

Universidade de Évora – Escola de Ciências e Tecnologia

Mestrado em Bioquímica

Dissertação

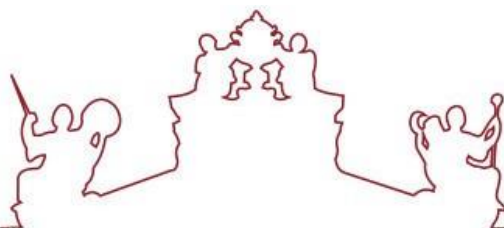
**Implementação da metodologia para a deteção do vírus
SARS-Cov-2 em amostras de águas residuais, por RT-
PCR em Tempo Real**

Rúben Miguel Dias Duarte

Orientador(es) / Maria Alexandra Marchâ Penha

Maria Manuela Morais

Évora 2022



Universidade de Évora – Escola de Ciências e Tecnologia

Mestrado em Bioquímica

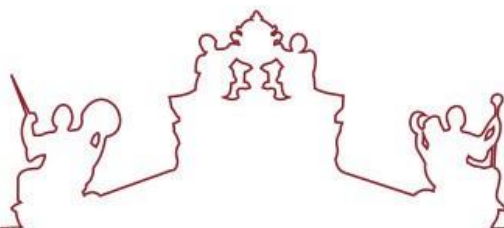
Dissertação

**Implementação da metodologia para a deteção do vírus
SARS-Cov-2 em amostras de águas residuais, por RT-
PCR em Tempo Real**

Rúben Miguel Dias Duarte

Orientador(es) / **Maria Alexandra Marchã Penha**

Maria Manuela Morais

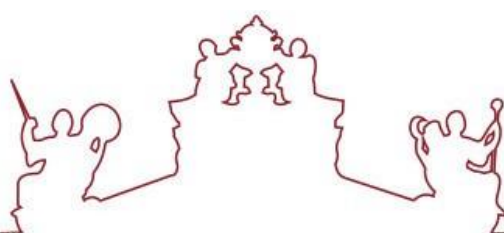


A dissertação foi objeto de apreciação e discussão pública pelo seguinte júri nomeado pelo Diretor da Escola de Ciências e Tecnologia:

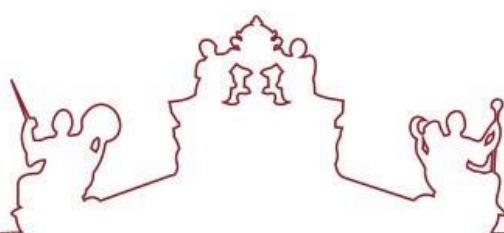
Presidente | Ana Vitória Dordio (Universidade de Évora)

Vogais | M. Ramiro Pastorinho (Universidade de Évora) (Arguente)

Maria Alexandra Marchâ Penha (Universidade de Évora) (Orientador)



*Ao meu Querido Bisavô,
Que nos voltemos a encontrar*



Agradecimentos

Em primeiro lugar, quero agradecer à Doutora Maria Alexandra Penha pela oportunidade que me proporcionou em voltar a ter a possibilidade de estagiar com ela, desta vez na Dissertação de Mestrado e, principalmente com um tema que neste momento é do interesse de todos. Não foi uma caminhada fácil, uma vez que já estava tudo preparado e “com pernas para andar”, mas a situação que presenciamos vem dificultar em tudo este trabalho, mas com a sua ajuda não seria possível estar no lugar onde estou hoje e preparado para defender este trabalho da melhor forma.

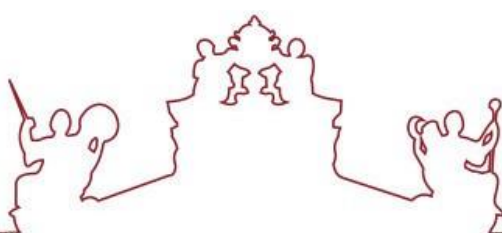
À Sr.^a Professora Doutora Manuela Morais, por mais uma vez ser minha co-orientadora, bem como, pelo facto de me voltar a permitir usufruir do Laboratório da Água para a realização deste projeto, bem como pela oportunidade de participar num projeto desenvolvido pela Universidade de Évora, o projeto ARCO.

Também um agradecimento a toda a equipa do Laboratório de Água por mais uma vez, seja qual fosse a circunstância, estarem dispostos a ajudar no que fosse necessário.

Um agradecimento muito especial à Ana Sofia Miguel, minha namorada, pelo amor, por ser a minha melhor amiga, por toda a preocupação que demonstra e demonstrou sempre comigo, em especial pela que teve durante todo o tempo de realização de projeto, pelas horas que despendeu para me ajudar nas minhas dificuldades, fossem elas da parte da edição ou até mesmo da escrita e, que por mais que eu pensasse em desistir esteve sempre lá para colocar um ponto final nessa minha ideia. Um enorme obrigado à minha pequena força da natureza.

Aos meus pais e irmão, por uma vez mais estarem dispostos a tudo fossem as minhas dificuldades as que fossem, pelo apoio demonstrado, pelo facto de me terem ajudado sempre e nunca me deixarem desistir da minha educação e formação, com os seus conselhos que só eles sabem dar, por serem a meu suporte na vida pessoal e profissional.

Quero agradecer também a todos os meus colegas de trabalho no Laboratório

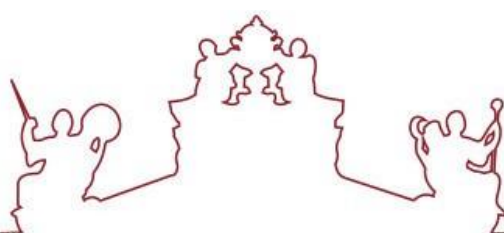


DePrado, Eunice, Célia, Ana, Margarida, Gonçalo e Maria pela disponibilidade na troca de folgas, por se disponibilizarem também para a realização das tarefas de trabalho diárias para que este projeto fosse terminado e, em particular à responsável do Laboratório e minha chefe, Clara, um enorme obrigado também, principalmente pela compreensão e interesse que demonstrou para que fosse possível a conclusão deste projeto.

Por último, um enorme agradecimento a toda a minha restante família, que apesar de tudo, principalmente da distância, estiveram, de uma forma ou de outra, sempre presentes durante todo este meu percurso mostrando também todo o apoio disponível e, em especial ao meu bisavô, que apesar de já não estar presente, foi durante a minha infância, uma das principais pessoas que ajudou-me a tornar na pessoa que sou hoje. As tardes inteiras a jogar futebol que, por mais quedas que desse, ele estava lá sempre para me levantar e dizer que para a próxima corria melhor.

Obrigado a Todos,

Rúben Duarte



Agradecimento Institucional



UNIVERSIDADE DE ÉVORA
ESCOLA DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
LABORATÓRIO DA ÁGUA

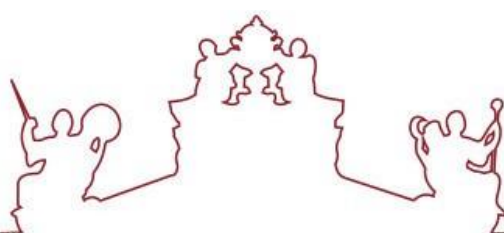


UNIVERSIDADE DE ÉVORA

arco alentejo region
applied research for
COVID-19

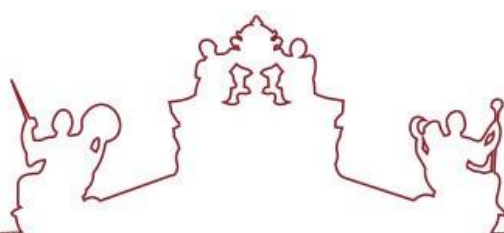


Instituto de Ciências da Terra
Institute of Earth Sciences

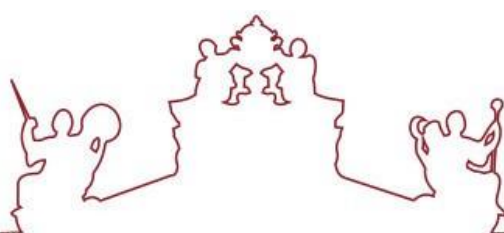


Índice

Agradecimentos	5
Agradecimento Institucional	7
Índice de Figuras	10
Abreviaturas	12
Resumo	14
Abstract	15
“Implementation of the methodology for the detection of the SARS-CoV-2 vírus in wastewater samples, by RT-PCR in Real Time”	15
A. Introdução.....	16
1. Problemática.....	16
2. Objetivos de Estudo	16
B. Fundamentos Teóricos.....	17
1. Qual a origem das Pandemias?	17
2. COVID-19.....	18
2.1. SARS-CoV-2	19
2.1.1. Origem e Infecção.....	19
2.1.2. Família Coronaviridae	20
2.1.3. Genética e Morfologia.....	22
2.1.4. Transmissibilidade.....	27
2.1.5. Sinais e Sintomas.....	29
2.1.6. Como é efetuado o diagnóstico laboratorial?	30
2.1.7. Vacinação	32
2.2. Biologia Molecular na Deteção de Vírus	34
2.2.1. Quais as suas vantagens?.....	34
3. Águas Residuais	36
3.1. ETAR'S.....	37
3.2. Efluentes Hospitalares	38
3.3. Componentes Presentes.....	39
3.4. Comparação entre metodologias de deteção do SARS-CoV-2 nas águas residuais	39
4. Projeto ARCO.....	44



4.1.	Enquadramento, objetivos e solução proposta.....	44
5.	Epidemiologia da Pandemia	45
5.1.	Recolha de Amostras	45
5.2.	Análise Laboratorial.....	46
5.3.	Análise de Dados	46
C.	Metodologia.....	48
1.	Amostragem e Condições de Filtração	48
2.	Filtração de Fluxo Tangencial	49
3.	Extração de Ácidos Nucleicos (RNA).....	50
4.	Reação em Cadeia de Polimerase em Tempo Real (RT-PCR) com Transcriptase Reversa.....	51
D.	Resultados e Discussão.....	55
E.	Conclusão e Perspetivas Futuras	65
F.	Referências Bibliográficas.....	66



Índice de Figuras

Figura 2. Provável Origem do vírus SARS-CoV-2 adaptado de Shereen et al., 2020).....	19
Figura 3. Representação esquemática da taxonomia de Coronaviridae. BuCoV-HKU11, coronavírus HKU11; HCoV, coronavírus humano; MERS-CoV, coronavírus da síndrome respiratória do Oriente Médio; SARS-CoV, coronavírus da síndrome respiratória aguda grave; SARS-CoV-2, síndrome respiratória aguda grave coronavírus-2. (Tang, Comish and Kang, 2020).....	21
Figura 4. Apresentação esquemática da estrutura e organização do genoma do SARS-CoV-2 com base na sequência de referência (EPI_ISL_412026). (A) O virião é coberto pelas proteínas spike (S), assim como as proteínas de membrana (M) e envelope (E) são colocadas entre as proteínas S no envelope do vírus. O RNA genómico é cercado por proteínas nucleocapsídicas fosforiladas (N) dentro de bicamadas fosfolipídicas. (B) O genoma do SARS-CoV-2 (29.903 nucleotídeos) compreende o 5' UTR, ORF1a/b codificando 16 nsps para replicação, quatro genes que codificam proteínas estruturais, incluindo proteínas S, E, M e N, seis genes acessórios que codificam seis proteínas acessórias como ORF3a, ORF6, ORF7a, ORF7b, ORF8 e ORF10, bem como a 3' UTR. A localização das dezassete mutações e comutações de alta frequência relatadas na literatura são mostradas no genoma por linhas verticais vermelhas e círculos com cores semelhantes, respetivamente. Abreviaturas: SARS-CoV-2, síndrome respiratória aguda grave coronavírus 2; 5' UTR, região 5' não traduzida; OFR, quadro de leitura aberto; nsp, proteína não estrutural (Rahimi, Mirzazadeh and Tavakolpour, 2021).....	25
Figura 5. Meios de Transmissão do vírus Sars-CoV-2 (adaptado de Folheto do Gabinete do Primeiro Ministro e do Ministério da Saúde, do Trabalho e Bem-estar do Japão, 2020).	28
Figura 6. Sinais e Sintomas de Infeção pelo vírus Sars-CoV-2 (ilustração: annarodriguezdesign, Infoescola).	29
Figura 7.	33
Figura 8. Exemplo de uma Estação de Tratamento de Águas residuais (ETAR)	38
Figura 9. Logotipo do Projeto ARCO	44
Figura 10. Gráfico e diagrama com número de novos casos diários em Portugal. (https://www.worldometers.info/coronavirus/country/portugal/)	47
Figura 11. Gráfico e diagrama com número de mortes diários em Portugal. (https://www.worldometers.info/coronavirus/country/portugal/)	47
Figura 12. Condições testadas antes das Filtração por Fluxo Tangencial.....	48

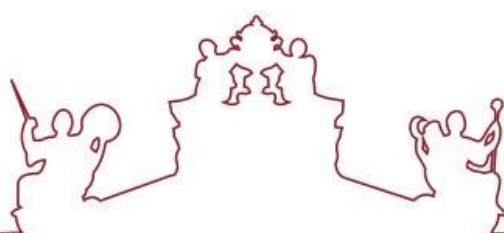
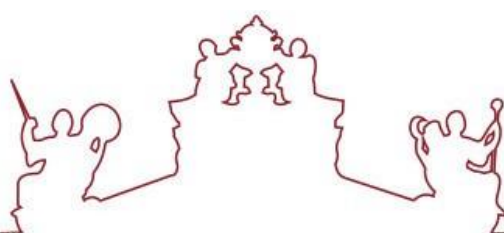
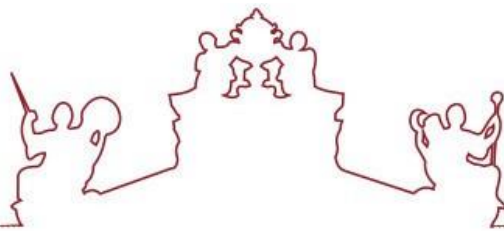


Figura 13. Esquema de volumes utilizados neste trabalho e volume final filtrado obtido, entre 6 e 8 mL. ..	50
Figura 14. Esquema do procedimento de Extração de RNA total seguindo as instruções do fabricante do kit E.Z.N.A.®, Omega	51
Figura 15. Esquema da estrutura do vírus SARS-CoV-2 com representação do genoma do respetivo genoma, com identificação dos genes amplificados.. ..	53
Figura 16. Protocolo de RT-PCR para a identificação do vírus SARS-CoV-2.	53
Figura 17. Fluxograma da metodologia aplicada, desde a amostragem até à identificação por RT-PCR. ...	54
Figura 18. Curva de amplificação do controlo interno RNA-IPC.	55
Figura 19. Curva de amplificação do gene N para as duas amostras testadas. A curva que ultrapassa a baseline (linha horizontal) corresponde à amplificação do gene N para a amostra de 50 mL sem pré-filtração.	56
Figura 20. Curva de amplificação do gene RdRp para as duas amostras testadas. A curva que ultrapassa a baseline (linha horizontal) corresponde à amplificação do gene RdRp para a amostra de 50 mL sem pré-filtração.	56
Figura 21. Curvas de amplificação do gene N para as amostras testadas. As curvas que ultrapassam a baseline (linha horizontal) correspondem à amplificação do gene N.	57
Figura 22. Curvas de amplificação do gene RdRp para as amostras testadas. As curvas que ultrapassam a baseline (linha horizontal) correspondem à amplificação do gene N.	58
Figura 23. Curvas de amplificação do gene N para as amostras testadas. As curvas que ultrapassam a baseline (linha horizontal) correspondem à amplificação do gene N.	59
Figura 24. Curvas de amplificação do gene RdRp para as amostras testadas. As curvas que ultrapassam a baseline (linha horizontal) correspondem à amplificação do gene N.	59
Figura 25. Resultados dos ciclos de quantificação para cada uma das amostras testadas.	60
Figura 26. Resumo dos resultados.	61
Figura 27. Fluxograma da metodologia implementada para a deteção do vírus SARS-CoV-2 em amostras de águas residuais e efluentes hospitalares.	64

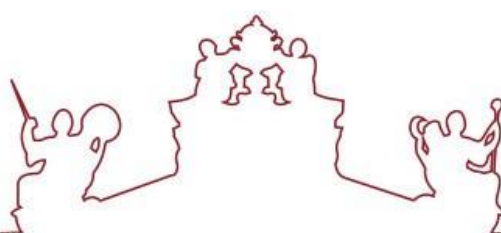


Abreviaturas

- SARS-CoV-2 – Síndrome Respiratória Aguda Grave – Coronavírus-2;
- OMS – Organização Mundial de Saúde;
- PCR – Reação em Cadeia da Polimerase;
- RNA – Ácido Ribonucleico;
- ssRNA – Vírus de Cadeia Simples de RNA;
- DNA – Ácido Desoxirribonucleico;
- ECA2 – Enzima Conversora da Angiotensina 2;
- RaGT13 – Subgénero *Sarbecovirus*;
- RBD – Recetor Biding Domain;
- RdRp – RNA-dependent RNA-Polymerase;
- ORF – Open Reading Frame;
- GISAID – Global Initiative on Sharing All Influenza Data;
- INSA – Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge;
- MERS-CoV – Síndrome Respiratória do Médio Oriente;
- SARA – Síndrome de Angústia Respiratória Aguda;
- CDC – Centers for Disease Control and Prevention;
- RT-PCR – Reação em Cadeia de Polimerase com Transcriptase Reversa;
- ETAR – Estação de Tratamento de Águas Residuais;



- TFF – *Tangencial Flow Filtration* (Filtração de Fluxo Tangencial);
- ARCO – Alentejo Region Applied Research for COVID-19;
- DQA - Diretiva Quadro de Água;
- RNA-IPC – Internal Positive RNA Control Assay;
- cDNA – DNA complementar;
- EMV – Método de Vortex de Membrana Eletronegativo;
- BSL – Biological Safety Level
- qPCR – Reação em Cadeia de Polimerase Quantitativa
- PES - m-Polietersulfona.

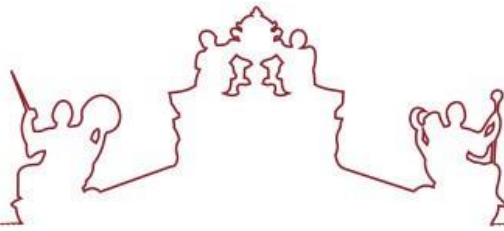


Resumo

A síndrome respiratória aguda grave coronavírus 2 (SARS-CoV-2) responsável pela doença COVID-19, surgiu em dezembro de 2019 em Wuhan, na China, e rapidamente se espalhou globalmente, sendo considerada uma pandemia, pela OMS a 11 de março de 2020.

Além de o vírus ser detetável pela nasofaringe pode ser também detetado nas fezes de pacientes sintomáticos e assintomáticos. Esses resultados clínicos indicam que se tornou evidente que as águas residuais humanas podem conter o vírus SARS-CoV-2.

A epidemiologia com base em águas residuais é uma abordagem promissora para entender a prevalência de vírus uma vez que, as águas residuais contêm vírus excretados de indivíduos sintomáticos e assintomáticos. Este método epidemiológico é especialmente útil para o alerta precoce de surtos de doenças. Este estudo tem como foco a implementação de uma metodologia para concentração e deteção do vírus SARS-CoV-2 em amostras de águas residuais por meio da RT-PCR em tempo real.



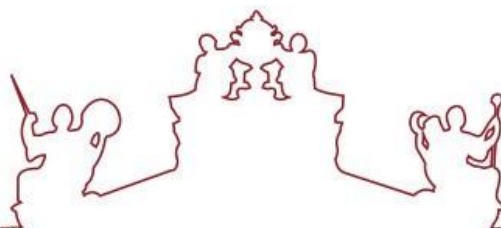
Abstract

“Implementation of the methodology for the detection of the SARS-CoV-2 vírus in wastewater samples, by RT-PCR in Real Time”

The severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) responsible for the disease COVID-19, emerged in December 2019 in Wuhan, China, and quickly spread globally, being considered a pandemic, by the WHO on March 11, 2019. 2020

In addition, to the virus being detectable by the nasopharynx, it can also be detected in the feces of symptomatic and asymptomatic patients. These clinical results indicate that it has become evident that human wastewater may contain the SARS-CoV-2 virus.

Wastewater-based epidemiology is a promising approach to understanding virus prevalence as wastewater contains viruses excreted from symptomatic and asymptomatic individuals. This epidemiological method is especially useful for early warning of disease outbreaks. This study focuses on the implementation of a methodology for concentration and detection of the SARS-CoV-2 virus in wastewater samples using real-time RT-PCR.



