



## VII-1626 - PROSPECÇÃO E MONITORAMENTO EPIDEMIOLÓGICO DE PATÓGENOS VIRAIS DE INTERESSE CLÍNICO NO ESGOTO DA CIDADE DE CURITIBA E REGIÃO METROPOLITANA/PR POR MEIO DE SEQUENCIAMENTO DE ÚLTIMA GERAÇÃO

### **Emanuel Razzolini** <sup>(1)</sup>

Biólogo, Pós doutorando vinculado ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia, Departamento de Patologia Básica Setor de Ciências Biológicas Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Brasil.

### **Selma Aparecida Cubas** <sup>(2)</sup>

Engenheira Civil pela Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUC). Doutora em Engenharia Civil com ênfase em Hidráulica e Saneamento pela Escola de Engenharia de São Carlos (EESC/USP). Professora adjunta do Departamento de Hidráulica e Saneamento da Universidade Federal do Paraná (UFPR).

### **Cesar Mota** <sup>(3)</sup>

Professor Associado. Coordenador - Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia - Estações Sustentáveis de Tratamento de Esgoto (<https://etes-sustentaveis.org>). Rede Monitoramento Covid Esgotos (<https://www.gov.br/ana/pt-br/assuntos/acontece-na-ana/monitoramento-covid-esgotos>).

### **Vania Aparecida Vicente** <sup>(4)</sup>

Líder do projeto Genoma de Leveduras Negras no Paraná e membro da equipe. Coordenadora e Responsável pela implantação do Centro de Coleções Microbiológicas da Rede Paranaense Taxonline (CMRP/Taxonline).

### **Fernanda Janaina Oliveira** <sup>(5)</sup>

Gerência de Pesquisa e Inovação - GPIN / Diretoria de Operações / SANEPAR.

**Endereço** <sup>(1)</sup>: Rua Cel. Francisco H. dos Santos – Jardim das América – Curitiba – Paraná - CEP: 81531-990 - Brasil - E-mail: [erazzolini@gmail.com](mailto:erazzolini@gmail.com).

## **RESUMO**

A pandemia do SARS-COV-2 trouxe um impacto significativo no sistema de saúde, acarretando mais de 380 milhões de casos e cinco milhões de mortes no mundo em um curto período. Adicionalmente, o surgimento de variantes de preocupação do vírus (VOC) representa um risco para a saúde pública. Neste contexto, o monitoramento da evolução genética do SARS-CoV-2 por sequenciamento de nova geração (NGS) tem permitido o planejamento de medidas de contenção do patógeno. A vigilância epidemiológica baseada no uso do NGS em amostras de esgotos se revela uma metodologia robusta para examinar a expansão do vírus em centros urbanos, além de permitir a detecção de múltiplas variantes simultaneamente, e até mesmo à quantificação relativa das VOCs em circulação, o que pode auxiliar na efetividade das ações governamentais em saúde pública. Neste contexto, o objetivo principal do projeto é obter sequências do SARS-CoV-2 para avaliar a circulação do vírus e a chegada precoce de VOCs no esgoto de Curitiba e região metropolitana. Para isto diferentes estratégias de sequenciamento foram adotadas para identificar e quantificar as variantes do SARS-COV-2 em amostras obtidas no projeto em desenvolvimento pela Rede Covid Esgoto (<https://www.gov.br/ana/pt-br/assuntos/acontece-na-ana/monitoramento-covid-esgotos>). O desenvolvimento deste projeto inferiu dados para avaliação epidemiológica da doença Covid-19 em Curitiba e região metropolitana, contribuindo na elucidação da circulação do vírus e detecção de novas VOCs.

