



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

MONITORAMENTO DE PATÓGENOS VIRAIS POR MEIO DE
EPIDEMIOLOGIA BASEADA EM ÁGUAS RESIDUÁRIAS

ADRIANO ROBERTO VIEIRA DE SOUSA

GOIÂNIA-GO
2026



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO (TECA) PARA DISPONIBILIZAR VERSÕES ELETRÔNICAS DE TESES

E DISSERTAÇÕES NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a [Lei 9.610/98](#), o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou download, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

O conteúdo das Teses e Dissertações disponibilizado na BDTD/UFG é de responsabilidade exclusiva do autor. Ao encaminhar o produto final, o autor(a) e o(a) orientador(a) firmam o compromisso de que o trabalho não contém nenhuma violação de quaisquer direitos autorais ou outro direito de terceiros.

1. Identificação do material bibliográfico

☐ Dissertação ☒ Tese ☐ Outro*: _____

*No caso de mestrado/doutorado profissional, indique o formato do Trabalho de Conclusão de Curso, permitido no documento de área, correspondente ao programa de pós-graduação, orientado pela legislação vigente da CAPES.

Exemplos: Estudo de caso ou Revisão sistemática ou outros formatos.

2. Nome completo do autor

Adriano Roberto Vieira de Sousa

3. Título do trabalho

Monitoramento de patógenos virais por meio de epidemiologia baseada em águas residuárias

4. Informações de acesso ao documento (este campo deve ser preenchido pelo orientador)

Concorda com a liberação total do documento ☐ SIM ☒ NÃO¹

[1] Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. Após esse período, a possível disponibilização ocorrerá apenas mediante:

- a) consulta ao(a) autor(a) e ao(a) orientador(a);
 - b) novo Termo de Ciência e de Autorização (TECA) assinado e inserido no arquivo da tese ou dissertação.
- O documento não será disponibilizado durante o período de embargo.

Casos de embargo:

- Solicitação de registro de patente;
- Submissão de artigo em revista científica;
- Publicação como capítulo de livro;
- Publicação da dissertação/tese em livro.

Obs. Este termo deverá ser assinado no SEI pelo orientador e pelo autor.



Documento assinado eletronicamente por **Elisangela De Paula Silveira Lacerda**, Professor do **Magistério Superior**, em 30/05/2026, às 07:15, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Adriano Roberto Vieira De Sousa, Discente**, em 01/06/2026, às 09:54, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **5854531** e o código CRC **B582B248**.

Referência: Processo nº 23070.025433/2024-25

SEI nº 5854531

ADRIANO ROBERTO VIEIRA DE SOUSA

**MONITORAMENTO DE PATÓGENOS VIRAIS POR MEIO DE
EPIDEMIOLOGIA BASEADA EM ÁGUAS RESIDUÁRIAS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Goiás, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas.

Área de Concentração: Bioquímica e Genética
Orientador: Prof. Dra. Elisângela de Paula
Silveira Lacerda

GOIÂNIA-GO

2026

de Sousa, Adriano Roberto Vieira

MONITORAMENTO DE PATÓGENOS VIRAIS POR MEIO DE
EPIDEMIOLOGIA BASEADA EM ÁGUAS RESIDUÁRIAS [Manuscrito]:
MONITORING OF VIRAL PATHOGENS THROUGH WASTEWATER-BASED
EPIDEMIOLOGY / Adriano Roberto Vieira de Sousa. - 2026.

XVIII, 83 f.: 2026

Orientadora: Prof(a). Dra. Elisangela de Paula Silveira Lacerda

Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Goiás, Instituto de
Ciências Biológicas (ICB), Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas,
Goiânia, 2026.

Anexo.

Bibliografia.

Inclui: siglas, tabelas, grafico, lista de figuras, lista de tabelas.

1. Sars-cov-2. 2. Covid-19. 3. Arboviroses. 4. Monitoramento. 5.

Pysewage..

I. Lacerda, Elisangela de Paula Silveira, orient. II. Título.

CDU 577.2



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

ATA DE DEFESA DE TESE

Ata Nº 124 da sessão de Defesa de Tese do Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas que confere a **Adriano Roberto Vieira de Sousa** o título de Doutor em Ciências Biológicas, na área de concentração em Bioquímica e Genética.

Aos sete dias do mês de junho de 2024, a partir das 08:00 horas, por videoconferência, realizou-se a sessão pública de Defesa de Tese intitulada “Monitoramento de patógenos virais por meio de epidemiologia baseada em águas residuárias”. Os trabalhos foram instalados pela Orientadora, Professora Doutora Elisângela de Paula Silveira Lacerda (ICB - UFG) com a participação dos demais membros da Banca Examinadora: Professora Doutora Caroline Rigotto (Universidade Feevale), membro titular externo; Professora Doutora Gabriela Rodrigues Mendes Duarte (IQ - UFG), membro titular externo; Professora Doutora Elisa Flávia Luiz Cardoso Bailão (UEG), membro titular externo; Doutora Lívia do Carmo Silva (ICB - UFG), membro titular externo. Durante a arguição os membros da banca **não fizeram** sugestão de alteração do título do trabalho. A Banca Examinadora reuniu-se em sessão secreta a fim de concluir o julgamento da Tese tendo sido o candidato **aprovado** pelos seus membros. Proclamados os resultados pela Professora Doutora Elisângela de Paula Silveira Lacerda, Presidente da Banca Examinadora, foram encerrados os trabalhos e, para constar, lavrou-se a presente ata que é assinada pelos Membros da Banca Examinadora, aos sete dias do mês de junho de 2024.

TÍTULO SUGERIDO PELA BANCA



Documento assinado eletronicamente por **Elisangela De Paula Silveira Lacerda, Professor do Magistério Superior**, em 07/06/2024, às 13:12, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Elisa Flávia Luiz Cardoso Bailão, Usuário Externo**, em 11/06/2024, às 14:06, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Gabriela Rodrigues Mendes Duarte, Professor do Magistério Superior**, em 26/07/2024, às 14:01, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Lívia do Carmo Silva, Usuário Externo**, em 29/07/2024, às 10:23, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Manoel Francisco Biancardi, Coordenador**, em 12/12/2025, às 11:46, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **4589269** e o código CRC **DC2E1F45**.

Referência: Processo nº 23070.025433/2024-25

SEI nº 4589269

DEDICATÓRIA

“Sonho que se sonha só
É só um sonho que se sonha só
Mas sonho que se sonha junto é realidade”

Raul Seixas

Dedico este trabalho aos meus sobrinhos
lindos e amados, Anna Vitória, João Paulo,
Eva e Maria.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, agradeço a Deus, à minha família e aos meus amigos. Aos meus pais, Paulo Roberto e Maria do Rosário, e aos meus irmãos, Anna Paula, André, Paulinho, Sandro e Roberta, por todo apoio e confiança em mim depositados. Agradeço à minha amada esposa, Flavia Cruvinel, pelos anos de apoio, companheirismo e amizade.

Agradeço à minha querida orientadora, Dra. Elisângela Lacerda, por ter confiado e acreditado em mim, e por ter sido uma “mãezona” para todos nós do laboratório. Hoje posso dizer que ela não é apenas minha orientadora, mas também minha colega de profissão, sempre disponível para parcerias profissionais, e espero que isso continue por toda a vida. Estendo meus agradecimentos aos professores Dr. Carlos Eduardo, Dr. Marco Túlio Zapata, Dra. Silvia Salem e Dr. Hugo Delleon por estarem sempre me apoiando e ajudando na parte intelectual e experimental deste trabalho. Agradeço também à professora Dra. Gislaine Fongaro, da UFSC, que me ajudou disponibilizando o protocolo de concentração viral e esclarecendo dúvidas importantíssimas. Também agradeço, em nome da SANEAGO e de toda a sua equipe técnica, ao Dr. Carlos pela parceria realizada.

Agradeço às minhas queridas amigas Dra. Juliana de Curcio e Dra. Lívia do Carmo, que foram excepcionais para a concretização deste trabalho. Agradeço ao meu grande amigo Dr. Flávio Olímpio pelos ensinamentos, pela parceria no desenvolvimento do aplicativo web deste trabalho e pelas horas intermináveis programando em Python.

Agradeço à Universidade Federal de Goiás e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas e a todo o seu corpo docente pelos anos de aprendizado e ensinamentos. Não poderia deixar de agradecer a todos os amigos e colegas que fiz no Laboratório de Genética Molecular e Citogenética da UFG, que direta ou indiretamente colaboraram para minha formação.

Agradeço também aos meus colegas da Universidade Estadual de Goiás pelas parcerias ocorridas durante o meu doutorado, em especial às professoras Dra. Samantha Salomão, Dra. Elisa Flávia e Dra. Luciane Almeida por disponibilizarem o Laboratório de Biotecnologia LaBiotec quando precisei.

Por fim, agradeço à CAPES e à JBS por financiarem este trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	x
LISTA DE FIGURAS.....	xii
LISTA DE TABELAS.....	xiii
RESUMO.....	xiv
ABSTRACT.....	xv
IMPACTO E RELEVÂNCIA DA PESQUISA PARA SOCIEDADE.....	xvi
1. INTRODUÇÃO.....	19
1.1 Re-Emergência de Doenças Infecciosas.....	19
1.2 SARS-CoV-2.....	20
1.3 Arbovírus.....	22
1.4 Diagnóstico e o Monitoramento de Doenças.....	25
1.5 Epidemiologia Baseada em Águas Residuárias.....	26
1.6 Aspectos Bioquímicos e Físico-Químicos.....	28
1.7 Taxa de Excreção.....	29
1.8 Auxílio de Ferramentas Computacionais.....	30
2 OBJETIVOS.....	32
2.1 Objetivo Geral.....	32
2.2 Objetivos Específicos.....	32
3 METODOLOGIA.....	33
3.1 Fluxograma de Trabalho.....	33
3.2 Estação de Tratamento de Esgoto.....	33
3.3 Coleta das Amostras.....	34
3.4 Concentração Viral.....	35
3.5 Extração do RNA viral.....	36
3.6 Reação em Cadeira da Polimerase (RT-qPCR).....	36
3.7 Curva Padrão RT-qPCR.....	37
3.8 Comparação dos Dados Moleculares e Clínicos.....	38
3.9 Análises Estatísticas e Desenvolvimento do Web Aplicativo.....	38
4 RESULTADOS.....	39
4.1 Artigo Científico 1.....	39
4.2 Artigo Científico 2.....	50
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	71

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	72
ANEXOS.....	80

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACE2: proteína conversora de angiotensinogênio

ADE: aprimoramento do anticorpo dependente

BRT: Brasília *time*

°C: grau Celsius

CDC: Centro de Controle e Prevenção de Doenças

CHIKV: vírus da chikungunya

COVID-19: do inglês, *coronavirus disease* (doenças provocada por coronavírus)

Cq: ciclo de quantificação

Ct: *cycle threshold*

DENV: vírus da dengue

DNA: ácido desoxirribonucleico

E.T.E: estação de tratamento de esgoto

EUA: Estados Unidos da América

HCl: ácido clorídrico

kb: kilobase

km: quilômetros

L: litros

LGMC: Laboratório de Genética Molecular e Citogenética

M: molar

MAYV: vírus mayaro

MERS-CoV: síndrome respiratória do oriente médio provocada por coronavírus

mL: mililitros

N.D: não detectado

N.R: não reportado

OMS: Organização Mundial da Saúde

PAHO: Organização Pan-Americana da Saúde

PBS: tampão salino fostato

qPCR: reação em cadeia da polimerase em tempo real

RNA: ácido ribonucleico

rpm: rotações por minuto

RT-qPCR: reação em cadeia da polimerase em tempo real precedida de transcriptase reversa

S: glicoproteína *spike*

SARS-CoV-2: síndrome aguda grave respiratória provocada por coronavírus

TMPRSS2: protease transmembrana serina 2

UFG: Universidade Federal de Goiás

WBE: do inglês, *wastewater-based epidemiology* (epidemiologia baseada em águas residuárias)

ZIKV: vírus da zika

μL: microlitros

LISTA DE FIGURAS

- Figura 01. Estruturas das proteínas não estruturais do SARS-CoV-2. O genoma completo do SARS-CoV-2 e suas 16 proteínas não estruturais são mostrados como um desenho animado representação com cores do arco-íris. Adaptado de Bai et al., 2022.....19
- Figura 2. Estruturas das proteínas estruturais e acessórias do SARS-CoV-2. As estruturas são mostradas como uma representação de desenho animado com as cores do arco-íris. Adaptado de Bai et al., 2022.....19
- Figura 3. Diagrama do genoma de DENV2 demonstrando as regiões codificantes de poliproteínas antes do processamento proteolítico. Adaptado de Shen et. al., 2015.....22
- Figura 4. Fluxograma representando as etapas do trabalho: I) coleta de amostras, II) concentração viral, III) extração do RNA viral, IV) reação em cadeia da polimerase (RT-qPCR) e V) análise de dados.....31

LISTA DE TABELAS

Tabela 01.