A. Introdução

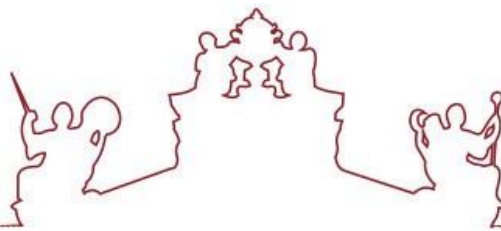
1. Problemática

O RNA do SARS-CoV-2 foi detetado nas fezes de pacientes, não apenas sintomáticos, como também assintomáticos.

Estas Observações clínicas sugerem que as águas residuais municipais das comunidades afetadas podem conter o vírus.

2. Objetivos de Estudo

O objetivo principal deste estudo é a pesquisa do vírus SARS-CoV-2 em amostras de águas residuais colhidas na Estação de Tratamento de Águas Residuais de Évora e Odemira (ETAR) (particularmente na entrada e saída, antes e após o tratamento) e nos hospitais, nomeadamente no Hospital do Espírito Santo em Évora, com o auxílio e implementação da metodologia de Filtração de Fluxo Tangencial (*Tangencial Flow Filtration*) (TFF) e *Reverse Transcription – Polymerase Chain Reaction in Real Time* (RT-PCR em tempo real) para concentração e deteção do vírus.

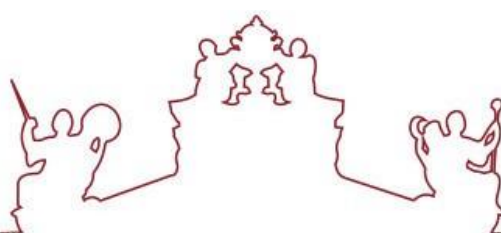


B. Fundamentos Teóricos

1. Qual a origem das Pandemias?

Uma pandemia, apesar de não se poder definir concretamente só assim se pode designar quando uma determinada doença infecciosa não se mantém apenas numa determinada região, mas sim, quando esta se expande a diversas regiões (países e continentes, Kelly *et al.*, 2011).

A transmissão sustentada da doença é caracterizada pela transmissão indivíduo a indivíduo mesmo ambos não estando presentes em países contaminados (Figura 1). Esta pode ser feita por via aérea ou por outra via diferente pelos indivíduos que sabendo ou não que são portadores acabam por assegurar o percurso da mesma, os designados pacientes assintomáticos (só após testagem é que saberão se possuem a doença e não manifestam sintoma nenhum) (Rasanathan and Evans, 2020).



2. COVID-19

A COVID-19 é uma doença que adquiriu esta designação uma vez que é causada por um vírus, mais concretamente, o vírus SARS-CoV-2, da família dos *Coronaviridae* (Coronavírus).

Os primeiros casos desta variante foram verificados no início de Dezembro de 2019 na cidade de Wuhan, província de Hubei, china.

Após a descoberta dos primeiros casos, em Janeiro de 2020, foi decretada quarentena na cidade de Wuhan, no entanto a doença viral não se manteve apenas pela China tendo-se alastrado por diversos países, onde a 11 de Março de 2020, a COVID-19 foi declarada como uma pandemia global e a sexta emergência de saúde pública pela Organização Mundial de Saúde (OMS) tendo em consideração que já se verificavam mais de 100 mil casos da doença registados em mais de 100 países e cerca de 4500 mortes (Rahimi, Mirzazadeh and Tavakolpour, 2021).

Diversos estudos baseados das análises genéticas do SARS-CoV-2 e posterior comparação com a genética de outros coronavírus referem que este apenas apresenta uma única diferença.

É uma infeção viral com elevada transmissibilidade, designada como branda, no entanto, pode desencadear pneumonia, insuficiência respiratória e/ou morte (Jiehao *et al.*, 2020).

A fonte de infeção é ainda desconhecida, no entanto, estima-se que é oriunda de animais, particularmente morcegos (Figura 2).

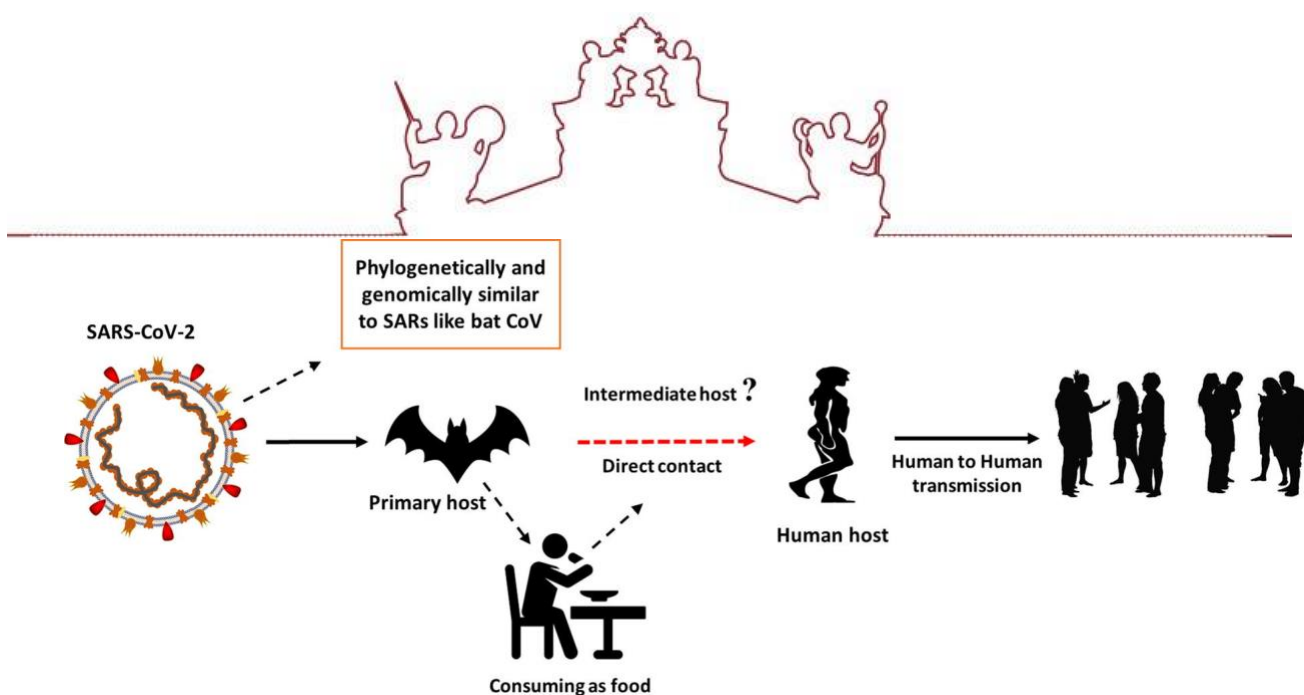


Figura 1. Provável Origem do vírus SARS-CoV-2 adaptado de Shereen *et al.*, 2020).

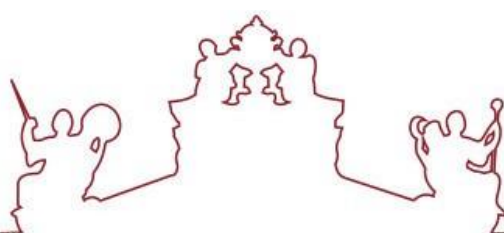
2.1. SARS-CoV-2

2.1.1. Origem e Infecção

O Coronavírus da Síndrome Respiratória Aguda Grave 2 (SARS-CoV-2), vulgarmente conhecido como causador da doença COVID-19, é um vírus da cadeia simples de RNA positiva ((+)ssRNA), contendo um genoma linear, característico da maioria dos vírus mais abundantes do planeta.

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), estipula-se que o reservatório natural que deu origem a este vírus sejam os morcegos e ou pangolins, embora existam muitas diferenças entre os vírus encontrados em morcegos e os vírus que surgiram em humanos, uma vez que estes sugerem que foram infetados por um hospedeiro intermédio (Andersen *et al.*, 2020).

A sequência genética deste vírus possui um índice de semelhança, com valores a rondar os 79,6%, relativamente à do coronavírus da síndrome respiratória aguda grave (SARS-CoV). O SARS-CoV-2 é um vírus que ataca o trato respiratório, com espectro



clínico que varia desde assintomático a síndrome do desconforto agudo (Rahimi, Mirzazadeh and Tavakolpour, 2021).

Desde a descoberta deste vírus os investigadores sempre se debateram com a sua possível origem, ao qual se especulava ser de origem laboratorial, no entanto, os dados genéticos não suportam essa hipótese e mostram que o SARS-CoV-2 não derivou de um “backbone” de um vírus previamente conhecido. (Andersen *et al.*, 2020). Segundo Andersen (2020) poderá haver duas hipóteses: seleção natural de um animal hospedeiro antes da transferência zoonótica ou seleção natural em humanos após a transferência zoonótica.

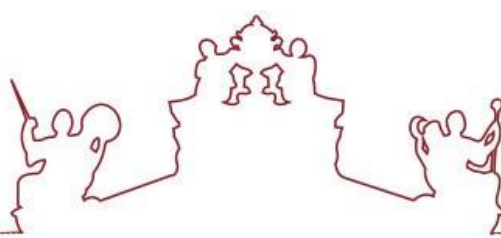
2.1.2. Família Coronaviridae

Esta família de vírus é conhecida por causar doenças no ser humano, em que a infeção normalmente é semelhante a uma síndrome gripal, no entanto, também se pode apresentar como uma doença mais grave designada por pneumonia.

É conhecida desde os anos 60, estando a sua designação associada à forma que apresentam quando observados por microscopia eletrónica.

Existe uma grande diversidade de coronavírus especialmente no reino animal, como por exemplo, o vírus designado como BCoV, causador da doença do complexo respiratório bovino. ^[11]

Os coronavírus são vírus de RNA encapsulados (camada lipídica que reveste o vírus quando este sai da célula que acabou de invadir) de elevada importância médica e veterinária. A nível molecular, empregam uma variedade de estratégias incomuns para realizar um programa complexo de expressão genética. A replicação deste vírus envolve a mudança do quadro do ribossoma durante a tradução do genoma, a síntese de várias espécies de RNA genómico e a montagem de viriões descendentes por uma via única entre vírus de RNA encapsulados (Masters, 2006).



De acordo com as conclusões do Comité Internacional de Taxonomia de Vírus (ICTV), o SARS-CoV-2 pertence ao subgénero *Sarbecovirus*, a linha do tipo B do beta-coronavírus, a subfamília *Orthocoronavirinae*, a família *Coronaviridae* (que também inclui a subfamília *Letovirinae*), e a ordem *Nidovirales* (Wu *et al.*, 2008; Zhao *et al.*, 2010; Chatterjee, 2020; Gorbalenya *et al.*, 2020; Lu and Shi, 2020). A família *Coronaviridae* é dividida em 4 tipos: alfa-coronavírus, beta-coronavírus, gama-coronavírus e delta-coronavírus. Outros representantes do género beta-coronavírus além do SARS-CoV-2 incluem SARS-CoV-1, MERS, HKU-1, HKU-4, HKU-5, HKU-9, OC43, BetaCov-1 e MurineCov. Juntamente com outros seis vírus: MERS, SARS-CoV-1, 229E, HKU-1, NL63 e OC43, o SARS-CoV-2 pertence ao grupo de coronavírus (CoVs) patogénicos para humanos (dos quais dois pertencem a alfa-coronavírus e cinco para beta-coronavírus) (Chatterjee, 2020; Gorbalenya *et al.*, 2020; Gussow *et al.*, 2020; Lu and Shi, 2020).

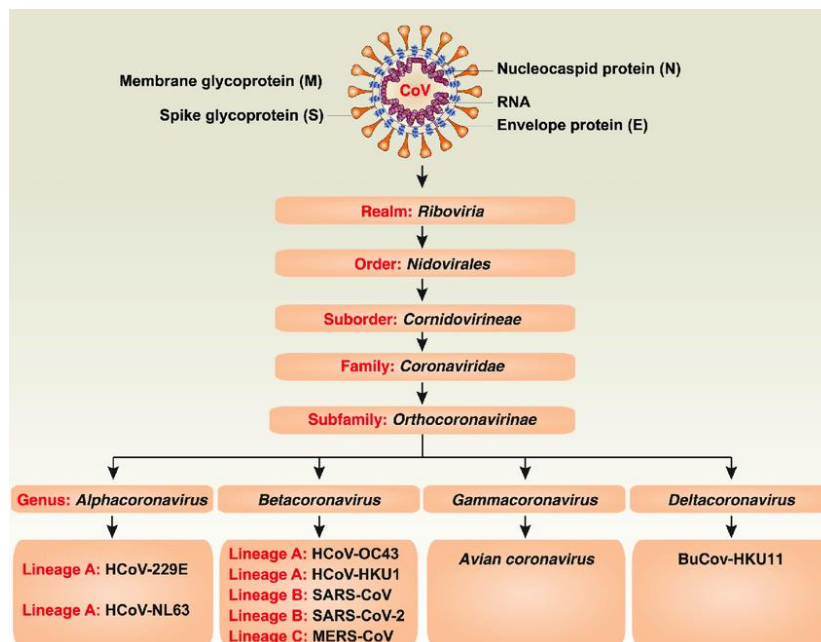
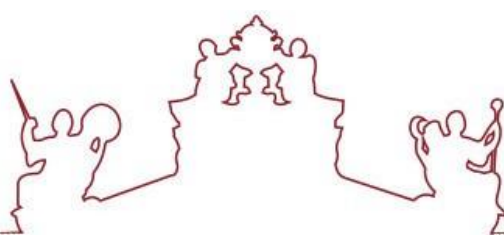


Figura 2. Representação esquemática da taxonomia de Coronaviridae. BuCoV-HKU11, coronavírus HKU11; HCoV, coronavírus humano; MERS-CoV, coronavírus da síndrome respiratória do Oriente Médio; SARS-CoV, coronavírus da síndrome respiratória aguda grave; SARS-CoV-2, síndrome respiratória aguda grave coronavírus-2. (Tang, Comish and Kang, 2020)



2.1.3. Genética e Morfologia

Compreender a genética do SARS-CoV-2 pode abrir novos caminhos/estudos para o desenvolvimento de terapias direcionadas de maior eficácia e mais seguras, bem como, novas gerações de vacinas para este vírus com elevada capacidade de mutações (Rahimi, Mirzazadeh and Tavakolpour, 2021).

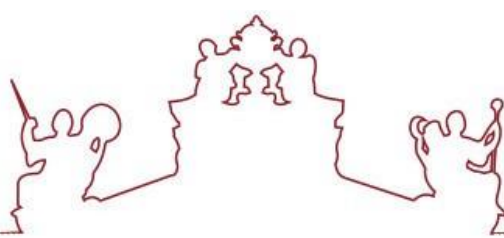
A análise de genomas e a sua comparação com genomas de coronavírus previamente conhecidos indicam que o SARS-CoV-2 apresenta características únicas que o distinguem de outros coronavírus, tais como, a afinidade ideal para o recetor da enzima conversora da angiotensina 2 (ACE2) e um local de clivagem polibásico no pico S1/S2, junção que determina a infecciosidade e gama de hospedeiros (Andersen *et al.*, 2020). (Figura 4B)

O SARS-CoV-2 é altamente semelhante ao coronavírus do tipo SARS de morcego (Wu *et al.*, 2008), e este, como já mencionado anteriormente pode ser o hospedeiro do reservatório.

O vírus RaGT13, do subgénero *Sarbecovirus*, é cerca de 96% idêntico ao SARS-CoV-2. Possui algumas diferenças no domínio de ligação do recetor (RBD – *Receptor Biding Domain*) da Proteína S (ou proteína *Spike*), que depende da vitamina K, que atua como cofator para a clivagem mediado pela Proteína C Reativa dos fatores Va e VIIIa. Estas diferenças podem explicar as desigualdades na afinidade de ACE2 entre SARS-CoV-2 e coronavírus semelhantes ao SARS.

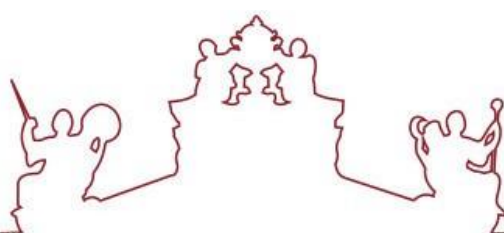
O local de clivagem polibásico do SARS-CoV-2 não está presente no beta-coronavírus do morcego, que compartilha semelhanças com o SARS-CoV-2, além disso, a sequência de RBD da proteína S sugere que ela ascendeu de um processo evolutivo natural (Andersen *et al.*, 2020).

As estimativas do ancestral comum mais recente do SARS-CoV-2 datam a epidemia entre o final de novembro de 2019 e o início de dezembro de 2019, o que é compatível com os primeiros casos relatados (Huang *et al.*, 2020a).



Assim, houve transmissão humana despercebida após o evento zoonótico e antes da aquisição do sítio de clivagem da furina polibásica (Andersen *et al.*, 2020).

Semelhante a outros vírus de RNA, a diversidade genética no SARS-CoV-2 é fundamental para sua aptidão, sobrevivência e provavelmente sua patogénese. Num estudo realizado sobre a origem do SARS-CoV-2, foi demonstrado que mutações aleatórias e recombinação são duas fontes principais de diversidade genética neste vírus (Domingo, 2010; Rehman *et al.*, 2020). A esse respeito, nove padrões recombinantes putativos foram identificados no genoma do SARS-CoV-2, incluindo seis regiões críticas de recombinação no gene S e uma em cada RdRp (RNA-dependent RNA-polymerase), nsp13 (Proteína não-estrutural 13) e ORF3a (Open Reading Frame) (Rehman *et al.*, 2020). Além disso, os resultados das análises genómicas sugerem que o motivo de ligação ao recetor no SARS-CoV-2 pode surgir da ocorrência de uma recombinação entre as estirpes de coronavírus encontradas no morcego e no RaTG13 (Flores-Alanis *et al.*, 2020; Wong *et al.*, 2020). De acordo com dados extraídos do banco de dados público da *Global Initiative on Sharing All Influenza Data* (GISAID) em setembro de 2020, o vírus SARS-CoV-2 tem uma taxa de mutação de cerca de 8×10^{-4} nucleotídeos/genoma por ano (Shu and McCauley, 2017), ainda que essa taxa seja elevada para um vírus de RNA (Holmes *et al.*, 2016; Domingo-Calap *et al.*, 2018; Jia *et al.*, 2021). A análise de 220 sequências genómicas do banco de dados GISAID revelou que o número e a ocorrência de mutações são significativamente maiores na Europa e América do Norte em comparação com a Ásia indicando provavelmente diferentes padrões de mutação (Pachetti *et al.*, 2020). A distribuição dos padrões de mutação do SARS-CoV-2 mostra uma diferença de tempo, geografia e idade (Chen *et al.*, 2020). No entanto, de acordo com um estudo recente sobre mutações do SARS-CoV-2 nos Estados Unidos, amostras de genoma isoladas de pacientes mulheres mostraram uma taxa de mutação mais alta em comparação com aquelas isoladas de homens. Da mesma forma, um padrão dominado por mulheres foi observado na mutação 27964^{C>T} (S24L) na proteína ORF8 (R. Wang *et al.*, 2020).

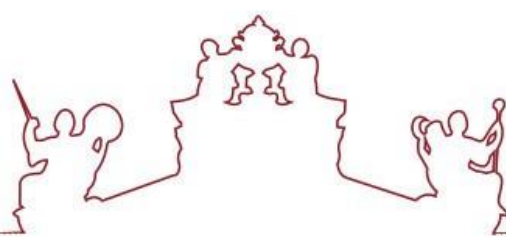


Considerando o papel da mutação como um dos mais importantes mecanismos de evolução em vírus de RNA (Zhao *et al.*, 2004), vários estudos foram realizados até agora para detectar variações genómicas do SARS-CoV-2, o que resultou na descoberta de diversas variações genéticas de diferentes tipos, incluindo *missense*, sinónima, inserção, eliminação e mutações não codificantes (Wang *et al.*, 2020; Chan *et al.*, 2020; Chen *et al.*, 2020; Koyama, Platt and Parida, 2020; Mercatelli and Giorgi, 2020; Soratto *et al.*, 2020; Yin, 2020). Alegadamente, mutações *missense* e sinónimas foram o tipo mais frequente de mutações ao longo do genoma do SARS-CoV-2 (Laamarti *et al.*, 2020; Chen *et al.*, 2020).

