

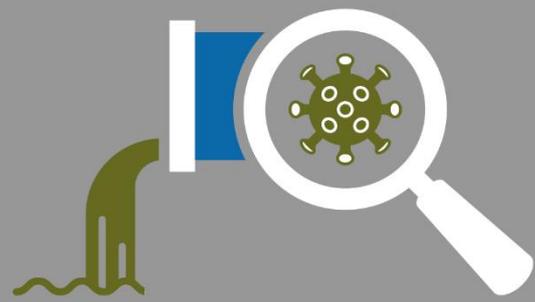


MONITORAMENTO

BOLETIM TEMÁTICO No. 2

Quantificação do material genético do novo coronavírus: sensibilidade dos ensaios moleculares e correlação das cargas virais com o número de casos de COVID-19

(Período: 4 de maio a 03 de julho de 2020)



MONITORAMENTO COVID ESGOTOS



Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia – INCT ETEs Sustentáveis

etes-sustentaveis.org

Agência Nacional de Águas – ANA

www.ana.gov.br

Companhia de Saneamento de Minas Gerais – COPASA

www.copasa.com.br

Secretaria de Estado da Saúde de Minas Gerais – SES

www.saude.mg.gov.br

Instituto Mineiro de Gestão das Águas – IGAM

www.igam.mg.gov.br

Equipe Técnica

ANA

Supervisão do Projeto

Sérgio Ayrimoraes

Equipe Técnica

Carlos Perdigão

Diana Leite

Flávia Pierry

Flávio Tröger

Marcus Fückner

Thamiris Lima

Thiago Fontenelle

INCT ETEs Sustentáveis

Coordenação Geral

Carlos Chernicharo

Coordenação Executiva

Juliana Calábria

Cesar Mota

Equipe Técnica

Ayana Lemos

Bernardo Borges de Lima

Gabriel Tadeu

Izabel Chiodi

Lariza Azevedo

Lívia Lobato

Lucas Chamhum

Lucas Vassalle

Matheus Pascoal

Rafael Pessoa

Thiago Bressani

Thiago Morandi

Equipe de Laboratório

Cíntia Leal

Deborah Leroy

Elayne Machado

Luyara Fernandes

Maria Fernanda Espinosa

Thiago Leão

COPASA

Supervisão do Projeto

Marcus Tullius

Equipe Técnica

David Bichara

Jorge Luiz Borges

Gilberto Gomes

Ronaldo de Melo

Sérgio Neves

Solange da Costa

SES

Supervisão do Projeto

Filipe Laguardia

Equipe Técnica

Beatriz Carvalho

Dario Ramalho

IGAM

Supervisão do Projeto

Marília Melo

Equipe Técnica

Katiane Cristina de Brito Almeida

Valquíria Moreira

Equipe Editorial

Supervisão editorial

Agência Nacional de Águas

Elaboração dos originais

INCT ETEs Sustentáveis

Revisão dos originais

Agência Nacional de Águas

Projeto gráfico, editoração e capa

Monumenta Comunicação e Estratégias Sociais

Mapas temáticos

INCT ETEs Sustentáveis

O projeto piloto: *Deteção e quantificação do novo coronavírus em amostras de esgoto nas cidades de Belo Horizonte e Contagem - Monitoramento COVID Esgotos* - é coordenado e executado pelo Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia Estações de Tratamento de Esgotos Sustentáveis (INCT ETEs Sustentáveis) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), com o apoio técnico e financeiro da Agência Nacional de Águas (ANA) e apoio técnico da Companhia de Saneamento de Minas Gerais (COPASA), da Secretaria de Estado de Saúde de Minas Gerais (SES) e do Instituto Mineiro de Gestão das Águas (IGAM). Gestão Financeira: Fundação Christiano Ottoni.

As ilustrações, tabelas e gráficos sem indicação da fonte foram elaborados pelo INCT ETEs Sustentáveis. Todos os direitos reservados. É permitida a reprodução deste texto e dos dados nele contidos, desde que citada a fonte. Reproduções para fins comerciais são proibidas. Disponível também em: <http://www.ana.gov.br>.

APRESENTAÇÃO

O plano de comunicação estabelecido no âmbito do *Projeto-piloto: Detecção e quantificação do novo coronavírus em amostras de esgoto nas cidades de Belo Horizonte e Contagem* contempla, além de outras iniciativas, a publicação de dois tipos de Boletins: os de Acompanhamento e os Temáticos. Enquanto os Boletins de Acompanhamento têm por objetivo a divulgação regular dos resultados de monitoramento do novo coronavírus nas amostras de esgoto coletadas em diferentes pontos do sistema de esgotamento sanitário de Belo Horizonte e parte de Contagem, os Boletins Temáticos buscam abordar, em maior profundidade, outras variantes do estudo, a exemplo da ocorrência do vírus em outras amostras de interesse, como as resultantes do monitoramento das estações de tratamento de esgoto (ETEs) e das calhas dos ribeirões Arrudas e Onça, assim como dos hospitais.