Tabela 1. Características da excreção urinária após infecção por vários arbovírus.
Dados adaptados de Lee et al., (2022).....28

Tabela 2. Descrição sobre a etapa de coleta das amostras de esgoto.....33

RESUMO

Surtos, endemias e pandemias causados por agentes virais representam um desafio global para a saúde pública. Recentemente, a pandemia de COVID-19 resultou em milhões de mortes no mundo. Paralelamente, epidemias de arboviroses continuam sendo um grave problema sanitário, especialmente em países tropicais, como o Brasil. Nesse contexto, a epidemiologia baseada em águas residuárias (*Wastewater-Based Epidemiology*, WBE) tem se destacado como uma ferramenta promissora para a detecção e o monitoramento de patógenos virais em nível populacional. O presente estudo realizou o monitoramento de patógenos virais - especificamente o coronavírus (SARS-CoV-2) e os vírus causadores das arboviroses dengue (DENV), zika (ZIKV) e chikungunya (CHIKV) — por meio da WBE. As amostras foram coletadas entre janeiro e agosto de 2021 e entre janeiro e dezembro de 2023 na Estação de Tratamento de Esgoto Dr. Hélio de Seixo Britto, localizada em Goiânia, Goiás, Brasil, a qual atende mais de 700 mil habitantes. A detecção viral envolveu etapas de concentração com polietilenoglicol (PEG6000), extração de ácidos nucleicos e posterior análise por reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR). Para o SARS-CoV-2, foram monitoradas duas regiões genômicas, N1 e N2, ao longo de 30 semanas de 2021. Os resultados indicaram que 43,63% das amostras foram positivas, sem diferença significativa entre a detecção pelos primers N1 (média de 3,23 log₁₀ cópias do genoma/L; dp = 0,23) e N2 (média de 2,95 log₁₀ cópias do genoma/L; dp = 0,29). Os dados moleculares foram comparados com dados clínicos oficiais. Quanto às arboviroses, o RNA viral de proteínas não estruturais foi detectado em 36 das 39 semanas monitoradas em 2023 (92%) para pelo menos um dos três vírus (DENV, ZIKV ou CHIKV). Ademais, foi desenvolvido um aplicativo web — “pySewage” — para automatizar a previsão do número de pessoas infectadas. Espera-se que o protocolo experimental proposto, aliado à interface web, contribua para ampliar a capacidade de predição e monitoramento de patógenos virais em águas residuárias, oferecendo suporte estratégico às ações de vigilância epidemiológica.

Palavras-chave: SARS-CoV-2, COVID-19, arboviroses, vigilância, monitoramento, pySewage.

ABSTRACT

Outbreaks, endemics, and pandemics caused by viral agents pose a global challenge to public health. Recently, the COVID-19 pandemic resulted in millions of deaths worldwide. In parallel, epidemics of arboviral diseases remain a serious health problem, especially in tropical countries such as Brazil. In this context, wastewater-based epidemiology (WBE) has emerged as a promising tool for the detection and monitoring of viral pathogens at the population level. This study monitored viral pathogens—specifically the coronavirus (SARS-CoV-2) and the arboviruses dengue (DENV), Zika (ZIKV), and chikungunya (CHIKV)—through WBE. Samples were collected between January and August 2021 and between January and December 2023 at the Dr. Hélio de Seixo Britto Wastewater Treatment Plant, located in Goiânia, Goiás, Brazil, which serves more than 700,000 inhabitants. Viral detection involved concentration with polyethylene glycol (PEG6000), extraction of nucleic acids, and subsequent analysis by real-time polymerase chain reaction (qPCR). For SARS-CoV-2, two genomic regions, N1 and N2, were monitored over 30 weeks in 2021. Results indicated that 43.63% of the samples were positive, with no significant difference between detection using primers N1 (mean 3.23 log₁₀ genome copies/L; SD = 0.23) and N2 (mean 2.95 log₁₀ genome copies/L; SD = 0.29). Molecular data were compared with official clinical records. Regarding arboviruses, viral RNA from nonstructural proteins was detected in 36 of the 39 monitored weeks in 2023 (92%) for at least one of the three viruses (DENV, ZIKV, or CHIKV). Additionally, a web application—“pySewage”—was developed to automate the prediction of the number of infected individuals. It is expected that the proposed experimental protocol, combined with the web interface, will enhance the capacity for predicting and monitoring viral pathogens in wastewater, providing strategic support for epidemiological surveillance efforts.

Keywords: SARS-CoV-2, COVID-19, arboviruses, surveillance, monitoring, pySewage.

IMPACTO E RELEVÂNCIA DA PESQUISA PARA SOCIEDADE

A epidemiologia baseada em águas residuárias é uma ferramenta para monitorar patógenos virais em amostras de esgoto. Essa abordagem combina técnicas de biologia molecular em três etapas principais: concentração viral, extração viral e detecção viral. Essas etapas são conduzidas em laboratório, com equipamentos e técnicas específicas, visando identificar os patógenos virais presentes no esgoto. Quando esses patógenos são detectados, são gerados dados que refletem o perfil de contaminação da população, já que o esgoto é predominantemente composto por amostras humanas provenientes de residências, estabelecimentos comerciais, entre outros.

Neste estudo, foram coletadas amostras de esgoto durante os anos de 2021 e 2023 com o objetivo de monitorar o vírus responsável pela COVID-19 e as arboviroses (dengue, zika e chikungunya). O uso dessa ferramenta possibilita o monitoramento em tempo real de surtos, endemias e pandemias, auxiliando as autoridades de saúde na tomada de decisões. Além disso, permite o monitoramento precoce, uma vez que os patógenos podem ser detectados nas fezes, urina e outros fluidos corporais antes do aparecimento dos sintomas.

Outro aspecto relevante é que durante surtos e pandemias, os hospitais e sistemas de saúde podem ficar sobrecarregados, com falta de testes para todos. A epidemiologia baseada em águas residuais oferece uma forma de testar em larga escala as populações, priorizando o atendimento em áreas mais afetadas por esses patógenos.

Por fim, essa abordagem é de baixo custo financeiro e não invasiva, não exigindo a coleta de sangue do paciente, e pode ser integrada a outros dados clínicos, como notificações no sistema de saúde, aumentando a capacidade de resposta epidemiológica das autoridades de saúde e aliviando a pressão sobre os sistemas de saúde durante crises como a COVID-19 e surtos de arboviroses.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Re-Emergência de Doenças Infecciosas

O crescimento das populações humanas e a elevada densidade populacional em grandes centros urbanos, impulsionados pela globalização, têm contribuído para a (re) emergência de doenças infecciosas. Diversos patógenos virais e os danos que causam à saúde humana estão associados às mudanças climáticas, especialmente ao aumento da temperatura global, como é o caso das arboviroses (DENV, ZIKV e CHIKV), entre outros. (Mora et al. 2018, 2022).

Os efeitos dessas mudanças climáticas podem ser observados no aumento do tamanho e da densidade das populações de vetores artrópodes, assim como nos níveis de replicação dos vírus nesses vetores (Tabachnick 2016). Por outro lado, durante a pandemia da doença provocada por coronavírus (COVID-19), a dinâmica de transmissão e difusão do vírus da síndrome aguda grave respiratória (SARS-CoV-2) apresentou ser uma complexa relação entre mudanças ambientais, climáticas e sociais (Amoatey et al. 2020; Coccia 2021a). Ademais, a poluição do ar pode aumentar a suscetibilidade às complicações da COVID-19 e contribuir para taxas mais elevadas de transmissão e mortalidade (Coccia 2021b).

Outros fatores também estão associados ao surgimento de doenças infecciosas. A migração é um fenômeno intrínseco às populações humanas devido a uma variedade de fatores políticos, sociais e econômicos. A conexão entre a introdução de novas doenças e a migração demonstra uma correlação positiva. Nesse contexto, a prevalência de infecções locais, relacionadas aos países de origem dos imigrantes, assim como questões de marginalização e pobreza, contribuem negativamente para os aspectos epidemiológicos (Gushulak and Macpherson 2004; Castelli and Sulis 2017). Além disso, as alterações nas relações ecológicas de nichos e habitats de diversas espécies, provocadas pela expansão econômica e social do ser humano, possibilitou a extinção e/ou adaptação das espécies invadidas. O mosquito *Aedes aegypti* é responsável por transmitir diversas arboviroses para o ser humano e outros animais, provavelmente tenha se adaptado à “domesticação” na época das grandes embarcações (Powell and Tabachnick 2013).

Nesse contexto, as doenças reemergentes configuram-se uma complexa relação de fatores ambientais, sociais e ecológicos, demandando uma atenção

especial por parte das autoridades de saúde, da comunidade científica e da sociedade civil, uma vez que são caracterizadas como um problema de saúde pública a nível global.

1.2 SARS-CoV-2

Em dezembro de 2019, foi observado um grupo de pacientes apresentando sintomas de pneumonia em Wuhan, Hubei, China. Posteriormente foi confirmado como sendo o novo corona vírus, também chamado de síndrome respiratória aguda grave (SARS-CoV-2), que causa a doença da COVID-19 - do inglês, *corona virus disease* (Graham Carlos et al. 2020). Em março de 2020, a Organização Mundial da Saúde (OMS) classificou a epidemia da COVID-19 como pandemia (World Health Organization 2020a).

O SARS-CoV-2 é um vírus de RNA de sentido positivo com aproximadamente 30 kb de comprimento, codificando mais de dez genes - Sequência de Referência no NCBI: NC_045512.1 (Koyama and Parida 2020). Sua sequência genômica de nucleotídeos possui 79,5% de homologia com o SARS-CoV e 50% de homologia com o coronavírus da Síndrome Respiratória do Oriente Médio – MERS-CoV (Lu et al. 2020; Wu et al. 2020b).

O genoma do SARS-CoV-2 codifica proteínas estruturais e não estruturais (Figura 1 e 2). As proteínas não estruturais, compreendendo 16 proteínas no total, são codificadas a partir de duas regiões de quadro aberto de leitura (ORF), são elas, ORF1a e ORF1b responsáveis pela regulação da replicação e transcrição do RNA viral (Bai et al. 2022). Além disso, seu genoma codifica quatro proteínas estruturais, sendo elas, proteína S, proteína N, proteína M e proteína E (Bai et al. 2022). A glicoproteína *spike* (S), localizada no envelope do SARS-CoV-2, possui subunidades que interagem com uma proteína conversora de angiotensinogênio (ACE 2), localizada na superfície de várias células humanas, permitindo a fusão do vírus com a membrana da célula do hospedeiro e, por conseguinte, a sua entrada na célula (Ali and Vijayan 2020). Adicionalmente, uma vez que a proteína *spike* se liga a proteína ACE 2, inicia uma ativação da proteína *spike* por meio de proteases da célula do hospedeiro, incluindo a protease transmembrana serina 2 (TMPRSS2), sendo que a alta expressão de ACE 2 e TMPRSS2 aumenta a capacidade de invasão do SARS-CoV-2 (Sato et al. 2021).

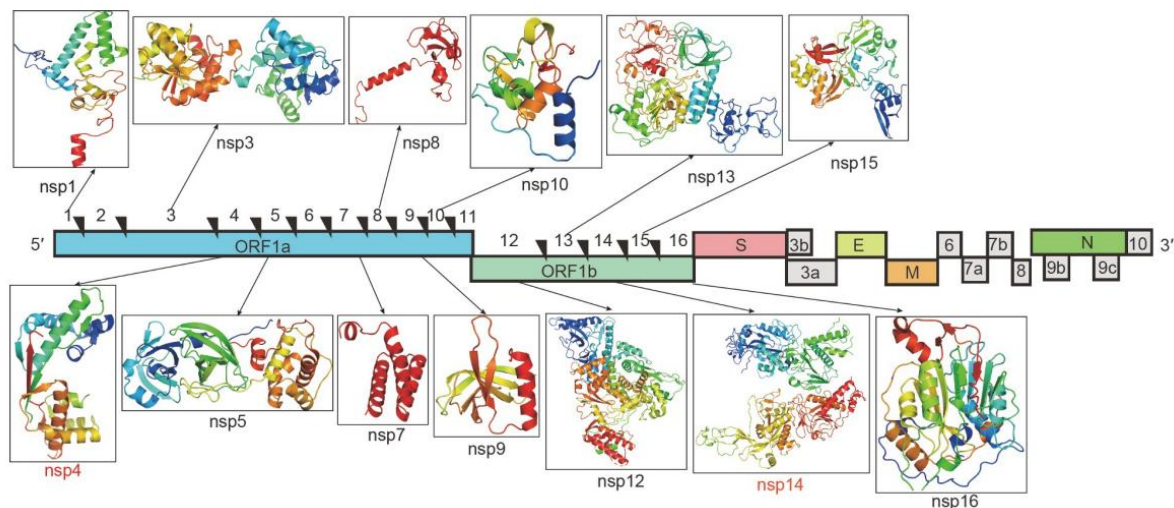


Figura 01. Estruturas das proteínas não estruturais do SARS-CoV-2. O genoma completo do SARS-CoV-2 e suas 16 proteínas não estruturais são mostrados como um desenho animado representação com cores do arco-íris. Adaptado de Bai et al., 2022.

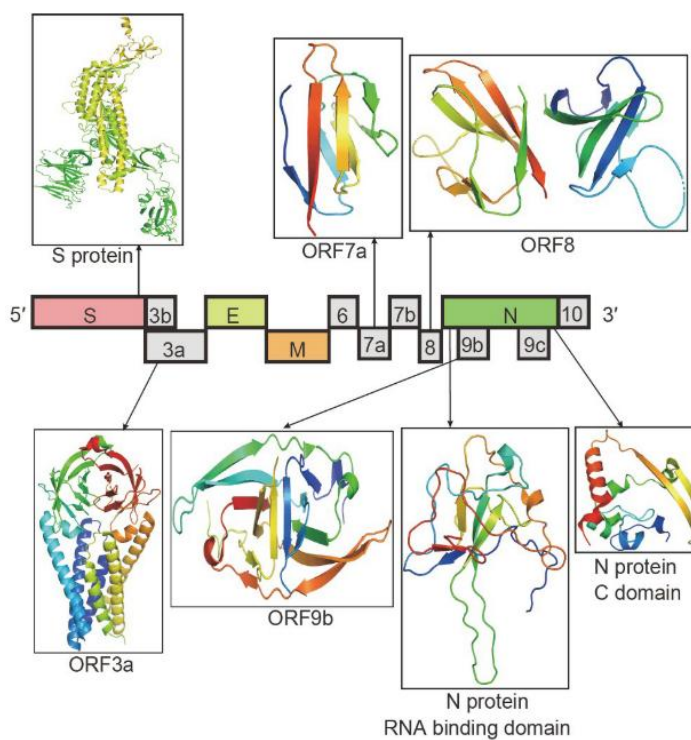


Figura 2. Estruturas das proteínas estruturais e acessórias do SARS-CoV-2. As estruturas são mostradas como uma representação de desenho animado com as cores do arco-íris. Adaptado de Bai et al., 2022.