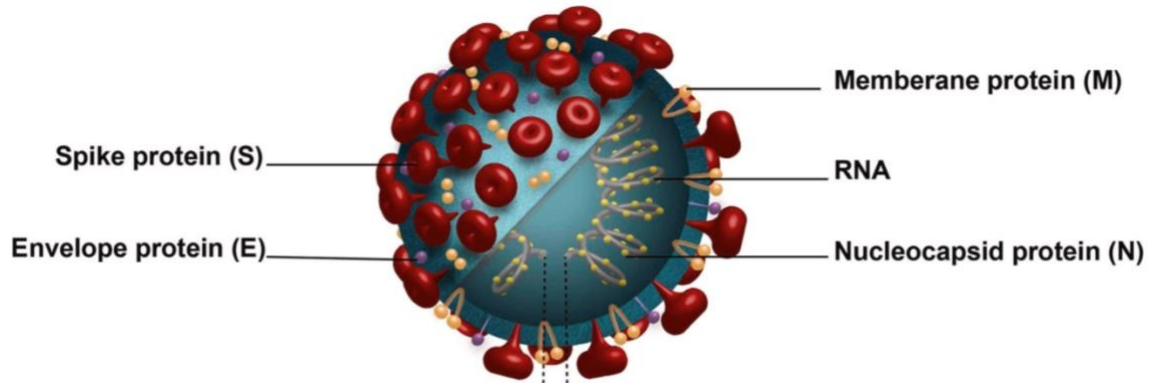
Desde que foi detetado pela primeira vez, o SARS-CoV-2 já possui mais de 1800 mutações genéticas.

Para a OMS, as maiores preocupações que continuam a surgir perante a contínua emergência destas novas variações incidem essencialmente sobre a sua transmissibilidade, a capacidade de reinfeção, a severidade da doença e a eficácia das vacinas.

Em Portugal, foi efetuado pelo Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, I.P. (INSA) um estudo de monitorização da disseminação do novo Coronavirus SARS-CoV-2, através da análise do genoma deste vírus pandémico. A sequência completa do genoma é identificada essencialmente com recurso a tecnologias de sequenciação e análise bioinformática. (Borges *et al.*, 2018).



A



B

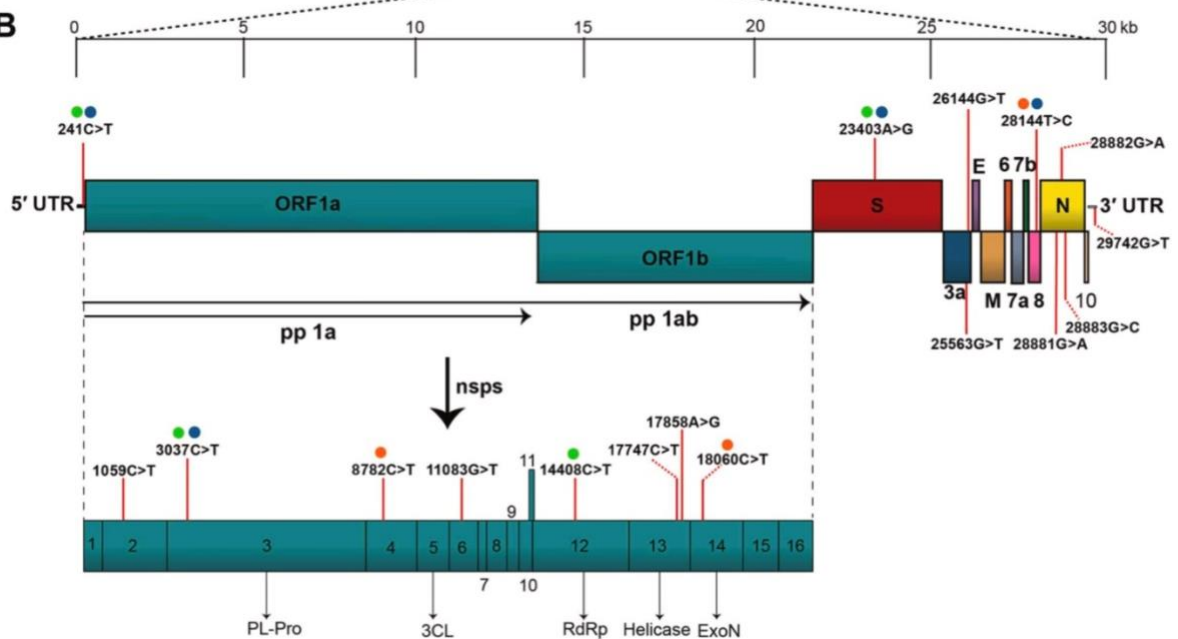
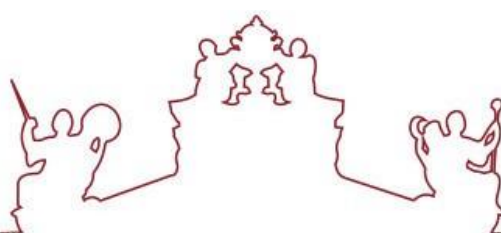
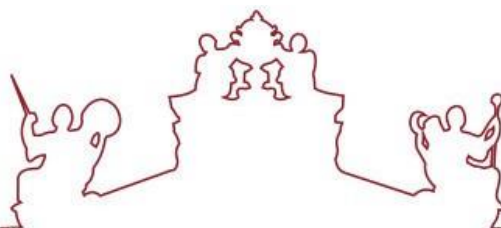


Figura 3. Apresentação esquemática da estrutura e organização do genoma do SARS-CoV-2 com base na sequência de referência (EPI_ISL_412026). (A) O virião é coberto pelas proteínas spike (S), assim como as proteínas de membrana (M) e envelope (E) são colocadas entre as proteínas S no envelope do vírus. O RNA genômico é cercado por proteínas nucleocapsídicas fosforiladas (N) dentro de bicamadas fosfolipídicas. (B) O genoma do SARS-CoV-2 (29.903 nucleotídeos) compreende o 5' UTR, ORF1a/b codificando 16 nsps para replicação, quatro genes que codificam proteínas estruturais, incluindo proteínas S, E, M e N, seis genes acessórios que codificam seis proteínas acessórias como ORF3a, ORF6, ORF7a, ORF7b, ORF8 e ORF10, bem como a 3' UTR. A localização das dezassete mutações e comutações de alta frequência relatadas na literatura são mostradas no genoma por linhas verticais vermelhas e círculos com cores semelhantes, respetivamente. Abreviaturas: SARS-CoV-2, síndrome respiratória aguda grave coronavírus 2; 5' UTR, região 5' não traduzida; ORF, quadro de leitura aberta; nsp, proteína não estrutural (Rahimi, Mirzazadeh and Tavakolpour, 2021).



Morfologicamente, os CoVs são vírus de RNA e possuem os maiores genomas (26-32 kb) de todas as famílias de vírus de RNA. Cada transcrito viral tem uma estrutura 5'-cap e uma cauda 3' poli (A) (Lai and Stohlman, 1981). Os diâmetros de um único virião variam de 50-200 nm (Chatterjee, 2020) uma vez que na maioria das vezes, o virião do SARS-CoV-2 possui uma forma esférica, mas também ocorrem formas pleomórficas e ovais. O envelope viral é constituído por três proteínas: a proteína S-spike que forma os peplómeros e confere ao vírus uma forma característica de coroa, a proteína da membrana M e a proteína do envelope E, que conferem a estrutura do anel (Lu and Shi, 2020; Chen *et al.*, 2020). Existe também uma outra proteína, a proteína N-nucleocapsídeo, uma fosfoproteína, que é um componente estrutural do nucleocapsídeo (Chatterjee, 2020; Lu and Shi, 2020; Navratil *et al.*, 2020; Wu and McGoogan, 2020; Wu *et al.*, 2020). (Figura 4A)

A proteína S pertence às glicoproteínas de fusão do grupo I. É caracterizada por uma estrutura homotrimérica com uma única conformação superior e duas inferiores (Figura 4A) (Luan *et al.*, 2020; Ou *et al.*, 2020; Walls *et al.*, 2020; Yan *et al.*, 2020). A identidade da sequência de aminoácidos da proteína S entre SARS-CoV-1 e SARS-CoV-2 é de cerca de 75,5% (Zheng and Song, 2020). A espícula é composta por duas subunidades: a N'-terminal S1 e a C'-terminal S2, responsáveis pela associação com a célula hospedeira e endocitose do virião, respetivamente. Entre eles está uma região de 4 aminoácidos, envolvida na clivagem da proteína furina durante a biossíntese, que distingue o SARS-CoV-2 do SARS-CoV-1 (Gussow *et al.*, 2020; Harcourt *et al.*, 2020; Liu *et al.*, 2020; Shang *et al.*, 2020; Walls *et al.*, 2020). A subunidade S1 contém um recetor de ligação ao domínio de 200 aminoácidos (RBD) conhecido como domínio CTD-C-terminal (Q. Wang *et al.*, 2020). As subunidades S1 e S2 do SARS-CoV-2 têm aproximadamente 64% e 90% de semelhança com as subunidades análogas do SARS-CoV-1, respetivamente (Ou *et al.*, 2020; Walls *et al.*, 2020; Grudlewska-Buda *et al.*, 2021; Tian and Tao, 2021).



2.1.4. Transmissibilidade

Muitos casos iniciais de COVID-19 estavam ligados ao Mercado grossista de frutos do mar de Wuhan sugerindo que o SARS-CoV-2 teria sido transmitido de animais para humanos, no entanto, o papel do mercado na propagação do vírus não está plenamente “explicado” (Li *et al.*, 2020).

Após o dia 1 de Janeiro, numa análise mais detalhada dos casos foi possível verificar que menos de 10% dos pacientes infetados tinham estado presentes no mercado e que mais de 70% não tinham “sofrido” essa exposição (Li *et al.*, 2020).

Acredita-se que, sendo este vírus um agente infeccioso, a transmissão de indivíduo para indivíduo seja principalmente efetuada por contactos próximos (isto é, através do contacto com objetos/superfícies anteriormente contaminados) mas, maioritariamente por aerossóis e gotículas de secreções respiratórias (Harapan *et al.*, 2020). Os “fómites” (mais especificamente, superfícies de retenção de agentes infecciosos) podem ser uma grande fonte de transmissão, por conseguinte, esta transmissão ocorre de uma forma mais limitado tendo em conta que estes microrganismos são sensíveis à humidade, não sendo viáveis no meio ambiente por longos períodos de tempo, nomeadamente, o SARS-CoV persiste nas superfícies até 96h (Kramer, Schwebke and Kampf, 2006) e outros coronavírus persiste até 9 dias (Kampf *et al.*, 2020). Contudo, o tempo de permanência ativo do vírus nas superfícies também depende da composição da mesma (plástico, aço, cartão, madeira, entre outras (Figura 5).¹

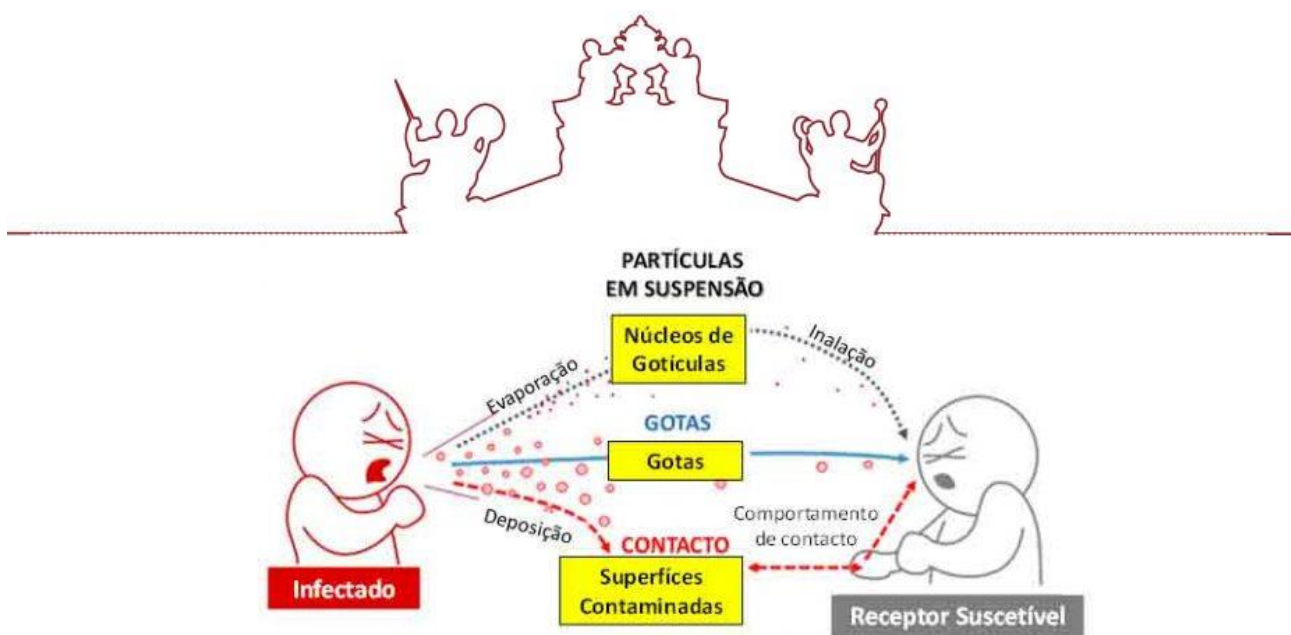
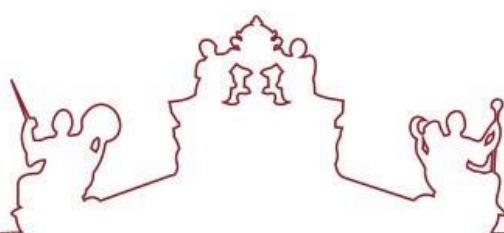


Figura 4. Meios de Transmissão do vírus Sars-CoV-2 (adaptado de Folheto do Gabinete do Primeiro Ministro e do Ministério da Saúde, do Trabalho e Bem-estar do Japão, 2020).

É controverso dizer se há ou não transmissão assintomática do vírus. Um estudo inicial publicado em 30 de Janeiro (Rothe *et al.*, 2020) relatou transmissão assintomática, mas mais tarde os investigadores verificaram que não tinham analisado diretamente o paciente, que de fato, mostrava sintomas antes da transmissão do vírus (Kupferschmidt, 2020). Outro estudo mais recente publicado em 21 de Fevereiro (Bai *et al.*, 2020) também pretendia estudar a transmissão assintomática do vírus, mas qualquer estudo deste tipo pode ser limitado por erros nos sintomas auto-reportados ou por contato com outros casos e “fómites” (Harapan *et al.*, 2020).

Os resultados sobre as características da doença mudam rapidamente e estão sucessivamente sujeitos a tendência de seleção. Um estudo indicou que o período médio de incubação foi de 5,2 dias (intervalo de confiança de 95% [IC95%]: 4,1-7,0) (Li *et al.*, 2020). Geralmente, as verificações de teste positivo/negativo dependem de uma janela de 14 dias (World Health Organization, 2020).

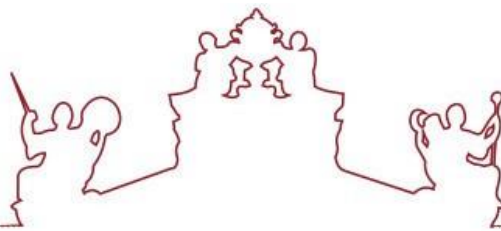


2.1.5. Sinais e Sintomas



Figura 5. Sinais e Sintomas de Infecção pelo vírus Sars-CoV-2 (ilustração: annarodriguezdesign, Infoescola).

As manifestações clínicas da infecção por SARS-CoV-2 têm semelhanças com o SARS-CoV, onde os sintomas mais comuns incluem ageusia (perda do sentido do gosto) e anósmia (perda do olfato), febre, tosse seca, dispneia, dor no peito, fadiga e mialgia (Wang *et al.*, 2020; Huang *et al.*, 2020b; Zhu *et al.*, 2020)[7,30,47]. Existem também sintomas menos comuns, tais como, dor de cabeça, tontura, dor abdominal, diarreia, náuseas e vômitos (Wang *et al.*, 2020; Huang *et al.*, 2020b) (Figura 6). Com base no relato dos primeiros 425 casos confirmados em Wuhan, os sintomas mais comuns incluem febre, tosse seca, mialgia e fadiga, sendo menos comuns a produção de escarro, dor de cabeça, hemoptise, dor abdominal e diarreia (Li *et al.*, 2020). Aproximadamente 75% dos pacientes tinham pneumonia bilateral (N. Chen *et al.*, 2020). A diferença entre as infecções por SARS-CoV e MERS-CoV, baseiam-se que num reduzido número de pacientes com COVID-19 estes apresentaram sinais e sintomas proeminentes do trato respiratório superior, como rinorreia, espirros ou dor de garganta, sugerindo que o vírus pode ter maior preferência por infectar o trato respiratório inferior (Huang *et al.*, 2020a).



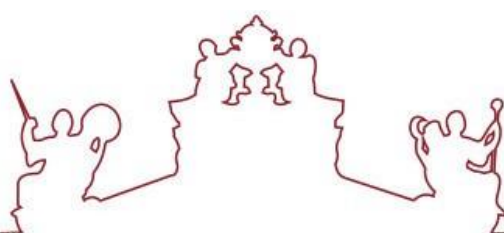
Existem complicações mais graves, como hipoxemia, Síndrome de Angústia Respiratória Aguda (SARA), arritmia. Um estudo com 99 pacientes descobriu que aproximadamente 17% dos pacientes desenvolveram SARA e, entre eles, 11% morreram de falência múltipla de órgãos (Chen *et al.*, 2020) e a duração média dos primeiros sintomas à SARA foi de 8 dias (Wang *et al.*, 2020).

Também são possíveis verificar sinais e sintomas num indivíduo após este ter estado infetado, normalmente designado como “Long or Post-COVID”. Estes podem ser mais gerais tais como, fadiga e cansaço no regresso ao dia-a-dia, alguma febre e também algum sintoma ainda possível aquando de um esforço físico e/ou mental. Após um indivíduo ter estado recentemente infetado pode ainda durante alguns dias continuar a proferir alguns dos sintomas que sofreu (CDC, 2022).

2.1.6. Como é efetuado o diagnóstico laboratorial?

Um dos focos principais para o tratamento e controlo da COVID-19 é o diagnóstico laboratorial rápido e precoce baseados em testes moleculares e serológicos. Os testes moleculares são a base para a confirmação do vírus, por sua vez, os testes serológicos estão amplamente disponíveis e desempenham um papel importante na compreensão da epidemiologia do vírus bem como na identificação de populações com maior risco de infeção. Existem também os testes “point-of-care” (vulgarmente designados como testes rápidos) tendo estes como principais características o facto de apresentarem um resultado rápido, fácil portabilidade e um baixo custo (Robert and Arkadiusz, 2020).

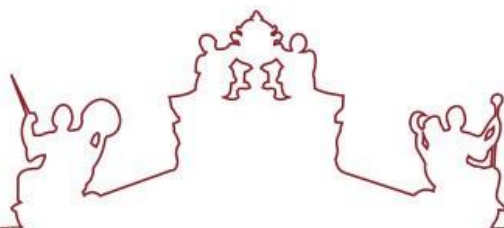
Os tipos de amostras que se utilizam para o diagnóstico são nasofaríngeas (saliva e muco nasal – testes moleculares), urina e sangue (teste serológico) e amostras de fezes (Wang *et al.*, 2020).



Foram efetuados estudos para controlar a propagação da COVID-19, tais como, instituir medidas de quarentena e isolamento e gerir clinicamente e adequadamente os pacientes que exigem ferramentas úteis de triagem e diagnóstico. Enquanto o SARS-CoV-2 se continua a propagar, outras infeções respiratórias podem ser mais comuns na comunidade. A OMS divulgou uma diretriz sobre vigilância de casos de COVID-19 a 31 de janeiro de 2020 (World Health Organization, 2020). Para uma pessoa que apresenta certos critérios, a OMS recomenda a primeira triagem para causas mais comuns de doenças respiratórias, dada a estação do ano e o local de residência. Se um resultado negativo for encontrado, a amostra deve ser enviada para o laboratório de referência para deteção de SARS-CoV-2.

O número de casos pode variar de acordo com o país e evoluirão ao longo do tempo à medida que as circunstâncias epidemiológicas mudam. Na China, um caso confirmado a partir de 15 de janeiro de 2020 exigiu uma ligação epidemiológica com Wuhan de 2 semanas e características clínicas como febre, pneumonia e baixa contagem de glóbulos brancos. A 18 de janeiro de 2020, o critério epidemiológico foi expandido para incluir contato com qualquer indivíduo que tenha estado em Wuhan nas últimas 2 semanas (*Chinese Center for Disease Control and Prevention, 2022*). Posteriormente, o número de casos confirmados refutaram o relacionamento epidemiológico.

Para pacientes que atendem aos critérios diagnósticos para o teste de SARS-CoV-2, o CDC (*Centers for Disease Control and Prevention*) recomenda a colheita de amostras do trato respiratório superior (zangaratoa nasofaríngeo e orofaríngeo) e, se possível, do trato respiratório inferior (saliva, secreção traqueal ou lavado broncoalveolar). Em cada país, os testes são realizados pelos laboratórios designados pelo governo (Harapan *et al.*, 2020).