O *Projeto-piloto Covid Esgotos* é uma iniciativa conjunta da Agência Nacional de Águas (ANA) e do Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Estações Sustentáveis de Tratamento de Esgoto (INCT ETEs Sustentáveis - UFMG), em parceria com a Companhia de Saneamento de Minas Gerais (COPASA), o Instituto Mineiro de Gestão das Águas (IGAM) e a Secretaria de Estado de Saúde de Minas Gerais (SES).

Este Boletim Temático N.2 visa apresentar uma análise das concentrações do material genético do novo coronavírus em amostras de esgoto coletadas na entrada das ETEs de Belo Horizonte (Arrudas e Onça), abordando dois temas principais: *i) Detecção do material genético do novo coronavírus a partir de duas regiões-alvo do genoma do SARS-CoV-2 (regiões N1 e N2): avaliação da sensibilidade e padrão de resposta dos alvos; e ii) Correlação das cargas virais determinadas para as regiões genômicas N1 e N2 com o número de casos confirmados para a Covid-19 em Belo Horizonte, no período de 4 de maio a 03 de julho de 2020 (equivalente às semanas epidemiológicas 19 a 27).*

A detecção e quantificação do RNA do novo coronavírus em esgoto é realizada através da técnica de transcrição reversa seguida de reação em cadeia pela polimerase quantitativa em tempo real (RT-qPCR), usando protocolo recomendado pelo Centro de Controle e Prevenção de Doenças dos Estados Unidos (CDC-EUA) desenvolvido para amostras clínicas. O protocolo recomenda a utilização de dois ensaios de RT-qPCR (N1 e N2), que têm como alvo regiões diferentes do gene que codifica a proteína do nucleocapsídeo (N) do vírus SARS-CoV-2 (ver explicação detalhada no quadro ao final deste boletim). Esses dois ensaios são sensíveis e específicos para o novo coronavírus e indicados pelo CDC-EUA para o diagnóstico clínico. Os resultados são expressos em *número de cópias do material genômico do vírus por mL* de esgoto, nesse Boletim expressas abreviadamente em “cópias/mL”.

Devido ao rigor exigido para o uso da técnica de RT-qPCR aplicada ao diagnóstico clínico (Bustin *et al.* 2009), o resultado é considerado positivo para a presença do genoma do SARS-CoV-2 (confirmação da infecção) apenas quando ambos os ensaios (N1 e N2) amplificam o sinal genético ultrapassando o limiar de detecção antes de 40 ciclos da reação. Quando somente um dos alvos amplifica, ou isso ocorre após 40 ciclos, os resultados são considerados inconclusivos. No uso da técnica RT-qPCR em estudos com amostras ambientais (como esgoto ou água), os principais parâmetros que geram preocupação quanto aos métodos analíticos são a *sensibilidade* e *especificidade* dos ensaios, pois amostras ambientais costumam ter pequenas quantidades de material genômico viral e grande diversidade viral, em relação às amostras clínicas. A *sensibilidade* refere-se ao número

mínimo de cópias que pode ser medido com precisão em uma amostra, ou seja, o número mínimo de cópias amplificadas na reação e, conseqüentemente, a menor concentração que pode ser detectada na amostra em número de cópias por mL. Já a *especificidade* refere-se à capacidade do método de detectar a sequência alvo adequada em detrimento de outros alvos não específicos também presentes na amostra (por exemplo, os outros vírus presentes na amostra, que não o vírus SARS-CoV-2 causador da Covid-19, e que poderiam interferir no resultado). Destaca-se que ambos os alvos são 100% específicos para a detecção do SARS-CoV-2 (Nalla *et al.*, 2020).

No presente projeto foi adotada a estratégia de analisar todas as amostras usando ambos os ensaios (N1 e N2) em triplicatas técnicas. São considerados como resultados positivos aqueles em que ocorre a amplificação de no mínimo duas réplicas. Como ainda não está claro se uma região alvo do genoma pode ser considerada melhor que a outra, são exploradas neste boletim as diferenças encontradas nos resultados obtidos com ambos os ensaios (N1 e N2). Os resultados são comparados com estudos internacionais e discutidos a seguir.

RESULTADOS

1. Concentrações do material genético viral (RNA) do novo coronavírus: Explorando a sensibilidade de cada região alvo (N1 e N2).

Neste boletim são apresentadas as concentrações do RNA viral nas amostras de esgoto bruto afluente às ETEs Arrudas e Onça por cada um dos ensaios (N1 e N2), ao longo de nove semanas consecutivas de monitoramento (correspondentes às semanas epidemiológicas 19 a 27). Os resultados são primeiramente apresentados sob a forma de um gráfico box-plot (Figura 1). Nota-se que, apesar dos resultados para N1 e N2 guardarem certa similaridade em relação às faixas de concentração observadas, é nítido que concentrações menores foram detectadas prioritariamente com o ensaio N1 (75% dos dados para N1 são superiores a 0,2 cópias/mL, ao passo que para N2, 75% dos dados são superiores a 2,0 cópias/mL).