O novo coronavírus SARS-CoV-2 é transmitido primariamente por meio do contato com pessoas infectadas através de gotículas de saliva, fômite e aerossol (Meyerowitz et al. 2021). A infecção pelo vírus pode ser assintomática, porém, quando sintomática, a doença pode se manifestar desde a forma mais branda/leve com sintomas incluindo febre, tosse e falta de ar, até formas mais graves de severidade levando a morte (Esakandari et al. 2020). De Maria et al., 2020, reportaram uma alta prevalência de pacientes com sintomas de distúrbio do paladar e olfato durante infecção por SARS-CoV-2.

No início da pandemia de COVID-19, algumas medidas não farmacêuticas foram adotadas para mitigar o risco de disseminação do vírus, tais como, *lockdown*, uso de máscaras, distanciamento social e restrições de viagens (Coccia 2020; Bo et al. 2021). Essas medidas diminuíram os casos de transmissão do vírus e mortes em comunidades locais (Iezadi et al. 2021). Entretanto, medidas como *lockdown* de longa duração propicia impactos negativos em aspectos sociais, psicológicos e econômicos (Brooks et al. 2020; Coccia 2021c; Iezadi et al. 2021). Com o desenvolvimento das vacinas objetivando a proteção imunológica das populações, observou-se no entanto, que parte dos indivíduos eram céticos quanto a efetividade das vacinas, ou até mesmo a existência da doença, devido à crenças pessoais (Tzenios et al. 2023).

De acordo com a Organização Mundial da Saúde, até março de 2023 foram confirmados mais de 760 milhões de casos de COVID-19 com mais de 6,8 milhões de óbitos em todo o mundo. No Brasil, de janeiro de 2020 até março de 2023, houveram mais de 37 milhões de casos confirmados de COVID-19 com mais de 690 mil mortes (World Health Organization 2020b) - COVID-19 Dashboard – disponível em <https://covid19.who.int/>. No estado de Goiás, Brasil, de 30 de dezembro de 2019 até 02 de julho de 2022, foram reportados mais de 1,5 milhões de casos confirmados de COVID-19 e mais de 26 mil óbitos de acordo com o 77º boletim epidemiológico emitido pela Secretaria de Saúde de Goiânia (disponível em: <https://www.saude.go.gov.br/coronavirus/boletins-epidemiologicos>).

1.3 Arbovírus

Os arbovírus são definidos como vírus que são transmitidos para mamíferos hospedeiros, geralmente após vetores artrópodes se alimentarem do sangue dos hospedeiros, incluindo mosquitos, carrapatos e outros (Gubler 2002; Conway et al.

2014). Os gêneros *Flavivirus* e *Alphavirus* estão classificados como os mais importantes devido à sua ampla distribuição geográfica e a sua morbidade, compreendendo os vírus da Dengue (DENV), Zika (ZIKV), Chikungunya (CHIKV), Mayaro (MAYV), Febre Amarela (YFV), dentre outros (Gubler 2002; Gould et al. 2017).

O tamanho do genoma dos *Flavivirus* e dos *Alphavirus* compreende aproximadamente 11 kb, composto por uma fita simples de RNA com polaridade positiva que codifica cerca de dez genes responsáveis por formar proteínas estruturais do capsídeo, membrana, envelope e as proteínas não-estruturais (Jose and Kuhn 2009; Abushouk et al. 2016), existindo porém, diferenças estruturais específicas entre estes dois gêneros (Hernandez et al. 2014).

As arboviroses são endêmicas em países tropicais, sendo consideradas pela literatura como doenças tropicais negligenciadas, uma vez que estão relacionadas com vários fatores, dentre eles, a falta e/ou ausência de investimentos em infraestrutura sanitária, ausência de controle eficaz dos vetores, ausência de monitoramento eficaz dos pacientes infectados, baixa assistência médica adequada à população, ausência diagnóstico diferencial adequado, dentre outros (Labeaud 2008; Acosta-Ampudia et al. 2018; World Health Organization 2018).

As arboviroses são transmitidas para o homem e outros animais vertebrados, primariamente, por meio da picada do mosquito vetor infectado. Entretanto, há evidências de transmissão de DENV por meio do contato com o sangue contaminado (Chen and Wilson 2004), de ZIKV por meio do intercuro sexual (McCarthy 2016), de CHIKV durante o parto (Senanayake et al. 2009). A maioria das infecções são assintomáticas (Eppes et al. 2017). Os casos sintomáticos mais comuns para DENV, ZIKV e CHIKV incluem febre, dor nas articulações e irritações na pele. Nos casos mais severos, observa-se a ocorrência de febre hemorrágica nos casos de DENV (Gubler 1998), microcefalia e o desenvolvimento da síndrome de Guillain-Barré nos casos de ZIKV (Cao-Lormeau et al. 2016; Musso and Gubler 2016).

O vírus da Dengue possui quatro sorotipos (DENV1-4). A rápida expansão e o aumento da circulação desses sorotipos nas populações humanas estão associados ao crescimento urbano acelerado e desordenado, resultando em uma hiperendemicidade (a coexistência de múltiplos sorotipos em uma mesma área). Nesse contexto, os casos mais graves de Dengue, como a febre hemorrágica, estão

relacionados à hiperendemicidade dos sorotipos circulantes (Gubler 1997). Os quatro sorotipos de DENV codificam uma poliproteína que posteriormente sofre processamento proteolítico – ver Figura 3 (Shen et al. 2015).



Figura 3. Diagrama do genoma de DENV2 demonstrando as regiões codificantes de poliproteínas antes do processamento proteolítico. Adaptado de Shen et. al., 2015.

A hipótese do Aprimoramento Dependente de Anticorpos (ADE, do inglês *Antibody-Dependent Enhancement*) foi descoberta nas décadas de 1960 e 1970 e sugere que, se um paciente desenvolver uma segunda infecção por um sorotipo diferente daquele que causou a primeira infecção por DENV, os anticorpos produzidos durante a primeira infecção podem se ligar ao vírus da segunda infecção (Brandt et al. 1982; Kulkarni 2020). No entanto, esses anticorpos não neutralizam completamente o vírus, o que pode resultar no desenvolvimento de casos mais graves de dengue hemorrágica (Brandt et al. 1982; Kulkarni 2020). Nesse sentido, para o desenvolvimento de vacinas contra o DENV é necessário considerar o efeito do ADE nos pacientes (Cui et al. 2021).

A estimativa anual da prevalência de casos de DENV em todo o mundo é de 96 milhões, enquanto nas Américas são registrados 693 mil casos de CHIKV e 500 mil casos de ZIKV. (Franklinos et al. 2019). Em 2021, a Organização Pan-Americana da Saúde (PAHO) reportou mais de 1,4 milhões de casos de infecção por arbovírus, sendo que 88,9% eram casos de DENV, 9,6% de CHIKV e 1,5% de ZIKV (PAHO/WHO 2021). No estado de Goiás, Brasil, no ano de 2022 (até a 52ª semana epidemiológica) foram reportados mais de 275 mil casos de DENV, 3980 casos de CHIKV e 296 casos de ZIKV de acordo com o Boletim Epidemiológico das Arboviroses, volume I (disponível em: <https://www.saude.go.gov.br/boletins-informes>).

1.4 Diagnóstico e o Monitoramento de Doenças

O diagnóstico de infecções em populações humanas é fundamental para traçar estratégias de controle, monitoramento e tratamento adequado de pacientes durante surtos, endemias, epidemias e pandemias (Perkins et al. 2017). O uso de técnicas que dependam de laboratórios equipados, recursos humanos qualificados e tecnologias específicas são fatores imprescindíveis para a realização de diagnósticos precisos, sobretudo em países que carecem de recursos financeiros, humanos e tecnológicos (Musso and Gubler 2016).

Durante a pandemia de COVID-19, casos de coinfeção por SARS-CoV-2 e arboviroses foram reportados (Yan et al. 2020; da Silva 2021), desafiando as autoridades em saúde devido a alguns aspectos como a similaridade dos sintomas clínicos e a reação cruzada de testes sorológicos (Duffy et al. 2009; Gyurech et al. 2016; Yan et al. 2020). Além disso, ainda no contexto da pandemia de COVID-19, houve pouco esforço voltado para entender as relações de coinfeção entre arboviroses e SARS-CoV-2, assim como suas implicações nos sistemas de saúde pública (Milby et al. 2020).

No decorrer de surtos e epidemias, as fases da doença, em pacientes sintomáticos, são imprescindíveis para se determinar o teste diagnóstico adequado. A primeira fase, ou fase aguda, compreende o início dos sintomas onde é possível obter um maior pico de carga viral do ciclo da infecção, seguida pela segunda fase, ou fase de convalescência, com diminuição da carga viral (Dulgheroff et al. 2015).

O diagnóstico clínico das arboviroses é desafiador devido à semelhança dos sintomas entre as diferentes arboviroses (como DENV, ZIKV, CHIKV, MAYV, etc), quando presentes nos pacientes. Portanto, é necessário realizar um diagnóstico diferencial por meio de técnicas moleculares e/ou sorológicas (Gulati and Maheshwari 2012; Dulgheroff et al. 2015; Silveira-Lacerda et al. 2021). Ao longo da pandemia da COVID-19, algumas estratégias de testagem em massa estavam sendo realizadas, porém tais estratégias demandam altos custos financeiros, o que torna-se inviável em vários países, sobretudo nos países subdesenvolvidos (Brault et al. 2021). Nesse sentido, a baixa capacidade de realização de diagnósticos durante surtos e epidemias compromete as estratégias de ação por parte das autoridades em saúde (Kelly-cirino et al. 2019).

O monitoramento de doenças se dá de várias formas, dentre elas, por meio da vigilância sentinela, vigilância clínica, aplicação de questionários entre membros de uma comunidade, *google flu trends*, taxas de mortalidade e morbidade, dados de admissão em hospitais, taxas de prescrição de medicamentos, biomonitoramento (exposição ambiental a toxinas) e a epidemiologia baseada em águas residuárias (Sims and Kasprzyk-hordern 2020). Entretanto, em países subdesenvolvidos, a falta de recursos financeiros, humanos, de infraestrutura e de tecnologia, para se investir em ferramentas e sistemas de monitoramento, se caracterizam como um problema/desafio global para a saúde humana (CDC 2012).

1.5 Epidemiologia Baseada em Águas Residuárias

A epidemiologia baseada em águas residuárias (do inglês, *wastewater-based epidemiology*, ou WBE) é uma ferramenta utilizada para monitorar o perfil químico e biológico de comunidades a partir de análises moleculares qualitativas e quantitativas em amostras de águas residuárias. No início dos anos 2000, Zucatto et. al., 2005, implementaram o primeiro estudo utilizando a ferramenta WBE com o intuito de estimarem o abuso do consumo de cocaína de comunidades em algumas cidades da Itália. Os usuários do entorpecente, liberam uma molécula metabolizada (marcador), em sua urina, podendo ser então detectada a partir de amostras de água da rede de tratamento de esgoto (Zuccato et al. 2005). Desde então, a ferramenta WBE vem sendo utilizada para monitorar, não somente o consumo de drogas e medicamentos como também, pesticidas, metais pesados, patógenos virais como o vírus influenza, arboviroses, e mais recentemente SARS-CoV-2 na pandemia da COVID-19 (Ye et al. 2016; Choi et al. 2018; Markosian and Mirzoyan 2019; Ahmed et al. 2020a, 2021; Sherchan et al. 2020; Mao et al. 2021; Lee et al. 2022).

Em 2014, a ferramenta WBE foi empregada como uma estratégia de monitoramento ambiental em diversos países, em consonância com a Iniciativa Global de Erradicação da Poliomielite, uma doença infecciosa causada pelo poliovírus. Seu objetivo era detectar o vírus em amostras de esgoto, visando mapear o perfil epidemiológico da circulação do vírus nas comunidades. Essa abordagem desempenhou um papel significativo no esforço global de erradicação da doença (Asghar et al. 2014). Recentemente, durante a pandemia de COVID-19 a ferramenta WBE foi utilizada no monitoramento dos casos de infecção, pois pessoas infectadas estavam eliminando o SARS-CoV-2 nas fezes, permitindo, em alguns locais, a

detecção precoce do vírus antes mesmo do primeiro caso ser relatado pelas autoridades em saúde (Ahmed et al. 2021).

Para que a ferramenta WBE seja útil no monitoramento do perfil químico e biológico de comunidades humanas, sobretudo em águas residuárias, é necessário considerar os fluidos corporais em que a substância ou molécula alvo está diluída/contida. Nesse sentido, cientistas tem caracterizado a faixa de amplitude da taxa de eliminação de alguns patógenos (arboviroses e SARS-CoV-2) nos fluidos corporais, em espécimes como urina, fezes, saliva, sêmen, dentre outros (Van den Bossche et al. 2015; Lalle et al. 2018; Li et al. 2018; Wu et al. 2020c; Chandra et al. 2021).

A WBE é uma ferramenta promissora no monitoramento de doenças e outros agravos à saúde de populações e comunidades humanas, por ser barata e não invasiva, sendo possível monitorar casos de infecções sintomáticas e assintomáticas (Prado et al. 2020, 2021, 2023). Os dados quantitativos e qualitativos são gerados em tempo real, durante surtos e endemias, possibilitando o monitoramento de um grande número de pessoas, revelando os prováveis focos de maior concentração de pessoas infectadas, auxiliando assim, na tomada antecipada de decisões por parte das autoridades de saúde (Bivins et al. 2020; Larsen and Wigginton 2020; Sims and Kasprzyk-hordern 2020; Hewitt et al. 2022; Monteiro et al. 2022). Além disso, a ferramenta pode ser utilizada na investigação da distribuição espacial de casos de infecção, por meio do monitoramento das subestações e tubulações de esgoto (Henriques et al. 2023). Entretanto, há algumas limitações da ferramenta WBE, tais como, a seleção dos biomarcadores, a complexidade de substâncias que compõe a matriz de esgoto, o tipo de tratamento empregado ao esgoto, a diluição dos patógenos no esgoto, o clima de certas regiões, a ausência de técnicas padronizadas, a especificidade-patógeno de cada técnica de monitoramento, ausência de infraestrutura sanitária em várias comunidades, dentre outras (Sims and Kasprzyk-hordern 2020; Wu et al. 2020a; Adhikari and Halden 2022).