**PALAVRAS-CHAVE:** SARS-CoV-2, COVID-19, esgoto, águas residuais, Curitiba.

## INTRODUÇÃO

Desde a identificação do SARS-CoV-2 em 2019, mais de 630 milhões de casos e 6,6 milhões de mortes foram notificados durante o período de pandemia (OMS, 2022). Atualmente, o surgimento de variantes de preocupação (VOC) do vírus ainda representa um risco para a saúde pública. No final de 2021 a VOC Omicron e suas subvariantes ganharam relevância devido à alta transmissibilidade apresentada (OMS, 2022). Neste contexto, o monitoramento da evolução genética do SARS-CoV-2 por sequenciamento de nova geração (NGS) tem permitido o planejamento de medidas de contenção do patógeno. Com mais de 680 mil óbitos no país, existe uma urgência na produção de informações para auxiliar medidas de contenção da doença. Uma vez que o vírus pode ser excretado nas fezes, tem sido demonstrado que a quantificação da carga viral em esgotos é diretamente proporcional ao número de pessoas infectadas em datas subsequentes (Ahmed et al., 2020; Medema et al., 2020; Gerrity et al. 2021; Boletim Rede Covid-Esgotos-[www.gov.br/ana/pt-br](http://www.gov.br/ana/pt-br)). Além disso, com auxílios de dados oriundos do esgoto tem sido possível identificar e quantificar outras doenças emergentes/ re-emergentes, como Varíola M (de Jonge et al., 2022), Sarampo (Benschop et al., 2017), Poliomielite (Troy et al., 2011) e Enterovírus E68 (McAllister et al., 2015) que podem entrar na lista de preocupação das Secretarias de Saúde locais e até mesmo da OMS.

Neste contexto, a vigilância epidemiológica baseada nos esgotos se mostrou eficaz para examinar a expansão de doenças em centros urbanos, o que pode subsidiar as ações em saúde pública. No Paraná mais de 2,7 milhões de infecções e mais de 45 mil mortes foram notificadas até novembro de 2022 (SSE/PR, 2022). Embora esses números representem aproximadamente 7,86% dos casos registrados no Brasil, apenas pouco mais de 12 mil genomas foram produzidos e depositados no GISAIID ([gisaid.org](http://gisaid.org)). Tais dados demonstram a necessidade urgente do estabelecimento de ferramentas adicionais para ampliar a capacidade do monitoramento epidemiológico da doença. O sequenciamento completo do genoma das amostras humanas, considerado padrão-ouro para identificar as variantes apresenta, além do alto custo, dificuldades amostrais, que podem ser contornados por meio da utilização de amostras ambientais, como as de esgoto possibilitando detectar e quantificar múltiplas variantes simultaneamente de forma randomizada (Kampf et al., 2020; Medema et al., 2020).

## OBJETIVOS

Neste contexto, o objetivo deste trabalho tem sido desenvolver o monitoramento em tempo real da circulação de vírus de interesse clínico em águas residuais de Curitiba e região metropolitana, em parceria com a Companhia de Saneamento do Paraná (SANEPAR) e Rede Covid Esgotos ([www.gov.br/ana/pt-br](http://www.gov.br/ana/pt-br)). Adicionalmente, vem sendo realizado o sequenciamento de nova geração das amostras de material genético do vírus SARS-CoV2 obtidas a partir de esgoto da região em estudo.

O conhecimento sobre presença dos diferentes agentes virais analisados (SARS-CoV2, Sarampo, Poliomielite, Varíola M e enterovírus E68) será utilizado na prospecção sobre a origem e/ou existência de reservatórios não humanos dos vírus em estudo, em conformidade com as diretrizes da ODS ([odsbrasil.gov.br](http://odsbrasil.gov.br)), visando o desenvolvimento de uma ferramenta adicional e robusta para o monitoramento de recursos hídricos.

## METODOLOGIA UTILIZADA

A partir amostras de águas residuais obtidas através da SANEPAR e conjunto, com amostras gentilmente cedidas pelo Projeto Rede Covid Esgotos, têm sido realizadas quantificações da carga viral de vírus de interesse clínico tais como SARS-CoV2 e outros agentes emergentes e reemergentes em circulação em Curitiba e região Metropolitana utilizando a técnica de qPCR. Para isto, tem sido aplicado marcadores específicos tais como P1, P2 e P3 (Troy et al., 2011), N1 (Benschop et al., 2017), G2R (de Jonge et al., 2022) e D68 (McAllister et al., 2015) para vírus causadores de doenças emergentes/reemergentes em circulação na região estudada.

Além disso, com objetivo de identificar as linhagens de SARS-CoV2 que circularam em Curitiba e região Metropolitana durante o período da pandemia, foram adotadas metodologias de sequenciamento de nova geração nas plataformas Illumina e Nanopore com protocolos específicos para detecção das variantes e

sequenciamento genômico dessas linhagens. Tais dados têm sido aplicados para elucidação da epidemiologia da doença (Karthikeyan et al., 2022).

