Hospital de Emergência e Trauma Dom Luiz Gonzaga Fernandes e da UPA Adhemar Dantas (Dinamérica).
- (III) O Interceptor Depuradora tem início nas proximidades da Rua Presidente Roosevelt 652 no Alto Branco, estendendo-se até o encontro entre as ruas Paulo Matias e Manoel Batista do Bairro Acácio Figueiredo. Neste percurso, este interceptor recebe efluente de coletores que atendem a região sul do Alto Branco e Lozeiro, bem como, de toda região que compreende os bairros Palmeira, Conceição e Lauritzem, Prata, Centro e José Pinheiro, além da região oeste do Santo Antônio e Monte Castelo. Também são atendidos pelo Interceptor depuradora as regiões a leste dos bairros Quarenta, Jardim Quarenta e Cruzeiro, mas também toda região da Estação Velha, Catolé, Mirante, Sandra Cavalcante, Tambor, Jardim Paulistano, Itararé, Distrito Industrial e Velame.

O interceptor Leste compreende toda região descrita para Interceptor Depuradora, com exceção dos bairros Itararé, Distrito Industrial e Velame, além da região sul do Tambor e Jardim Paulistano e Cruzeiro. Com base neste levantamento detalhado, foi obtido o mapa georreferenciado apresentado na Figura 4, que contém as regiões urbanas que podem ser monitoradas quanto a presença SARS-CoV-2 nas águas residuárias.

Figura 4 – Mapa georreferencial das regiões urbanas da cidade de Campina Grande – PB para ser monitoradas quanto a presença SARS-CoV-2 nas águas residuárias

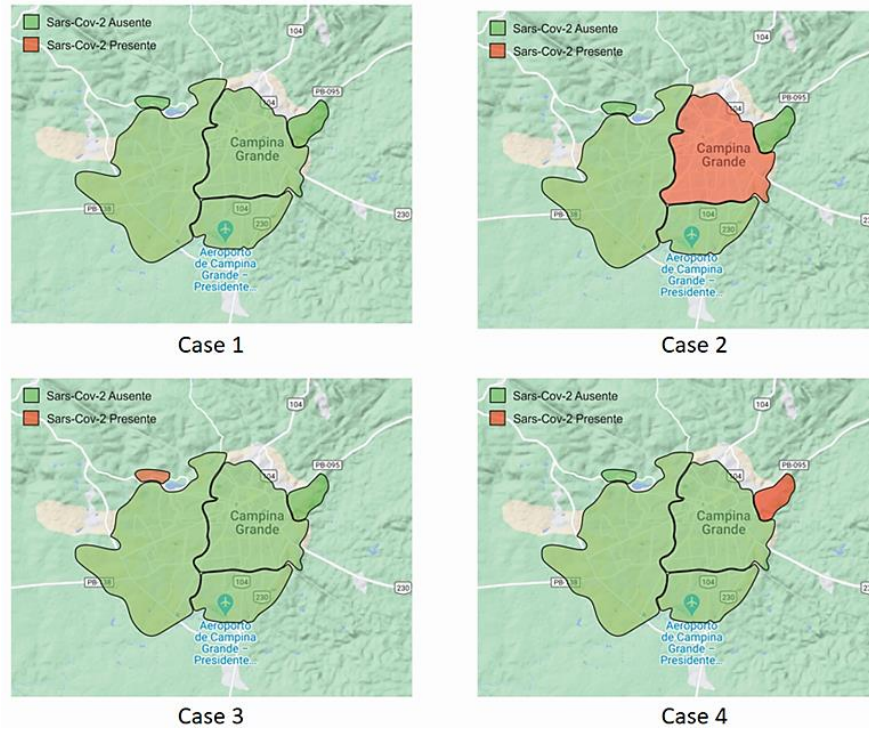


Fonte: FAPESQ, 2021.

A região 1 compreende a zona urbana cujos efluentes confluem para ETE Glória. A região 2 envolve a região descrita para o Interceptor Bodocongó. A região 3 abrange os bairros e zonas do Interceptor Bodocongó e da EE16, que confluem para a ETE Catingueira juntamente com os efluentes das regiões 5 e 4. A região 4, em especial, é a descrita para o interceptor leste, cuja coleta é realizada nas dependências da EXTRABES.

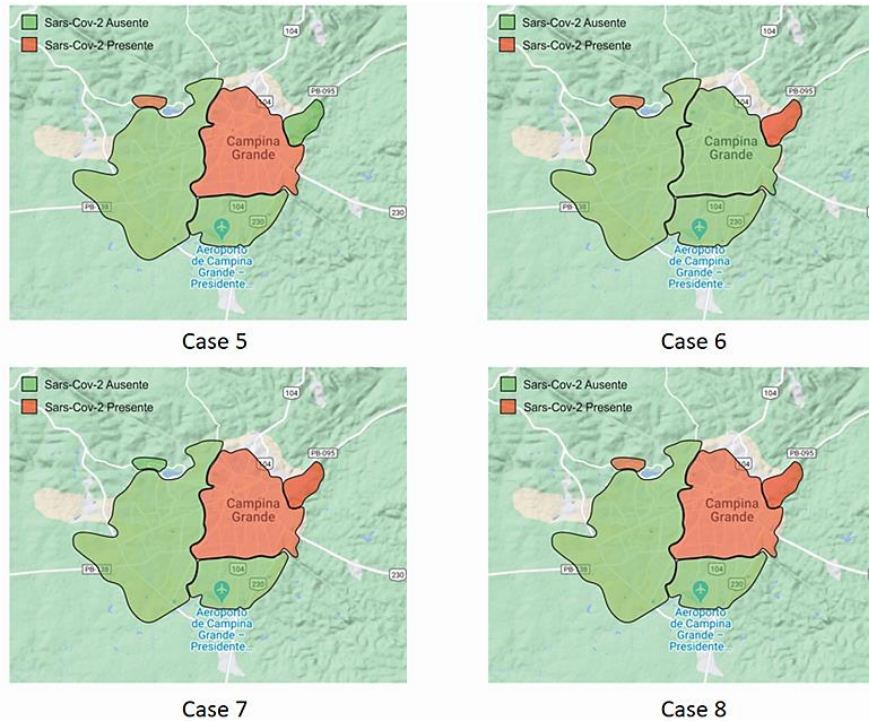
Com base nos dados apresentados na Tabela 1 e Figura 4, foram desenvolvidos os mapas georreferencial para cada um dos cases de contaminação descritos para o arranjo 2ⁿ. As Figuras 5 e 6 apresentam os cases da Tabela 1 na configuração georreferencial.

Figura 5 – Mapas georreferenciais para os casos de 1 a 4



Fonte: FAPESQ, 2021.

Figura 6 – Mapas georreferenciais para os casos de 5 a 8



Fonte: FAPESQ, 2021

3.2 Funcionamento da Plataforma Web

O acesso a plataforma é público e gratuito através do link <https://mgeocov2cg.herokuapp.com/principal>. A navegação é de fácil compreensão por qualquer usuário.

A parte visual da plataforma foi consolidada com base em um design moderno e informativo. Foi elaborado um slogan de apresentação que contempla o cabeçalho e logo da plataforma Mapeamento georreferencial e disseminação da COVID-19 em águas residuárias de Campina Grande – PB (MGeoCoV2-CG) (Figura 7) e rodapé (Figura 8) presentes em todas as abas da plataforma.