Os processos de detecção de patógenos virais por meio da ferramenta WBE podem seguir diferentes metodologias combinadas com técnicas de biologia molecular. As etapas da técnica são, geralmente, I) coleta das amostras de água, II) concentração viral, III) extração dos ácidos nucleicos, IV) análise molecular (por meio da reação em cadeia da polimerase – PCR, ou outra técnica), V) análise

epidemiológica dos dados - incidência, prevalência, distribuição espacial dos casos, comparação com dados clínicos, dentre outros (Ahmed et al. 2020b; Sherchan et al. 2020; Fongaro et al. 2021; Mota et al. 2021).

A etapa de concentração viral é crucial para um bom desenvolvimento da metodologia como um todo, tornando-se um desafio para a técnica de WBE, pois é necessário considerar os efeitos de diluição do esgoto, como a água da chuva, ligações clandestinas, e outros componentes químicos presentes na matriz do esgoto (Ciannella et al. 2023). Além disso, podem ocorrer variações ou combinações dos métodos, tais como, precipitação com polietileno glicol (PEG), filtragem membranas eletricamente carregadas, ultracentrifugação, dentre outros (Ahmed et al. 2020c; Cervantes-Avilés et al. 2021; Prado et al. 2021). A precipitação com PEG representa uma alternativa simples e barata para se realizar a concentração viral. Nesse tipo de alternativa, o polímero PEG atua na separação de proteínas (por exemplo, vírions) excluindo-as da fase do solvente, fazendo com que as proteínas possam se concentrar e precipitar (Lewis and Metcalf 1988; Barril et al. 2021; Torii et al. 2022). Por outro lado, métodos como a floculação por leite desnatado (do inglês, *skimmed milk flocculation*) pode ser considerado uma alternativa para laboratórios com poucos recursos, uma vez que este método não requer grande quantidade de consumíveis permitindo uma performance ininterrupta de vigilância (Ciannella et al. 2023).

1.6 Aspectos Bioquímicos e Físico-Químicos

A complexidade das matrizes de águas residuais é evidenciada pela presença de diversos tipos de substâncias a nível molecular, influenciando nos processos de recuperação viral. (Michael-kordatou et al. 2020; Ciannella et al. 2023). Nesse contexto, as cargas superficiais das partículas virais desempenham um papel crucial nos processos de recuperação, uma vez que variações no pH podem alterar essas cargas, afetando diretamente a eficiência da recuperação através de interações eletrostáticas de atração ou repulsão (Hao et al. 2022). Além disso, é importante ressaltar que os vírus envelopados geralmente são menos resistentes em ambientes aquosos em comparação com os vírus não envelopados. Isso se deve à presença de uma camada lipídica na estrutura dos vírus envelopados, o que os torna mais sensíveis ao ambiente circundante (Roos 2020; Hao et al. 2022).

Outro fator importante a se considerar é concentração de cloreto de sódio (NaCl), pois o sal pode facilitar a recuperação viral nas fases de separação entre a fase aquosa e a fase orgânica, alterando as cargas iônicas dos vírus (Lewis and Metcalf 1988; Barril et al. 2021). Entretanto, é imprescindível considerar os fatores físico-químicos de cada tipo viral ao sistema aquoso em questão e o desenho experimental adequado para cada situação (Hao et al. 2022).

1.7 Taxa de Excreção

A taxa de excreção (do inglês *shedding rate*) dos patógenos virais, nos espécimes de fluidos corporais, é um fator determinante na análise em águas residuárias, sendo utilizado como um biomarcador para estimar a prevalência de infecção nas populações por meio da ferramenta WBE (Schmitz et al. 2021). Adicionalmente, a taxa de excreção parece estar relacionada com a gravidade dos sintomas dos pacientes e com o pico do ciclo de infecção (Jones et al. 2020).

O RNA viral de arboviroses e SARS-CoV-2 pode ser detectado por meio de testes moleculares em urina e fezes (Van den Bossche et al. 2015; Wu et al. 2020c), possibilitando o seu monitoramento através da ferramenta WBE. Entretanto, para se detectar estes vírus em águas residuárias é necessário considerar o título viral de infecções sintomáticas e assintomáticas e a persistência do RNA viral em matrizes complexas de esgoto (Lee et al. 2022). Nesse sentido, ao relacionar o RNA viral quantificado nas matrizes de esgoto com a sua taxa de excreção na urina e fezes dos pacientes infectados (sintomáticos e assintomáticos), é possível estimar a prevalência de infecção (Ahmed et al. 2020b). Ademais, é necessário considerar que existem outros fluidos de excreção, além da urina e fezes, que contribuem para a carga viral nas plantas de tratamento de esgoto, tais como, saliva e escarro (Crank et al. 2022).

Durante a pandemia de COVID-19, os cientistas reportaram evidências de que o SARS-CoV-2 pode ser detectado em amostras de fezes em até 47 dias após o início dos sintomas, e em até 33 dias após amostras de nasofaringe se tornarem negativas (Wu et al. 2020c). Ainda que a persistência do vírus em amostras de fezes possibilite a detecção por um longo período de tempo, sugerindo uma nova rota de transmissão fecal-oral, não há evidências robustas que demonstrem uma infectividade do vírus em amostras de fezes (Gupta et al. 2020).

As taxas de excreção de algumas arboviroses, tais como, DENV e ZIKV em particular (ver Tabela 1), podem ser menores do que os vírus entéricos (SARS-CoV-2) e sua detecção por WBS pode exigir a recuperação de volumes maiores de águas residuais (Zuo et al. 2021; Lee et al. 2022).

Tabela 1. Características da excreção urinária após infecção por vários arbovírus. Dados adaptados de Lee et al., (2022).

Espécie viral e gênero	Dias após o início da febre	Porcentagem de pacientes com amostras de urina testadas positivas, %	Amplitude da taxa de excreção do vírus na urina
Vírus da Dengue (DENV) <i>Flavivirus</i>	0–14	57.6% (68/118)	10^2 – 10^4 cópias genômicas/mL
	0–37	57% (12/21)	Ct 29.8–47.1
	0–20	95% (52/55)	Ct $\leq$ 38
Vírus da Zika (ZIKV) <i>Flavivirus</i>	0–4	44% (4/9)	10^2 – 10^5 cópias genômicas/mL (n = 4)
	3–12	100% (1/1)	10^3 – 10^4 cópias genômicas/mL
	0–28	N.R	média 8.8×10^2 cópias genômicas/mL
Vírus da Febre Amarela (YFV) <i>Flavivirus</i>	10 16	100% (1/1)	9.3×10^6 cópias genômicas/mL
			3.3×10^3 cópias genômicas/mL
Vírus da Chikungunya (CHIKV) <i>Alphavirus</i>	6–14	100% (4/4)	Ct 21–40
	0–7	8.3% (2/24)	Dado não reportado
	0–7	100% (6/6)	Dado não reportado

N.R – Não reportado

1.8 Auxílio de Ferramentas Computacionais

Nos últimos anos, tem se tornado evidente que os sistemas tradicionais de vigilância epidemiológica apresentam limitações importantes frente ao surgimento e à reemergência de doenças infecciosas, sobretudo aquelas de origem zoonótica. Nesse cenário, abordagens baseadas em análise de dados e modelagem preditiva têm sido apontadas como alternativas capazes de ampliar a detecção precoce de ameaças e

subsidiar a tomada de decisão em saúde pública, ao transformar grandes volumes de dados em informações acionáveis sobre perfis de infecção e risco populacional (Folasole 2023). De forma complementar, discute-se que a preparação para emergências em saúde depende não apenas da identificação de surtos, mas também do fortalecimento de sistemas de vigilância integrados, capazes de utilizar ferramentas computacionais, modelagem e previsão para antecipar cenários epidemiológicos e orientar respostas rápidas e coordenadas (Bedi et al. 2021). Assim, a incorporação de recursos computacionais ao monitoramento epidemiológico — como modelagens, algoritmos preditivos e interfaces digitais — configura-se como um componente estratégico que potencializa metodologias emergentes, incluindo a epidemiologia baseada em águas residuárias, ampliando a capacidade de prever tendências, direcionar ações preventivas e otimizar a gestão de crises sanitárias (Bedi et al. 2021; de Sousa et al. 2022; Folasole 2023).

Nesse sentido, durante a pandemia de COVID-19, uma grande quantidade de dados epidemiológicos, clínicos e biológicos foram produzidos. Nesse contexto, a bioinformática e os cientistas de dados representam um papel importante na análise de informações, para fomentar a pesquisa básica e o gerenciamento de doenças em epidemias e surtos (Mercatelli et al. 2021a). O uso de ferramentas computacionais são essenciais para estratégias de controle e prevenção das doenças, sendo possível automatizar os processos de análise de dados permitindo uma rapidez na interpretação dos dados (Mercatelli et al. 2021b), como também monitorar a distribuição espacial e prevalência de infecções (Henriques et al. 2023).

A utilização de *big data* como uma forma de detecção precoce de doenças infecciosas, objetivando aumentar a capacidade de responder localmente a surtos, por meio da vigilância digital, busca ganhar conhecimento através de análises dos padrões de acesso e a distribuição de dados nos domínios digitais (internet, sites de pesquisa, publicações, entre outros), caracterizando-se como uma abordagem viável (Milinovich et al. 2015).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

O objetivo geral deste trabalho foi monitorar patógenos virais na maior estação de tratamento de esgoto (E.T.E) da cidade de Goiânia, Goiás, Brasil, com o intuito de compreender a relação epidemiológica entre os dados moleculares e clínicos da população atendida pela E.T.E. Além disso, desenvolver um aplicativo web para automatizar a predição de infecções.

2.2 Objetivos Específicos

Monitorar a carga viral do vírus SARS-CoV-2 em amostras de águas residuárias de esgoto (esgoto bruto) da E.T.E Dr. Hélio de Seixo Britto utilizando a técnica molecular da reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR).

Monitorar a carga viral das arboviroses (DENV, ZIKV e CHIKV) 2 em amostras de águas residuárias de esgoto (esgoto bruto) da E.T.E Dr. Hélio de Seixo Britto por meio da técnica molecular da reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR).

Relacionar os dados moleculares de cada tipo viral com os dados epidemiológicos fornecidos pela Secretaria Municipal de Saúde de Goiânia.

Realizar a predição de infecção da população da cidade de Goiânia, com base na carga viral presente nas amostras de esgoto bruto.

Desenvolver um aplicativo web para automatizar a predição de infecção do corona vírus (SARS-CoV-2) e das arboviroses (DENV, ZIKV e CHIKV).

3 METODOLOGIA

3.1 Fluxograma de Trabalho

Para melhor adequar-se à rotina de trabalho dos pesquisadores, foi realizado um Fluxograma de Trabalho com as cinco principais etapas deste trabalho (Figura 4). Para um melhor entendimento de cada fase do trabalho (artigo 1 e 2), foi descrito as etapas metodológicas enfatizando cada uma das fases deste trabalho separadamente ao longo do texto.

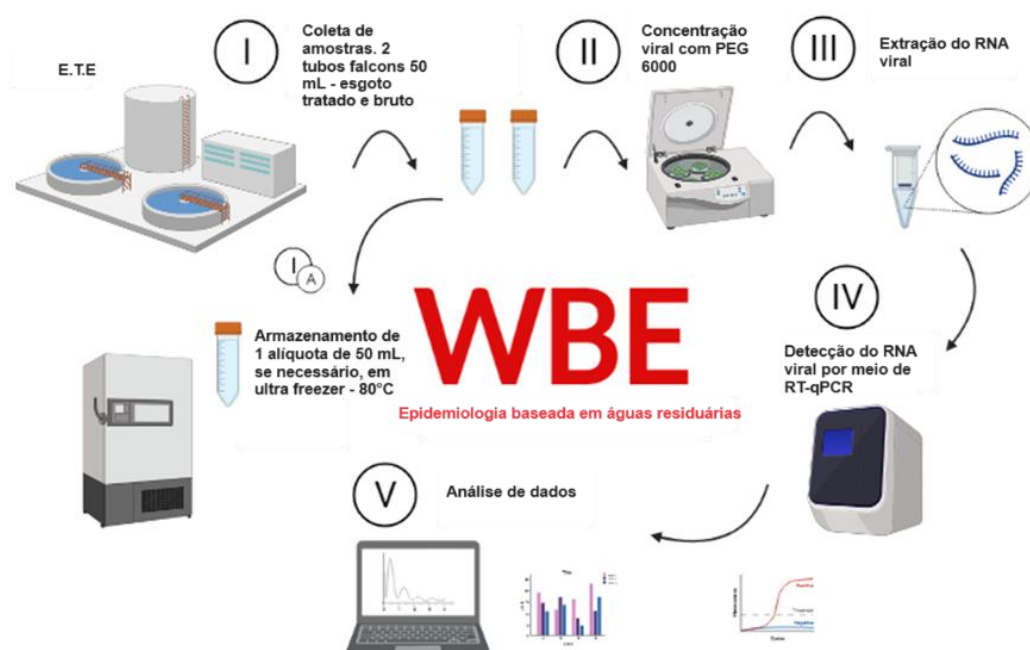


Figura 4. Fluxograma representando as etapas do trabalho: I) coleta de amostras, II) concentração viral, III) extração do RNA viral, IV) reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR) e V) análise de dados.

3.2 Estação de Tratamento de Esgoto

As amostras foram coletadas na Estação de Tratamento de Esgoto Dr. Hélio Seixo de Britto, em Goiânia, Goiás, Brasil. Essa estação atende a cerca de 57,51% da população de Goiânia, o equivalente a mais de 700.000 pessoas. Seu processo de tratamento envolve um tratamento primário aprimorado, com uma vazão máxima de 2300 litros por segundo para tratamento de esgoto.

A chegada do efluente à estação ocorre por gravidade, iniciando-se o tratamento preliminar com a remoção de sólidos grossos na grade grossa, por meio da descarga de uma estação elevatória. Após uma limpeza mecanizada nas grades

finas, o coagulante é adicionado. A medição do fluxo na calha *Parshall* é realizada por um medidor ultrassônico, seguida pela adição de polímero aniônico. Após isso, o efluente alcança a caixa de distribuição, de onde é distribuído para três decantadores primários. O lodo primário acumulado no tanque de armazenamento é centrifugado por meio do processo de desidratação mecânica. Em seguida, o efluente tratado é descarregado diretamente no rio. A lama seca é misturada mecanicamente com óxido de cálcio para estabilizá-la (pH 12) e melhorar suas características de manipulação. Posteriormente, o lodo é transportado para o aterro sanitário visando a recuperação de áreas degradadas.