### RESULTADOS OBTIDOS OU ESPERADOS

Com auxílio das plataformas de sequenciamento de nova geração tem sido identificadas as linhagens de SARS-CoV2, inclusive as VOCs, em circulação durante a pandemia na região da grande Curitiba. A partir destes resultados, um método de modelagem e processamento de dados vem sendo desenvolvido visando elucidação da circulação do SARS-CoV-2 durante o período da pandemia, em que houve coleta de dados pela Rede Covid Esgotos, e do acompanhamento de novas variantes do vírus por meio de sequenciamento (resultados ainda em andamento). Esta metodologia também vem sendo empregada para outros agentes virais, promovendo a ampliação da capacidade de monitoramento epidemiológico de doenças infecciosas a partir do esgoto. Em amostra de 25 de outubro de 2022, além de alta proporção das variantes BA.5\* previamente relatadas em amostras clínicas, foram realizados os primeiros registros para a região da linhagem BQ.1, atualmente dominante no Brasil, além da presença das linhagens XBB.1 e outras. Além disso, foi confirmada a detecção por qPCR de Varíola M, Sarampo, enterovírus E68 e Poliomielite em amostras de novembro de 2022. Dentro deste contexto, a partir do dados encontrados durante o monitoramento extensivo realizado para o vírus SARS-CoV2 (Rede Covid Esgotos) será possível estabelecer uma ferramenta robusta que poderá ser aplicada na prospecção de outras doenças infecciosas emergentes/reemergentes, fornecendo subsídios para as autoridades no estabelecimento de ações visando o controle de doenças, visando o monitoramento de recursos hídricos em conformidade com as diretrizes da ODS (Objetivos de Desenvolvimento Sustentável: <https://odsbrasil.gov.br>).

Os resultados de sequenciamento de amostras previamente obtidas pela Rede Covid Esgotos sugerem que em outubro de 2022 a variante Omicron BA.5.2.1 foi a variante predominante em circulação nas águas residuais de Curitiba, seguida da linhagem Omicron BA.5.1, BA.5 e outras linhagens em menor prevalência (Figura 1). Além dos resultados obtidos até aqui, foi possível amplificar outros patógenos que estes estão em circulação na população de Curitiba em níveis detectáveis em amostras de águas residuais da região. E assim, espera-se que com o avanço das análises seja possível fornecer base de dados fundamentais para entender a dinâmica passada, presente e futura da circulação do Sars-CoV2 na região de Curitiba/PR, bem como a circulação de outros patógenos de interesse em saúde pública.

### Prevalência das Variantes

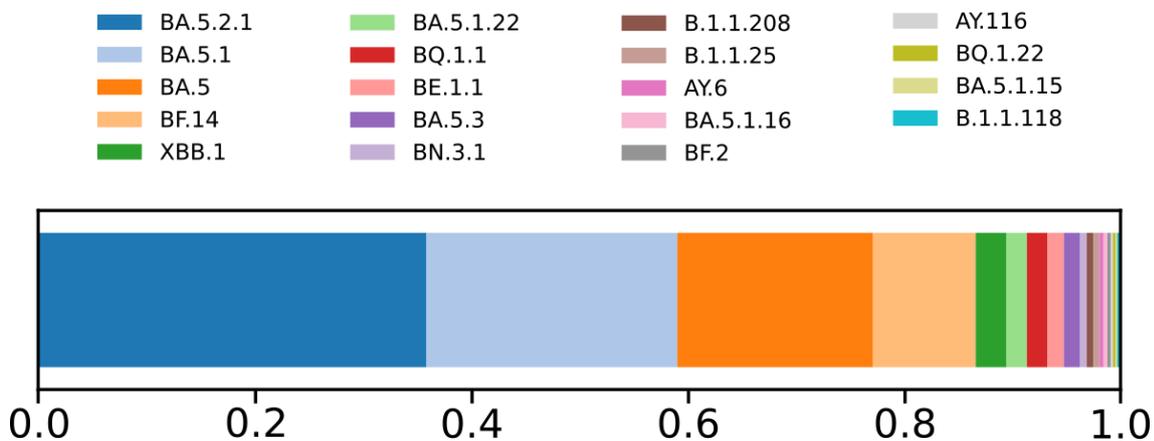


Figura 1: PREVALÊNCIA DAS VARIANTES DE SARS-CoV2 EM CIRCULAÇÃO NAS ÁGUAS RESIDUAIS DE CURITIBA/PR EM OUTUBRO/2022, com base em sequenciamento genético a partir da plataforma Illumina.