Figura 7 – Cabeçalho e logo da plataforma MGeoCoV2-CG



Fonte: MGeoCoV2-CG

Figura 8 – Rodapé da plataforma MGeoCoV2-CG



Fonte: MGeoCoV2-CG

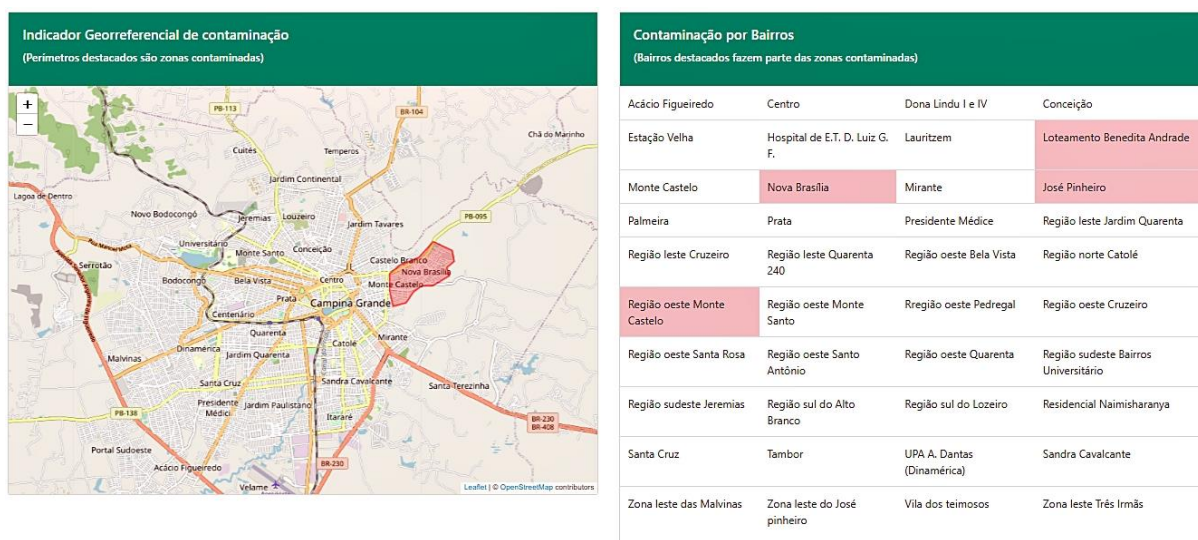
Os dados disponíveis na plataforma, foram obtidos das análises moleculares das amostras de esgoto em RT-qPCR. Além disso, foram utilizados sites oficiais como o Ministério da Saúde e também informações que foram disponibilizadas pela Secretaria de Vigilância Epidemiológica de Campina Grande – PB, que consistem em números de casos confirmados por testes sorológicos e RT-PCR na população do município. Esses dados foram computados durante o período do início da pandemia, especificamente da vigésima primeira semana

epidemiológica de 2020 até a vigésima sexta semana de 2021, o que compreende o período de maio de 2020 a junho de 2021. A plataforma é alimentada pelos pesquisadores através do “Acesso restrito”, espaço acessível pelo login e senha, para ser atualizados os dados e informações disponibilizadas na plataforma web.

A partir disso, gráficos foram elaborados e disponibilizados na plataforma digital, sendo estes de forma intuitiva, informativa e dinâmica, podendo ser atualizada com novos dados a qualquer momento.

A primeira página da plataforma apresenta os recursos do monitoramento georreferencial, dispondo de um mapa dinâmico (Indicador Georreferencial de Contaminação), no qual regiões vulneráveis à presença de SARS-CoV-2 em águas residuárias são evidenciados por um perímetro vermelho georreferenciado como ilustra a Figura 9. Como pode ser visualizado, ao lado do mapa é apresentada uma tabela destacando os nomes dos bairros que estão inseridos na região indicada do mapa.

Figura 9 – Recursos disponíveis que destacam a região que está mais vulnerável ao novo coronavírus



Fonte: MGeoCoV2-CG

O usuário da plataforma pode navegar pelo mapa, utilizando a barra de rolagem do mouse para dar zoom ou um click + podendo também deslocar o mapa vertical ou horizontalmente. Com essa ferramenta é possível visualizar com clareza os nomes das ruas que fazem parte da zona contaminada como pode ser visualizado na Figura 10.

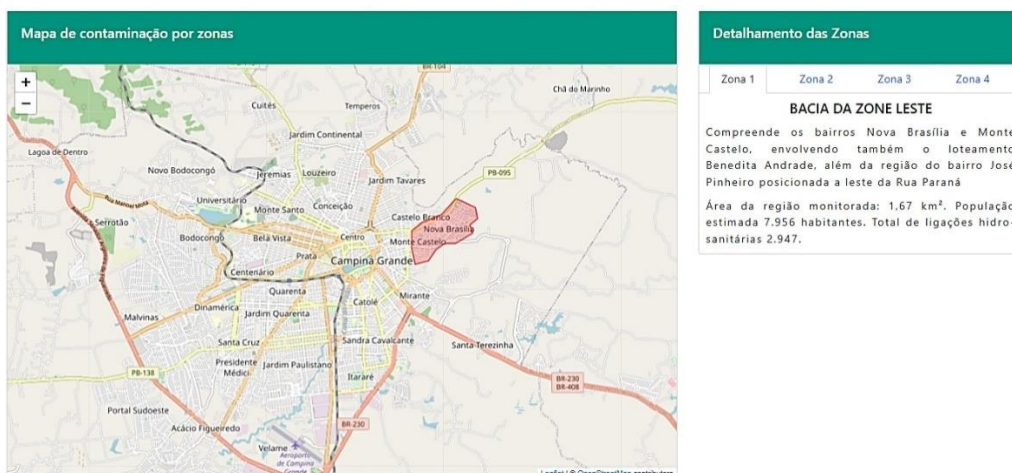
Figura 10 – Recurso de georreferenciamento para indicação de contaminação com zoom



Fonte: MGeoCoV2-CG

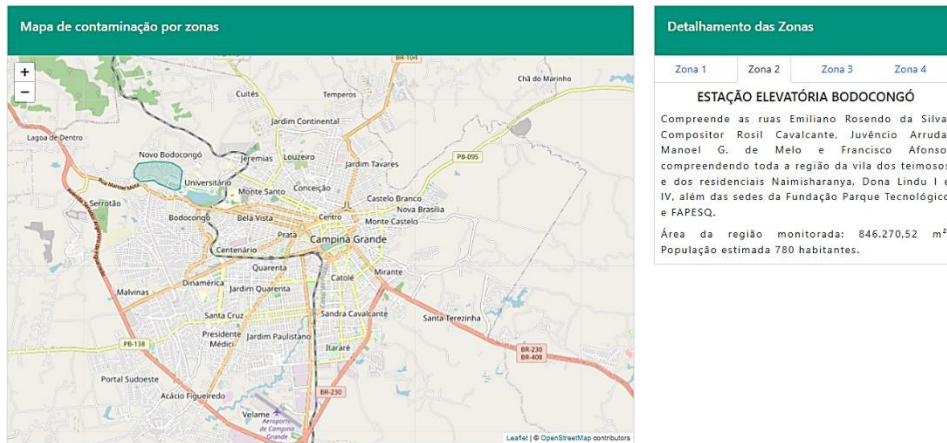
Ainda na primeira página, é disponibilizado ao usuário informações sobre cada região monitorada. Trata-se do Mapa de Contaminação por Zonas. Este referido mapa visibiliza as delimitações das regiões e dispõe de um box de texto lateral com uma aba de navegação para cada zona, com uma série de dados e informações acessíveis. As Figuras de 11 a 14 apresentam as imagens do detalhamento de cada zona.