3.3 Coleta das Amostras

Para o artigo 1, entre janeiro e agosto de 2021, foram coletadas 30 amostras de águas residuais na Estação de Tratamento de Esgoto Dr. Hélio Seixo Britto, equivalentes a 30 semanas epidemiológicas. A coleta consistiu em obter 200 mL de amostras, divididas igualmente entre influentes (esgoto bruto) e efluentes (esgoto tratado), entre 14h e 15h (horário de Brasília, – 03:00 UTC), utilizando o método "*grab sample method*". As amostras foram transportadas em gelo úmido para o Laboratório de Genética Molecular e Citogenética (LGMC) da Universidade Federal de Goiás (UFG), localizado em Goiânia, Goiás. A distância entre o ponto de coleta na E.T.E. e o laboratório LGMC é de aproximadamente 3,6 km, com um tempo estimado de trajeto de 15 minutos. No laboratório, as amostras foram armazenadas em ultra freezer a –80 °C até a etapa de concentração viral.

Para o artigo 2, entre janeiro e dezembro de 2023, foram coletadas 39 amostras de águas residuais na mesma E.T.E., equivalentes a 39 semanas epidemiológicas. O método de coleta envolveu a obtenção de 100 mL de amostras de influentes (esgoto bruto) entre 14h e 15h (horário de Brasília, – 03:00 UTC), utilizando o método "*grab sample method*". Em seguida, as amostras foram transportadas para o LGMC e armazenadas em ultra freezer a -80°C até a etapa de concentração viral.

Tabela 02. Descrição sobre a etapa de coleta das amostras de esgoto.

Descrição - Coleta de Amostras	Concentração Viral	
	Artigo 1 (SARS-CoV-2)	Artigo 2 (Arboviroses)
Quantidade de amostras	30	39
Volume de amostras (mL)	200	100
Tipo de amostras	Esgoto bruto e tratado	Esgoto bruto
Método de coleta utilizado	"grab sample method" entre 14h e 15h	"grab sample method" entre 14h e 15h
Horário de coleta	(horário de Brasília, – 03:00 UTC)	(horário de Brasília, – 03:00 UTC)

3.4 Concentração Viral

A concentração viral foi realizada conforme a metodologia descrita por Fongaro et al. (2021). Para o artigo 1, 50 mL de amostras de esgoto bruto e tratado foram submetidos a um ajuste de pH para 3,5 utilizando HCl 1M. Em seguida, as amostras foram agitadas por 30 minutos a uma temperatura de 4°C em um agitador a 1500 rpm. Posteriormente, foram centrifugadas por 30 minutos a 4700 rpm a 4°C. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o pellet foi ressuspensionado em 25 mL de tampão glicina (0,25M; pH 9,5). Após a ressuspensão, as amostras foram incubadas a 4°C e agitadas por 30 minutos a 1500 rpm. Em seguida, foram centrifugadas por 60 minutos a 4700 rpm a 4°C. O sobrenadante foi coletado e adicionado a 4,2 mL de PEG 6000 24%. As amostras foram então agitadas por 120 minutos a 4°C a 1500 rpm. Na próxima etapa, foram centrifugadas por 180 minutos a 4700 rpm a 4°C. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o pellet foi ressuspensionado em 500 uL de PBS a pH 7,2. Por fim, as amostras foram armazenadas em ultra freezer a -80°C até a análise de extração dos ácidos nucleicos.

Para o artigo 2, 100 mL de amostras de esgoto bruto foram submetidos a um ajuste de pH para 3,5 utilizando HCl 1M. Em seguida, as amostras foram agitadas por 30 minutos a uma temperatura de 4°C em um agitador a 1500 rpm. Posteriormente, foram centrifugadas por 30 minutos a 5500 rpm a 4°C. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o pellet foi ressuspensionado em 40 mL de tampão glicina (0,25M; pH 9,5). Após a ressuspensão, as amostras foram incubadas a 4°C e agitadas por 60 minutos a 1500 rpm. Em seguida, foram centrifugadas por 60 minutos a 5500 rpm a 4°C. O sobrenadante foi coletado e adicionado a 8 mL de PEG 6000 8%. As

amostras foram então agitadas por 180 minutos a 4°C a 1500 rpm. Na próxima etapa, foram centrifugadas por 180 minutos a 5500 rpm a 4°C. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o pellet foi ressuspenso em 500 µL de PBS a pH 7,2. Por fim, as amostras foram armazenadas em ultra freezer a -80°C até a análise de extração dos ácidos nucleicos.

3.5 Extração do RNA viral

Para o artigo 1, o RNA viral foi extraído de 100 µL das amostras usando o MagMAX™ Viral/Pathogen Nucleic Acid Kit de isolamento (Thermo Fisher Scientific, MA, EUA) de acordo com o protocolo do fabricante. O ácido nucleico extraído foi armazenado em ultra freezer a -80 °C até as próximas análises de qPCR.

Para o artigo 2, o RNA viral foi extraído de 200 µL das amostras utilizando o PureLink™ Viral RNA/DNA Mini Kit (Invitrogen, MA, EUA) de acordo com o protocolo do fabricante. O ácido nucleico extraído foi armazenado em ultra freezer a -80 °C até as próximas análises de qPCR.

3.6 Reação em Cadeira da Polimerase em Tempo Real (qPCR)

Para o artigo 1, a detecção do RNA viral de duas distintas regiões do gene do nucleocapsídeo do SARS-CoV-2 foi realizada por meio da reação em cadeia da polimerase em tempo real precedida de transcriptase reversa (RTqPCR), utilizando dois pares de *primers*, N1 e N2 (IDT, IA, EUA, número do catálogo 10006770), seguindo todas as recomendações do Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC). O mix de PCR foi preparado utilizando o kit GoTaq® Probe 1-Step RT-qPCR System (Promega, WI, EUA), em um volume total de reação de 20 µL. Esse volume incluiu 10 µL de GoTaq Probe qPCR Master Mix, 0,4 µL de Go Script RT Mix para a etapa de transcriptase reversa, 3,6 µL de água livre de DNase/RNase, 1 µL de *primer/probe* e 5 µL de amostra de RNA. O termociclador utilizado foi o AriaMX (Agilent, CA, EUA), seguindo um programa de ciclagem compreendendo um ciclo a 45 °C por 15 minutos para a etapa de transcriptase reversa, seguido de um ciclo a 95 °C por 2 minutos para a desnaturação da transcriptase reversa e ativação da DNA polimerase. As etapas seguintes de desnaturação da fita dupla e sua posterior extensão compreenderam 45 ciclos a 95 °C por 15 segundos e 60 °C por 1 minuto, respectivamente.

Para o artigo 2, a detecção do RNA viral de proteínas não estruturais de arbovírus (DENV, ZIKV e CHIKV) foi realizada por meio de RT-qPCR utilizando o termociclador AriaMX (Agilent, Santa Clara, Califórnia, EUA). As sequências de *primers/probes* foram utilizadas conforme reportadas por de Curcio et. al., (2022), obtidas da IDT; Integrated DNA Technologies (Coralville, IA, EUA). As reações de RT-qPCR foram conduzidas utilizando o kit GoTaq® Probe 1-Step RT-qPCR System (Promega, Madison, Wisconsin, EUA) seguindo as recomendações do fabricante. O programa de ciclagem compreendeu um ciclo a 45 °C por 15 minutos para a etapa de transcriptase reversa, seguido de um ciclo a 95 °C por 2 minutos para a desnaturação da transcriptase reversa e ativação da DNA polimerase. As etapas seguintes de desnaturação da fita dupla e sua posterior extensão compreenderam 40 ciclos a 95 °C por 15 segundos e 60 °C por 1 minuto, respectivamente.

3.7 Curva Padrão qPCR

Para o artigo 1, a fim de determinar o limite de detecção da técnica de qPCR foi realizado uma curva padrão a partir de diluições seriadas do controle positivo do kit IDT 2019-nCoV_N_Positive Control, variando de 10^5 a 1 cópia por reação. A curva padrão foi feita a partir da interpolação dos ciclos de quantificação (Cq) obtidos de cada reação (Eixo X) e os respectivos logaritmos da concentração relativa de cDNA presente nas amostras (Eixo Y). A curva é então representada por uma regressão linear de equação $y = ax+b$.

Para o artigo 2, foi desenhado um gBlock (Integrated DNA Technologies, Coralville, IA, EUA) contendo uma sequência parcial de DNA fita dupla sintético representando cada arbovírus, conforme reportado por de Curcio et. al., (2022). Fragmentos de DNA sintético do DENV, ZIKV e CHIKV foram combinados e usados tanto como controle positivo quanto para gerar curvas padrão para quantificação absoluta das reações de RT-qPCR. As sequências específicas dentro do gBlock são reconhecidas por pares de *primers/probes* projetados para amplificação dos genes de proteínas não estruturais do DENV (GenBank: OK040058.1), ZIKV (GenBank: OK054487.1) e CHIKV (GenBank: MW581885.1). É importante destacar que nosso gBlock abrange toda a região de DNA amplificada por esses *primers*. A curva padrão para cada arbovírus específico foi construída usando uma série de diluição que variou de 10^6 a 1 cópia por reação, com cada reação realizada em duplicata. A equação linear

resultante da curva padrão foi usada para determinar o número de cópias de material genético viral nas amostras de águas residuais.

Em ambos os artigos, as reações de qPCR foram singleplex e não diferenciavam o sorotipo das cepas virais.

3.8 Comparação dos Dados Moleculares e Clínicos

Para ambos os artigos, os dados moleculares resultantes da detecção do RNA viral por meio da técnica de RT-qPCR foram confrontados com os dados clínicos relacionados ao COVID-19 e às arboviroses. Esses dados clínicos foram obtidos dos boletins epidemiológicos divulgados pela Secretaria Municipal de Saúde de Goiânia, (disponíveis em <https://www.saude.go.gov.br/coronavirus/boletins-epidemiologicos> e <https://saude.goiania.go.gov.br/informe-dengue-chikungunya-zika-e-microcefalia/informe-dengue-2023/>).

3.9 Análises Estatísticas e Desenvolvimento do Web Aplicativo

As análises estatísticas, tais como gráficos e correlações, foram realizadas por meio de códigos de programação utilizando linguagem Python e suas bibliotecas disponíveis. Para disseminar ainda mais nossos dados, foi desenvolvido um aplicativo web, também por meio de programação em Python para automatizar a predição de pessoas infectadas a partir da carga viral detectada nas amostras de água residuária. Foi utilizado simulação Monte Carlo para diminuir as incertezas das variáveis.

É importante ressaltar que o aplicativo web foi desenvolvido inicialmente no artigo 1, para automatizar a predição de indivíduos infectados por SARS-CoV-2 a partir das amostras de águas residuais. No entanto, conforme o trabalho se desenvolveu na detecção e monitoramento de arboviroses (artigo 2), foi oportuno realizar a extensão do aplicativo para também automatizar a predição de arboviroses, de acordo com as variáveis intrínsecas para cada arbovirose, também utilizando as ferramentas estatísticas necessárias (simulação Monte Carlo) para diminuir as incertezas das variáveis.

4 RESULTADOS

4.1 Artigo Científico 1

“pySewage”: a hybrid approach to predict the number of SARS-CoV-2-infected people from wastewater in Brazil

Adriano Roberto Vieira de Sousa¹ · Lívia do Carmo Silva¹ · Juliana Santana de Curcio¹ · Hugo Delleon da Silva^{1,2} · Carlos Eduardo Anunciação³ · Silvia Maria Salem Izacc¹ · Flavio Olimpio Sanches Neto⁴ · Elisângela de Paula Silveira Lacerda¹

¹ Department of Genetics, Institute of Biological Sciences, Federal University of Goiás, Goiânia, Brazil

² Universitary Center of Goiás (UNIGOIÁS), Goiânia, Goiás, Brazil

³ Department of Biochemistry and Molecular Biology, Institute of Biological Sciences, Federal University of Goiás, Goiânia, Brazil

⁴ Institute of Chemistry, University of Brasília, Brasília, Brazil

Periódico: Environmental Science and Pollution Research

Fator de Impacto: 5.190

Status: Publicado

<https://doi.org/10.1007/s11356-022-20609-z>



“pySewage”: a hybrid approach to predict the number of SARS-CoV-2-infected people from wastewater in Brazil

Adriano Roberto Vieira de Sousa¹ · Lívia do Carmo Silva¹ · Juliana Santana de Curcio¹ · Hugo Delleon da Silva^{1,2} · Carlos Eduardo Anunciação³ · Sílvia Maria Salem Izacc¹ · Flavio Olimpio Sanches Neto⁴ · Elisângela de Paula Silveira Lacerda¹

Received: 27 December 2021 / Accepted: 30 April 2022 / Published online: 6 May 2022
© The Author(s), under exclusive licence to Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2022

Abstract

It is well known that the new coronavirus pandemic has global environmental, public health, and economic implications. In this sense, this study aims to monitor SARS-CoV-2 in the largest wastewater treatment plant of Goiânia, which processes wastewater from more than 700,000 inhabitants, and to correlate the molecular and clinical data collected. Influent and effluent samples were collected at Dr. Helio de Seixo Britto's wastewater treatment plant from January to August 2021. Viral concentration was performed with polyethylene glycol before viral RNA extraction. Real-time qPCR (N1 and N2 gene assays) was performed to detect and quantify the viral RNA present in the samples. The results showed that 43.63% of the samples were positive. There is no significant difference between the detection of primers N1 (mean 3.23 log₁₀ genome copies/L, std 0.23) and N2 (mean 2.95 log₁₀ genome copies/L, std 0.29); also, there is no significant difference between the detection of influent and effluent samples. Our molecular data revealed a positive correlation with clinical data, and infection prevalence was higher than clinical data. In addition, we developed a user-friendly web application to predict the number of infected people based on the detection of viral load present in wastewater samples and may be applied as a public policy strategy for monitoring ongoing outbreaks.