Os valores medianos determinados para as ETEs Arrudas e Onça foram de 1,3 e 1,8 cópias/mL para o alvo N1, respectivamente, e de 7,5 e 4,8 cópias/mL para o alvo N2, respectivamente. Esses valores são maiores do que os reportados por Ahmed *et al.* (2020) (0,12 cópias/mL), para amostras de esgoto afluente a ETEs na Austrália, e menores do que os reportados por Wu *et al.* (2020) (10 a 100 cópias/mL) e por Randazzo *et al.* (2020) (553 cópias/mL para o alvo N2), para amostras de esgoto afluente a ETEs nos Estados Unidos e Espanha, respectivamente. A título de comparação, a concentração reportada de vírus entéricos humanos determinada em esgoto tem sido da ordem de 10^3 cópias/mL (Bisseux *et al.*, 2018). No Brasil, as concentrações dos vírus entéricos como adenovírus e poliomavírus variam entre 10^2 e 10^3 cópias/mL, enquanto norovírus varia entre 1 e 10 cópias/mL (Fumian *et al.*, 2013).

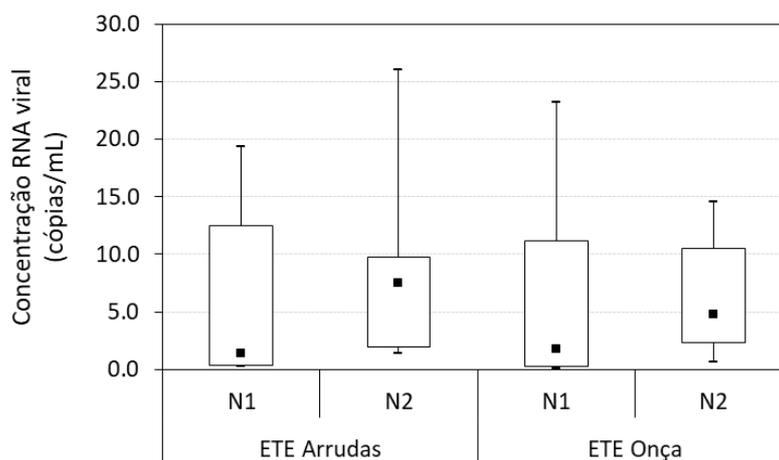


Figura 1: Box-plot das concentrações do RNA viral (SARS-CoV-2) determinadas no esgoto afluente às ETEs Arrudas e Onça, para os alvos N1 e N2. Os resultados são referentes às amostras coletadas em 9 semanas consecutivas de monitoramento, correspondentes às semanas epidemiológicas 19 a 27.

Uma avaliação mais detalhada em relação à sensibilidade dos alvos é realizada por meio da análise da Figura 2, em que os mesmos resultados anteriormente representados sob a forma de gráfico box-plot (Figura 1) são apresentados ao longo de cada campanha de monitoramento efetuada. Apesar do limite de detecção (determinado com a curva padrão elaborada a partir da diluição do controle positivo) ter sido igual a 2 cópias por μL de reação de RT-qPCR para ambos os alvos (N1 e N2), verificou-se que o limite de quantificação observado (ou seja, a menor concentração do RNA viral determinada na amostra de esgoto) foi de 0,03 e 0,06 cópias/mL para N1 e N2, respectivamente.

Na figura 2a, observa-se que o alvo N1 apresentou resultado positivo de amplificação em concentrações muito baixas (0,03 cópias/mL) na semana 21, quando comparado com N2. Adicionalmente, a resposta para o N2 foi negativa (não detecção) para a amostra da semana epidemiológica 19 referente ao afluente à ETE Onça (Figura 2a), ao passo que para N1 houve amplificação (0,07 cópias/mL). Não obstante, para o esgoto afluente à ETE Arrudas, a amostra referente à semana epidemiológica 19 foi positiva para N2, mas negativa para N1. Ainda para o esgoto afluente à ETE Arrudas, o alvo N2 apresentou resultado positivo de amplificação em concentrações também muito baixas na semana 21 (0,06 cópias/mL) (Figura 2b). Portanto, nota-se que o comportamento entre os alvos foi variável e nem sempre a tendência de aumento observada para N1 ocorreu para N2 (Figura 2a e 2b). Adicionalmente, quando a concentração se reduziu para N1, verificou-se que o decréscimo para N2 não aconteceu na mesma proporção (Figura 2b). Em suma, a tendência de aumento ou de redução de concentração determinada para cada alvo não seguiu a mesma proporção, indicando padrão variável de amplificação dos alvos.