Figura 11 – Mapa de contaminação por zonas da plataforma (Zona 1)



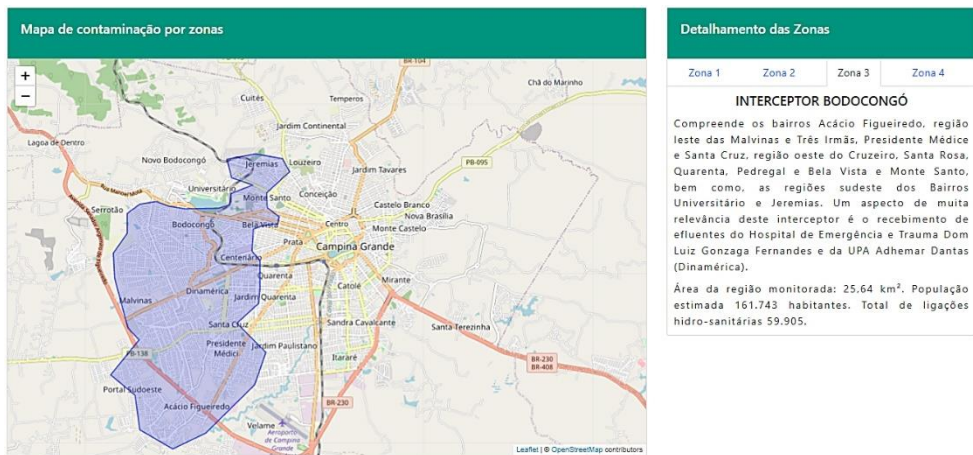
Fonte: MGeoCoV2-CG

Figura 12 – Mapa de contaminação por zonas da plataforma (Zona 2)



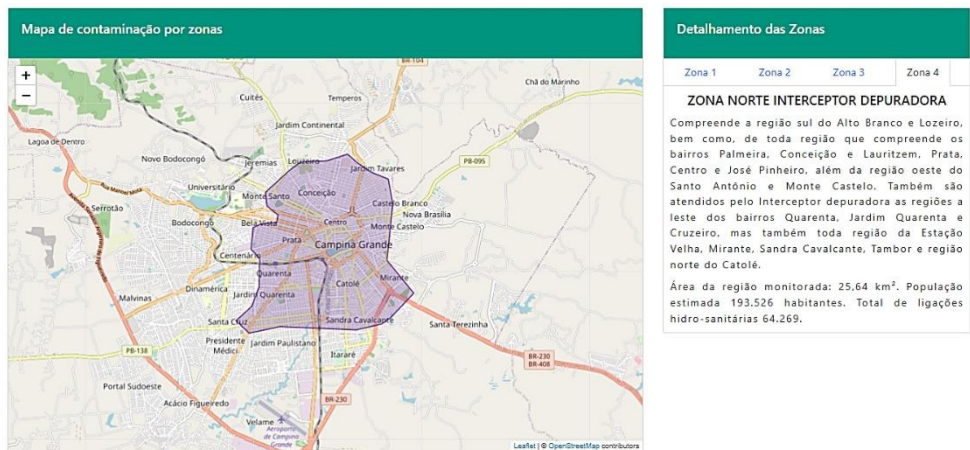
Fonte: MGeoCoV2-CG

Figura 13 – Mapa de contaminação por zonas da plataforma (Zona 3)



Fonte: MGeoCoV2-CG

Figura 14 – Mapa de contaminação por zonas da plataforma (Zona 4)



Fonte: MGeoCoV2-CG

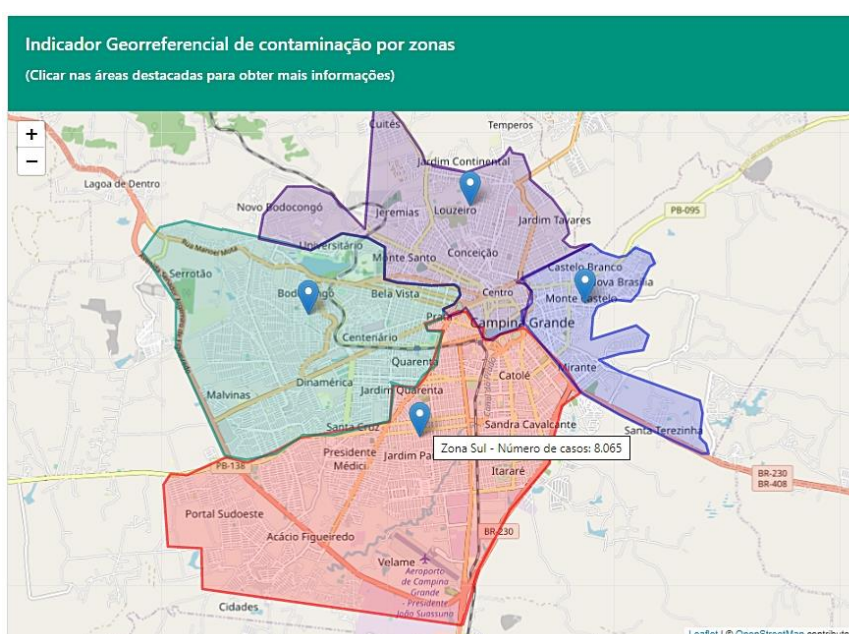
Na página (Dados da Secretaria Municipal) é acessível os dados obtidos da Secretaria de Vigilância Epidemiológica do município do início da pandemia até o mês de junho de 2021 através de uma tabela são mostrados os bairros e a quantidade de casos confirmados por testes laboratoriais sendo RT-PCR ou sorológicos (Figura 15). Na mesma página, após a tabela é exibido um mapa (Indicador Georreferencial de contaminação por zonas) onde o usuário pode obter a quantidade de casos confirmados para a COVID-19 clicando na zona (Norte, Sul, Leste e Oeste) desejada que está em destaque em diferentes cores (Figura 16).

Figura 15 – Tabela do número de casos confirmados em cada bairro

Número de contaminados por Bairros				
ALTO BRANCO - Nº CASO(S): 801	ACÁCIO FIGUEIREDO - Nº CASO(S): 158	ALUIZIO CAMPOS - Nº CASO(S): 130	ANA AMÉLIA - Nº CASO(S): 1	ÁREA/ZONA RURAL - Nº CASO(S): 653
ARAXÁ - Nº CASO(S): 82	BAIRRO UNIVERSITÁRIO - Nº CASO(S): 137	BAIRRO DAS CIDADES - Nº CASO(S): 185	BAIRRO DAS NAÇÕES - Nº CASO(S): 95	BODOCONGÓ - Nº CASO(S): 1256
BELA VISTA - Nº CASO(S): 272	BELO MONTE - Nº CASO(S): 7	CATOLÉ JOSÉ FERREIRA - Nº CASO(S): 72	CAATINGUEIRA - Nº CASO(S): 101	CENTRO - Nº CASO(S): 1983
CASTELO BRANCO - Nº CASO(S): 128	CATOLÉ - Nº CASO(S): 1888	CENTENÁRIO - Nº CASO(S): 493	CHICO MENDES - Nº CASO(S): 2	CINZA - Nº CASO(S): 67
CONCEIÇÃO - Nº CASO(S): 197	CONJUNTO RONALDO CUNHA LIMA - Nº CASO(S): 3	CRUZEIRO - Nº CASO(S): 910	CUITÉS - Nº CASO(S): 145	DINÂMICA - Nº CASO(S): 280
DISTRITO DOS MECÂNICOS - Nº CASO(S): 6	DISTRITO INDUSTRIAL - Nº CASO(S): 67	ESTAÇÃO VELHA - Nº CASO(S): 133	GLÓRIA - Nº CASO(S): 13	GLÓRIA I - Nº CASO(S): 15
GLÓRIA II - Nº CASO(S): 7	ITARARÉ - Nº CASO(S): 321	JURACY PALHANO - Nº CASO(S): 20	JARDIM CONTINENTAL - Nº CASO(S): 65	JARDIM PAULISTANO - Nº CASO(S): 635
JARDIM QUARENTA - Nº CASO(S): 183	JARDIM TAVARES - Nº CASO(S): 275	JARDIM AMÉRICA - Nº CASO(S): 2	JEREMIAS - Nº CASO(S): 438	JOSÉ PINHEIRO - Nº CASO(S): 914
LAURITZEN - Nº CASO(S): 79	LIBERDADE - Nº CASO(S): 1076	LIGEIRO - Nº CASO(S): 71	LOUZEIRO - Nº CASO(S): 9	MIRANTE - Nº CASO(S): 263
MONTE CASTELO - Nº CASO(S): 400	MONTE SANTO - Nº CASO(S): 475	MALVINAS - Nº CASO(S): 1871	MAIOR VENEZIANO - Nº CASO(S): 4	NOVA BRASÍLIA - Nº CASO(S): 384
NOVO BODOCONGÓ - Nº CASO(S): 51	NOVO CRUZEIRO - Nº CASO(S): 176	NOVO HORIZONTE - Nº CASO(S): 38	PRATA - Nº CASO(S): 263	PRES. MÉDICI - Nº CASO(S): 485
PALMEIRA - Nº CASO(S): 365	PALMEIRA IMPERIAL - Nº CASO(S): 45	PEDREGAL - Nº CASO(S): 295	POSTAL SUDOESTE - Nº CASO(S): 122	QUARENTA - Nº CASO(S): 254
RAMADINHA - Nº CASO(S): 258	RAMADINHA I - Nº CASO(S): 35	ROCHA CAVALCANTE - Nº CASO(S): 86	ROSA CRUZ - Nº CASO(S): 400	RESSUREIÇÃO - Nº CASO(S): 34
SÃO JANUÁRIO - Nº CASO(S): 23	SÃO JOSÉ - Nº CASO(S): 306	SANTA ROSA - Nº CASO(S): 707	SANTO ANTÔNIO - Nº CASO(S): 360	SANDRA CAVALCANTE - Nº CASO(S): 288
SANTA CRUZ - Nº CASO(S): 401	SERROTÃO - Nº CASO(S): 591	SÍTIO ESTREITO - Nº CASO(S): 3	SÍTIO LUCAS - Nº CASO(S): 8	TAMBOR - Nº CASO(S): 231