Keywords COVID-19 · Web application · Coronavirus · SARS-CoV-2 · Wastewater-based epidemiology · Surveillance

Introduction

In December 2019, a cluster of patients with pneumonia symptoms was observed in Wuhan, Hubei, China. After further investigation, the outbreak was identified as coronavirus disease (COVID-19) caused by severe acute

respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) (Dong et al. 2020; Graham Carlos et al. 2020). The rapid global spread of SARS-CoV-2 led the World Health Organization to classify COVID-19 as a pandemic in March 2020 (World Health Organization 2020). The current COVID-19 outbreak has become a serious threat to human health around the world (Liu et al. 2020).

In the early days of the pandemic, nonpharmaceutical measures (NPIs) such as isolation through quarantine, social distancing, wearing face masks, and travel restrictions were implemented in many countries to contain the peak of COVID-19 infection (Coccia 2020a; Bo et al. 2021). These measures have had a positive impact on the natural environment, as many sources of pollution have been reduced or eliminated (Elsaid et al. 2021), and transmission of COVID-19 within the local population has also decreased (Flaxman et al. 2020; Huang et al. 2021). However, some NPIs, such as prolonged lockdown, could have negative impacts on many aspects of life, including psychological, social, and economic consequences (Brooks et al. 2020; Coccia 2021a, b).

Responsible Editor: Lotfi Aleya

✉ Adriano Roberto Vieira de Sousa
adrianoarvs@gmail.com

- ¹ Department of Genetics, Institute of Biological Sciences, Federal University of Goiás, Goiânia, Brazil
- ² University Center of Goiás (UNIGOIÁS), Goiânia, Goiás, Brazil
- ³ Department of Biochemistry and Molecular Biology, Institute of Biological Sciences, Federal University of Goiás, Goiânia, Brazil
- ⁴ Institute of Chemistry, University of Brasília, Brasília, Brazil

On the other hand, the transmission dynamics and diffusion of SARS-CoV-2 appear to be a complex relationship between climate, environment, and social aspects (Coccia 2020a, b, 2021a). Cities with high levels of air pollution combined with low production of renewable wind energy may have accelerated the spread of COVID-19, especially in people with concomitant diseases such as heart disease, chronic obstructive pulmonary disease, and lung cancer (Amoatey et al. 2020; Coccia 2020a, b, 2021a, c). Gross domestic product (GDP) per capita, health expenditures, population mobility, and social interactions are also factors that can contribute to the spread and mortality of COVID-19 (Bontempi et al. 2020; Coccia 2021d).

SARS-CoV-2 is readily transmitted from human-to-human through contact with aerosols, droplets, and fomites from infected individuals (He et al. 2020; Meyerowitz et al. 2021). However, active viral replication in the gut and detection of SARS in intestinal samples have been reported, even when some patients did not have any gastrointestinal symptoms (Zuo et al. 2021). Released SARS-CoV-2 viral particles are rapidly inactivated in gastrointestinal fluid (Larsen and Wigginton 2020). There is evidence of cell tropism of SARS-CoV-2 in multiple organs, not only in the lung but also in the small intestine, pancreas, blood vessels, and other tissues (Liu et al. 2021). Moreover, SARS-CoV-2 was detected in stool samples over a longer time, namely after 5 weeks, whereas it was undetectable in respiratory swab samples (Wu et al. 2020b), indicating possible contamination via the fecal–oral route (Heller et al. 2020; Guo et al. 2021).

Hence, epidemiological monitoring should be prioritized by surveillance services in the context of the pandemic, as it allows a better knowledge of the current epidemiological scenario (Peccia et al. 2020). Concentrations of SARS-CoV-2 RNA in wastewater samples can be correlated with reported COVID-19 cases and predict the outcomes of community clinical trials, sometimes 6 to 14 days before the onset of symptoms (Peccia et al. 2020; Cervantes-Avilés et al. 2021; Kumar et al. 2021a; Barua et al. 2022). One strategy that has been used is mass testing, but this strategy is costly and not feasible for low-income countries, even with existing adaptations such as the use of sample pools (Brault et al. 2021). Thus, cost-effective alternatives that can help with epidemiological monitoring and community surveillance are needed.

Wastewater-based epidemiology (WEB) is a population-wide potential tool for monitoring the chemical or microbiological profile of a community. This methodology allows assembly inferences about infected asymptomatic and symptomatic individuals by assessing the viral load in wastewater in a given population (Bivins et al. 2020; Hewitt et al. 2022). Also, it allows the collection of data from people who lack access to health care and provides health authorities with real-time monitoring of outbreaks (Larsen and Wigginton 2020).

Furthermore, this approach has been supported by several studies on COVID-19 epidemiological control; Ahmed et al. (2021) estimated the average number of infected individuals in Australia to range from 171 to 1090, which was consistent with clinical observations. In Brazil, Claro et al. (2021) observed for 44 weeks at five different sites. The prevalence of infection ranged from 0.05 to 0.38%, showing a positive correlation with clinical observations. Other studies detected SARS-CoV-2 viral RNA in wastewater in India (Arora et al. 2020), Germany (Westhaus et al. 2021), the USA (Wu et al. 2021; Barua et al. 2022), Croatia (Brnić et al. 2022), and the United Arab Emirates (Hasan et al. 2021).

Since the beginning of the pandemic, an avalanche of molecular data has been produced worldwide, making the development of data science and bioinformatics protocols essential (Mercatelli et al. 2021b). Once new data is daily produced, computational tools may accelerate the monitoring of infected people around the world (Hufsky et al. 2021), although several web tools have been developed for analysis regarding SARS-CoV-2 (Mercatelli et al. 2021a).

Bioinformatics tools play an important role in monitoring SARS-CoV-2 and provide non-computational users with the possibility to analyze data and advanced knowledge related to COVID-19 (Hufsky et al. 2021). This is probably part of the reason that although several studies have been conducted to monitor SARS-CoV-2, and estimate the number of infected people from wastewater samples, they are mostly used by a small group of researchers (Sanches-Neto et al. 2021). Therefore, in addition to studies of SARS-CoV-2 monitoring by experimental techniques such as RT-qPCR and genomic sequencing, it is extremely important to develop web applications to automate the SARS-CoV-2 detection combined with COVID-19 monitoring (Pérez-Cataluña et al. 2022). Moreover, the use of our web application can provide early prediction in wastewater, potentially identifying new variants for recurrent outbreaks (Peterson et al. 2022; Wurtzer et al. 2022).

Nevertheless, to the best of our knowledge, there are no web applications regarding the monitoring of the number of people infected with SARS-CoV-2 from the viral load detected in wastewater. Thus, the focus of this work aimed to monitor the SARS-CoV-2 viral load in wastewater samples in a large community in Brazil-Midwest combined with the development of a user-friendly web application to predict the number of infected people.

Materials and methods

Sample and data

A total of 55 wastewater samples were collected from January to August 2021 (30 weeks) at Dr Hédio Seixo

de Britto's wastewater treatment plant (WWTP) located in Goiânia, Goiás, Brazil (latitude – 16.6799, longitude – 49.255 16° 40' 48" South, 49° 15' 18" West). A total of 200 mL of influent and effluent samples was collected between 2 and 3 pm (BRT – Brazilian time zone, – 03:00 UTC) in sterile bottles using the grab sample method, transported on wet ice to the testing laboratory within 15 min, and frozen at – 80 °C until the samples were processed for virus concentration. The WWTP serves about 57.51% of the population of Goiânia (over 700,000 people) and its treatment consists of chemically enhanced primary treatment with a maximum capacity for sewage treatment of 2300L/s⁻¹ T (Fig. 1).

Virus concentration

Viral concentration was performed according to Fongaro et al. (2021), and 50 mL of influent and effluent were processed. The pH of the sample was adjusted to 3.5 using HCl 1 M (Sigma-Aldrich, MO, USA). Samples were then shaken at 4 °C for 30 min and centrifuged at 2474 g at 4 °C for 30 min. The supernatant was discarded and the pellet was resuspended with 25 mL of glycine–NaOH (0.25 M) buffer, pH 9.5, shaken for 30 min at 4 °C, and centrifuge at 2474 g at 4 °C for 60 min. The supernatant was homogenized with 4 mL polyethylene glycol 24% PEG 6000 (Sigma-Aldrich, MO, USA) by shaking for 120 min at 4 °C and then centrifuged for 180 min at 2474 g at 4 °C. The supernatant was discarded and the pellet formed was eluted with 1 mL

of phosphate-buffered saline (PBS 1x—137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, and 1.8 mM KH₂PO₄, pH 7.0). Samples were stored at – 80 °C until RNA extraction. To evaluate the viral concentration protocol, samples were spiked with a double-stranded DNA control cloned into a plasmid containing the complete nucleocapsid gene sequence of the 2019-nCoV virus containing the two regions analyzed with the 2019-nCoV RUO N1 and N2 kit (IDT, Integrated and Technologies).

Viral RNA extraction

SARS-CoV-2 RNA was extracted from 100 µL of the samples using the MagMAX™ Viral/Pathogen Nucleic Acid Isolation Kit (Thermo Fisher Scientific, MA, USA) according to the manufacturer's protocol. The extracted nucleic acid was stored at – 80 °C until additional downstream analysis.

RT-qPCR analysis

The different regions of the SARS-CoV-2 nucleocapsid gene were detected by RT-qPCR using two primers pairs—N1 and N2 (IDT, IA, USA) and according to the recommendations of the Centers for Disease Control and Prevention protocols (<https://www.fda.gov/media/134922/download>) and GoTaq® Probe 1-Step RT-qPCR System (Promega, WI, USA). The total reaction volume was 20 µL (10 µL GoTaq Probe qPCR Master Mix, 0.4 µL Go Script RT Mix for 1-Step RT-qPCR, 3.6 µL

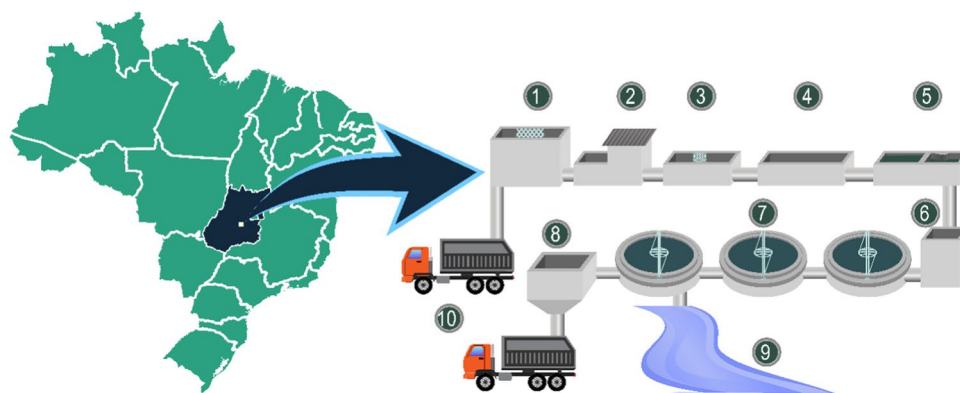


Fig. 1 Dr. Hélio Seixo de Britto's wastewater treatment plant (WWTP), located in Goiânia, Goiás, Brazil (16° 37'59" S 49° 15' 44" W). The effluent reaches WWTP by gravity starting the preliminary treatment by removing coarse solids in the coarse grid (1) and by discharge from a lifting station (2). The raw sewage goes to a new mechanized cleaning in the grids (3), followed by sandpits with three sand traps (4). At the exit of the sand trap, the coagulant is added, and later in the parshall gutter (5), the flow measurement is measured by an ultrasonic meter, and then the anionic polymer is added. Subsequently, the effluent reaches the distribution box (6) and is dis-

tributed to three primary decanters (7). The primary sludge present in the storage tank is repressed for the mechanical dehydration process, which occurs by centrifugation (8). The treated primary effluent is discharged directly into the river (9). The dry sludge is mechanically mixed with CaO, in order to stabilize it (pH 12) and improve its characteristics of manipulation. After this step, the sludge is transported to the landfill for the recovery of areas degraded (10). The influent and effluent samples were collected after the 3 and 7 steps, respectively

Table 1 SARS-CoV-2 viral RNA concentration of the N1 and N2 gene assays

Country	City, state, or region	Primer	$\log_{10}$ RNA Concentration GC/L			% of positive samples	Sample type	Reference
			Mean $\pm$ SD	Minimum	Maximum			
Brazil	Goiania, Goiás	N1	3.28 $\pm$ 0.27	2.73	3.73	43.3%	Influent/effluent	This study
		N2	3.30 $\pm$ 0.72	2.69	5.47	40%		
Ecuador	Quito	N1	N.A	5.46	6.50	N.A	Urban streams	(Guerrero-Latorre et al. 2020)
		N2	N.A	5.31	6.34	N.A		
Australia	Brisbane, Queensland	N1	N.A	3.13	5.07	48.4%	Wastewater, WWTP C	(Ahmed et al. 2021)
		N2	N.A	N.D	N.D	N.D		
Brazil	ABC, São Paulo	N1	5.1 $\pm$ 1.0	2.7	7.1	53%	Wastewater	(Claro et al. 2021)
		N2	5.5 $\pm$ 1.3	2.8	7.0	34%		
Spain	Region of Mujica	N1	5.1 $\pm$ 0.3	N.A	N.A	71.4%	Influent	(Randazzo et al. 2020)
		N2	5.5 $\pm$ 0.2	N.A	N.A	42.8%		
USA	Southern Louisiana	N1	N.A	3.87	N.A	N.A	Influent	(Sherchan et al. 2020)
		N2	N.A	3.63	N.A	N.A		
Brazil	Florianópolis, Santa Catarina	N1	5.83 $\pm$ 0.12	5.49	6.68	N.A	Influent	(Fongaro et al. 2021)
		N2	N.A	N.A	N.A	N.A		