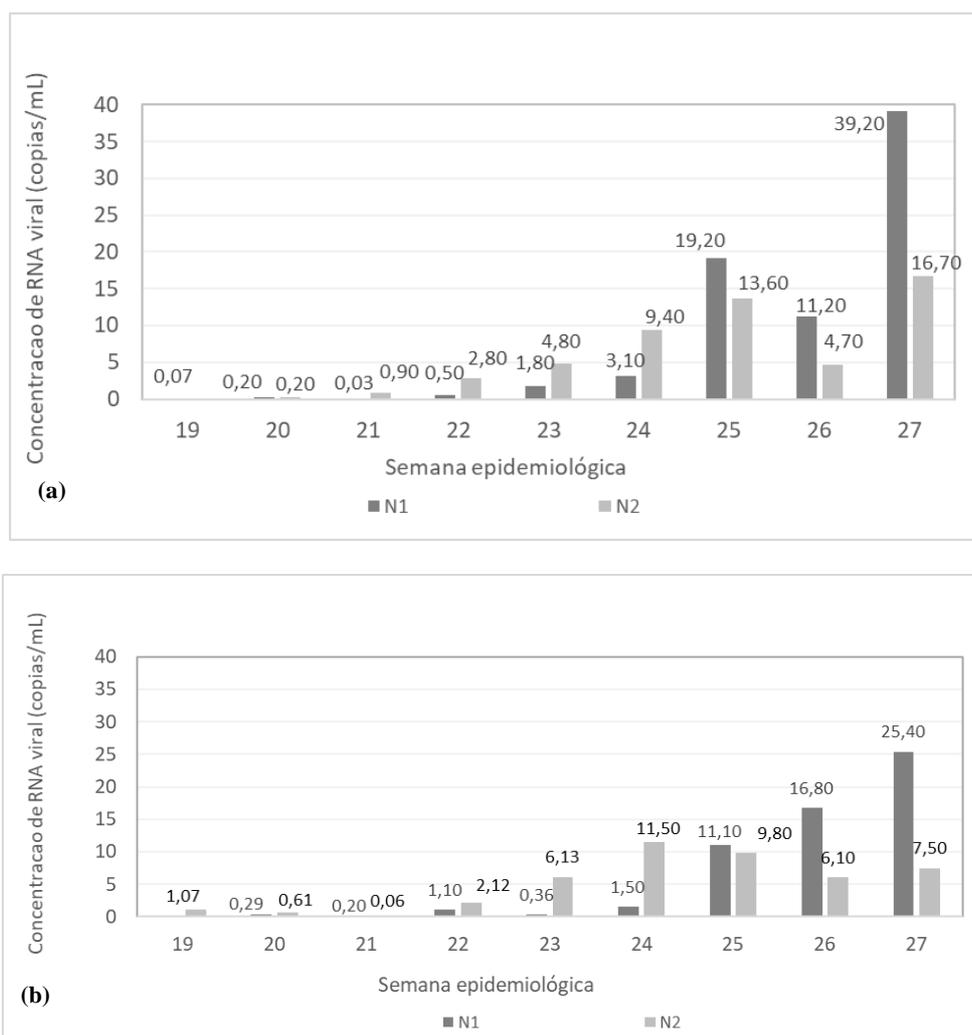


Figura 2: Evolução temporal das concentrações do RNA viral (SARS-CoV-2) para as regiões alvo (N1 e N2) determinadas no esgoto afluente às ETEs Onça (a) e Arrudas (b). Os resultados são referentes às amostras coletadas em 09 semanas consecutivas de monitoramento, correspondentes às semanas epidemiológicas 19 a 27.

Entretanto, ressalta-se que o alvo N1 apresentou frequência de detecção maior ou igual em relação ao N2. Na Tabela 1 são apresentados os percentuais das amostras de esgoto afluente às ETEs que testaram positivo para cada alvo (N1 e N2).

Tabela 1: Percentual de amostras de esgoto bruto afluente às ETEs Arrudas e Onça que testaram positivo para o RNA do novo coronavírus com cada uma das regiões alvo (N1 e N2) (total de 09 amostras - semanas epidemiológicas 19 a 27)

Afluente ETE Arrudas		Afluente ETE Onça	
N1	N2	N1	N2
88,8%	88,8%	100%	88,8%

Quando se expande a análise para o conjunto das amostras de esgoto coletadas nas 15 sub-bacias de esgotamento monitoradas¹, considerando as semanas epidemiológicas 16 a 27 (12 semanas de monitoramento) (Figura 3), verifica-se que maior frequência de detecção também foi observada para o alvo N1, especificamente nas oito semanas iniciais de monitoramento (semanas epidemiológicas 16 a

¹ Detalhes dos pontos de monitoramento e sua localização geoespacial podem ser encontradas nos Boletins de Acompanhamento.

23). Nas semanas seguintes (semanas epidemiológicas 24 a 27), a frequência de detecção foi de 100% para ambas as regiões alvos (N1 e N2). Destaca-se a semana epidemiológica 17, na qual houve detecção do material genético do novo coronavírus somente com o ensaio N1.