Fonte: MGeoCoV2-CG

Figura 16 – Mapa indicador Georreferencial de contaminação por zonas



Fonte: MGeoCoV2-CG

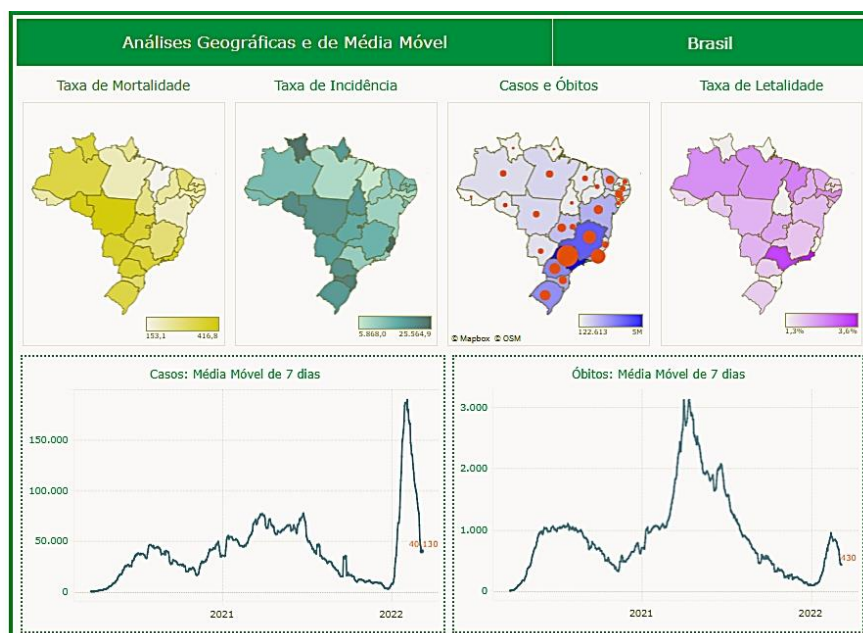
Na terceira página da plataforma (Informações Gerais) está integrada ao Painel CONASS: Conselho Nacional de Secretários de Saúde da Covid 19, que é vinculado as secretarias estaduais de saúde, e dispõe de uma série de informações gerais sobre os quadros da Covid-19 a nível nacional e regional. Nesse painel (Figura 17 e 18) os dados estatísticos por região ou nacional são apresentados de modo dinâmico em gráficos e mapas, trazendo sempre as informações mais atualizadas sobre a disseminação da COVID-19.

Figura 17 – Página de Informações gerais sobre a COVID-19 em nível nacional e regional (Painel CONASS)



Fonte: MGeoCoV2-CG

Figura 18 – Página de Informações gerais sobre a COVID-19 em nível nacional e regional (Painel CONASS)



Fonte: MGeoCoV2-CG

3.3 Escolha dos Pontos de Coleta

O sistema de esgotamento sanitário de Campina Grande-PB é composto por 3 bacias: Depuradora, Bodocongó e Glória (Figura 19). Para a realização do monitoramento do vírus SARS-Cov-2 nas águas residuárias desse município foram selecionados pontos de coleta georreferenciados e em diferentes bacias de esgotamento sanitário.

Figura 19 – Bacias de esgotamento sanitário de Campina Grande - PB



Fonte: Lopes et al., 2016

Um dos objetivos da escolha dos pontos de coleta é que atendam as comunidades das localidades nas quais a população está em condições de alta vulnerabilidade social, habitacional e econômicas. Como exemplo, a Estação Elevatória número 8 localizada no bairro Novo Bodocongó que recebe águas residuárias oriundas especificamente da população da Vila dos Teimosos, uma população extremamente vulnerável.

A princípio foram pontos de coleta a ETE Catingueira, a EE Bodocongó e a ETE Glória. Apesar da ETE Catingueira ser substituída pelo o Interceptor Leste, as amostras que ainda foram coletadas nessa estação também foram analisadas.

3.4 Coleta, Armazenamento da amostra e Concentração do vírus

Nos pontos de coleta, foi adotado o procedimento de amostragem em que as alíquotas de esgoto são obtidas a mais ou menos 2/3 da garganta do medidor Parshall, para que se tenha uma melhor representatividade quanto a regime hidráulico e lâmina do líquido. As coletas foram semanais, no turno matutino durante quatro horas, a cada doze minutos. Totalizando em dez litros de água residuária, realizava-se a homogeneização da amostra e apenas dois litros eram reservados e armazenados em freezer a -20°C.

Após a coleta e armazenamento das amostras, deu-se início à etapa de concentração do vírus. O método utilizado para a concentração e quantificação do novo coronavírus nas amostras de esgoto foi com base nos estudos de Ahmed et al. (2020) através de membranas eletronegativas e ultrafiltração no método de concentração viral e método de detecção através do RT-qPCR direcionado aos genes N, como descrito a seguir.

As amostras foram retiradas do freezer cerca de 12h antes de serem filtradas, ocorrendo o descongelamento em temperatura ambiente. Após descongelamento, adicionou-se 1 mL de MgCl₂ 25 mM em 200 mL da amostra, a fim de auxiliar na amplificação dos ácidos nucleicos, aumentando a atividade enzimáticas nos processos de RT-qPCR (FAPESQ, 2021). O pH, inicialmente em torno de 7,0, foi reduzido entre 3 e 3,5 utilizando-se ácido acético (HAc) 10 M.

As amostras acidificadas foram centrifugadas a 5500 rpm, por 5 minutos, em tubos Falcon de 50 mL com o objetivo de eliminar parte dos sólidos suspensos e, dessa forma, facilitar o processo de filtração. Após a centrifugação, sucedeu a concentração viral em membrana utilizando bomba e sistema de filtração à vácuo, através de membrana Nitrocellulose, HAWPo4700 com poro de 45mm, diâmetro de 47mm (MILLIPORE, Irlanda), previamente autoclavada, carregada eletronegativamente por meio de HAc 1,0 mM e conectada a um suporte de filtro de vidro estéril.

Após a filtração dos 200 mL de amostra, a membrana foi removida do suporte, depois de colmatada, e cortada ao meio. As metades foram colocadas uma sobre a outra, dobradas com o auxílio de uma pinça e de uma espátula e, posteriormente, colocadas em um tubo Eppendorf de 2 mL. Os tubos foram mantidos em freezer (-20 °C) durante cerca de uma semana. A baixa

temperatura teve por finalidade tornar a membrana mais quebradiça, facilitando, assim, a sua posterior fragmentação.

Ao tubo Eppendorf contendo a membrana, foi adicionado 0,7 mL de PBS (tampão fosfato salino, pH 7,2) e fragmentou-se a membrana com o auxílio de uma pinça. Com a membrana já fragmentada, adicionou-se ao tubo Eppendorf 1,0 mL de PBS e 0,05g de glass beads (2-3 mm de diâmetro) e agitou-se o material em vórtex-mixer durante 10 minutos, para favorecer o desprendimento do material genético do vírus da membrana.