2.1.7. Vacinação

Aquando do início da pandemia existiam diversos antivirais (por exemplo remdesivir) e medicamentos anti-inflamatórios (por exemplo, tocilizumab) que mostraram resultados aceitáveis para a eliminação do vírus bem como a melhoria dos pacientes. (Xu et al., 2020; Grein, *et al.*, 2020; Nili *et al.*, 2020.

Existem diversos estudos efetuados de vacinas para o combate ao vírus SARS-CoV-2, no entanto, estas não possuem a capacidade de eliminar o vírus, mas sim amenizar e imunizar, e diminuir os efeitos e a transmissibilidade do mesmo nos indivíduos.

As vacinas mais conhecidas até ao momento e as mais aplicadas na vacinação em massa até ao momento são (Figura 7):

- Pfizer, da BioNTech;
- Janssen, da Johnson & Johnson;
- Moderna;
- AstraZeneca/Oxford.

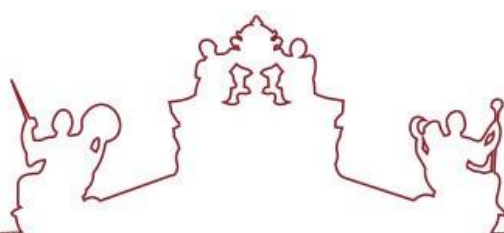


Figura 6.

Vacinas na União Europeia

✓ Já validadas pela Agência Europeia do Medicamento

- Proteção
- Tecnologia
- Refrigeração



Pfizer/ /BioNTech
(EUA/Alemanha)



2 doses
Intervalo:
21 dias

■ **62%** (1.ª dose)
92,6% (1.ª dose)

■ mRNA*
■ 2°C e 8°C (5 dias)



AstraZeneca/ /Oxford
(Reino Unido e Suécia)



2 doses
Intervalo:
8-12 semanas

■ **76%** (1.ª dose)
82,4% (2.ª dose)

■ adenovírus**
■ 2°C e 8°C



Moderna
(EUA)



2 doses
Intervalo:
28 dias

■ **92,1%** (1.ª dose)
94,1% (2.ª dose)

■ mRNA*
■ 2°C e 8°C



Johnson & Johnson/ /Janssen (EUA)



1 dose

■ **85%**

■ adenovírus**

■ 12°C e 8°C

*Feita pela Janssen Pharmaceuticals da Johnson & Johnson na Bélgica

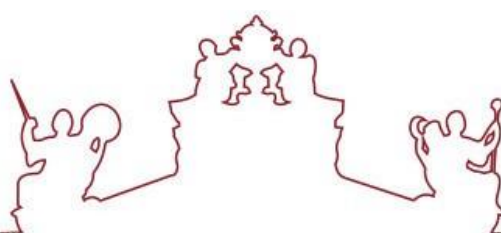
*material genético do vírus, tecnologia inovadora

**usa como suporte outro vírus mais agressivo

FONTE: BMJ, FINANCIAL TIMES, HEALTHLINE, GRAPHIC NEWS INFOGRAFIA JN

Figura 7. Vacinas para prevenção da propagação do SARS-CoV-2 e suas características

Das vacinas anteriormente referidas todas conferem alta imunidade nos indivíduos para com o vírus, no entanto, a que apresenta uma eficácia mais elevada e mais prolongada é a vacina da Pfizer, uma vez que apresenta um valor de imunidade a rondar os 69% em períodos superiores a 150 dias. Já existem mais dosagens a ser administradas bem como outras novas vacinas a ser também administradas, no entanto, as 4 vacinas referidas continuam sendo as mais utilizadas por maioria dos laboratórios de vacinação e hospitais em Portugal.



2.2. Biologia Molecular na Detecção de Vírus

Os vírus patogénicos são vírus que podem infetar e se replicar dentro das células humanas e causar doenças. A sua contínua emergência e reemergência de vírus patogénicos tornou-se uma grande ameaça à saúde pública.

Sempre que surgem vírus patogénicos, a sua rápida deteção é fundamental para permitir a implementação de medidas específicas de controlo e a limitação da propagação do vírus. Uma caracterização molecular adicional para entender melhor esses vírus é necessária para o desenvolvimento de testes diagnósticos e contramedidas (Artika, Wiyatno and Ma'roef, 2020).

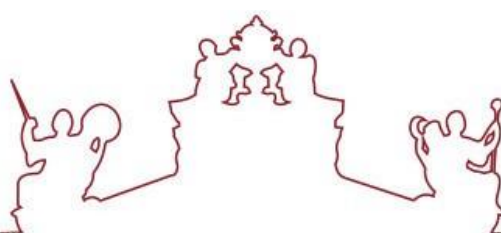
Os avanços nas técnicas de biologia molecular revolucionaram os procedimentos de deteção e caracterização de vírus patogénicos. O desenvolvimento de técnicas baseadas em PCR, juntamente com a tecnologia de sequenciação de DNA, forneceram métodos altamente sensíveis e específicos para determinar a circulação do vírus.

Vírus potencialmente patogénicos com consequências catastróficas globais podem surgir em regiões onde a capacidade de deteção e caracterização é limitada sendo o desenvolvimento de uma capacidade local para identificar rapidamente novos vírus fundamental. Os princípios de boas práticas de laboratório para manipulação de vírus patogénicos também são discutidos (Artika, Wiyatno and Ma'roef, 2020).

2.2.1. Quais as suas vantagens?

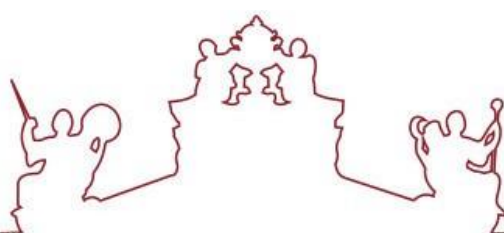
A deteção rápida e precisa de vírus emergentes é essencial para uma resposta rápida, atendimento clínico otimizado e para limitar a propagação desses vírus. Idealmente, um teste de diagnóstico necessita de ser rápido, barato, preciso e aplicável em ambientes remotos (Powers and Waterman, 2017; Chertow, 2018).

No passado, o diagnóstico de vírus patogénicos era baseado no isolamento do vírus e na serologia, no entanto, esses métodos têm algumas vantagens e desvantagens.



Apresenta como vantagens uma alta sensibilidade e especificidade na investigação do alvo de interesse, ou seja, gera resultados mais precisos, permitindo também uma maior reprodutibilidade dos ensaios, contando com protocolos práticos e kits de fácil utilização e, por fim, apresenta uma elevada performance, uma vez que, para além de reduzir o tempo de análise e libertação de resultados é mais rápida que as técnicas *Gold Standard* (RT-PCR, eletroforese, entre outros) . Como desvantagens são evidenciadas o facto de o isolamento do vírus ser dispendioso e trabalhoso, os testes serológicos carecem da sensibilidade e especificidade necessárias para a deteção de vírus em nível baixo (Artika, Wiyatno and Ma'roef, 2020).

Avanços nos métodos moleculares revolucionaram a deteção e caracterização de vírus emergentes, sendo estes métodos empregados em estudos de biologia molecular e outras disciplinas das ciências biológicas que lidam com manipulação e análise de ácidos nucleicos e proteínas. Atualmente, os métodos moleculares encontram ampla aplicação no diagnóstico e pesquisa de vírus patogénicos. Um dos métodos moleculares amplamente utilizados na deteção e identificação de vírus patogénicos é a reação em cadeia da polimerase (PCR) (Artika, Wiyatno and Ma'roef, 2020).



3. Águas Residuais

As águas residuais podem ter várias definições. Assim, águas residuais são definidas como uma combinação de um ou mais de:

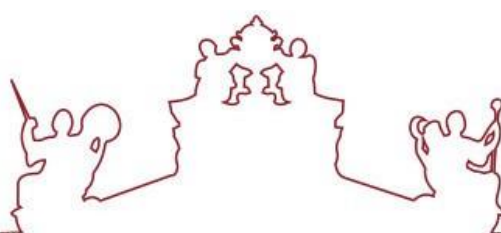
- efluente doméstico constituído por águas negras (excrementos, urina e lamas fecais) e águas cinzentas (águas residuais de cozinha e balneários);
- água de estabelecimentos e instituições comerciais, incluindo hospitais;
- efluentes industriais, águas pluviais e outros escoamentos urbanos;
- efluentes agrícolas, hortícolas e aquícolas, dissolvidos ou em suspensão (Corcoran et al. 2010).

Embora, usando esta definição, o termo “águas residuais” claramente englobe componentes domésticos, comerciais, industriais, agrícolas e também lodo fecal, estes são às vezes cobertos separadamente para esclarecer ou destacar a importância dos componentes individuais ou fluxos de águas residuais (A UN-Water Analytical Brief, 2017).

O RNA do SARS-CoV-2 é frequentemente detetado na urina e nas fezes de indivíduos infetados.

Existem dois tipos de amostra de vigilância de águas residuais:

- **Águas residuais não tratadas:** As águas residuais não tratadas incluem resíduos de uso doméstico ou de construção (por exemplo, sanitários, chuveiros, pias), que contêm resíduos fecais humanos, bem como resíduos de fontes não domésticas (por exemplo, água da chuva, uso industrial). As águas residuais não tratadas podem ser amostradas a partir do afluente da estação de tratamento de águas residuais (antes do tratamento primário) ou a montante na rede de recolha de águas residuais. As alterações nas concentrações de RNA do SARS-CoV-2 em amostras de águas residuais coletadas de afluentes da estação de tratamento de águas



residuais demonstraram se correlacionar com as tendências nos casos relatados. Na maioria dos casos, águas residuais não tratadas provavelmente exigirão concentração antes da extração de RNA. O número de infecções necessárias para detetar o vírus em águas residuais sem concentração é difícil de determinar porque depende tanto do limite de deteção do método quanto da quantidade de vírus nas fezes, para os quais existem poucos dados (CDC, 2022).

- **Lamas primárias:** compreendem sólidos suspensos que se depositam nas águas residuais durante o primeiro processo de remoção de sólidos (“sedimentação”) em uma estação de tratamento de águas residuais. A lama primária é distinta do lodo secundário, que passou por um tratamento inicial que pode remover o RNA do SARS-CoV-2. As alterações nas concentrações de RNA do SARS-CoV-2 em amostras primárias de lama demonstraram se correlacionar com as tendências nos casos relatados. Uma vantagem das amostras primárias de lama em comparação com as águas residuais não tratadas é que o SARS-CoV-2 se concentra na lama, o que reduz o volume de amostra necessário para detetar o vírus e pode eliminar a necessidade de concentrar a amostra antes da quantificação. No entanto, a extensão da concentração de RNA do SARS-CoV-2 na lama não está bem caracterizada. Amostras de lodo também podem apresentar desafios que devem ser avaliados para cada estação de tratamento de águas residuais, como produtos químicos adicionados na estação de tratamento, concentrações aumentadas de compostos que podem interferir nos métodos laboratoriais ou a adição de fluxos de resíduos reciclados de outras partes da estação de tratamento (CDC, 2022).

3.1. ETAR’S

As Estações de Tratamento de Águas Residuais (ETARs) é onde ocorre toda a transformação das águas “suja” (Figura 8).

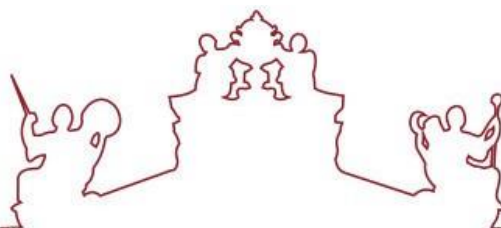


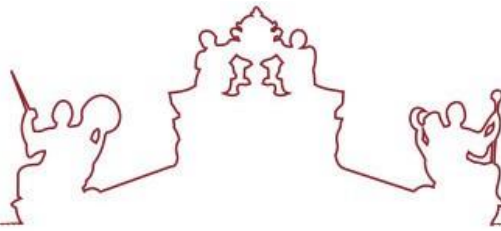
Figura 7. Exemplo de uma Estação de Tratamento de Águas residuais (ETAR)

3.2. Efluentes Hospitalares

As águas residuais hospitalares contêm uma variedade de substâncias tóxicas ou persistentes, como produtos farmacêuticos, radioisótopo, solventes e desinfetantes para fins médicos numa ampla gama de concentrações devido a atividades laboratoriais e de pesquisa ou excreção de medicamentos principalmente da parte dos pacientes (Verlicchi *et al.*, 2010).

A maioria desses compostos pertence aos designados como contaminantes emergentes. Muitas vezes poluentes não regulamentados que podem ser candidatos a regulamentação futura dependendo de pesquisas sobre seus potenciais efeitos à saúde e monitoramento de sua ocorrência. A sua principal característica é que não precisam persistir no meio ambiente para causar efeitos negativos uma vez que as suas altas taxas de transformação/remoção podem ser compensadas por sua introdução contínua no meio ambiente (Verlicchi *et al.*, 2010).

Alguns desses compostos, a maioria farmacêuticos e produtos de cuidado pessoal, também podem estar presentes em efluentes urbanos e as suas concentrações nos efluentes podem variar de ng L^{-1} a $\mu\text{g L}^{-1}$.



3.3. Componentes Presentes

As águas residuais caracterizadas por meio de um conjunto de parâmetros, nomeadamente, físicos, químicos e biológicos. Dentro dos parâmetros físicos podemos verificar a cor, o odor, sólidos e a temperatura, ao contrário do que, por sua vez, nos biológicos encontramos essencialmente microorganismos (e.g., bactérias). Indo ao encontro dos produtos químicos presentes nestas águas, os mais comuns são os poluentes prioritários (nomeadamente orgânicos, tais como, hidrocarbonetos, gorduras animais, óleo, pesticidas, fenol, proteínas, etc.), inorgânicos e gases (tais como, sulfato de hidrogénio, metano e oxigénio e hidrogénio (H₂O)) (A UN-Water Analytical Brief, 2017).

3.4. Comparação entre metodologias de deteção do SARS-CoV-2 nas águas residuais

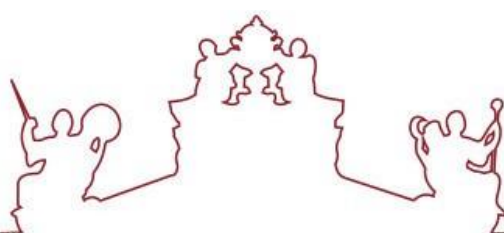
Para este subcapítulo foram recolhidos alguns estudos efectuados para a possível comparação entre eles e entre nossa metodologia:

- **Caso de Estudo nº1:**

Métodos descritos anteriormente para avaliar a persistência e desinfeção do vírus Ébola nas águas residuais esterilizadas e em superfícies foram adotados para SARS-CoV-2 (Fischer *et al.*, 2015; Bibby *et al.*, 2017).

A 5 de agosto de 2019, aproximadamente 1 L de efluente primário não tratado foi recolhido de uma estação municipal de tratamento de águas residuais no norte de Indiana, Estados Unidos, que recebe em média de 11 milhões de litros por dia (MGD). Imediatamente após a colheita, a amostra foi armazenada durante a noite a -80 °C e a 6 de agosto de 2019, enviada para os Laboratórios Rocky Mountain (RML) durante a noite sempre em congelação e foi então novamente armazenada a -80 °C no respetivo laboratório (RML) até que a experiência fosse iniciada (Bivins *et al.*, 2020).

Segundo o estudo efetuado por Corman *et al.*, (2020) que propôs este estudo, para



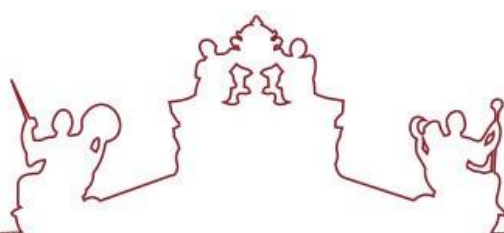
determinar a estabilidade do sinal de RNA SARS-CoV-2 em águas residuais, as amostras foram analisadas por RT-qPCR. As amostras foram inativadas primeiramente usando o procedimento operacional padrão (SOP) para transferir amostras do laboratório de segurança biológica nível 4 (BSL4) e transferir para o BSL2. O RNA foi extraído usando um QIAamp 96 Virus QIAcube HT Kit com um sistema de vácuo QIAvac 96 (Qiagen) seguindo as instruções do fabricante. O ensaio RT-qPCR usado tem como alvo o gene E do SARS-CoV-2. Resumidamente, o RNA extraído foi medido usando reagentes QuantiFast Probe RT-PCR + ROX Vial Kit (Qiagen) em um termociclador em tempo real Rotor-Gene Q (Qiagen). As condições da reação foram as seguintes: transcrição reversa por 10 minutos a 50°C, desnaturação e ativação por 5 minutos a 95°C e reação em duas etapas de 10 s a 95°C e 30 s a 60°C por 40 ciclos. O conjunto *primer*/sonda usado para o ensaio do gene E é o mesmo usado no ensaio de Berlim (Bivins *et al.*, 2020).

o **Caso de Estudo nº2:**

De acordo com (Haramoto, Yamada and Nishida, 2011; Haramoto *et al.*, 2012) com pequenas modificações conforme descrito anteriormente (Malla *et al.*, 2019), a concentração de vírus e extração de RNA foram realizadas usando dois métodos.

No primeiro método, as amostras de água (águas residuais e águas de rio) (V = 200 mL) foram concentradas utilizando o método de vórtex de membrana eletronegativo (EMV) e, posteriormente, filtradas através de uma membrana mista de éster de celulose (tamanho do poro, 0,8 µm; diâmetro, 90 mm; Merck Millipore, Billerica, MA, EUA). Subsequentemente, 10 mL de um tampão de eluição contendo 0,2 g/L de difosfato de sódio deca-hidratado (Na₄P₂O₇ 10H₂O), 0,3 g/L de sal trissódico de ácido etilenodiaminotetracético tri-hidratado (C₁₀H₁₃N₂O₈Na₃ 3H₂O) e 0,1 mL/L de Tween 80 (polioxietileno (20) sorbitanomonooleato) foram adicionados num tubo plástico de 50 mL contendo a membrana (Haramoto *et al.*, 2020).

A etapa de eluição foi realizada por uma agitação por vortex do tubo contendo a



membrana e uma barra de agitação em forma de esfera. Este procedimento foi repetido adicionando 5 mL do tampão de eluição para obter um volume final de, aproximadamente, 15ml. Posteriormente, seguiu-se uma etapa de centrifugação a 2.000G, durante 10 min, a uma temperatura de 4° C para obter o sobrenadante. Uma unidade de filtro de membrana descartável (tamanho do poro, 0,45 µm; diâmetro, 25 mm; Advantec, Tóquio, Japão) foi usada para a filtração do sobrenadante e, o filtrado foi subsequentemente concentrado usando um dispositivo de ultrafiltração Centriprep YM-50 (Merck Millipore) para obter um concentrado de vírus. Cerca de 140 µL do concentrado de vírus foram para extração de RNA viral com um Mini Kit de RNA Viral QIAamp (Qiagen, Hilden, Alemanha) em uma plataforma automatizada QIAcube (Qiagen) para obter um extrato de RNA de, aproximadamente, 60 µL.

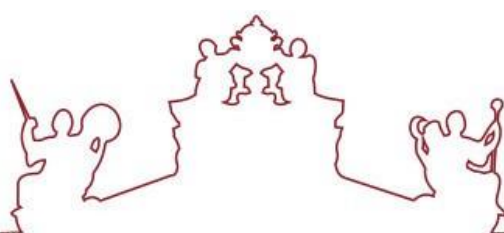
No segundo método, foi utilizado um método de extração de RNA direto por adsorção, as amostras de água com 25 mM de MgCl₂ foram filtradas através de uma membrana mista de éster de celulose (tamanho do poro, 0,8 µm; diâmetro, 90 mm; Merck Millipore). O RNA foi extraído diretamente de 1/4 da membrana que foi inserida num tubo de esferas PowerWater de 5 mL de um Kit RNeasy PowerWater (Qiagen). Por fim, 50 µL de extrato de RNA foi obtido de acordo com as instruções do fabricante (Haramoto *et al.*, 2020).

Um kit de transcrição reversa de cDNA de alta capacidade (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) foi utilizado para obter um cDNA de 60 µL de um RNA viral de 30 µL para ambos os métodos, seguindo o protocolo do fabricante.

Conforme recomendado anteriormente (Haramoto *et al.*, 2018), o colifago MS2 (controlo interno deste estudo) (ATCC 15597-B1) foi adicionado à amostra antes da extração do RNA como controle do processo molecular.