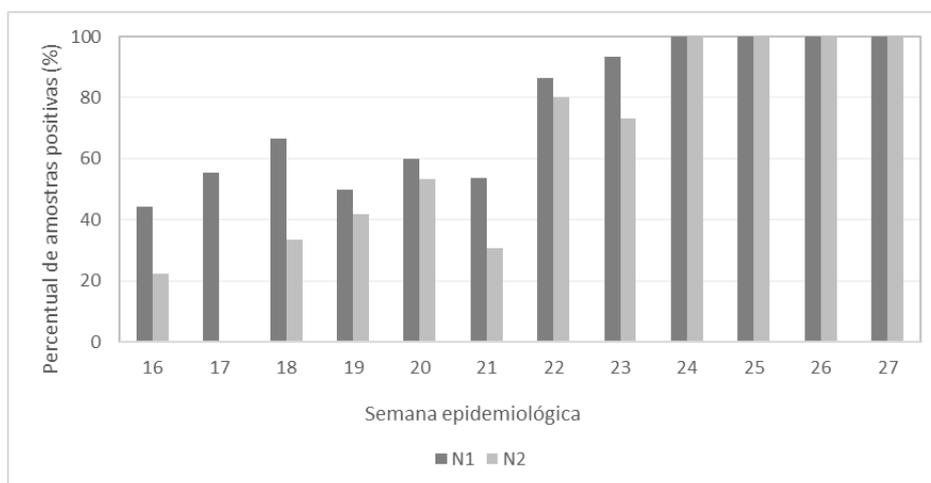


Figura 3: Frequência de detecção (%) do RNA do novo coronavírus para cada um dos ensaios (N1 e N2) por semana epidemiológica considerando o conjunto das amostras das 15 sub-bacias de esgotamento desde o início do monitoramento (a partir da semana epidemiológica 16).

Em conjunto, os resultados apresentados neste trabalho (Figuras 1, 2, 3 e Tabela 1) sugerem que o alvo N1 foi mais sensível que o N2, detectando concentrações mais baixas de material genético viral, maior frequência de detecção e apresentando padrão de resposta mais consistente ao longo do tempo.

As diferenças nos resultados dos alvos N1 e N2 provavelmente ocorrem porque diferentes ensaios de RT-qPCR não são igualmente suscetíveis à inibição da reação por substâncias que são co-purificadas nos extratos de ácidos nucleicos (Bustin *et al.* 2009). Tais diferenças têm sido relatadas em alguns estudos que também realizaram a detecção e quantificação do material genético do SARS-CoV-2 em amostras de esgoto usando os alvos N1 e N2 (Wu *et al.*, 2020; Randazzo *et al.*, 2020; Nemudryi *et al.*, 2020). Portanto, é provável que um dos alvos (N1 ou N2) seja mais adequado dependendo de um conjunto de condições, incluindo a composição do esgoto, a qualidade do material genético extraído e os diferentes tipos e marcas de reagentes utilizados nas reações de RT-PCR. Assim, é recomendável que cada cidade realize testes com ambos alvos, usando os mesmos reagentes de RT-PCR, a fim de identificar o alvo mais adequado à composição do esgoto local. Medema *et al.* (2020) reportaram que o alvo N1 seria mais sensível em relação ao N2, pois foi verificado resultado positivo somente para N1 na amostra de esgoto quando o número de casos reportados de Covid-19 era de 1 em 100.000 habitantes. Em contrapartida, Nalla *et al.* (2020) reportaram que a região alvo N2 seria mais sensível do que as outras.

Portanto, ainda que não exista consenso na literatura sobre qual região alvo seria a mais adequada para a determinação da presença e quantificação do material genético do SARS-CoV-2, os resultados no âmbito do presente projeto sugerem que o alvo N1 é mais adequado para avaliação das amostras de esgoto de Belo Horizonte e Contagem.

2. Correlação da carga viral (cópias do RNA do novo coronavírus/dia) e do número de novos casos semanais de Covid-19 em Belo Horizonte

Na Figura 4 são apresentados os gráficos de dispersão para os dados de carga viral total determinada no esgoto bruto afluente às ETEs, considerando os alvos N1 e N2, juntamente com os novos casos confirmados (Figuras 4a e 4b) e novos casos suspeitos (Figuras 4c e 4d) de Covid-19 para cada uma das semanas epidemiológicas analisadas (semanas 19 a 27). Nota-se que apenas para o alvo N1 houve correlação positiva significativa entre o incremento das cargas virais e o aumento do número de casos suspeitos e confirmados a cada semana epidemiológica reportados pela Prefeitura Municipal de Belo Horizonte (PBH).

O valor do coeficiente de determinação (R^2) entre as variáveis foi superior a 0,86 (o que corresponde a um coeficiente de correlação (ρ) superior a 0,93) para o alvo N1, ao passo que para N2 foi inferior a 0,6. (coeficiente de correlação $\rho \leq 0,77$). Weidhaas *et al.* (2020) também reportaram elevados coeficientes de correlação ($\rho = 0,82$ e $0,96$) entre as cargas de RNA viral *per capita* determinadas no esgoto afluente de duas ETEs e o número de casos de Covid-19 por semana (em 100 mil habitantes). Verificaram ainda elevado coeficiente de determinação ($R^2 = 0,81$) para a relação entre o número estimado de indivíduos infectados (baseado na carga viral do esgoto) em cada bacia de esgotamento sanitário analisada e o número de casos confirmados acumulados de Covid-19 na mesma região.