Em seguida, centrifugou-se o material a 7000 rpm, por 10 min. Após centrifugação, os sobrenadantes (1,2 a 1,5 mL) foram retirados cuidadosamente e transferidos para um novo tubo Eppendorf de 2 mL, devidamente etiquetado, e finalmente congelados a -20°C para posterior extração do RNA do vírus e amplificação por RT-qPCR.

3.5 Extração do vírus e Análise de RT-qPCR

Transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-qPCR) é um recurso da biologia molecular. A primeira etapa que ocorre na técnica de RT-qPCR é a conversão do RNA extraído da amostra, previamente selecionada, em cDNA. A partir da presença do cDNA, decorrem simultaneamente os processos de amplificação e detecção do material genético amplificado. O processo de detecção é feito por meio de sondas que contêm fluoróforos. Os fluoróforos são moléculas capazes de emitir um sinal fluorescente, permitindo a detecção do produto de PCR – cópias do gene que foi amplificado de maneira exponencial.

Para ser executada a fase de extração de material genético, identificação e quantificação do RNA viral através da técnica RT-qPCR, as análises foram realizadas em parceria com o Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA) na Universidade Federal de Pernambuco (UFPE).

A extração do RNA viral do eluato oriundo da membrana filtrante foi realizada por meio do QIA Symphony® Cabinet SP/AS instrument (Quiagen®, Hilden, Alemanha), utilizando o QIA Symphony® DSP Virus/Pathogen Mini Kit (Quiagen®, Hilden, Alemanha) e seguindo o protocolo do fabricante. Neste caso, aproximadamente, 60 µL de RNA extraído foram coletados. Posteriormente, o extrato de RNA foi congelado a -80°C até a quantificação por Quantitative Reverse Transcription PCR (RT-qPCR).

Para detecção de SARS-CoV-2, foi utilizado o QuantStudio™ 5 Real-Time PCR (Thermo Fisher Scientific®, Waltham, MA) com os primers da Síntese Biotecnologia, IDT,

preconizados pelo CDC (Centers for Disease Control and Prevention) e a sonda TaqMan® referente aos genes N1 e N2 da GoTaq® Probe qPCR and RT-qPCR Systems, marcados na extremidade 5' com a molécula repórter 6-carboxifluoresceína (FAM) e com o inibidor Black Hole Quencher 1 (BHQ-1) (FAPESQ, 2021).

Juntamente com os procedimentos dos kits de primers e sondas foram adicionados 5 µL de RNA viral extraídos das amostras de águas residuárias, totalizando o volume reacional de 20 µL. O cálculo do número de cópias foi realizado de acordo com a curva absoluta de calibração padronizada para uma faixa de Ct entre 40 e 20, correspondendo ao número de cópias de 5 a 100000 unidades virais (genomes copies - gc).

A interpretação dos dados oriundos de RT-qPCR foi realizada por meio dos valores dos Cycles Thresholds (Ct). Valores de Ct menores que 40 foram interpretados como sendo positivos para o SARS-CoV-2, tanto um ou ambos os genes N1 e N2. Valores com Ct maiores que 40 foram identificados como negativos. Por meio da curva de calibração absoluta foram obtidas as concentrações virais expressas em número de cópias genômicas por mL (gc/mL).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Análise RT-qPCR das amostras de Esgoto

Resultados falso-negativos podem ocorrer devido à baixa concentração viral nas amostras ou degradação do material genético ocorrido conveniente ao método de coletas, transporte e manuseio das amostras bem como substâncias interferentes nas águas residuárias.

Durante o período de agosto de 2020 até março de 2021 foram coletadas cerca de 60 amostras de esgotos oriundas dos pontos anteriormente descritos. No entanto, devido a contaminação de algumas amostras, as análises foram realizadas no total de 54 amostras. Através das análises RT-qPCR a Tabela 2 revela o percentual de amostras que testaram positivo para a presença do RNA do SARS-CoV-2 nos esgotos sanitários.

Tabela 2 – Percentual de amostras de esgoto bruto avaliadas que testaram positivo para o RNA do novo coronavírus com cada uma das regiões

ETE	Glória		Elevatória n. 8		EXTRABES		Catingueira	
	N1	N2	N1	N2	N1	N2	N1	N2
Genes								
%	47	13	61	17	60	47	67	17
N. de amostras testadas	15		18		15		6	

Fonte: FAPESQ, 2021.

Percebe-se que os maiores percentuais foram obtidos para o gene N1. Os pontos EXTRABES e Catingueira apresentaram maior percentual para presença do SARSCoV-2 nas águas residuárias, comparado à quantidade de amostras testadas.

Tendo conhecimento que o ponto Catingueira foi substituído pela EXTRABES e só teve 6 amostras testadas, considerou-se que o Interceptor Leste foi o ponto de coleta que apresentou maior quantidade de concentração viral nas águas residuárias. As coletas realizadas na EXTRABES foram iniciadas a partir da 40ª semana epidemiológica, especificamente no início do 4º trimestre de 2020. Cada vírus tem uma única sequência genética, desse modo, os valores de concentração viral expostos na Tabela 3 se referem ao número do vírus SARS-CoV-2 em um litro de amostra coletadas na EXTRABES.

Tabela 3 – Concentração de SARS-CoV-2 a cada litro coletado na EXTRABES

	Semana epidemiológica	N1 - Concentração viral (gc.L⁻¹)
2020	40	2,34E+02
	47	3,70E+02
	48	5,94E+02
	49	1,12E+03
	55	5,90E+02
2021	3	1,56E+04
	4	3,54E+02
	10	1,21E+02
	12	3,41E+02

Fonte: FAPESQ, 2021.

Aplicando a equação (1) foi possível estimar a carga viral a cada semana epidemiológica, tendo conhecimento que a vazão nessa localidade é de 1,74E+07 L.dia⁻¹ (Tabela 4).

$$C = CV * Q_{EXTRABES} \quad (1)$$

- C: Carga (gc.dia⁻¹)
- CV: Concentração viral (gc.L⁻¹)
- Q: Vazão (L.dia⁻¹)

Tabela 4 – Carga viral por dia nas águas residuárias da EXTRABES

	Semana epidemiológica	Carga viral (gc.d⁻¹)
2020	40	4,07E+09
	47	6,44E+09
	48	1,03E+10
	49	1,94E+10
	55	1,03E+10
2021	3	2,72E+11
	4	6,15E+09
	10	2,10E+09
	12	5,94E+09

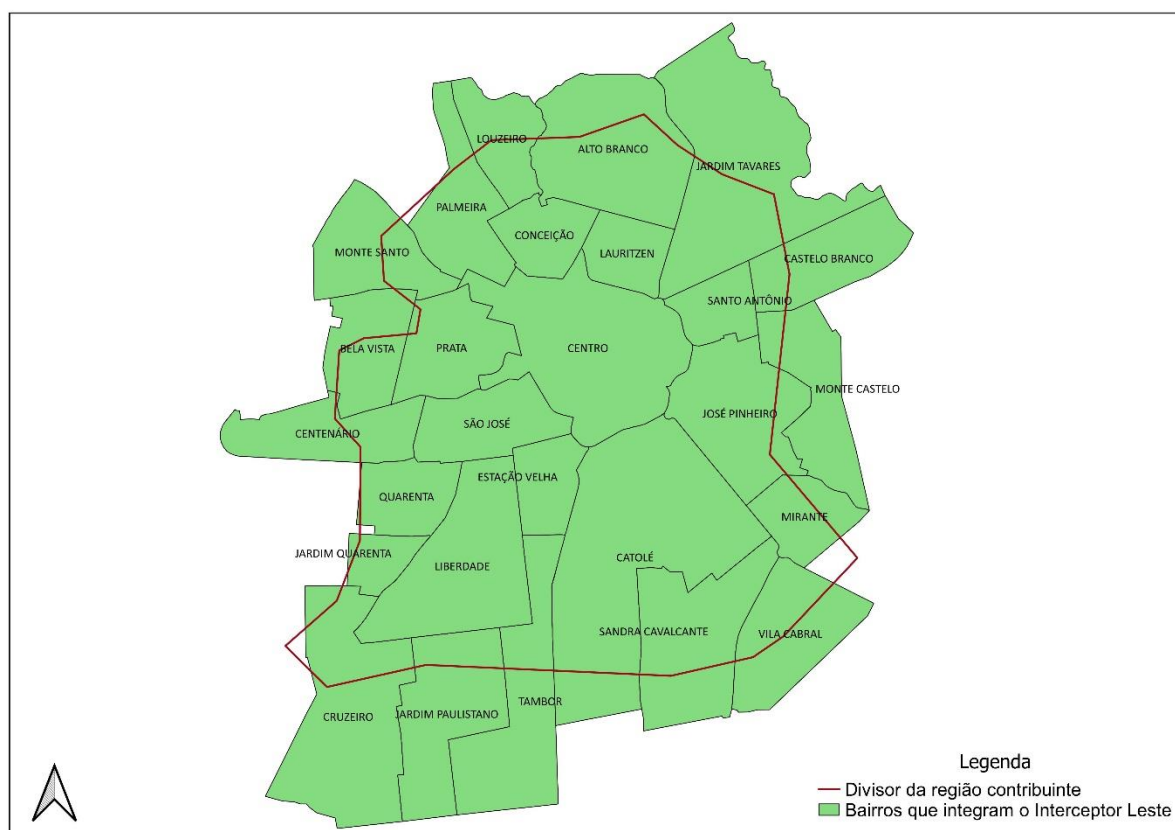
Fonte: FAPESQ, 2021.