○ **Caso de Estudo nº3:**

Doze amostras de esgoto bruto foram coletadas entre 3 de fevereiro e 2 de abril de



2020 de três ETAR's, localizadas em Milão (duas ETAR'S distintas, informadas como A e B) e em Roma (uma ETAR recebendo duas condutas diferentes, C1 e C2, de diferentes bairros da cidade), respectivamente (La Rosa *et al.*, 2020).

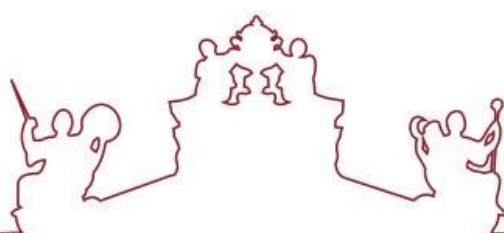
A amostragem foi efetuada de forma composta, onde durante 24 horas, foram recolhidas amostras do afluente das ETAR's, imediatamente armazenadas a -20°C e enviadas em congelação para o Instituto Nacional de Saúde para análise.

Antes da deteção da concentração viral, as amostras foram submetidas a um tratamento de 30 minutos a 56°C para aumentar a segurança do protocolo analítico para os colaboradores do laboratório e para o ambiente. Após o tratamento térmico, as amostras foram processadas numa câmara de segurança biológica de classe II e foram aplicadas as normas de boas práticas laboratoriais (produtos para higiene das mãos e equipamentos de proteção individual (EPI's), como luvas, aventais, proteção facial e ocular).

A concentração da amostra ocorreu por meio de separação em duas fases (método PEG-dextrano), conforme detalhado no protocolo das Diretrizes para Vigilância Ambiental do Poliovírus da OMS de 2003 (Organização Mundial da Saúde, 2003a), com modificações para adaptar o protocolo aos vírus envelopados.

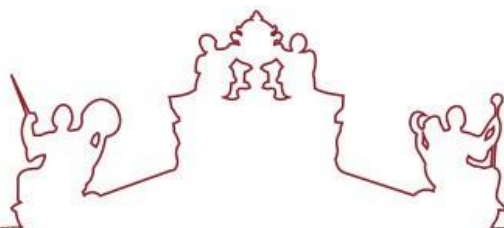
Resumindo, a amostra de efluente (250 ml) foi centrifugada para granular os sólidos do efluente, retendo o granulado para processamento posterior. A água residual clarificada foi misturada com dextrano e polietilenoglicol (PEG), e a mistura ficou em repouso durante a noite, a uma temperatura de 4°C , num funil de separação. A camada inferior e a interface foram recolhidas gota a gota e este concentrado foi adicionado ao sedimento da centrifugação inicial. O tratamento com clorofórmio que o protocolo da OMS prevê nesta fase foi omitido para preservar a integridade dos vírus envelopados objeto deste estudo (La Rosa *et al.*, 2020).

A extração do RNA viral foi efetuada através do sistema de extração semiautomatizado NucliSENS miniMAG com sílica magnética e realizada de acordo com



as instruções do fabricante (bioMerieux, Marcy l'Etoile, França) porém, com pequenas modificações. A fase de lise foi prolongada para 20 min, uma rápida centrifugação (2000 G, 1 min) foi usada para sedimentar o RNA e, posteriormente, esferas magnéticas de sílica foram adicionadas ao sobrenadante limpo. Antes dos testes moleculares, os ácidos nucleicos extraídos foram ainda purificados de potenciais inibidores de PCR usando o OneStep PCR Inhibitor Removal Kit (Zymo Research, CA, EUA).

Na ausência de um método padronizado para detecção de SARS-CoV-2 em amostras ambientais, os RNA's foram testados quanto à presença de SARS-CoV-2 usando três diferentes conjuntos de primers e sondas de RT-PCR aninhados (localização muito próxima) e um ensaio de qPCR em tempo real (La Rosa *et al.*, 2020).



4. Projeto ARCO

4.1. Enquadramento, objetivos e solução proposta

O Projeto ARCO tem como objetivo proporcionar à região do Alentejo infraestruturas, recursos e capacidade analítica que possam proporcionar uma resposta tangível ao seguimento e controlo da pandemia COVID-19. Irão se desenvolver várias atividades que terão como objetivo contribuir para uma melhor compreensão da pandemia.

Um dos desafios deste projeto é investigar a presença do vírus SARS-CoV-2 nas estações de tratamento de águas residuais, de uma população com surtos, podendo assim, monitorizar cidades onde nunca tenha sido detetado um surto.

Tem como principais objetivos:

- I. Implementar e validar o sistema de deteção do SARS-CoV-2 nas estações de águas residuais (ETAR's) e efluentes de hospitais adjacentes, com o fim de criar um sistema de alerta antecipado e de vigilância;
- II. Pretende-se também provar a eficiência das ETAR's, no que diz respeito ao tratamento de efluentes, mediante diversas amostragens, na entrada e saída das mesmas e, também, nos mesmo locais dos efluentes hospitalares;
- III. Em caso de falha no tratamento das ETAR's, pretende-se analisar a perigosidade dos efluentes das ETAR's que "são derramados" para os ambientes naturais e a possível contaminação dos corpos de água a jusante e, comprometer os objetivos ambientais da Diretiva Quadro de Água (DQA).

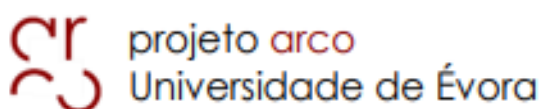
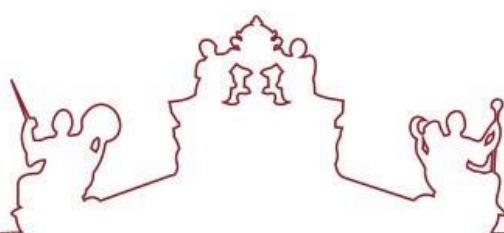


Figura 8. Logotipo do Projeto ARCO



5. Epidemiologia da Pandemia

5.1. Recolha de Amostras

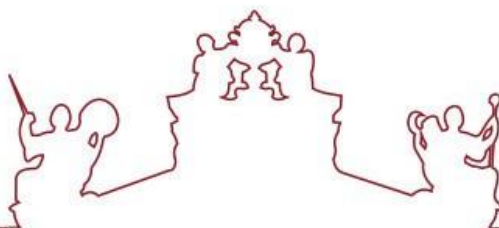
Na componente mais teórica deste estudo foi efetuada uma observação/acompanhamento contínuo de dados epidemiológicos da região de Évora, bem como a nível do Alentejo no geral e nacional. Esta recolha foi efetuada nomeadamente desde o dia 1 de Janeiro de 2021 até à fase de alívio da pandemia, uma vez que foi entre o dia 1 de Janeiro de 2021 até cerca do dia 30 de junho de 2021 onde se deu um dos picos mais críticos da pandemia, bem como, os mínimos da mesma.

Para a região do Alentejo a observação incidiu-se apenas nos casos confirmados até ao final de cada dia e no número de óbitos que se registou nesse mesmo dia. A nível nacional já foi efetuada um acompanhamento um pouco mais abrangente/alargado, em que foram observados os dados do número de contactos em vigilância, casos confirmados, casos recuperados, casos ativos e óbitos.

Para a região de Évora, tal como a nível nacional, foi efetuada um acompanhamento a nível do número de casos recuperados, totais, ativos e óbitos, no entanto, através das informações facultadas foi possível registar mais facilmente o número de novos casos a cada dia.

O acompanhamento da evolução/regressão da pandemia foi possível com recurso à plataforma online WorldoMeter, bem como através o link do SNS-COVID-19 e informações partilhadas pelas câmaras municipais das respetivas regiões de análise, posteriormente referidas (<https://www.worldometers.info/coronavirus/>).

Na componente mais prática, foi efetuada uma recolha de amostras de águas residuais na ETAR de Évora e Odemira e, entrada e saída, não tratada e tratada, respetivamente e no Hospital do Espírito Santo de Évora.



5.2. Análise Laboratorial

Em primeiro lugar, é importante referir que os processamentos e análises das amostras recolhidas tem de ser efetuados no mesmo dia, uma vez que, a amostra de água pode perder algumas das suas propriedades (RNA viral pode ser danificado).

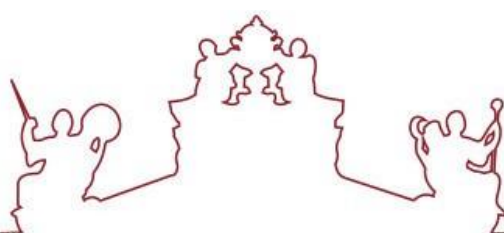
Após receção das amostras no laboratório é efetuada uma Filtração de Fluxo Tangencial, que efetua uma filtração de tal forma eficaz que no concentrado final encontram-se possivelmente presentes todos os componentes que se querem analisar, neste caso, o vírus Sars-CoV-2.

Após esse passo, prossegue-se a extração de RNA total para a deteção do SARS-CoV-2 nas águas residuais, em que se utiliza um Kit específico, nomeadamente o E.Z.N.A.® Total RNA kit II (R6934), da OMEGA.

Por fim, após a extração do RNA total segue-se a análise RT-PCR, onde, por fim, com recurso ao primeiro específico para o SARS-CoV-2, o gene RdRp, é possível verificar a existência ou inexistência do vírus.

5.3. Análise de Dados

Como referido anteriormente foi feita uma recolha de dados epidemiológicos de forma a obtermos uma relação com os resultados do projeto a desenvolver com a evolução/regressão da pandemia com o decorrer do tempo.



Através da visualização e análise detalhada dos gráficos/diagramas a seguir apresentados, é possível observar a linha de tendência crescente, e no de barras os diversos picos da pandemia (Figura 10 e 11).

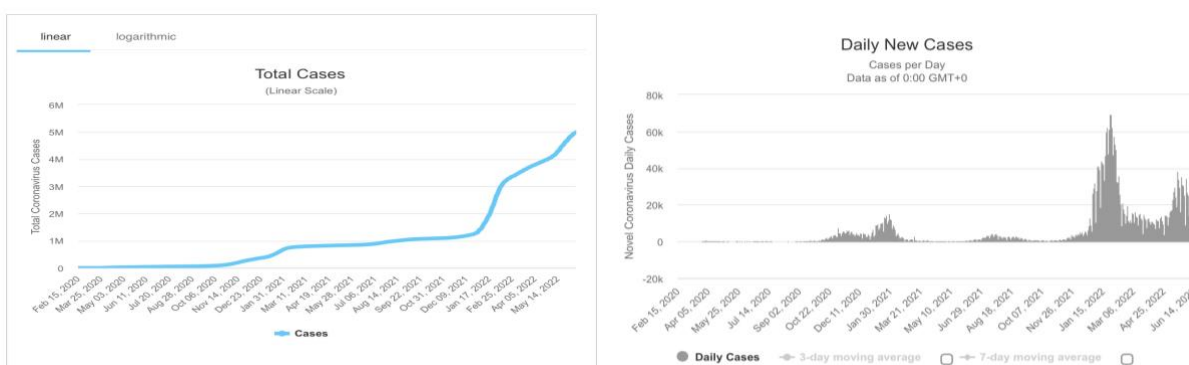


Figura 9. Gráfico e diagrama com número de novos casos diários em Portugal.
[\(https://www.worldometers.info/coronavirus/country/portugal/\)](https://www.worldometers.info/coronavirus/country/portugal/)

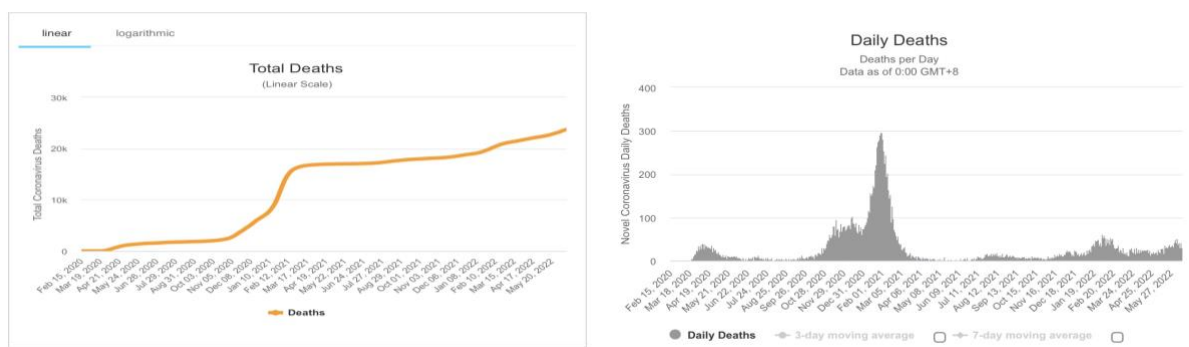
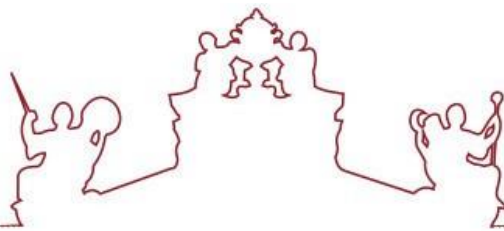


Figura 10. Gráfico e diagrama com número de mortes diários em Portugal.
[\(https://www.worldometers.info/coronavirus/country/portugal/\)](https://www.worldometers.info/coronavirus/country/portugal/)



C. Metodologia

1. Amostragem e Condições de Filtração

A amostragem foi efetuada nos dias 5 de Abril de 2022 na região de Évora e 19 de Abril de 2022 na região de Odemira (não representada na figura uma vez que esta é meramente para compreensão do estudo).

As amostras foram recolhidas e transportadas, a 4°C, para o Laboratório da Água da Universidade de Évora onde foram processadas. Antes das amostras serem submetidas ao processo de Filtração por Fluxo Tangencial (TFF), uma parte da amostra foi submetida a uma pré-filtração a vácuo, através de uma membrana com poro cerca de 1 µm, com o objetivo de reter as partículas de maior dimensão em suspensão. Outra parte da amostra foi filtrada diretamente no sistema TFF sem pré-filtração. Vários volumes de amostra foram filtrados em ambas as condições acima referidas de modo a verificar se o volume filtrado teria alguma influência no resultado final (Figura 12 e 13).

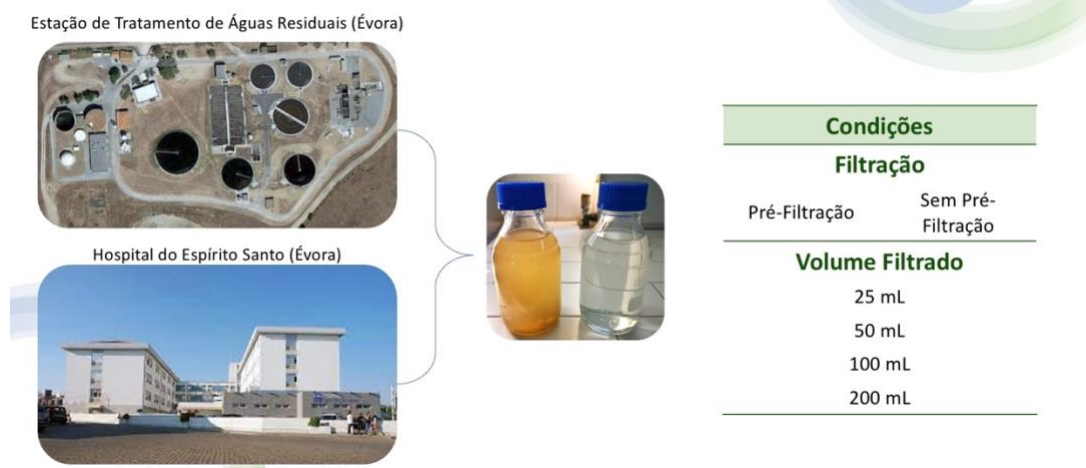
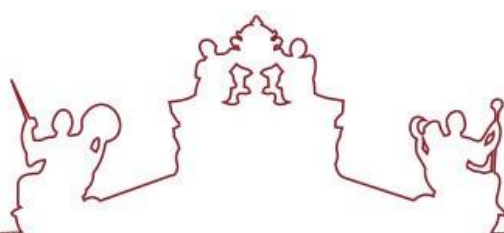


Figura 11. Condições testadas antes das Filtração por Fluxo Tangencial.



2. Filtração de Fluxo Tangencial

A Filtração de Fluxo Tangencial é um método rápido e eficiente para a concentração ou remoção de biomoléculas. Pode ser usado em uma ampla gama de aplicações, entre as quais:

- Concentração e dessalinização de proteínas, péptidos ou ácidos nucleicos (DNA, RNA, oligonucleótidos);
- Recuperar anticorpos ou proteínas recombinantes de meio de cultura celular;
- Processar enzimas e moléculas sensíveis a metais;
- Separar (fracionar) as biomoléculas grandes das pequenas;
- Recuperar ou remover vírus de soluções;
- Preparar as amostras antes da cromatografia em coluna;
- Concentrar as amostras após a filtração em gel;
- Substituir os aplicativos de diálise.

Este sistema utiliza uma membrana específica, a cápsula Minimate™ (TFF) para realizar a concentração em soluções de biomoléculas. As membranas são envoltas em um invólucro de polipropileno com conectores Luer nas portas de alimentação, retido e filtrado para fácil conexão a uma bomba e acessórios (PALL, Life Sciences, Care and Use Procedures, PN 88227, Minimate™ TFF Capsule).

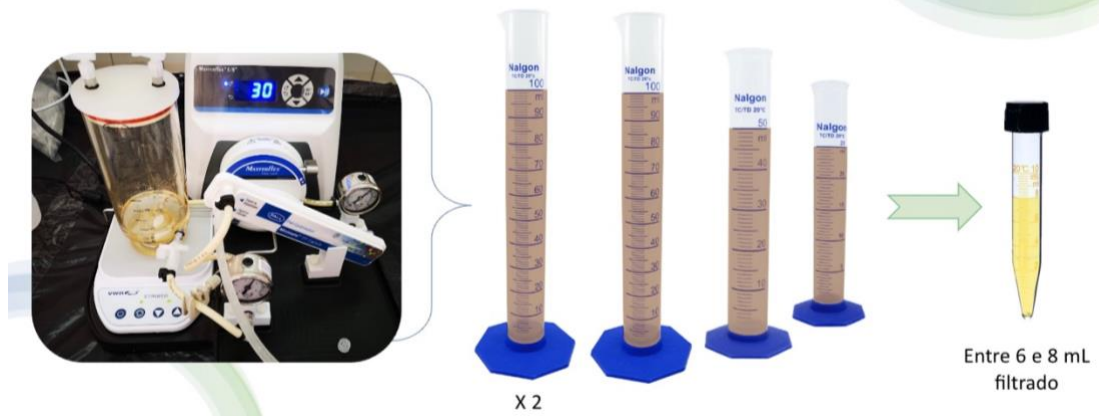
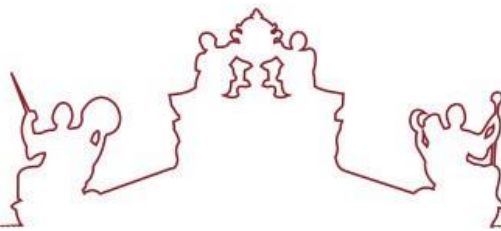


Figura 12. Esquema de volumes utilizados neste trabalho e volume final filtrado obtido, entre 6 e 8 mL.

3. Extração de Ácidos Nucleicos (RNA)

A metodologia de Extração de RNA total foi efetuada recorrendo ao kit E.Z.N.A.® Total RNA kit II seguindo as indicações do fabricante (Figura 14).

Realizada em análises laboratoriais de RNA, a extração e purificação dos ácidos nucleicos é um processo dividido em quatro etapas principais:

- ✓ Lise das membranas que contém lípidos;
- ✓ Purificação do RNA;
- ✓ Trabalho de precipitação do RNA;
- ✓ Finalização com a re-hidratação do RNA.

No primeiro passo do procedimento é efetuado um rompimento total das células. É neste passo de lise que se adiciona o RNA-IPC (controlo interno da reação), sendo esta uma sequência de RNA não específica que controla se a reação de PCR ocorre sem produtos de inibição.