Diferentemente do reportado por Medema *et al.* (2020), que comparou a concentração do RNA viral do SARS-CoV-2 detectado no esgoto com os casos acumulados reportados de Covid-19 nas 4 semanas que precederam a amostragem do esgoto, a presente avaliação considerou a soma das cargas virais afluentes às ETEs Arrudas e Onça com o total de novos casos suspeitos ou novos casos confirmados por semana em Belo Horizonte. Para que concentrações possam ser utilizadas ao invés de cargas virais, os casos confirmados reportados devem necessariamente ser regionalizados. Todavia, pode-se afirmar que os incrementos de carga viral detectados para ambos os alvos (N1 e N2) referem-se exclusivamente a incrementos de concentração viral, visto que as vazões ao longo do período analisado não sofreram alterações significativas.

Os resultados apresentados na Figura 4 podem ser entendidos como uma prova de conceito: ao passo que estimativas absolutas da prevalência de Covid-19 baseadas na concentração do RNA do SARS-CoV-2 detectadas no esgoto dependem da adoção de premissas tal como a contribuição *per capita* de fezes (ver Boletim Temático n. 1 – <https://etes-sustentaveis.org/monitoramento-covid-esgotos/>), os dados apresentados na Figura 4 sugerem que as alterações de concentração do RNA viral (e conseqüentemente, de cargas virais) presentes no esgoto bruto afluente às ETEs no transcurso do tempo são uma ferramenta sensível de monitoramento para caracterizar a circulação do vírus na população. O limite teórico de sensibilidade do monitoramento do esgoto como ferramenta de vigilância epidemiológica associa-se a um limite inferior de prevalência de Covid-19 da ordem de 0,005% (ou seja, um indivíduo infectado pode ser detectado em até 2.000.000 de pessoas) (Hart e Halden, 2020). Interessante notar que, ainda que relativamente baixo o número de casos confirmados (acumulados) reportados até a semana epidemiológica 19 (857 casos – prevalência de 0,03%), a técnica empregada no presente estudo foi capaz de detectar o sinal genético, tanto para N1 quanto para N2. Entretanto, sabe-se que o registro de casos confirmados sofre sérias limitações metodológicas, associadas ao dia de amostragem no paciente, amostragem realizada de maneira equivocada e,

principalmente, ao número extremamente baixo de testagens clínicas (em torno de 7.200 testes a cada 100.000 habitantes no caso da área deste estudo). Adicionalmente, os testes clínicos são tipicamente direcionados aos indivíduos que manifestam sintomas mais severos da doença, enquanto o monitoramento epidemiológico baseado no esgoto detecta as partículas virais excretadas por pessoas infectadas tanto sintomáticas quanto assintomáticas.