## CONCLUSÕES/RECOMENDAÇÕES

Os resultados apresentados até então sugerem que apesar da dominância em circulação das variantes Omicron outras linhagens ainda estão circulando na população local. Da mesma forma, por meio de rtPCR foi possível identificar a presença de outros patógenos de interesse em saúde pública, tais como Varíola M, Sarampo, Poliomielite e Enterovírus E68. Além disso, com os resultados esperados será possível criar uma rede de vigilância epidemiológica baseada em análises das águas residuais de Curitiba e Região Metropolitana possibilitando a identificação de patógenos emergentes ou reemergentes ainda com baixa ocorrência na população, auxiliando o monitoramento epidemiológico e fomentando políticas de saúde pública e auxiliando no controle de doenças.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Ahmed, W.; Bertsch, P.M.; Bivins, A.; Bibby, K.; Farkas, K.; Gathercole, A.; Haramoto, E. ... Kitajima, M; (2020a). Comparison of vírus concentration methods for the RT-qPCR-based recovery of murine hepatitis vírus, a surrogate for SARS-CoV-2 from untreated wastewater. *Science of the Total Environment*, 739, 139960
2. Benschop, K. S., van der Avoort, H. G., Jusic, E., Vennema, H., van Binnendijk, R., & Duizer, E. (2017). Polio and measles down the drain: environmental enterovirus surveillance in the Netherlands, 2005 to 2015. *Applied and environmental microbiology*, 83(13), e00558-17
3. de Jonge, E., Peterse, C., Koelewijn, J., van der Drift, A. M., van der Beek, R., Nagelkerke, E., & Lodder, W. (2022). The Detection of Monkeypox Virus DNA in Wastewater Samples in the Netherlands
4. Gerrity, D.; Papp, K.; Stoker, M.; Sims, A.; Frehner, W. (2021). Early pandemic wastewater surveillance of SARS-CoV-2 in Southern Nevada: Methodology, occurrence, and incidence/prevalence considerations. <https://doi.org/10.1016/j.wroa.2020.100086>
5. Kampf, G.; Todt, D.; Pfaender, S.; Steinmann, E. (2020). Persistence of coronaviruses on inanimate surfaces and their inactivation with biocidal agents. *Journal of Hospital Infection*, 104(3): 246–251
6. Karthikeyan, S.; Ronquillo, N.; Belda-Ferre, P.; Alvarado, D.; Javidi, T.; Longhurst, C. A.; Knight, R. (2021). High-Throughput Wastewater SARS-CoV-2 Detection Enables Forecasting of Community Infection Dynamics in San Diego County. *MSystems*, 6(2): 1–6. <https://doi.org/10.1128/mSystems.00045-21>
7. Medema, G.; Heijnen, L.; Elsinga, G.; Italiaander, R.; Brouwer, A. (2020). Presence of SARS-Coronavírus-2 RNA in Sewage and Correlation with Reported COVID-19 Prevalence in the Early Stage of the Epidemic in The Netherlands. *Environmental Science & Technology Letters*, 7(7): 511–516
8. OMS. WHO Director-General's opening remarks at the media briefing on COVID-19. (2022). Disponível em: <<https://www.who.int>>. Acesso em: 29 nov. 2022.
9. Troy, S. B., Ferreyra-Reyes, L., Huang, C., Mahmud, N., Lee, Y. J., Canizales-Quintero, S., ... & Maldonado, Y. (2011). Use of a novel real-time PCR assay to detect oral polio vaccine shedding and reversion in stool and sewage samples after a Mexican national immunization day. *Journal of clinical microbiology*, 49(5), 1777-1783.
10. Wilson, G., Bryan, J., Cranston, K., Kitzes, J., Nederbragt, L., & Teal, T. K. (2017). Good enough practices in scientific computing. *PLoS computational biology*, 13(6), e1005510.