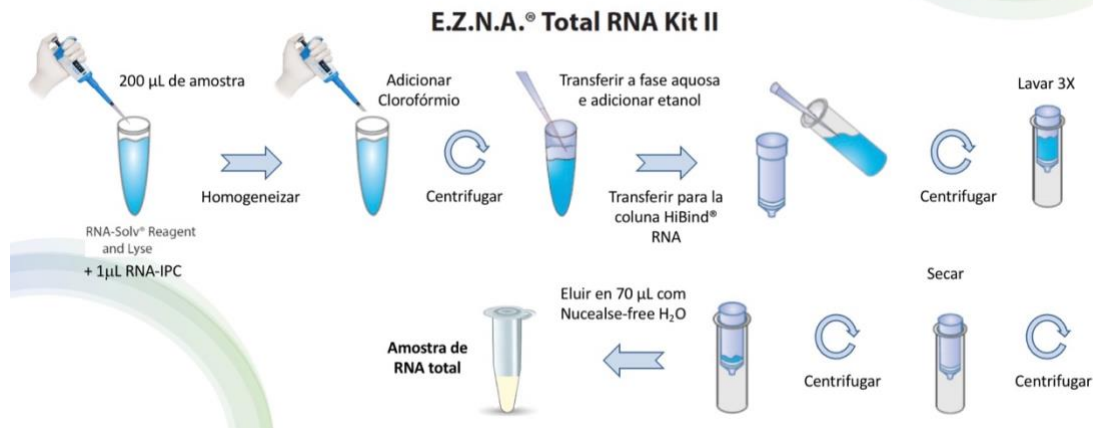
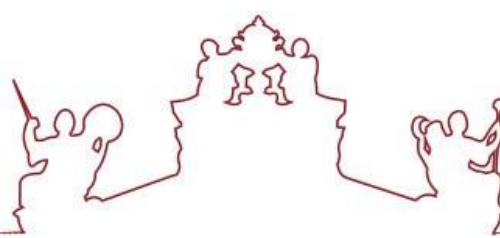
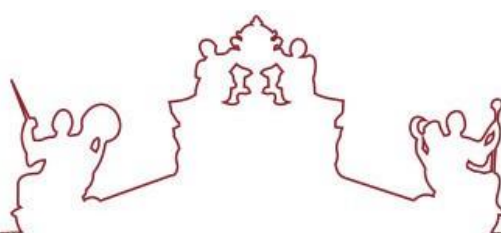


Figura 13. Esquema do procedimento de Extração de RNA total seguindo as instruções do fabricante do kit E.Z.N.A.®, Omega

4. Reação em Cadeia de Polimerase em Tempo Real (RT-PCR) com Transcriptase Reversa

A PCR é um processo enzimático *in vitro* usado para amplificar uma única ou algumas cópias de DNA em várias ordens de magnitude, resultando em milhares a milhões de cópias de um fragmento de DNA específico. É uma técnica poderosa que se tornou uma das técnicas mais utilizadas em biologia molecular por ser rápida, barata e simples (Joshi e Deshpande, 2011). Os ingredientes necessários para o ensaio de PCR incluem DNA modelo, *primers*, nucleotídeos e polimerase de DNA termoestável. A DNA polimerase é a principal enzima responsável pela ligação de nucleotídeos individuais para formar o produto de PCR. Os nucleotídeos constituem quatro bases, adenina (A), timina (T), citosina (C) e guanina (G) que atuam como os blocos de construção usados pela DNA polimerase para sintetizar o produto da PCR. O *primer* é um pequeno pedaço de DNA de fita simples (geralmente cerca de 18 a 22 bases) com uma sequência definida complementar ao DNA alvo que deve ser detetado e amplificado. Vários fatores precisam ser considerados no projeto de *primers*. O tamanho dos *primers* é otimizado para ser longo o suficiente para especificidade adequada e curto o suficiente para que o *primer* se ligue



facilmente ao modelo na temperatura de hibridização. Durante o processo de PCR, os *primers* funcionam como pontos de partida para a síntese de DNA. Eles são necessários porque as DNA polimerases só podem adicionar novos nucleotídeos a uma fita de DNA existente. O emparelhamento de *primers* na reação (*primers* diretos e reversos) especifica o fragmento de DNA exato a ser amplificado (Garibyan e Avashia, 2013).

Um bom design de *primer* e condições de PCR otimizadas são essenciais para uma reação bem-sucedida. Por exemplo, em um estudo para caracterizar a influenza humana A(H3N2) circulando na Indonésia, para obter a sequência de codificação completa do gene HA e NA do vírus, conjuntos de *primers* específicos tiveram que ser desenvolvidos e testados usando amostras do vírus H3N2 (Agustiningsih et al., 2016, (Artika, Wiyatno and Ma'roef, 2020).

A metodologia de RT-PCR apresentada neste trabalho foi usando o kit ViroReal® Kit SARS-CoV-2 Multiplex, Ingenetix. Este kit permite detetar 3 genes: o gene N, que amplifica o gene responsável pela proteína do Nucleosídeo que envolve a cadeia de RNA do SARS-CoV-2; o gene RdRp responsável pela produção da proteína viral (proteína S); e por último o gene RNA-IPC que se trata de RNA não específico que serve como controlo interno da reação de RT-PCR, tal como mencionado anteriormente (Figura 15).

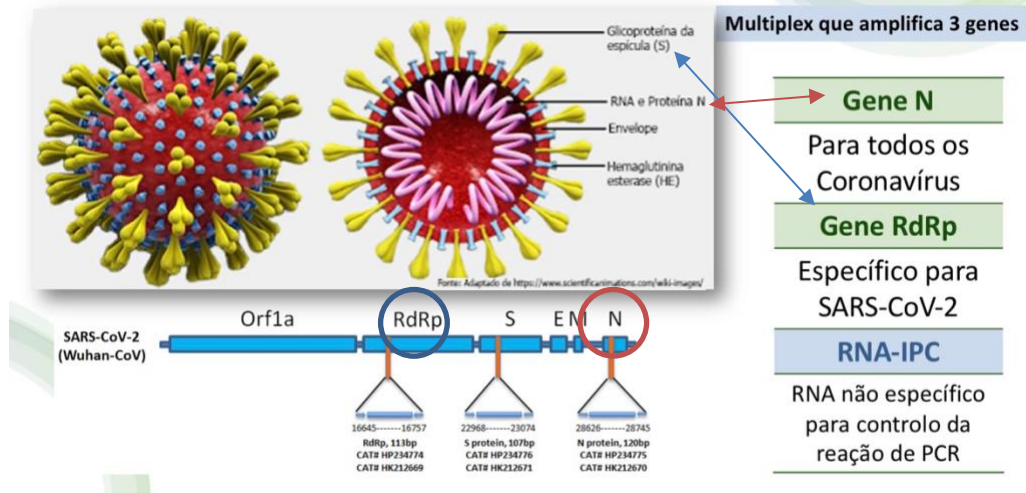
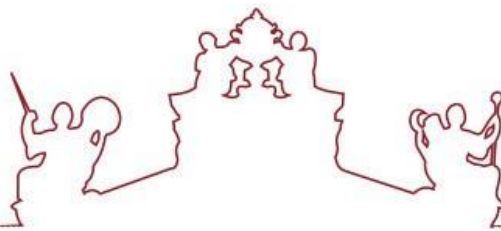


Figura 14. Esquema da estrutura do vírus SARS-CoV-2 com representação do genoma do respetivo genoma, com identificação dos genes amplificados..

O protocolo PCR está representado na figura 16.

Antes do procedimento corrente de PCR, no RT-PCR, existe um passo inicial a uma temperatura mais baixa (cerca de 50°C) que envolve a síntese de DNA complementar (cDNA), ou seja, a transformação do RNA viral em DNA complementar.

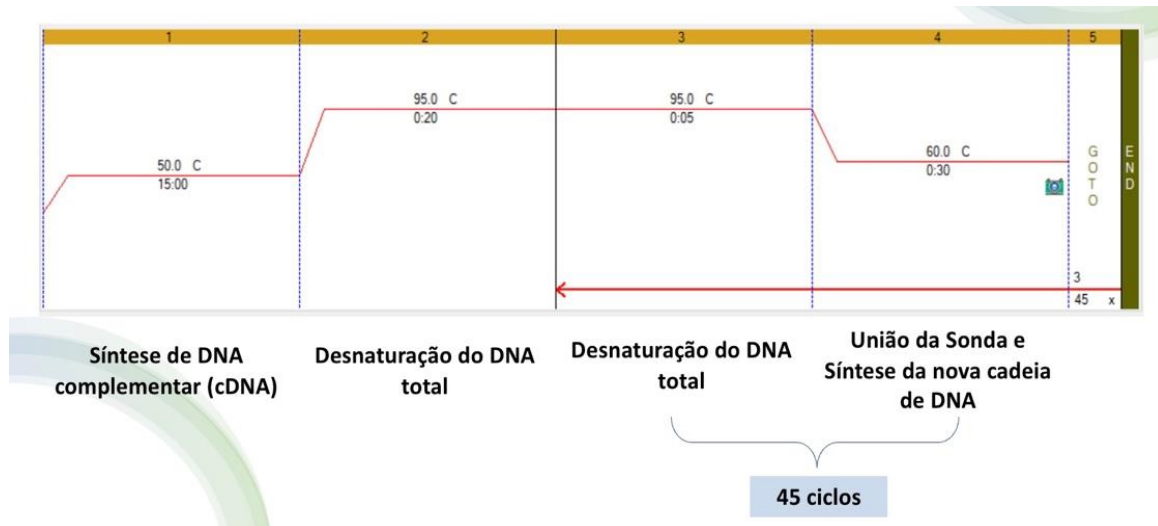
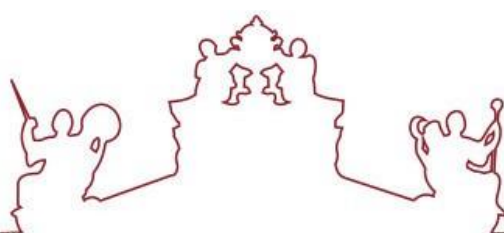


Figura 15. Protocolo de RT-PCR para a identificação do vírus SARS-CoV-2.



- Resumo da metodologia:

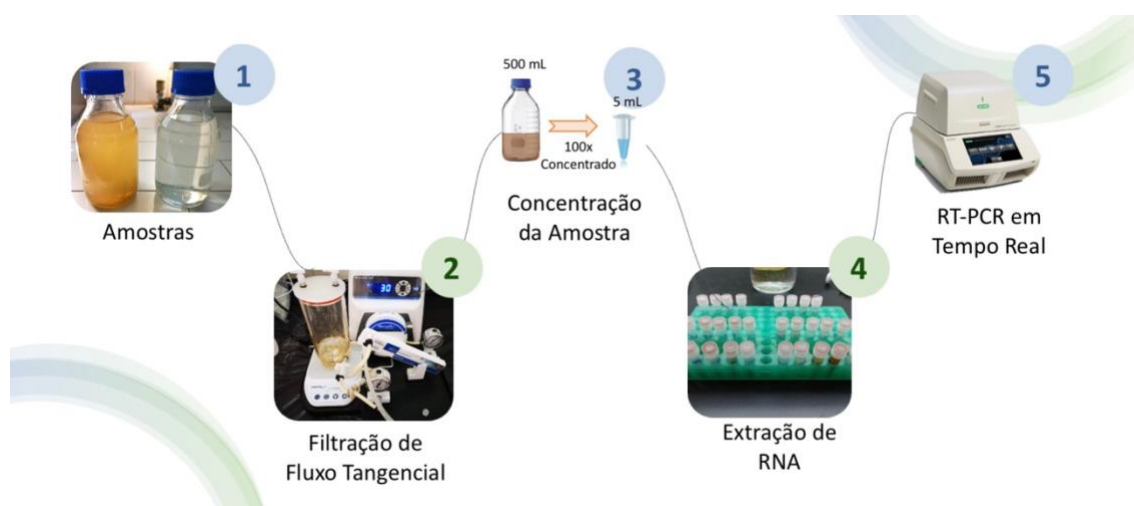
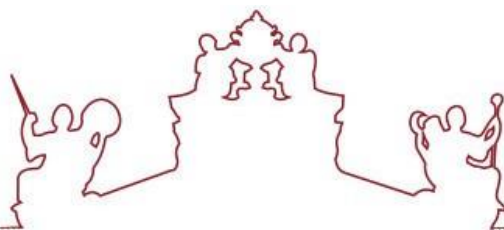


Figura 16. Fluxograma da metodologia aplicada, desde a amostragem até à identificação por RT-PCR.

A amostragem efetuada teve por base uma recolha de amostras compostas, ou seja, consiste na recolha de diversas amostras ao longo do dia, num período máximo de 24h, para uma maior variedade de dados para uma melhor análise e eficácia dos resultados.



D. Resultados e Discussão

As curvas de amplificação obtidas para validação da metodologia estão apresentadas nas seguintes figuras. O gene **N** (detetado em todos os coronavírus) é detetado através do canal **FAM** (canal de fluorescência específico para este gene) e o gene **RdRp** (gene específico para a proteína S do SARS-CoV-2 através do canal **VIC** (canal específico de fluorescência para este gene).

- **Curva de Amplificação do controlo interno (Curva-Padrão)**
 - ✓ **RNA-IPC:** RNA não específico para controlo da reação de PCR

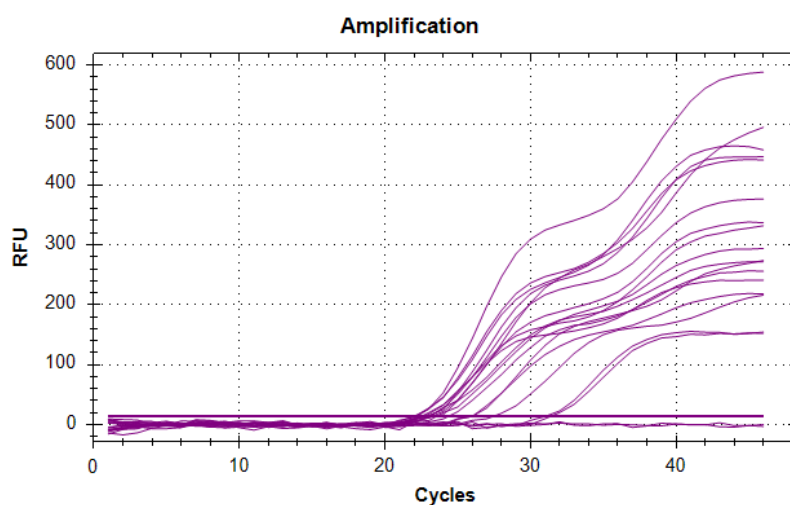
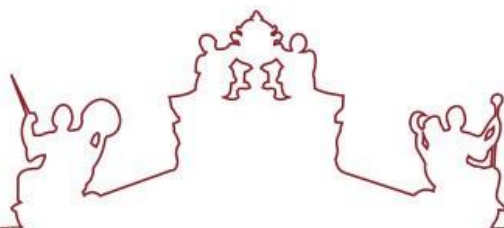


Figura 17. Curva de amplificação do controlo interno RNA-IPC.



- Évora, 2022 (25mL e 50 mL sem pré-filtração)

- ✓ Gene N: canal FAM (canal de fluorescência para este gene)

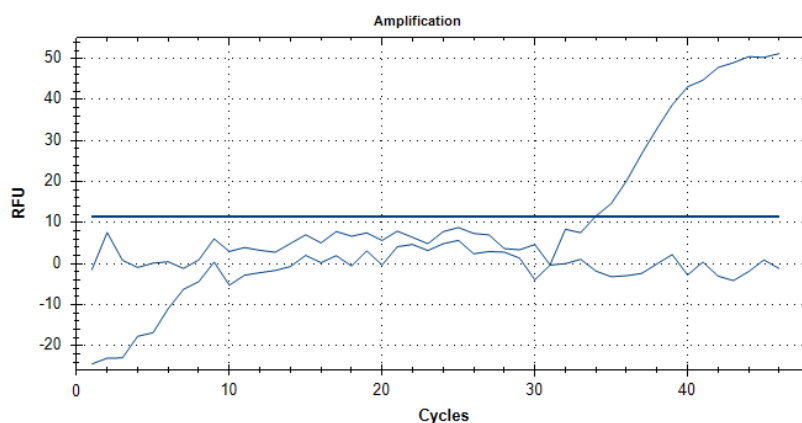


Figura 18. Curva de amplificação do gene N para as duas amostras testadas. A curva que ultrapassa a baseline (linha horizontal) corresponde à amplificação do gene N para a amostra de 50 mL sem pré-filtração.

- ✓ Gene RdRp: canal VIC (canal de fluorescência para este gene)

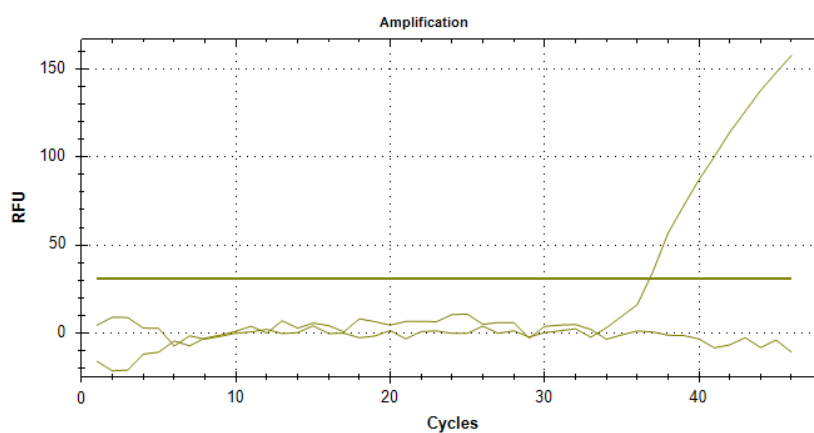
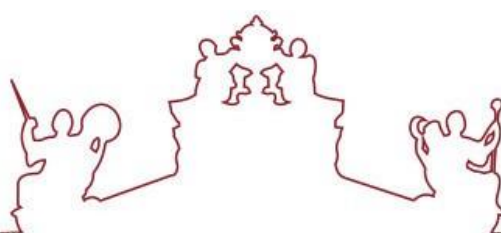


Figura 19. Curva de amplificação do gene RdRp para as duas amostras testadas. A curva que ultrapassa a baseline (linha horizontal) corresponde à amplificação do gene RdRp para a amostra de 50 mL sem pré-filtração.



Para as amostras analisadas da ETAR de Évora, sem pré-filtração realizada, verificou-se que apenas para a amostra de 50 mL foi possível detetar o gene N e o gene RdRp, indicando a presença dos mesmos na amostra. Apesar de ser possível usar um volume de amostra baixo e ser possível a deteção do vírus, sem pré-filtração torna-se um processo muito moroso. Isto deve-se ao facto das amostras se encontrarem com um teor em sedimentos bastante elevado, levando a um longo tempo de filtração para concentração da amostra. Efetuou-se apenas para estes volumes visto que, sendo eles os volumes mais baixos definiriam se seria possível ou não obter qualquer resultado.

- **Évora, 2022 (25mL, 50 mL, 100mL e 200 mL com pré-filtração)**

- ✓ Gene N:

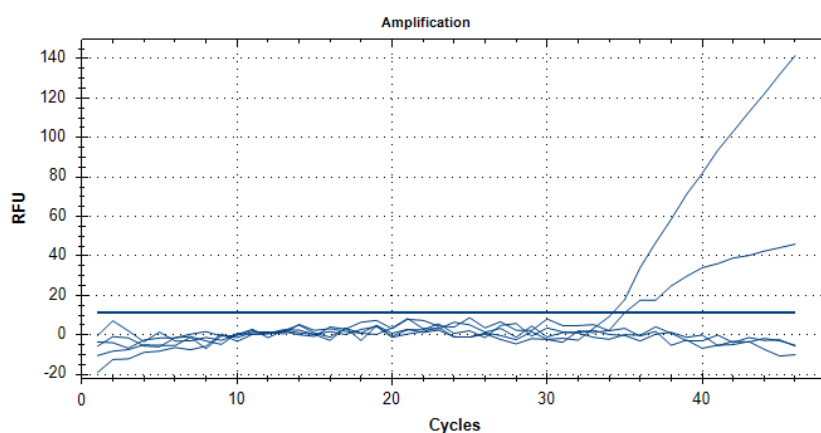
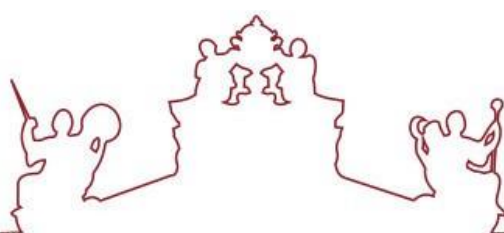


Figura 20. Curvas de amplificação do gene N para as amostras testadas. As curvas que ultrapassam a baseline (linha horizontal) correspondem à amplificação do gene N.