De acordo com os cálculos, houve uma maior carga viral nos esgotos na 49ª semana epidemiológica de 2020 e na 3ª semana epidemiológica de 2021. Atingido aproximadamente $2,0E+10$ cópias genômicas por dia.

4.2 Dados da Secretaria de Vigilância Epidemiológica de Campina Grande – PB

Segundo dados da Secretaria de Vigilância Epidemiológica do Município, os bairros que compõem a região sul da cidade e que fazem parte da zona 4 (Figura 20) apresentaram elevada incidência de pessoas infectadas, a exemplo dos bairros do Catolé, Jardim Paulistano e Liberdade, durante todo o período de estudo.

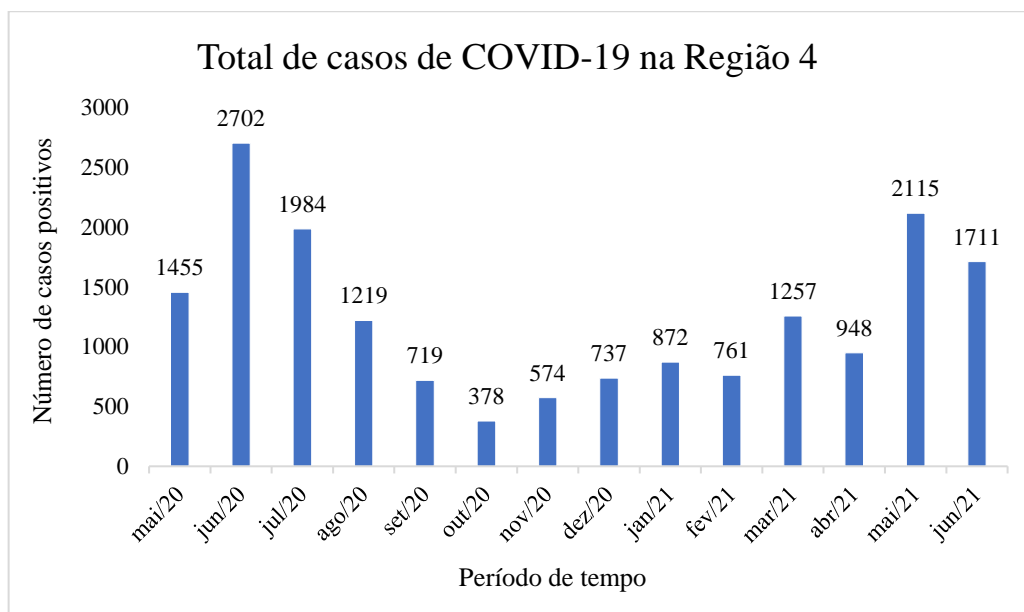
Figura 20 – Bairros que integram o Interceptor Leste



Fonte: Autor, 2022

Através da figura 21 podemos visualizar a totalidade de casos confirmados da doença COVID-19 no Interceptor Leste, somando todos os bairros que fazem parte dessa região.

Figura 21 – Número de casos positivos no Interceptor Leste



Fonte: Secretaria de Vigilância Epidemiológica de Campina Grande – PB

O mês de junho de 2020 apresentou o maior número de casos positivos, atingindo 2.702 pessoas residentes dentro da região 4. Esse período representa da 23^a a 27^a semana epidemiológica.

Foi observado em março de 2021 (9^a – 13^a semana epidemiológica), um alto número de infectados, justificando a alta carga viral nos esgotos coletados na EXTRABES na 12^a semana exibido na Tabela 4. Porém, foi no mês de maio que obteve mais casos confirmados de COVID-19 na região em 2021 de acordo com os dados disponíveis.

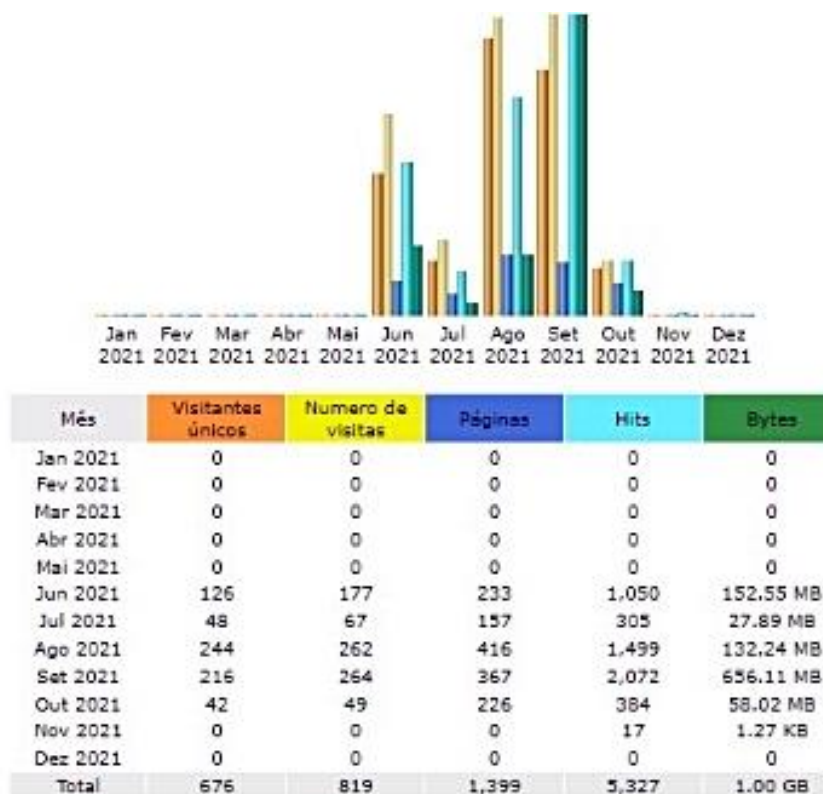
A zona 4 apresenta uma população estimada de 193.526 habitantes e uma área de 25,64 km², compreendendo a maior região estudada. O fato de abranger um maior número de bairros, associado a alta vazão afluyente, pode explicar os altos valores de cerca de 3,0E+10 cópias genômicas por dia (gc/dia) nas águas residuária do interceptor leste.

4.3 Desempenho da plataforma MgeoCov2-CG

De acordo com as estatísticas do Servidor Web do site (<https://mgeocov2cg.herokuapp.com/principal>), foi verificado o desempenho da plataforma. O relatório fornecido pelo Servidor é informado o número de visitas, a quantidade de páginas visitadas, as interações do usuário no website, e a quantidade de dados trocados entre o servidor

e os computadores que acessam a plataforma mensalmente. A figura 22 apresenta o histórico mensal avaliado no período de 2021.