GC/L, genomic copies per liters; N.A, data not available; WWTP, wastewater treatment plant

nuclease-free water, 1.0 primer/probe, and 5.0 μ L of RNA). Nuclease-Free Water for Molecular Biology (Sigma-Aldrich) was used as a negative control. The RT-qPCR was performed using the AriaMX Real-Time PCR System (Agilent, CA, USA). The amplification program consisted of one cycle at 45 °C for 15 min for reverse transcription, one cycle at 95 °C for 2 min for denaturation of reverse transcriptase and activation of DNA polymerase, followed by 45 cycles at 95 °C for 15 s, and 60 °C for 1 min for denaturation and amplification. We compared the amplification curves in the RT-qPCR reactions with both the commercial 2019-nCoV_N_Positive Control and the biological positive control using AriaMx software. All samples that presented Cq values lower than 40 were considered positive for SARS-CoV-2. This value was determined by the construction of a standard curve. We used a $\log_{10}$ dilution series ranging from 10^5 to 1 copy/reaction. The straight equation generated through the standard curve was used to determine the number of copies of viral genetic material present in samples. All the reactions were performed in triplicate and nuclease-free water was used as a negative control. Viral load (viral gene copies/L of wastewater) was determined by Eq. (1):

Viral Load

$$= \frac{\text{viral genomic copies } \mu\text{L eluted RNA} \cdot 40 \mu\text{L}(\text{total volume of eluted RNA})}{50 \text{mL}(\text{initial volume of concentrated wastewater sample}) \cdot 20} \quad (1)$$

Data analysis and procedures

As reported by Ahmed et al. (2021), the number of infected people (NIP) was estimated as follows Eq. (2):

$$NIP = \frac{VGC \cdot FR}{\alpha \cdot \beta \cdot \gamma} \quad (2)$$

where VGC is viral RNA genomic copies (per liter) of N1 or N2 gene targets detected in wastewater samples; FR is the flow rate of the wastewater treatment plant; α is the viral load shedding in the stool; β is the estimated daily production of stool per capita; and γ is the percentage of infected people shedding viral RNA in the stool. To calculate the flow rate (FR) of the wastewater treatment plant, data were collected and analyzed from health agencies, such as inflow rate, maximum daily inflow rate, and the mean inflow rate, to determine the average flow rate/day/L/s. Moreover, due to the wide variation in parameters such as viral load shedding rate (α), daily stool mass production per capita (β), and percentage of infected individuals shedding SARS-CoV-2 viral RNA in the stool (γ), it is difficult to interpret the infection prediction results. Thus, a Monte Carlo simulation was performed in Eq. 2 using the Python programming language. The viral load shedding rate in the stool (α) was modeled as a uniform distribution with a range of 0.8 to 7.5 $\log_{10} \text{gc} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{feces}^{-1}$ (Ahmed et al. 2021). Daily stool mass production per capita (β) was modeled as a normal distribution with a range of 75 to 520 g/capita/day in low-income countries, as reported by Rose et al. (2015). The percentage

Table 2 Number of infected people and prevalence of infection

EPI week	Year-month	Sample type	$\log_{10}$ RNA concentration GC/L		NIP	Prevalence (%)
			N1	N2		
1	2021-Jan	Effluent	2.81	N.D	2490	0.35
2	2021-Jan	Influent/effluent	3.25	2.47	7995	1.14
3	2021-Jan	Influent/effluent	3.21	3.19	12,256	1.75
4	2021-Jan	Influent/effluent	N.D	N.D	-	-
5	2021-Jan	N.A	N.A	N.A	N.A	N.A
6	2021-Feb	Effluent	3.35	N.D	8746	1.25
7	2021-Feb	Influent/effluent	N.D	N.D	-	-
8	2021-Feb	Influent/effluent	3.30	2.86	10,509	1.50
9	2021-Feb	Influent/effluent	3.46	2.69	13,145	1.87
10	2021-March	N.A	N.A	N.A	N.A	N.A
11	2021-March	Influent/effluent	3.11	2.69	6862	0.98
12	2021-March	Influent/effluent	N.D	N.D	-	-
13	2021-March	Influent	N.D	3.56	14,146	2.01
14	2021-April	Influent/effluent	N.D	N.D	-	-
15	2021-April	Influent/effluent	N.D	N.D	-	-
16	2021-April	Influent	N.D	3.41	10,015	1.43
17	2021-April	Effluent	3.14	N.D	5296	0.75
18	2021-May	Influent	3.30	N.D	7675	1.09
19	2021-May	Influent/effluent	N.D	N.D	-	-
20	2021-May	Influent/effluent	N.D	N.D	-	-
21	2021-May	Effluent	N.D	3.50	12,368	1.76
22	2021-May	N.A	N.A	N.A	N.A	N.A
23	2021-June	Effluent	N.D	2.92	3250	0.46
24	2021-June	Influent/effluent	3.71	3.43	30,147	4.29
25	2021-June	Influent	3.72	N.D	20,418	2.91
26	2021-June	Influent/effluent	N.D	N.D	-	-
27	2021-July	Influent	3.29	3.17	13,307	1.90
28	2021-July	Influent/effluent	N.D	N.D	-	-
29	2021-July	Influent	N.D	2.72	2051	0.29
30	2021-July	Influent/effluent	N.D	N.D	-	-
31	2021-Aug	Influent/effluent	N.D	N.D	-	-
32	2021-Aug	Effluent	3.24	N.D	6753	0.96
33	2021-Aug	Influent/effluent	N.D	N.D	-	-

EPI, epidemiological; GC/L, genomic copies per liters; NIP, number of infected people; N.D, not detected; N.A, data not available

of infected people shedding SARS-CoV-2 viral RNA in the stool (γ) was modeled with uniform distribution with a range of 30–90% (Ahmed et al. 2021).

COVID-19 surveillance data, such as the number of new confirmed cases, number of intensive care unit hospitalizations (ICU), and number of deaths, were obtained from the Goiânia Health Agencies database (available at <https://saude.goiania.go.gov.br/goiania-contra-o-coronavirus/informe-epidemiologico-covid-19/>) to compare clinical data and SARS-CoV-2 viral load detected in wastewater. According to the Goiânia Health Agencies database, the

prevalence of confirmed cases is 289.69 cases per 100 thousand inhabitants.

Results and discussion

SARS-CoV-2 RNA detection in wastewater samples

In this study, the presence of SARS-CoV-2 RNA in sewage was analyzed using probes directed to the regions of SARS-CoV-2 N (N1 and N2 gene assays), and the quantification

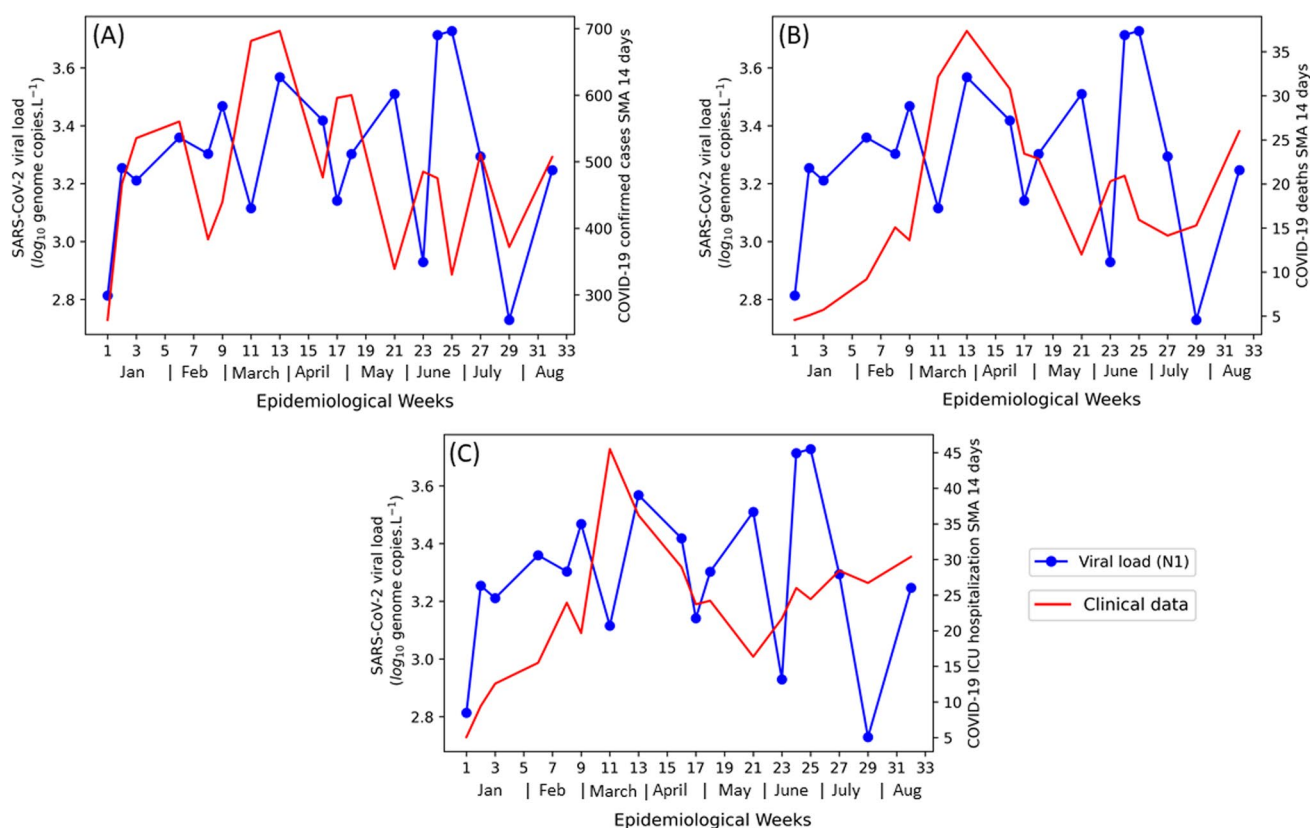


Fig. 2 Correlation between detection of RNA of SARS-CoV-2 in wastewater and clinical case of COVID-19. **A** SARS-CoV-2 viral load correlated with clinical data (confirmed cases). **B** SARS-CoV-2

viral load correlated with clinical data (deaths). **C** SARS-CoV-2 viral load correlated with clinical data (ICU hospitalizations)

cycle (Cq) values obtained in RT-qPCR were considered positive below 40. A total of 55 samples (30 weeks) were analyzed, among them, 24 (43.6%) showed positive for the occurrence of RNA of SARS-CoV-2. N1 gene assay was detected in 43.3% of the samples (13/30 weeks), while N2 gene assay was detected in 40% (12/30 weeks). The percentage of positive samples here is similar to other studies. Prado et al. (2020, 2021) and Ahmed et al. (2021) presented 41.6% and 48.4% of positivity in their samples, respectively. We found a viral load ranging from 2.73 to 3.73 log₁₀ for N1 gene assay, and 2.69 to 5.47 log₁₀ for N2 gene assay. Wastewater epidemiology is a useful public health tool to understand the dissemination of COVID-19 in a community from SARS-CoV-2 RNA quantification (Orive et al. 2020).

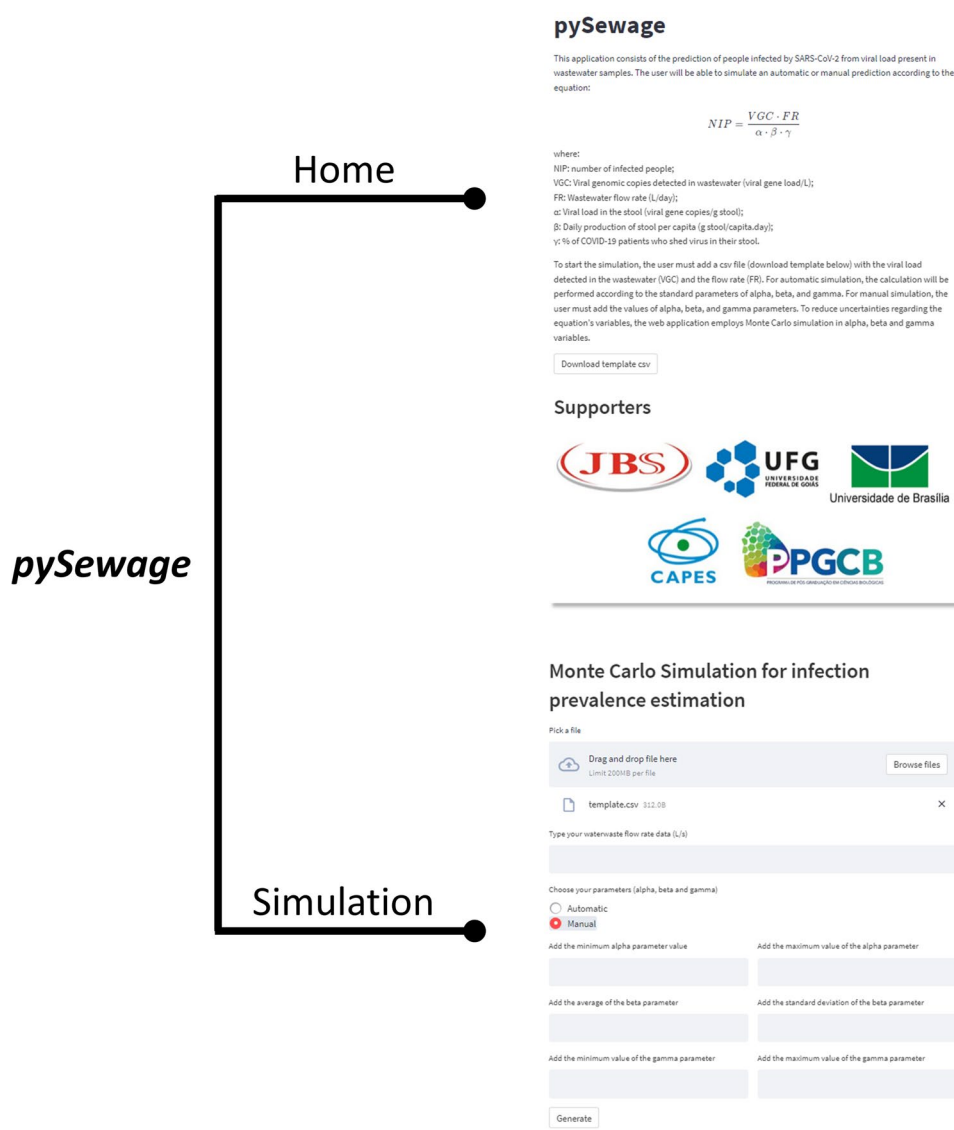
Table 1 shows some different results regarding the RNA concentration. This detection difference is consistent with what is reported in the literature (Guerrero-Latorre et al. 2020; Randazzo et al. 2020; Ahmed et al. 2021; Claro et al. 2021), and it is suggested to be related to the analytical sensitivity of gene assays (Randazzo et al. 2020). Additionally, PCR assays can be affected by potential inhibitors present in sewage (Kitajima et al. 2020), especially those WWTP that receive clandestine sewage. The wastewater-based

epidemiology could vary depending on laboratory resources, as there is no gold standard methodology leading to differences in viral load in the sample's positivity (Sherchan et al. 2021), suggesting that a widely standardized methodology would be required (Kaya et al. 2022).