✓ Gene RdRp

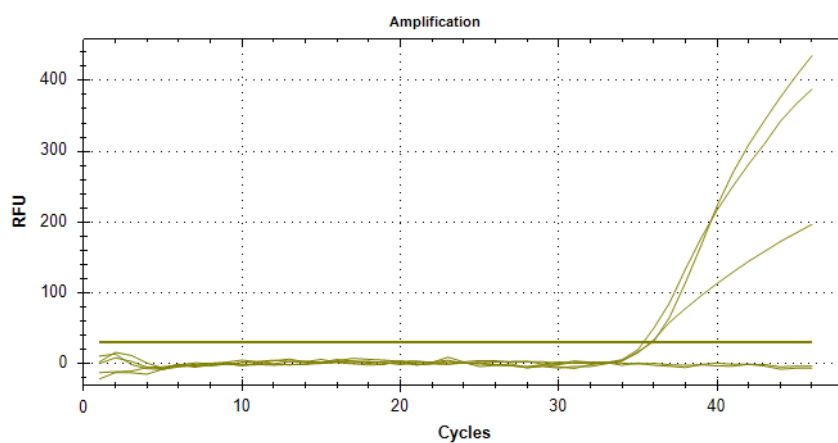
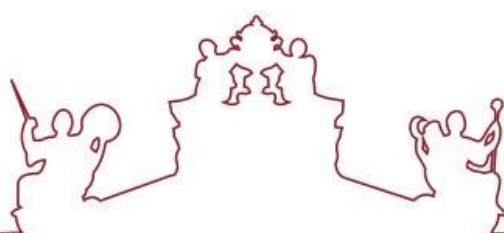


Figura 21. Curvas de amplificação do gene RdRp para as amostras testadas. As curvas que ultrapassam a baseline (linha horizontal) correspondem à amplificação do gene N.

Para as amostras analisadas da ETAR de Évora com pré-filtração realizada foi possível observar alguns resultados positivos para o SARS-Cov-2, nomeadamente para os volumes de 50 mL (apenas para o gene RdRp), 100 mL e 200 mL (para ambos os genes).



○ **Odemira, 2022 (25mL, 50 mL, 100mL e 200 mL com pré-filtração)**

✓ Gene N:

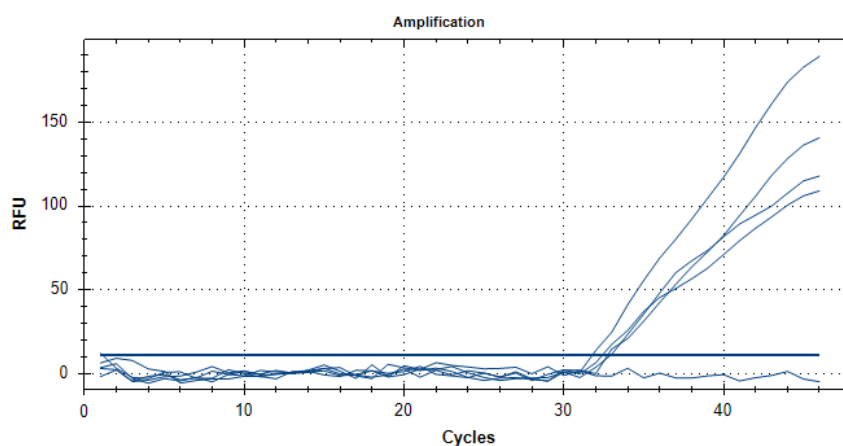


Figura 22. Curvas de amplificação do gene N para as amostras testadas. As curvas que ultrapassam a baseline (linha horizontal) correspondem à amplificação do gene N.

✓ Gene RdRp:

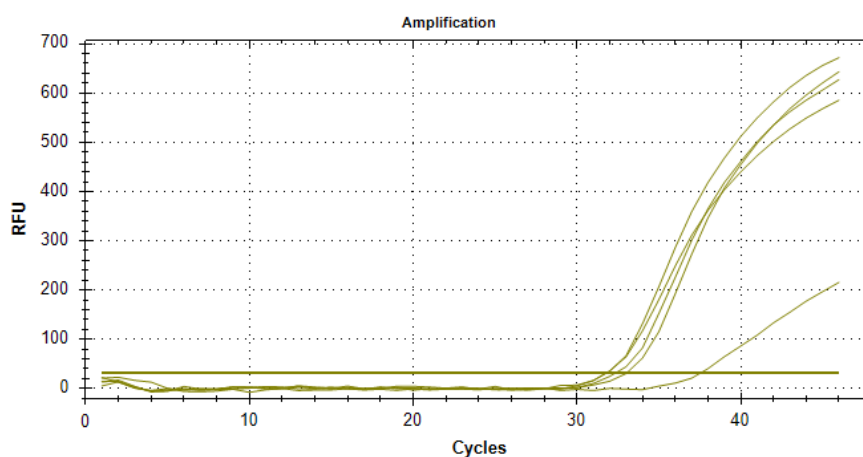
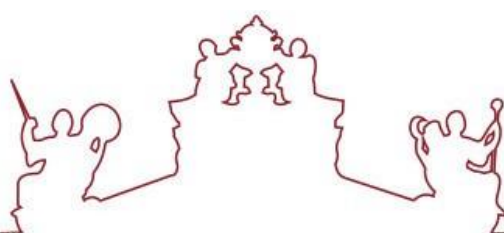


Figura 23. Curvas de amplificação do gene RdRp para as amostras testadas. As curvas que ultrapassam a baseline (linha horizontal) correspondem à amplificação do gene N.

Para as amostras analisadas da ETAR de Odemira com pré-filtração realizada foi possível observar resultados positivos para o SARS-Cov-2, para os todos volumes

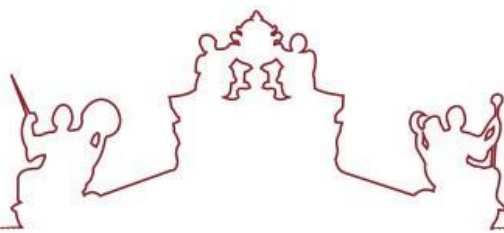


referidos anteriormente para ambos os genes, à exceção do volume de 50 mL em que apenas foi possível verificar um resultado positivo para o gene RdRp.

✓ código amostra	data colheita	volume filtrado (mL)	pré-filtração	vol concentr (mL)	% [amostra]	Gene N (FAM)	Gene RdRp (VIC)
SEM PRÉ-FILTRAÇÃO							
EEVR-AB	05/04/22	25	Não	8	3,13	ND	ND
EEVR-AB	05/04/22	50	Não	8	6,25	33,93	36,81
COM PRÉ-FILTRAÇÃO							
EEVR-AB	05/04/22	25	Sim	8	3,13	ND	ND
EEVR-AB	05/04/22	50	Sim	13	3,85	ND	35,36
EEVR-AB	05/04/22	100	Sim	9	11,11	35,01	35,83
EEVR-AB	05/04/22	200	Sim	10	20,00	34,24	35,96
EODE-AB	19/04/22	25	Sim	8	3,13	ND	37,5
EODE-AB	19/04/22	50	Sim	8	6,25	32,75	32,31
EODE-AB	19/04/22	100	Sim	8	12,50	31,79	31,75
EODE-AB	19/04/22	200	Sim	12,5	16,00	32,94	33,01
CONTROLO POSITIVO						26,74	25,43

Figura 24. Resultados dos ciclos de quantificação para cada uma das amostras testadas.

Com base nos resultados obtidos, podemos ver que para qualquer das condições inicialmente colocadas, na ETAR foi possível detetar o vírus SARS-CoV-2 com valores bastante superiores aos valores do controlo positivo. No entanto, o mesmo resultado não foi obtido para os Hospitais estudados.



Estação de Tratamento de Águas Residuais (Évora)



Condições

Filtração

Pré-Filtração



Sem Pré-Filtração



Volume filtrado

25 mL

50 mL

100 mL

200 mL

Hospital do Espírito Santo e Hospital do Patrocínio (Évora)



Condições

Filtração

Pré-Filtração



Sem Pré-Filtração



Volume filtrado

25 mL

50 mL

Figura 25. Resumo dos resultados.

Estação de Tratamento de Águas Residuais (Odemira)



Condições

Filtração

Pré-filtração

Sem pré-filtração

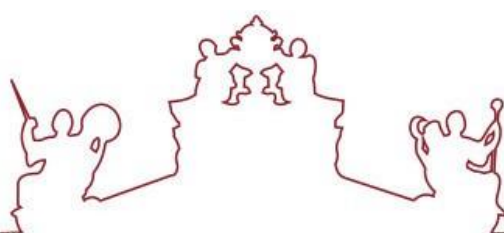
Volume filtrado

25 mL

50 mL

100 mL

200 mL

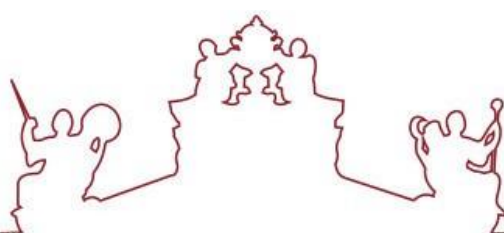


Resumidamente, a metodologia aqui implementada passa por:

- Amostragem;
- Pré-filtração em vácuo com membrana com poro cerca de 5 μm , do maior volume de amostra possível;
- Filtração por Fluxo Tangencial da amostra pré-filtrada;
- Extração do RNA total, com integração do RNA-IPC (controlo interno);
- Deteção do vírus SARS-CoV-2 por RT-PCR em tempo real.

Comparativamente aos casos de estudo referidos anteriormente (casos de estudo nº1, 2 e 3), o nosso método apresenta algumas vantagens, tais como:

- ✓ O tipo de amostragem efetuada – à exceção do caso de estudo nº3 que, tal como o nosso método, utiliza uma amostragem composta (amostragem efetuada ao longo do dia, num período máximo de 24h que nos permite uma maior e mais eficaz representatividade de resultados), os casos de estudo nº1 e 2 utilizam um tipo de amostragem pontual (colheita de amostras efetuada num determinado momento, local e hora);
- ✓ A metodologia de concentração da amostra – no nosso método foi utilizado a Filtração de Fluxo Tangencial (TFF) que, comparativamente com os métodos evidenciados no caso de estudo nº2 (Método de Vortex de Membrana Eletronegativo, seguido de uma ultrafiltração e Método de Extração de RNA direto por adsorção) e no caso de estudo nº3 (Método de Separação de duas fases – método PEG-dextrano) possui uma maior rapidez, eficácia e permite concentrar uma quantidade de amostra superior. Relativamente ao método representado no caso de estudo nº1 não é possível fazer uma comparação direta acerca da concentração das amostras a analisar visto que não existe uma referência relativa às mesmas.
- ✓ O armazenamento da amostra - à exceção do caso de estudo nº2, em todos os



outros casos as amostras foram armazenadas a temperaturas negativas (caso nº1 (-80°C) e caso nº3 (-20°C). No nosso método a amostra foi conservada a 4°C até ser processada e o RNA extraído foi armazenado a -80°. Nas diferentes amostragens, visto não tendo sido utilizado o mesmo intervalo de temperatura, um dos pontos críticos que podem surgir é o facto da alteração do microbiota que contribui para a decomposição de partículas infecciosas na matriz dos efluentes;

- ✓ O tipo de membrana utilizado – esta diferença apenas é possível verificar no caso nº2, onde as membranas utilizadas eram de materiais diferentes (membrana de éster de celulose e membrana descartável) e a sua porosidade e diâmetro muito superiores à utilizada no nosso método. No nosso método a membrana utilizada é uma membrana de m-Polietersulfona (PES) com coletores de Luer;
- ✓ A amplificação e deteção por PCR – no caso nº1 a deteção do vírus foi efetuada através do gene E (gene-alvo) por qRT-PCR. No caso nº2, detetou-se através da adição do Colifago MS2 (ATCC 15597-B1) à amostra antes da extração do RNA para controlo do processo molecular. (Controlo interno deles do RT-PCR). No caso nº3, a deteção do vírus foi recolhida de uma região altamente conservadora do genoma *Coronaviridae*. No nosso método, o gene N utilizado é mais específico para os *Sarbecovirus*.

Com base nos resultados obtidos podemos resumir a metodologia implementada, conforme fluxograma seguinte:

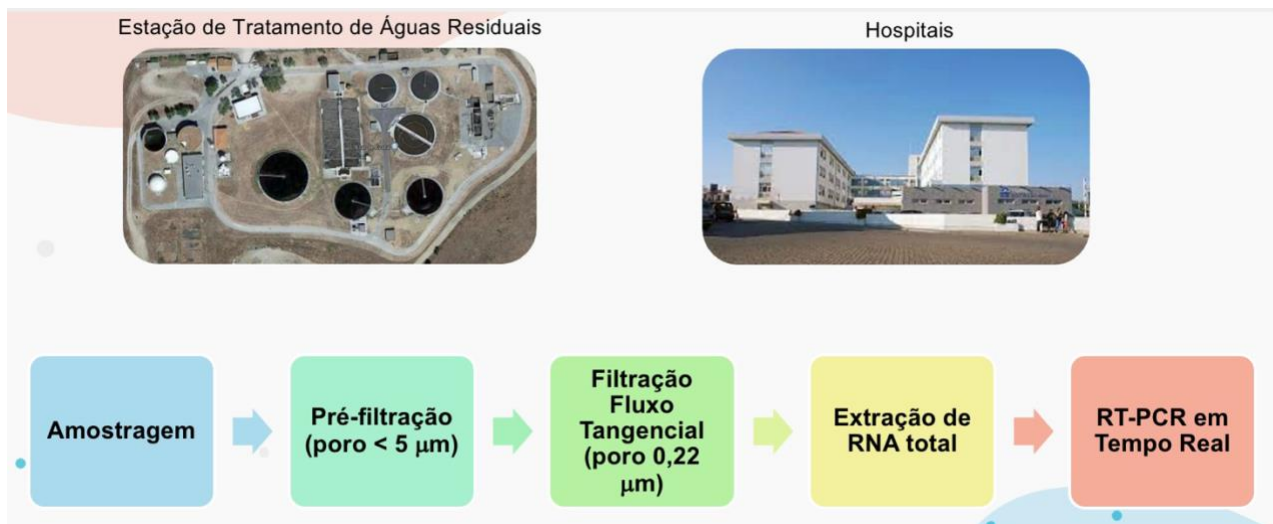
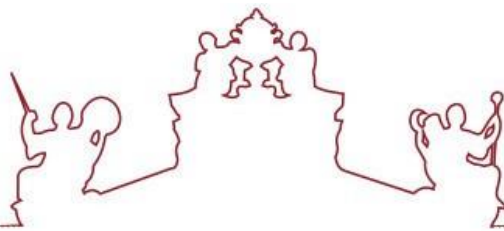
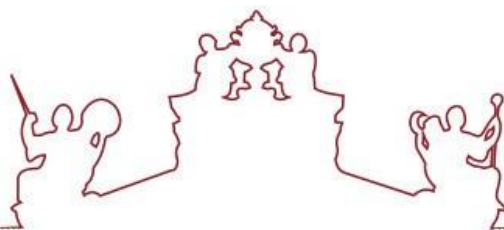


Figura 26. Fluxograma da metodologia implementada para a deteção do vírus SARS-CoV-2 em amostras de águas residuais e efluentes hospitalares.

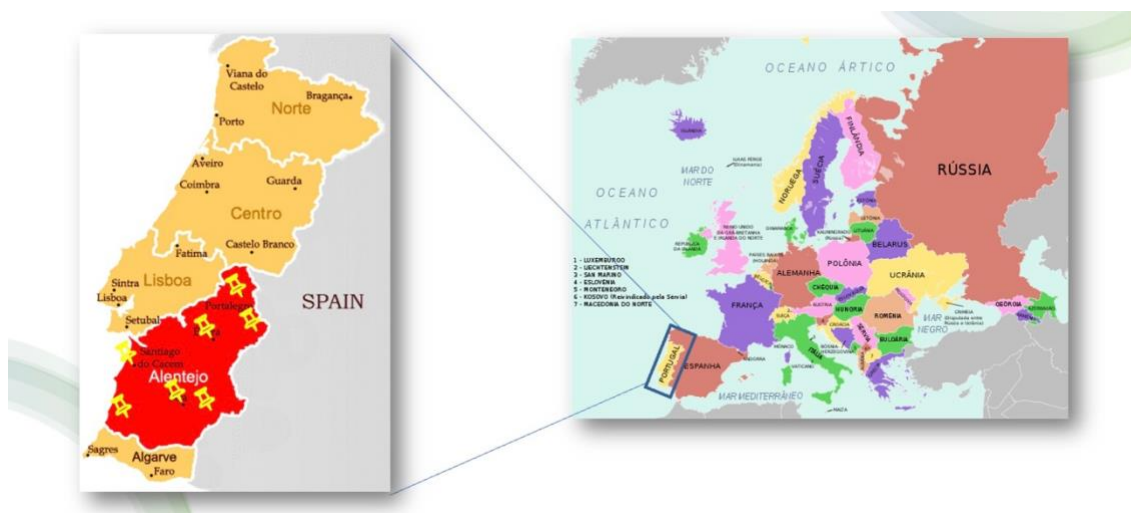
Estes resultados são de elevada importância, uma vez que, nos dias de amostragem não tinham sido detetados números elevados de casos positivos internados nos Hospitais (informação informal). Apesar de tudo, os casos positivos encontravam-se em casa a recuperar.

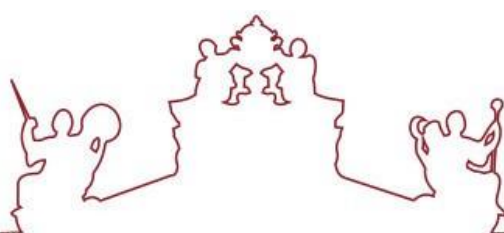


E. Conclusão e Perspetivas Futuras

Com tudo isto, podemos confirmar que as águas residuais são de extrema importância para criar um sistema de alerta precoce que nos possam antever um surto, mesmo ainda antes de ser notificado.

O próximo passo será aplicar a metodologia comprovada a várias Estações de Tratamento de Águas Residuais e hospitais adjacentes em toda a região do Alentejo.





F. Referências Bibliográficas

A UN-Water Analytical Brief (2017) *Wastewater Management*.

Andersen, K. G. *et al.* (2020) 'The proximal origin of SARS-CoV-2', *Nature Medicine*, 26, pp. 450–455. doi: 10.1038/s41591-020-0820-9.

Artika, I. M., Wiyatno, A. and Ma'roef, C. N. (2020) 'Since January 2020 Elsevier has created a COVID-19 resource centre with free information in English and Mandarin on the novel coronavirus COVID-19. The COVID-19 resource centre is hosted on Elsevier Connect, the company's public news and information', *Infection, Genetics and Evolution*, 81(January), pp. 1567–1348. doi: 10.1016/j.meegid.2020.104215.

Bai, Y. *et al.* (2020) 'Presumed Asymptomatic Carrier Transmission of COVID-19', *JAMA*, 323(14), pp. 1406–1407. doi: 10.1001/JAMA.2020.2565.

Bibby, K. *et al.* (2017) 'Disinfection of Ebola Virus in Sterilized Municipal Wastewater', *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 11(2), p. 5299. doi: 10.1371/JOURNAL.PNTD.0005299.

Bivins, A. *et al.* (2020) 'Persistence of SARS-CoV-2 in Water and Wastewater', *Environmental Science and Technology Letters*, 7(12), pp. 937–942. doi: 10.1021/ACS.ESTLETT.0C00730/ASSET/IMAGES/LARGE/EZ0C00730_0002.JPEG.

Borges, V. *et al.* (2018) 'INSaFLU: An automated open web-based bioinformatics suite "from-reads" for influenza whole-genome-sequencing-based surveillance', *Genome Medicine*, 10(1), pp. 1–13. doi: 10.1186/S13073-018-0555-0/TABLES/1.

CDC, C. for D. C. and P. (2022) *Developing a Wastewater Surveillance*. Available at: <https://www.cdc.gov/healthywater/surveillance/wastewater-surveillance/developing-a-wastewater-surveillance-sampling-strategy.html> (Accessed: 15 June 2022).

Chan, J. F. W., Yuan, S., *et al.* (2020) 'A familial cluster of pneumonia associated with the 2019 novel coronavirus indicating person-to-person transmission: a study of a family cluster', *Lancet (London, England)*, 395(10223), pp. 514–523. doi: 10.1016/S0140-6736(20)30154-9.

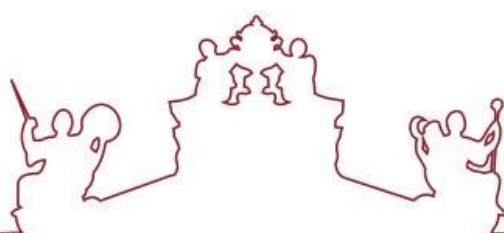
Chan, J. F. W., Kok, K. H., *et al.* (2020) 'Genomic characterization of the 2019 novel human-pathogenic coronavirus isolated from a patient with atypical pneumonia after visiting Wuhan', *Emerging microbes & infections*, 9(1), pp. 221–236. doi: 10.1080/22221751.2020.1719902.