Figura 22 – Estatísticas da plataforma MgeoCov2-CG



Fonte: Servidor Web da plataforma MgeoCov2-CG, 2022

O número de visitas mostra quantas vezes o site foi acessado sem levar em consideração a quantidade de pessoas. Através do resumo de 2021, percebe-se que o mês de setembro teve o maior número de visitas, porém o mês de agosto teve o maior número de visitantes únicos. Ou seja, o mesmo usuário acessou a plataforma mais de uma vez no mês de setembro.

No relatório, também consta que no período de 2021 a primeira visita realizada no website foi em 04 de junho de 2021 e a última visita em 19 de outubro de 2021. Em 2022 ainda não houve visitas, ocasionando uma concepção que os usuários antigos não estão mais temerosos a situação da COVID-19 na cidade devido diminuição de casos, como também a necessidade de a plataforma MgeoCov2-CG ser mais noticiada a população de Campina Grande – PB que ainda não tem conhecimento desse projeto.

4.4 Cenário atual da COVID-19

4.4.1 Brasil

Segundo dados do Conselho Nacional de Secretaria de Saúde (CONASS), o Brasil teve mais de 29 milhões de casos confirmados de COVID-19 e mais de 600 mil óbitos devido as complicações da doença.

No dia 15 de março de 2022 no Brasil, foi registrado no Pará e no Amapá os primeiros casos de pessoas infectadas por uma nova variante do novo coronavírus, a Deltacron. Se trata de uma nova cepa que combina características genéticas das conhecidas Delta e Ômicron.

Antes de chegar no País, a variante Deltacron foi identificada pela primeira vez em janeiro de 2022 em Chipre, uma ilha no Mar Mediterrâneo, e confirmada na França. Foi descoberta por Leondios Kostrikis, chefe do Laboratório Cipriota de Biotecnologia e Virologia Molecular e professor da Universidade de Chipre, que identificou a variante em 25 pessoas com COVID (BURSZTYNSKY, 2022). Ainda não é possível determinar se a Deltacron será mais agressiva do que as demais variantes. No entanto, é importante continuar o uso de máscaras e possuir ciclo vacinal completo para a prevenção da doença.

Atualmente, de acordo com os dados de vacinação mais recente, mais de 158 milhões de pessoas estão totalmente imunizadas possuindo duas doses, totalizando 74,3% da população brasileira.

4.4.2 Paraíba

De acordo com a Secretaria de Estado da Saúde (SES), mais 500 mil paraibanos foram infectados pelo novo coronavírus e confirmados mais de 10 mil óbitos.

Até o momento, foi constatado que 3.420.055 pessoas foram vacinadas com a primeira dose e 3.133.442 completaram os esquemas vacinais, o que representa 77,20% da população total da Paraíba. Do total de vacinados com o esquema primário completo, 3.049.417 tomaram as duas doses e 84.025 utilizaram imunizante de dose única.

5 CONCLUSÕES

O monitoramento da doença COVID-19, via análise de esgotos, é uma intervenção estratégica e alternativa de combate a disseminação do vírus. Com o desenvolvimento de uma plataforma online para disponibilizar informações de forma dinâmica o panorama da doença na cidade, é possível avaliar a distribuição e prevalência do novo coronavírus no município e alertar a população e gestores para tomada de decisões.

Através da técnica RT-qPCR foi analisado as amostras de esgoto, e verificado que o Interceptor Leste (região 4) de estudo apresentou maior concentração de SARS-CoV-2 nos esgotos sanitários. Como também os dados da Secretaria de Vigilância Epidemiológica constatarem altos números de casos confirmados da doença no mês de junho de 2020 e o mês de maio de 2021 na mesma região.

De acordo com os resultados de acessos a plataforma, ainda não é de vasto conhecimento a existência do website MGeoCov2-CG. Por isso a importância de ser mais divulgado a população de Campina Grande – PB, por se tratar de uma ferramenta necessária para a população saber em tempo real a circulação da carga viral nas regiões georreferenciadas.

Apesar do avanço vacinal a COVID-19 ainda se trata do maior problema de saúde pública do mundo. Não se sabe se o vírus persistirá em populações humanas com surtos recorrentes, como gripe ou outras infecções emergentes, mas será um problema que perdurará devido as mutações do novo coronavírus. Por isso a importância de pesquisas que envolvam o monitoramento de doenças através dos esgotos sanitários.

Por fim, o monitoramento do esgoto é uma ferramenta de vigilância epidemiológica imprescindível em epidemias e juntamente com um recurso tecnológico como a plataforma web MGeoCov2-CG, facilita a divulgação do cenário da COVID-19 na cidade através de gráficos, tabelas e mapas georreferenciados de fácil acesso e compreensão de todos.

REFERÊNCIAS

ADIL, M. T.; RAHMAN, R.; WHITELAW, D.; JAIN, V.; AL-TAAN, O.; RASHID, F.; MUNASINGHE, A.; JAMBULINGAM, PERIYATHAMBI. SARS-CoV-2 and the pandemic of COVID-19. **Postgraduate Medical Journal**, v. 97, p. 110-116, 2021. DOI doi:10.1136/postgradmedj-2020-138386.

AGÊNCIA NACIONAL DE ÁGUAS E SANEAMENTO BÁSICO (ANA). Rede Monitoramento Covid Esgotos. Boletim de apresentação. 15p. 2021.

AHMED, W.; BERTSCH, P. M.; BIVINS, A.; BIBBY, K.; FARKAS, K.; GATHERCOLE, A.; HARAMOTO, E. 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, 2020. DOI <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.139960>.

BURSZTYNSKY, J. Cyprus reportedly discovers a Covid variant that combines omicron and delta. **CNBC**, 8 jan. 2022. Disponível em: <https://www.cnbc.com/2022/01/08/cyprus-reportedly-discovers-a-covid-variant-that-combines-omicron-and-delta.html>. Acesso em: 16 mar. 2022.

CERDA, J.; VALDIVIA, G. John Snow, la epidemia de cólera y el nacimiento de la epidemiología moderna. **Revista chilena de infectología**, v. 24, p. 331-334, 2007. DOI <http://dx.doi.org/10.4067/S0716-10182007000400014>.

COMPANHIA DE ÁGUA E ESGOTOS DA PARAÍBA (CAGEPA). Malha de Esgotamento Sanitário de Campina Grande – PB. Arquivo digital. Agosto de 2020.

CONSELHO NACIONAL DE SECRETÁRIOS DE SAÚDE (CONASS). Painel Nacional: Covid-19.

CHEN, Y.; LIU, Q.; GUO, D. Emerging coronaviruses: Genome structure, replication, and pathogenesis. **Journal of Medical Virology**, v. 92, p. 418–423, 2020. DOI 10.1002/jmv.25681.

DING, S.; LIANG, T. J. Is SARS-CoV-2 Also an Enteric Pathogen With Potential Fecal–Oral Transmission? A COVID-19 Virological and Clinical Review. **Gastroenterology**, v. 159, p. 53-61, 2020. DOI <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2020.04.052>.

DOURADO, I. L.; CAETANO, L. A. V.; MARQUES, M. M.; PENNA, U. P. A.; COSTA, C. D. D.; ARRUDA, F. S.; FERREIRA, G. V. S.; LIBERA, L. S. D. Estudo da História Natural da Covid-19 e Epidemiologia da Infecção por Sars-Cov-2: Uma Revisão Descritiva da Literatura. **Brazilian Journal of Surgery and Clinical Research**, v. 33, p. 46-56, Dez 2020.

FOLADORI, P.; CUTRUPI, F.; SEGATA, N.; MANARA, S.; PINTO, F.; MALPEI, F.; BRUNI, L.; LA ROSA, G. SARS-CoV-2 from faeces to wastewater treatment: What do we know? A review. **Science of The Total Environment**, v. 743, 15 nov. 2020. DOI <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.140444>.

FUNDAÇÃO DE APOIO À PESQUISA DO ESTADO DA PARAÍBA (FAPESQ). Monitoramento do Sars-Cov-2 Em Águas Residuárias Produzidas pela População da Cidade

de Campina Grande (PB): Indicadores de Mapeamento Georreferencial e Disseminação da Covid. Relatório Técnico Final. 51p. 2021.