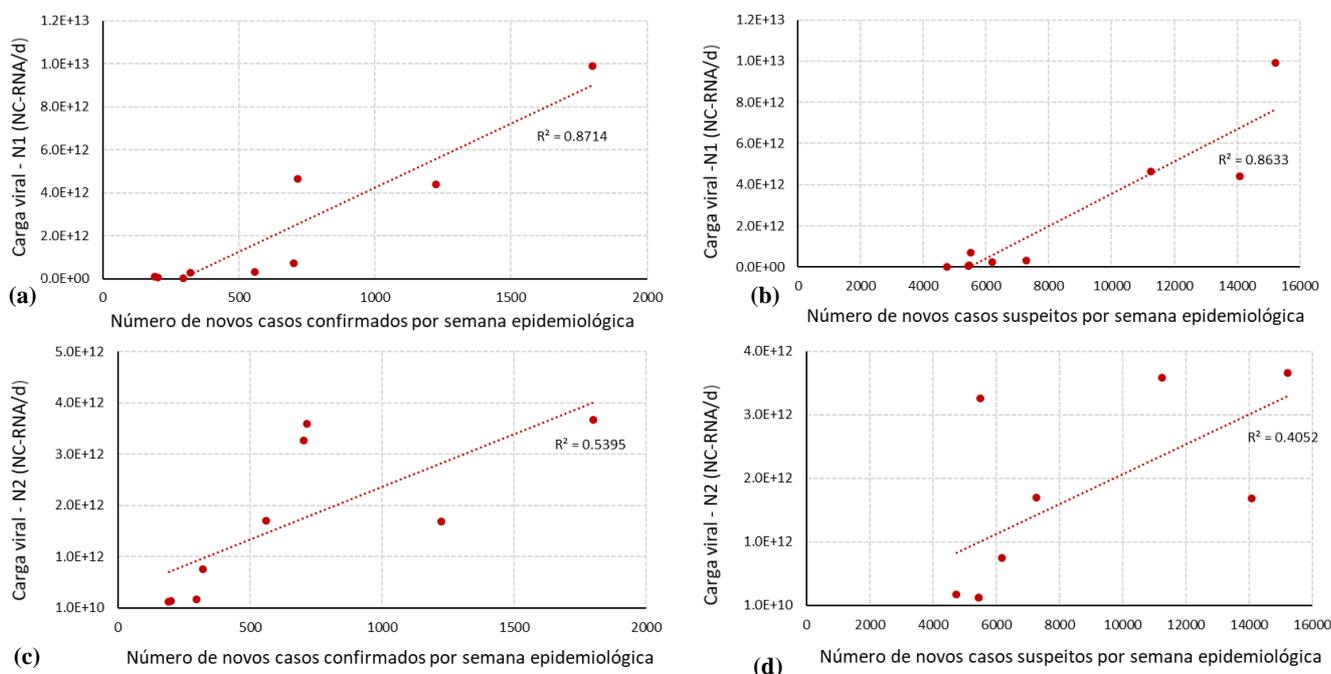


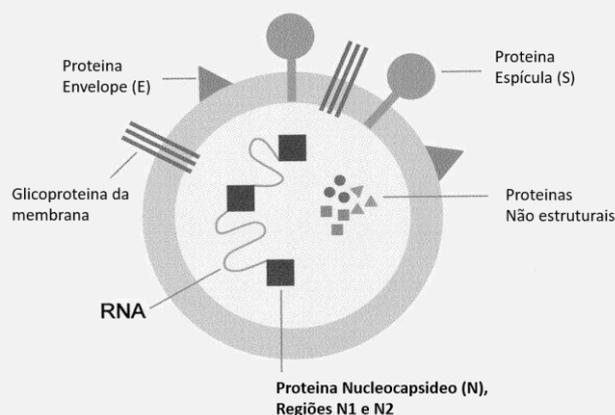
Figura 4: Correlação (gráfico de dispersão) da carga de RNA (número de cópias por dia) do SARS-CoV-2 no esgoto bruto afluente às ETEs Arrudas e Onça para o alvo N1 e do número de novos casos confirmados (a) e novos casos suspeitos (b) de Covid-19 por semana em Belo Horizonte. Correlação da carga de RNA do SARS-CoV-2 no esgoto bruto afluente às ETEs Arrudas e Onça para o alvo N2 e do número de novos casos confirmados (c) e novos casos suspeitos* (d) de Covid-19 por semana em Belo Horizonte. Período de referência: semanas epidemiológicas 19 a 27 (entre 4 de maio e 03 de julho/2020). * Esses dados se referem aos casos suspeitos (Síndrome Gripal + Síndrome Respiratória Aguda Grave com suspeita de Covid-19) reportados no boletim epidemiológico da PBH.

Cabe citar que as cargas virais detectadas no esgoto implicam uma prevalência de Covid-19 sobremaneira mais elevada (0,03% a 24,1% baseada em N1; semanas epidemiológicas 19 a 27) do que aquela calculada a partir dos dados de casos confirmados da PBH (0,03% a 0,24%; para o mesmo período). Todavia, é de natureza complexa uma comparação absoluta da prevalência determinada a partir dos casos clínicos confirmados reportados e aquela estimada a partir do monitoramento da concentração do RNA viral no esgoto, quer seja por N1 ou N2, visto que a primeira depende principalmente da quantidade e tipo de testes clínicos realizados, os quais sofrem severas limitações como reportado anteriormente. Nesse sentido, ressalta-se a importância dos resultados da Figura 4, em que, efetivamente, pode-se notar que o monitoramento do esgoto é uma importante ferramenta de vigilância epidemiológica para acompanhar a tendência de prevalência de Covid-19 em determinada região (neste caso Belo Horizonte).

DESTAQUES DO BOLETIM

1. A determinação da concentração viral no esgoto se mostrou mais adequada quando obtida com o alvo N1, tanto pela maior sensibilidade quanto pelo padrão consistente de resposta deste alvo ao longo do tempo.
2. Observou-se correlação elevada (ρ superior a 0,93) das cargas virais determinadas com o ensaio N1 e o número de novos casos confirmados e novos casos suspeitos de Covid-19 reportados a cada semana epidemiológica. O mesmo não foi verificado para o ensaio N2 (ρ em torno de 0,71). A correlação elevada indica que a tendência de aumento das cargas virais determinadas no esgoto aconteceu concomitantemente com o aumento do número de casos de Covid-19 reportados, demonstrando que o monitoramento do esgoto pode ser usado como ferramenta epidemiológica.
3. Os resultados confirmam que o monitoramento da carga viral no esgoto é uma ferramenta sensível de detecção da circulação do vírus em uma comunidade; e, portanto, o monitoramento do esgoto representa uma ferramenta complementar e importante de vigilância epidemiológica da Covid-19.