Chatterjee, S. (2020) 'Understanding the Nature of Variations in Structural Sequences coding for Coronavirus Spike, Envelope, Membrane and Nucleocapsid Proteins of SARS-CoV-2', *SSRN Electronic Journal*. doi: 10.2139/SSRN.3562504.

Chen, N. *et al.* (2020) 'Epidemiological and clinical characteristics of 99 cases of 2019 novel coronavirus pneumonia in Wuhan, China: a descriptive study', *Lancet (London, England)*, 395(10223), pp. 507–513. doi: 10.1016/S0140-6736(20)30211-7.

Chen, Z. *et al.* (2020) 'Global genetic diversity patterns and transmissions of SARS-CoV-2', *medRxiv*, p. 2020.05.05.20091413. doi: 10.1101/2020.05.05.20091413.

Chertow, D. S. (2018) 'Next-generation diagnostics with CRISPR', *Science (New York, N.Y.)*, 360(6387),



pp. 381–382. doi: 10.1126/SCIENCE.AAT4982.

Chinese Center for Disease Control and Prevention (2022). Available at: <https://www.chinacdc.cn/en/COVID19/> (Accessed: 15 June 2022).

Chu, D. K. W. *et al.* (2020) 'Molecular Diagnosis of a Novel Coronavirus (2019-nCoV) Causing an Outbreak of Pneumonia', *Clinical chemistry*, 66(4), pp. 549–555. doi: 10.1093/CLINCHEM/HVAA029.

Corman, V. *et al.* (2020) 'Diagnostic detection of Wuhan coronavirus 2019 by real-time RT-PCR Corman V, Bleicker T, Brünink S, Drosten C, Zambon M, World Health Organization: Diagnostic detection of Wuhan coronavirus 2019 by real-time RT-PCR.', *Geneva: World Health Organization*.

Domingo-Calap, P. *et al.* (2018) 'An unusually high substitution rate in transplant-associated BK polyomavirus in vivo is further concentrated in HLA-C-bound viral peptides', *PLoS Pathogens*, 14(10). doi: 10.1371/JOURNAL.PPAT.1007368.

Domingo, E. (2010) 'Mechanisms of viral emergence', *Veterinary research*, 41(6). doi: 10.1051/VETRES/2010010.

Fischer, R. *et al.* (2015) 'Ebola Virus Stability on Surfaces and in Fluids in Simulated Outbreak Environments', *Emerging Infectious Diseases*, 21(7), p. 1243. doi: 10.3201/EID2107.150253.

Flores-Alanis, A. *et al.* (2020) 'The receptor binding domain of SARS-CoV-2 spike protein is the result of an ancestral recombination between the bat-CoV RaTG13 and the pangolin-CoV MP789', *BMC Research Notes*, 13(1). doi: 10.1186/S13104-020-05242-8.

Gorbalenya, A. E. *et al.* (2020) 'The species Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus: classifying 2019-nCoV and naming it SARS-CoV-2', *Nature Microbiology* 2020 5:4, 5(4), pp. 536–544. doi: 10.1038/s41564-020-0695-z.

Grudlewska-Buda, K. *et al.* (2021) 'Sars-cov-2—morphology, transmission and diagnosis during pandemic, review with element of meta-analysis', *Journal of Clinical Medicinefile*, 10(9), pp. 1–33. doi: 10.3390/jcm10091962.

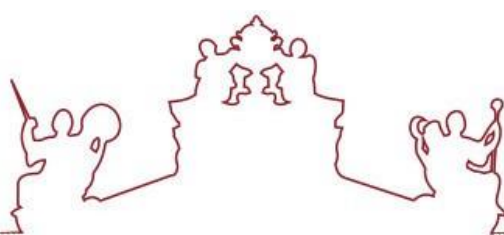
Gussow, A. B. *et al.* (2020) 'Genomic determinants of pathogenicity in SARS-CoV-2 and other human coronaviruses', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 117(26), pp. 15193–15199. doi: 10.1073/PNAS.2008176117/SUPPL_FILE/PNAS.2008176117.SAPP.PDF.

Haramoto, E. *et al.* (2012) 'Development of a novel method for simultaneous concentration of viruses and protozoa from a single water sample', *Journal of virological methods*, 182(1–2), pp. 62–69. doi: 10.1016/J.JVIROMET.2012.03.011.

Haramoto, E. *et al.* (2018) 'A review on recent progress in the detection methods and prevalence of human enteric viruses in water', *Water research*, 135, pp. 168–186. doi: 10.1016/J.WATRES.2018.02.004.

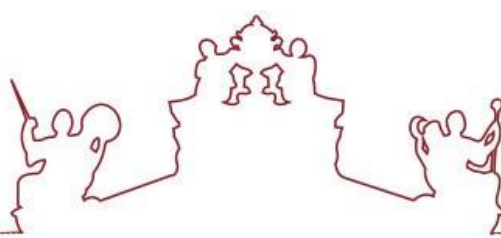
Haramoto, E. *et al.* (2020) 'First environmental surveillance for the presence of SARS-CoV-2 RNA in wastewater and river water in Japan', *The Science of the Total Environment*, 737, p. 140405. doi: 10.1016/J.SCITOTENV.2020.140405.

Haramoto, E., Yamada, K. and Nishida, K. (2011) 'Prevalence of protozoa, viruses, coliphages and indicator bacteria in groundwater and river water in the Kathmandu Valley, Nepal', *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 105(12), pp. 711–716. doi:

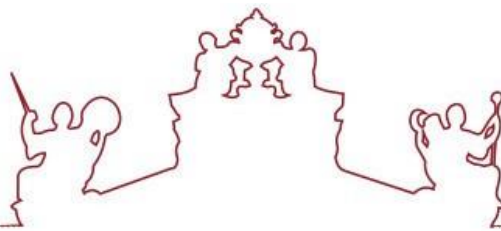


10.1016/J.TRSTMH.2011.08.004.

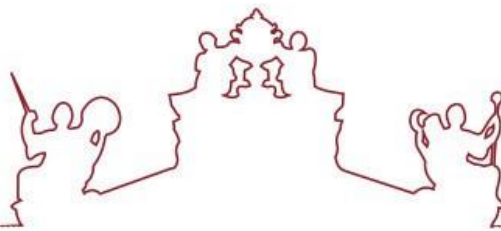
- Harapan, H. *et al.* (2020) 'Coronavirus disease 2019 (COVID-19): A literature review', *Journal of Infection and Public Health*, 13(5), pp. 667–673. doi: 10.1016/J.JIPH.2020.03.019.
- Harcourt, J. *et al.* (2020) 'Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 from Patient with Coronavirus Disease, United States', *Emerging infectious diseases*, 26(6), pp. 1266–1273. doi: 10.3201/EID2606.200516.
- Holmes, E. C. *et al.* (2016) 'The evolution of Ebola virus: Insights from the 2013-2016 epidemic', *Nature*, 538(7624), pp. 193–200. doi: 10.1038/NATURE19790.
- Huang, C. *et al.* (2020a) 'Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China', *The Lancet*, 395(10223), pp. 497–506. doi: 10.1016/S0140-6736(20)30183-5/ATTACHMENT/D5332CA1-83D8-4C4C-BC57-00A390BF0396/MMC1.PDF.
- Huang, C. *et al.* (2020b) 'Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China', *The Lancet*, 395(10223), pp. 497–506. doi: 10.1016/S0140-6736(20)30183-5.
- Jia, Y. *et al.* (2021) 'Analysis of the mutation dynamics of SARS-CoV-2 reveals the spread history and emergence of RBD mutant with lower ACE2 binding affinity', *bioRxiv*, p. 2020.04.09.034942. doi: 10.1101/2020.04.09.034942.
- Jiehao, C. *et al.* (2020) 'A Case Series of Children With 2019 Novel Coronavirus Infection: Clinical and Epidemiological Features', *Clinical Infectious Diseases BRIEF REPORT*, 71(6), pp. 1547–1551. doi: 10.1093/cid/ciaa198.
- Kampf, G. *et al.* (2020) 'Persistence of coronaviruses on inanimate surfaces and their inactivation with biocidal agents', *The Journal of hospital infection*, 104(3), pp. 246–251. doi: 10.1016/J.JHIN.2020.01.022.
- Kelly, Heath. (2011). The classical definition of a pandemic is not elusive. *Bulletin of the World Health Organization*, 89 (7), 540 - 541. World Health Organization. <http://dx.doi.org/10.2471/BLT.11.088815>
- Koyama, T., Platt, D. and Parida, L. (2020) 'Variant analysis of SARS-CoV-2 genomes', *Bulletin of the World Health Organization*, 98(7), p. 495. doi: 10.2471/BLT.20.253591.
- Kramer, A., Schwebke, I. and Kampf, G. (2006) 'How long do nosocomial pathogens persist on inanimate surfaces? A systematic review', *BMC infectious diseases*, 6. doi: 10.1186/1471-2334-6-130.
- Kupferschmidt, K. (2020) 'Study claiming new coronavirus can be transmitted by people without symptoms was flawed', *Science*. doi: 10.1126/SCIENCE.ABB1524.
- Laamarti, M. *et al.* (2020) 'Genome Sequences of Six SARS-CoV-2 Strains Isolated in Morocco, Obtained Using Oxford Nanopore MinION Technology', *Microbiology Resource Announcements*, 9(32). doi: 10.1128/MRA.00767-20.
- Lai, M. M. and Stohlman, S. A. (1981) 'Comparative analysis of RNA genomes of mouse hepatitis viruses', *Journal of virology*, 38(2), pp. 661–670. doi: 10.1128/JVI.38.2.661-670.1981.
- Li, Q. *et al.* (2020) 'Early Transmission Dynamics in Wuhan, China, of Novel Coronavirus–Infected Pneumonia', *New England Journal of Medicine*, 382(13), pp. 1199–1207. doi: 10.1056/NEJMOA2001316/SUPPL_FILE/NEJMOA2001316_DISCLOSURES.PDF.



- Liu, Z. *et al.* (2020) 'Composition and divergence of coronavirus spike proteins and host ACE2 receptors predict potential intermediate hosts of SARS-CoV-2', *Journal of medical virology*, 92(6), pp. 595–601. doi: 10.1002/JMV.25726.
- Lu, Q. and Shi, Y. (2020) 'Coronavirus disease (COVID-19) and neonate: What neonatologist need to know', *Journal of Medical Virology*, 92(6), pp. 564–567. doi: 10.1002/JMV.25740.
- Luan, J. *et al.* (2020) 'Spike protein recognition of mammalian ACE2 predicts the host range and an optimized ACE2 for SARS-CoV-2 infection', *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 526(1), pp. 165–169. doi: 10.1016/J.BBRC.2020.03.047.
- Malla, B. *et al.* (2019) 'Performance Evaluation of Human-Specific Viral Markers and Application of Pepper Mild Mottle Virus and CrAssphage to Environmental Water Samples as Fecal Pollution Markers in the Kathmandu Valley, Nepal', *Food and Environmental Virology*, 11(3), pp. 274–287. doi: 10.1007/S12560-019-09389-X/TABLES/4.
- Masters, P. S. (2006) 'The Molecular Biology of Coronaviruses', *Advances in Virus Research*, 65, pp. 193–292. doi: 10.1016/S0065-3527(06)66005-3.
- Mercatelli, D. and Giorgi, F. M. (2020) 'Geographic and Genomic Distribution of SARS-CoV-2 Mutations', *Frontiers in Microbiology*, 11, p. 1800. doi: 10.3389/FMICB.2020.01800/BIBTEX.
- Navratil, V. *et al.* (2020) 'The severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) envelope (E) protein harbors a conserved BH3-like sequence', *bioRxiv*, p. 2020.04.09.033522. doi: 10.1101/2020.04.09.033522.
- Nili A, Farbod A, Neishabouri A, Mozafarhashjin M, Tavakolpour S, Mahmoudi H. Remdesivir: A beacon of hope from Ebola virus disease to COVID-19. *Rev Med Virol.* 2020 Nov;30(6):1-13. doi: 10.1002/rmv.2133. Epub 2020 Jul 30. PMID: 33210457.
- Ou, X. *et al.* (2020) 'Characterization of spike glycoprotein of SARS-CoV-2 on virus entry and its immune cross-reactivity with SARS-CoV', *Nature Communications* 2020 11:1, 11(1), pp. 1–12. doi: 10.1038/s41467-020-15562-9.
- Pachetti, M. *et al.* (2020) 'Emerging SARS-CoV-2 mutation hot spots include a novel RNA-dependent-RNA polymerase variant', *Journal of translational medicine*, 18(1). doi: 10.1186/S12967-020-02344-6.
- Powers, A. M. and Waterman, S. H. (2017) 'A decade of arboviral activity—Lessons learned from the trenches', *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 11(4), p. e0005421. doi: 10.1371/JOURNAL.PNTD.0005421.
- Rahimi, A., Mirzazadeh, A. and Tavakolpour, S. (2021) 'Genetics and genomics of SARS-CoV-2: A review of the literature with the special focus on genetic diversity and SARS-CoV-2 genome detection', *Genomics*, 113(1P2), pp. 1221–1232. doi: 10.1016/J.YGENO.2020.09.059.
- Rasanathan, K. and Evans, T. G. (2020) 'Primary health care, the Declaration of Astana and COVID-19', *Bulletin of the World Health Organization*, 98(11), pp. 801–808. doi: 10.2471/BLT.20.252932.
- Rehman, S. U. *et al.* (2020) 'Evolutionary Trajectory for the Emergence of Novel Coronavirus SARS-CoV-2', *Pathogens (Basel, Switzerland)*, 9(3). doi: 10.3390/PATHOGENS9030240.
- Robert, K. and Arkadiusz, D. (2020) 'Molecular and Serological Tests for COVID-19 . A Comparative Review of SARS-CoV-2 Coronavirus Laboratory and Point-of-Care Diagnostics', *Diagnostics*, 10(6).



- La Rosa, G. *et al.* (2020) 'First detection of SARS-CoV-2 in untreated wastewaters in Italy', *The Science of the total environment*, 736. doi: 10.1016/J.SCITOTENV.2020.139652.
- Rothe, C. *et al.* (2020) 'Transmission of 2019-nCoV Infection from an Asymptomatic Contact in Germany', *The New England journal of medicine*, 382(10), pp. 970–971. doi: 10.1056/NEJMC2001468.
- Shang, J. *et al.* (2020) 'Structural basis of receptor recognition by SARS-CoV-2', *Nature* 2020 581:7807, 581(7807), pp. 221–224. doi: 10.1038/s41586-020-2179-y.
- Shereen, M. A. *et al.* (2020) 'COVID-19 infection: Emergence, transmission, and characteristics of human coronaviruses', *Journal of Advanced Research*, 24, pp. 91–98. doi: 10.1016/J.JARE.2020.03.005.
- Shu, Y. and McCauley, J. (2017) 'GISAI: Global initiative on sharing all influenza data – from vision to reality', *Eurosurveillance*, 22(13), p. 1. doi: 10.2807/1560-7917.ES.2017.22.13.30494.
- Soratto, T. A. T. *et al.* (2020) 'Four SARS-CoV-2 Genome Sequences from Late April in Stockholm, Sweden, Reveal a Rare Mutation in the Spike Protein', *Microbiology Resource Announcements*, 9(35). doi: 10.1128/MRA.00934-20.
- Tang, D., Comish, P. and Kang, R. (2020) 'The hallmarks of COVID-19 disease', *PLOS Pathogens*, 16(5), p. e1008536. doi: 10.1371/JOURNAL.PPAT.1008536.
- Tian, H. and Tao, P. (2021) 'Deciphering the protein motion of S1 subunit in SARS-CoV-2 spike glycoprotein through integrated computational methods', *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics ISSN:*, 39(17), pp. 6705–6712. doi: 10.1080/07391102.2020.1802338.
- Verlicchi, P. *et al.* (2010) 'Hospital effluents as a source of emerging pollutants: An overview of micropollutants and sustainable treatment options', *Journal of Hydrology*, 389(3–4), pp. 416–428. doi: 10.1016/J.JHYDROL.2010.06.005.
- Walls, A. C. *et al.* (2020) 'Structure, Function, and Antigenicity of the SARS-CoV-2 Spike Glycoprotein', *Cell*, 181(2), pp. 281–292.e6. doi: 10.1016/J.CELL.2020.02.058.
- Wang, C. *et al.* (2020) 'The establishment of reference sequence for SARS-CoV-2 and variation analysis', *Journal of medical virology*, 92(6), pp. 667–674. doi: 10.1002/JMV.25762.
- Wang, D. *et al.* (2020) 'Clinical Characteristics of 138 Hospitalized Patients With 2019 Novel Coronavirus–Infected Pneumonia in Wuhan, China', *JAMA*, 323(11), pp. 1061–1069. doi: 10.1001/JAMA.2020.1585.
- Wang, Q. *et al.* (2020) 'Structural and Functional Basis of SARS-CoV-2 Entry by Using Human ACE2', *Cell*, 181(4), pp. 894–904.e9. doi: 10.1016/J.CELL.2020.03.045.
- Wang, R. *et al.* (2020) 'Characterizing SARS-CoV-2 mutations in the United States'.
- Wang, Y. C. *et al.* (2020) 'Current diagnostic tools for coronaviruses—From laboratory diagnosis to POC diagnosis for COVID-19', *Bioengineering & Translational Medicine*, 5(3). doi: 10.1002/BTM2.10177.
- Wong, M. C. *et al.* (2020) 'Evidence of recombination in coronaviruses implicating pangolin origins of nCoV-2019', *bioRxiv*. doi: 10.1101/2020.02.07.939207.
- World Health Organization (2020) *Global Surveillance for human infection with novel coronavirus (2019-nCoV): interim guidance, 31 January 2020*. Geneva PP - Geneva: World Health Organization.



Available at: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/330857>.

- Wu, C. *et al.* (2020) 'Analysis of therapeutic targets for SARS-CoV-2 and discovery of potential drugs by computational methods', *Acta pharmaceutica Sinica. B*, 10(5), pp. 766–788. doi: 10.1016/J.APSB.2020.02.008.
- Wu, F. *et al.* (2008) 'A new coronavirus associated with human respiratory disease in China', *Nature*, 579, pp. 265–281. doi: 10.1038/s41586-020-2008-3.
- Wu, Z. and McGoogan, J. M. (2020) 'Characteristics of and Important Lessons From the Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) Outbreak in China: Summary of a Report of 72 314 Cases From the Chinese Center for Disease Control and Prevention', *JAMA*, 323(13), pp. 1239–1242. doi: 10.1001/JAMA.2020.2648.
- Xu X, Han M, Li T, Sun W, Wang D, Fu B, Zhou Y, Zheng X, Yang Y, Li X, Zhang X, Pan A, Wei H. Effective treatment of severe COVID-19 patients with tocilizumab. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2020 May 19;117(20):10970-10975. doi: 10.1073/pnas.2005615117. Epub 2020 Apr 29. PMID: 32350134; PMCID: PMC7245089.
- Yan, R. *et al.* (2020) 'Structural basis for the recognition of SARS-CoV-2 by full-length human ACE2', *Science*, 367(6485), pp. 1444–1448. doi: 10.1126/SCIENCE.ABB2762/SUPPL_FILE/ABB2762S1.MP4.
- Yin, C. (2020) 'Genotyping coronavirus SARS-CoV-2: methods and implications', *Genomics*, 112(5), pp. 3588–3596. doi: 10.1016/J.YGENO.2020.04.016.
- Yu, W. Bin *et al.* (2020) 'Decoding the evolution and transmissions of the novel pneumonia coronavirus (SARS-CoV-2 / HCoV-19) using whole genomic data', *Zoological Research*, 41(3), p. 247. doi: 10.24272/J.ISSN.2095-8137.2020.022.
- Zhao, M. *et al.* (2010) 'Effect of different land use/land cover on karst hydrogeochemistry: A paired catchment study of Chenqi and Dengzhanhe, Puding, Guizhou, SW China', *Journal of Hydrology*, 388(1–2), pp. 121–130. doi: 10.1016/j.jhydrol.2010.04.034.
- Zhao, Z. *et al.* (2004) 'Moderate mutation rate in the SARS coronavirus genome and its implications', *BMC Evolutionary Biology*, 4(1), pp. 1–9. doi: 10.1186/1471-2148-4-21/TABLES/4.
- Zheng, M. and Song, L. (2020) 'Novel antibody epitopes dominate the antigenicity of spike glycoprotein in SARS-CoV-2 compared to SARS-CoV', *Cellular & Molecular Immunology* 2020 17:5, 17(5), pp. 536–538. doi: 10.1038/s41423-020-0385-z.
- Zhu, N. *et al.* (2020) 'A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019', *New England Journal of Medicine*, 382(8), pp. 727–733. doi: 10.1056/NEJMOA2001017/SUPPL_FILE/NEJMOA2001017_DISCLOSURES.PDF.