HELLMÉR, M.; PAXEUS, N.; MAGNIUS, L.; ENACHE, L.; ARNHOLM, B.; JOHANSSON, A.; BERGSTROM, T.; NORDER, H. Detection of Pathogenic Viruses in Sewage Provided Early Warnings of Hepatitis A Virus and Norovirus Outbreaks. **Environmental Microbiology**, v. 80, 1 nov. 2014. DOI <https://doi.org/10.1128/AEM.01981-14>.

JOHNSON, R.; MULLER, C. J. F.; GHOOR, S.; LOUW, J.; ARCHER, E.; SURUJAL-NAICKER, S.; BERKOWITZ, N. et al. Qualitative and quantitative detection of SARS-CoV-2 RNA in untreated wastewater in Western Cape Province. **South African Medical Journal**, v. 111, p. 198-202, 2021. DOI <https://doi.org/10.7196/SAMJ.2021.v111i3.15154>.

KEVADIYA, B. D.; MACHHI, J.; HERSKOVITZ, J.; OLEYNIKOV, M. D.; BLOMBERG, W. R.; BAJWA, NEHA; SONI, D. et al. Diagnostics for SARS-CoV-2 infections. **Nature Materials**, v. 20, p. 593-605, 2021. DOI [10.1038/s41563-020-00906-z](https://doi.org/10.1038/s41563-020-00906-z).

KHAN, M.; ADIL, S. F.; ALKHATHLAN, H. Z.; TAHIR, M. N.; SAIF, S.; KHAN, M.; KHAN, S. T. COVID-19: A Global Challenge with Old History, **Epidemiology and Progress So Far. Molecules**, v. 26, 2020. DOI <https://dx.doi.org/10.3390/molecules26010039>.

LAUXMANN, M. A.; SANTUCCI, N. E.; AUTRÁN-GÓMEZ, A. N. The SARS-CoV-2 Coronavirus and the COVID-19 Outbreak. **International Brazilian Journal of Urology**, v. 46, p. 6-18, 5 jul. 2020. DOI [10.1590/S1677-5538.IBJU.2020.S101](https://doi.org/10.1590/S1677-5538.IBJU.2020.S101). Disponível em <<https://www.scielo.br/j/ibju/a/ymkTGVgBVd3ZhQLdVgMVQsQ/?format=pdf&lang=en>> Acesso em: 10 jan. 2022.

LOPES, W. S.; RODRIGUES, A. C. L.; FEITOSA, P. H. C.; COURA, M. A.; OLIVEIRA, R.; BARBOSA, D. L. Determinação de um índice de desempenho do serviço de esgotamento sanitário. Estudo de caso: cidade de Campina Grande, Paraíba. **Revista Brasileira de Recursos Hídricos**, v. 21, p. 01-10, 2016. DOI <http://dx.doi.org/10.21168/rbrh.v21n1.p1-10>.

LORENZO, M.; PICÓ, Y. Wastewater-based epidemiology: current status and future prospects. **Current Opinion in Environmental Science & Health**, v. 09, p. 77-84, 2019. DOI <https://doi.org/10.1016/j.coesh.2019.05.007>.

MAINARDI, P. H.; BIDOIA, E. D. Challenges and emerging perspectives of an international SARS-CoV-2 epidemiological surveillance in wastewater. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 93, 2021. DOI [10.1590/0001-3765202120210163](https://doi.org/10.1590/0001-3765202120210163).

MEDEMA, G.; HEIJNEN, L.; ELSINGA, G.; ITALIAANDER, R.; BROUWER, A. Presence of SARS-Coronavirus-2 RNA in Sewage and Correlation with Reported COVID-19 Prevalence in the Early Stage of the Epidemic in The Netherlands. **Environmental Science e Technology Letters**, v. 08, 2020. DOI <https://dx.doi.org/10.1021/acs.estlett.0c00357>. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7254611/pdf/ez0c00357.pdf>> Acesso em: 21 fev. 2022.

MOTA, C. R.; BRESSANI RIBEIRO, T.; ARAUJO, J. C.; LEAL, C. D.; LEROY FREITAS, D.; MACHADO, E. C.; ESPINOSA, M. F. et al. Assessing spatial distribution of COVID

prevalence in Brazil using decentralised sewage monitoring. **Water Research**, v. 202, 1 set. 2021. DOI <https://doi.org/10.1016/j.watres.2021.117388>.

MESSINA, S. Monitoring Human Waste: A Non-Invasive Early Warning Tool. **Voices in Bioethics**, v. 06, 2020. DOI <https://doi.org/10.7916/vib.v6i.6406>.

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE (OPAS). Transmissão do SARS-CoV-2: implicações para as precauções de prevenção de infecção. Resumo científico. 10p, 9 de julho de 2020.

POLO, D.; QUINTELA-BALUJA, M.; CORBISHLEY, A.; JONES, D. L.; SINGER, A. C.; GRAHAM, D. W.; ROMALDE, J. L. Making waves: Wastewater-based epidemiology for COVID-19 - approaches and challenges for surveillance and prediction. **Water Research**, v. 212, 2020. DOI [10.1016/j.watres.2020.116404](https://doi.org/10.1016/j.watres.2020.116404).

RUME, T.; ISLAM, S. M. Environmental effects of COVID-19 pandemic and potential strategies of sustainability. **Heliyon**. v. 06, 2020. DOI <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e04965>. Disponível em <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2405844020318089>> Acesso em: 10 jan. 2022.

SECRETARIA DE ESTADO DA SAUDE (SES). Covid-19 na Paraíba.

SOARES, A. F. S.; NUNES, B. C. R.; COSTA, F. C. R.; SILVA, L. F. M.; SOUZA, L. P. S. Sewage-Based Epidemiology and Covid-19 in Brazil: A Necessary Discussion. **International Journal of Development Research**, v. 10, p. 36476-36482, 2020.

SODRÉ, F. F.; BRANDÃO, C. C. S.; VIZZOTTO, C. S.; MALDANER, A. O. Epidemiologia do Esgoto como Estratégia para Monitoramento Comunitário, Mapeamento de Focos Emergentes e Elaboração de Sistemas de Alerta Rápido para Covid-19. **Química Nova**, v. 43, p. 515-519, 2020. DOI <http://dx.doi.org/10.21577/0100-4042.20170545>.

SOUSA, J. T.; LEITE, V. D.; LOPES, W. S.; MAIA, R. T. Plataforma de Mapeamento Georeferencial para Monitoramento da Disseminação da Covid-19 em Águas Residuárias (MGeoCoV2). Patente: Programa de Computador. Número do registro: 512021001720-0, data de registro: 20/03/2021, título: "Plataforma de Mapeamento Georeferencial para Monitoramento da Disseminação da Covid-19 em Águas Residuárias (MGeoCoV2). 2021. Instituição de registro: INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial.

WANG, D.; HU, B.; HU, C.; ZHU, F.; LIU, X.; ZHANG, J.; WHANG, B. et al. Clinical Characteristics of 138 Hospitalized Patients With 2019 Novel Coronavirus-Infected Pneumonia in Wuhan, China. **JAMA**, v. 323, p. 1061-1069, 2020. DOI [10.1001/jama.2020.1585](https://doi.org/10.1001/jama.2020.1585).

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Convened Global Study of Origins of SARS-CoV-2: China Part. China: WHO. 120p, 14 January-10 February 2021.

WURTZER, S.; MARECHAL, V.; MOUCHEL, J. M.; MADAY, Y.; TEYSSOU, R.; RICHARD, E.; ALMAYRAC, J. L.; MOULIN, L. Evaluation of lockdown effect on SARS-CoV-2 dynamics through viral genome quantification in waste water, Greater Paris, France, 5

March to 23 April 2020. **Eurosurveillance**, v. 25, Dez 2020. DOI 10.2807/1560-7917.ES.2020.25.50.2000776.

ZHOU, P.; YANG, X. L.; WANG, X. G.; HU, B.; ZHANG, L.; ZHANG, W.; SI, H. R. A. et al. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. **Nature**, v. 579, p. 270-273, 2020. DOI <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2012-7>.