A detecção e quantificação do material genético (RNA) do novo coronavírus em amostras de esgoto é realizada através da técnica de transcrição reversa seguida de reação em cadeia pela polimerase quantitativa (RT-qPCR), usando protocolo recomendado pelo Centro de Controle e Prevenção de Doenças dos Estados Unidos (CDC-EUA). O protocolo recomenda a utilização de dois ensaios de RT-qPCR (N1 e N2), que têm como alvo regiões diferentes do gene que codifica a proteína do nucleocapsídeo (N) do vírus SARS-CoV-2 (conforme desenho esquemático abaixo). Na realização desses ensaios de amplificação do material genético do vírus são usados iniciadores específicos que se ligarão à cada uma das regiões alvos (N1 e N2).



REFERÊNCIAS

- Ahmed W.; Angel N.; Edson J.; Bibby K.; Bivins A.; O'Brien J. W.; Choi P. M.; Kitajima M.; Simpson S. L.; Li, J., Tschärke, B.; Verhagen, R.; Smith, W. J. M.; Zaugg, J., Dierens, L.; Hugenholtz, P.; Thomas, K. V.; 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), 1-8. DOI:10.1016/j.scitotenv.2020.138764
- Bisseux M.; Colombet J.; Mirand A.; Roque-Afonso A-M.; Abravanel F.; Izopet J., *et al.* Monitoring human enteric viruses in wastewater and relevance to infections encountered in the clinical setting: a one year experiment in central France, 2014 to 2015. Vol. 23, *Eurosurveillance*. 2018. p. 1700237.
- Bustin, S. A.; Benes, V.; Garson, J. A.; Hellemans, J.; Huggett, J.; Kubista, M.; Mueller, R.; Nolan, T.; Pfaffl, M. W.; Shipley, G.L.; Vandesompele, J.; Wittwer, C. T. The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. *Clinical Chemistry*, v. 55, p. 611-622, 2009. doi:10.1373/clinchem.2008.112797
- Center for Disease Control and Prevention. 2019-Novel coronavirus (2019-nCoV) Real-time rRT-PCR panel primers and probes. <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/lab/rt-pcr-panel-primer-probes.html>
- Fumian, T. M. *et al.* Assessment of burden of virus agents in an urban sewage treatment plant in Rio de Janeiro, Brazil. *Journal of Water and Health*, v. 11, n. 1, p. 110–119, 2013.
- Hart, O. E.; Halden, R. U. 2020. Computational analysis of SARS-CoV-2/COVID-19 surveillance by wastewater-based epidemiology locally and globally: Feasibility, economy, opportunities and challenges. *Science of the Total Environment* 730 138875.
- Medema, G.; Heijnen, L.; Elsinga, G.; Italiaander, R. 2020. 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. *Environ. Sci. Technol. Lett.* <https://doi.org/10.1021/acs.estlett.0c00357>.
- Nalla A. K.; Casto A. M.; Huang M. W.; Perchetti G. A.; Sampoleo, R.; Shrestha, L.; Wei, Y.; Zhu, H.; Jerome, K.; Greninger, A. L. 2020 Comparative performance of SARS-CoV-2 detection assays using seven different primer/probe sets and one assay kit. *J Clin Microbiol.* JCM.00557-20. DOI: 10.1128/JCM.00557-20
- Nemudryi, A.; Nemudraia, A.; Surya K.; Wiegand T.; Buyukyoruk M.; Wilkinson, R.; Wiedenheft, B. 2020. Temporal detection and phylogenetic assessment of SARS-CoV-2 in municipal wastewater. <https://doi.org/10.1101/2020.04.15.20066746>.
- Randazzo, W.; Truchado P.; Cuevas-Fernando, E.; Simon, P.; Allende A.; Sanchez G. 2020 SARS-CoV-2 RNA Titters in wastewater anticipated COVID-19 occurrence in a low prevalence area. medRxiv doi: <https://doi.org/10.1101/2020.04.22.20075200>.
- Weidhaas, J.; Aanderud, Z.; Roper, D. K.; Van Derslice J.; Gaddis E. B.; Ostermiller J.; Hoffman, K.; Jamal R.; Heck P.; Zhang Y.; Torgersen K.; Vander Laan, V.; La Cross N. Correlation of SARS-CoV-2 RNA in wastewater with COVID-19 disease burden in sewersheds. Pre Print from Research Square, 14 Jul 2020. doi: 10.21203/rs.3.rs-40452/v1. PPR: PPR187805.
- Wu, F.; Xiao, A.; Zhang, J.; Gu, X.; Lee, W.; Kauffman, K.; Hanage, W. P.; Matus, M. Ghali, N.; Endo N.; Duvallat C.; Moniz K.; Erickson T. B.; Chai, P. R.; Thompson, J.; Alm E.J. 2020a SARS-CoV-2 titers in wastewater are higher than expected from clinically confirmed cases. medRxiv. <https://doi.org/10.1101/2020.04.05.20051540>.

Minas Gerais, 10 de Setembro de 2020