Kumar et al. (2021a, b) evaluated the efficacy of three gene assays: N-genes (nucleocapsid), S-genes (spike glycoprotein), and ORF-1ab genes (polyprotein) before and after the treatment. N genes showed to be more stable after the treatment when compared to S genes and ORF 1ab genes. It is due to these genes being protected in SARS-CoV-2 structures, and they are common genes among the family *Coronaviridae* (Kumar et al. 2021b).

There is no significant difference between N1 and N2 gene assays in both influent (raw sewage) and final effluent (treated sewage) sites (considering p -value < 0.05). The occurrence of positive samples in treated wastewater suggests that the treatment employed by the WWTP is not able to completely remove the virus as reported by Randazzo et al. (2020). Furthermore, discriminating between infectious and non-infectious viral particles in treated wastewater using RT-qPCR techniques is promising for further outbreaks (Monteiro et al. 2022).

Fig. 3 Web main screen of the pySewage user view



Correlation between the prevalence of reported cases of COVID-19 and predicted numbers of infected

The number of infected people was estimated from wastewater data. Although there are limitations to the data, studies have suggested that wastewater parameters should be performed via Monte Carlo (Ahmed et al. 2021; Claro et al. 2021; Hasan et al. 2021). The estimation of the possible number of infected people was performed via Monte Carlo simulation with 50,000 random samples of each parameter of Eq. 1. According to Eq. 1, the number of infected people by SARS-CoV-2 in this study ranged from 2490 to 30,147 people, with a minimum and maximum prevalence of 0.35, and 4.29%, respectively (Table 2). Ahmed et al. (2021) found a range of 122–1090 infected people. Wu et al. (2020a, b) have found a prevalence ranging from 0.1 to 5%, higher than the

clinical cases (0.026), in MA, USA. Claro et al. (2021) have found a prevalence in the ABC region (point 4—São Paulo state) ranging from 0.1 to 4.39. There are some factors to be considered in estimating the prevalence of infected people. First, there is no consensus in the scientific community about the timeframe of SARS-CoV-2 shedding in the stool; there are no standardized protocols for wastewater-based epidemiology, especially in viral concentration step; and little is known about the loss of viral particles in sewage and experimental procedures (Wu et al. 2020a). Although surveillance in wastewater is an important tool for monitoring pathogens that are circulating in the communities, further studies are needed to construct robust models of prevalence. Additionally, it is important to note that the accuracy and significance of the estimate performed depend on several parameters due to the large uncertainties and variability associated with the relevant SARS-CoV-2 data.

The matrices of WWTP are complex compositions. Several kinds of chemicals (organic and inorganic) and biological compounds may affect the integrity of the viral RNA molecule. The WWTP analyzed in that study not only receive domestic sewage but also industrialized sewage. RNA extraction steps need to be carefully performed with attention to some compounds such as glove powder, salts, and detergent molecules that act as PCR inhibitors. Moreover, there is no standardized RNA extraction protocol from influent wastewater which presents a complex matrix of compounds (Michael-kordatou et al. 2020; Claro et al. 2021).

SARS-CoV-2 viral load detected in wastewater was correlated with clinical cases (Fig. 2). The clinical cases (confirmed cases, deaths, and intense care unit—ICU hospitalizations) were measured as a simple moving average (SMA) of 14 days. The SARS-CoV-2 viral load has a peak of RNA detection in the upper respiratory tract within the first week after symptom onset. In stool samples, it can be detected, with high viral loads, after 2 and up to 4 weeks from the onset of symptoms (Cevik et al. 2021; Guo et al. 2021).

In the 25th epidemiological week (Fig. 2A), corresponding to the period between July 20 and 26, we observed a lower peak in clinical data (confirmed cases) with a high detected viral load. We suggest that the mass vaccination programs in Brazil may have led to a decrease in COVID-19 confirmed cases once there is evidence that vaccination reduces SARS-CoV-2 shedding rates (Levine-tiefenbrun et al. 2021; Li et al. 2022). From a public-health perspective, Coccia (2022) states that an effective policy to maximize vaccination reduces COVID-19 pandemic threats, which is consistent with our findings.

pySewage

To perform WBE detections, it is necessary to have expertise in molecular biology, in handling suitable laboratory equipment, and it is also time-consuming. In this context, the development of a web application becomes advantageous in analyzing large amounts of real-time data of infected people. We propose the use of an application tool based on python language—pySewage (Fig. 3). It targets health authorities and the academic community in dealing with large amounts of data, like those produced by WBE surveillance. In addition, pySewage can be utilized as a decentralized monitoring tool to assist health authorities with the spatial distribution and prevalence of infections (Mota et al. 2021). It can be accessed from www.pysewage.com.br. To the best of our knowledge, this is the first free-web application that estimates the number of people infected by SARS-CoV-2. Figure 3 shows a screenshot of the pySewage user view.

On the main page of the web application, the user can choose between two options: (i) Home and (ii) Simulation. If “Home” is chosen, a description of the pySewage application will be displayed. If the option “Simulation” is chosen, a page will be displayed for the user to estimate the prevalence of infection using Monte Carlo simulation due to the uncertainty of the variables (see Eq. 2). On the Simulation interface, the user can choose either “automatic or manual simulation.” For both cases, the user must add genomic copies per liter of sewage (excel format), and wastewater flow rate input (liters per second per day). However, the user can change some variables such as α , β , and γ (see Eq. 2) when manual mode is selected.

Conclusion

This study detected SARS-CoV-2 in the biggest wastewater treatment plant in a large city in the Midwest region of Brazil from January to August 2021. SARS-CoV-2 was detected in 43.63% of the samples. A correlation was observed between the clinical data and the viral load detected in this study. The main limitations of this work were the lack of viral concentration standardization in the scientific literature and the manifold factors associated with the uncertainty of the prevalence prediction variables. However, the viral concentration was performed with polyethylene glycol and extracted with commercial RNA kits. Moreover, to estimate the number of infected people, we performed a Monte Carlo simulation with 95% confidence intervals in the simulated variables to deal with uncertainty. To disseminate our results, we developed a user-friendly web application for the automatic prediction of the number of infected people. Therefore, the use of the web application combined with the WBE methodology for the detection of SARS-CoV-2 becomes an essential tool for epidemiological management and may be applied as a public policy strategy for monitoring ongoing outbreaks. Several factors regarding the viral pathogens outbreaks are related to complex interactions between humans and the environment. Additionally, the environmental climate changes affect not only human chronic diseases but also infectious diseases. Thus, to further disseminate the use of our results, the future perspectives of this investigation should include arboviruses monitoring, such as DENV, CHIKV, and ZIKV, once tropical countries are endemic to these viruses.

Supplementary Information The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1007/s11356-022-20609-z>.

Acknowledgements We are grateful to Dr. Gislaine Fongaro for the experimental support of the viral concentration protocol and SANEAGO wastewater treatment plant for the collaboration.

Author contribution Adriano Roberto Vieira de Sousa contributed to conceptualization, methodology, validation, formal analysis, writing—original draft, writing—review and editing, investigation, and data curation. Lívia do Carmo Silva contributed to methodology, investigation, data curation, and writing—review and editing. Juliana Santana de Curcio contributed to methodology, investigation, data curation, and writing—review and editing. Hugo Delleon contributed to conceptualization, methodology, investigation, writing—review and editing, and funding acquisition. Carlos Eduardo Anunciação contributed to conceptualization, methodology, and investigation. Silvia Maria Salem Izacc contributed to methodology. Flavio Olimpio Sanches Neto contributed to formal analysis, data curation, and writing—review and editing. Elisângela de Paula Silveira Lacerda contributed to conceptualization, methodology, validation, formal analysis, writing—original draft, writing—review and editing, investigation, data curation, supervision, project administration, and funding acquisition.

Funding This work was performed at Universidade Federal de Goiás supported by CAPES, JBS-Swift Foods Company – PI04742-2020, and by Academic Cooperation Program in National Defense (PROCAD) – 88887.387750/2019–00.

Data availability The datasets used and/or analyzed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

Declarations

Ethics approval and consent to participate Not applicable.

Consent for publication Not applicable.

Conflict of interest The authors declare no competing interests.

References

- Ahmed W, Tschärke B, Bertsch PM et al (2021) SARS-CoV-2 RNA monitoring in wastewater as a potential early warning system for COVID-19 transmission in the community: a temporal case study. *Sci Total Environ* 761:144216
- Amoatey P, Sicard P, De Marco A, Khaniabadi YO (2020) Long-term exposure to ambient PM_{2.5} and impacts on health in Rome. *Italy Clin Epidemiol Glob Heal* 8:531–535
- Arora S, Nag A, Sethi J et al (2020) Sewage surveillance for the presence of SARS-CoV-2 genome as a useful wastewater based epidemiology (WBE) tracking tool in India. *Water Sci Technol* 82:2823–2836
- Barua VB, Juel MAI, Blackwood AD et al (2022) Tracking the temporal variation of COVID-19 surges through wastewater-based epidemiology during the peak of the pandemic: a six-month long study in Charlotte. *North Carolina Sci Total Environ* 814:152503
- Bivins A, North D, Ahmad A et al (2020) Wastewater-based epidemiology: global collaborative to maximize contributions in the fight against COVID-19. *Environ Sci Technol* 54:7754–7757
- Bo Y, Guo C, Lin C et al (2021) Effectiveness of non-pharmaceutical interventions on COVID-19 transmission in 190 countries from 23 January to 13 April 2020. *Int J Infect Dis* 102:247–253
- Bontempi E, Vergalli S, Squazzoni F (2020) Understanding COVID-19 diffusion requires an interdisciplinary, multi-dimensional approach. *Environ Res* 188:109814
- Brault V, Mallein, Rupprecht JF (2021) Group testing as a strategy for COVID-19 epidemiological monitoring and community surveillance. *PLoS Comput Biol* 17:1–25
- Brnić D, Lojkić I, Škoko I et al (2022) SARS-CoV-2 circulation in Croatian wastewaters and the absence of SARS-CoV-2 in bivalve molluscan shellfish. *Environ Res* 207:112638
- Brooks SK, Webster RK, Smith LE et al (2020) The psychological impact of quarantine and how to reduce it: rapid review of the evidence. *Lancet* 395:912–920
- Cervantes-Avilés P, Moreno-Andrade I, Carrillo-Reyes J (2021) Approaches applied to detect SARS-CoV-2 in wastewater and perspectives post-COVID-19. *J Water Process Eng* 40:10
- Cevik M, Tate M, Lloyd O et al (2021) SARS-CoV-2, SARS-CoV, and MERS-CoV viral load dynamics, duration of viral shedding, and infectiousness: a systematic review and meta-analysis. *The Lancet Microbe* 2:e13–e22
- Claro ICM, Cabral AD, Augusto MR et al (2021) Long-term monitoring of SARS-COV-2 RNA in wastewater in Brazil: A more responsive and economical approach. *Water Res* 203:117534
- Coccia M (2020) How (Un)sustainable environments are related to the diffusion of covid-19: the relation between coronavirus disease 2019, air pollution, wind resource and energy. *Sustain* 12:1–12
- Coccia M (2020) Factors determining the diffusion of COVID-19 and suggested strategy to prevent future accelerated viral infectivity similar to COVID. *Sci Total Environ* 729:138474
- Coccia M (2021) Pandemic prevention: lessons from COVID-19. *Encyclopedia* 1:433–444
- Coccia M (2021) The relation between length of lockdown, numbers of infected people and deaths of Covid-19, and economic growth of countries: lessons learned to cope with future pandemics similar to Covid-19 and to constrain the deterioration of economic system. *Sci Total Environ* 775:145801
- Coccia M (2021) Effects of the spread of COVID-19 on public health of polluted cities: results of the first wave for explaining the déjà vu in the second wave of COVID-19 pandemic and epidemics of future vital agents. *Environ Sci Pollut Res* 28:19147–19154
- Coccia M (2021) High health expenditures and low exposure of population to air pollution as critical factors that can reduce fatality rate in COVID-19 pandemic crisis: a global analysis. *Environ Res* 199:111339
- Coccia M (2022) Preparedness of countries to face COVID-19 pandemic crisis: strategic positioning and factors supporting effective strategies of prevention of pandemic threats. *Environ Res* 203:111678
- Dong E, Du H, Gardner L (2020) An interactive web-based dashboard to track COVID-19 in real time. *Lancet Infect Dis* 20:533–534
- Elsaid K, Olabi V, Sayed ET et al (2021) Effects of COVID-19 on the environment: an overview on air, water, wastewater, and solid waste. *J Environ Manage* 292:112694
- Flaxman S, Mishra S, Gandy A et al (2020) Estimating the effects of non-pharmaceutical interventions on COVID-19 in Europe. *Nature* 584:257–261
- Fongaro G, Hermes P, Sobral D et al (2021) The presence of SARS-CoV-2 RNA in human sewage in Santa Catarina, Brazil, November 2019. *Sci Total Environ* 778:146198
- Graham Carlos W, Dela Cruz CS, Cao B et al (2020) Novel Wuhan (2019-NCov) coronavirus. *Am J Respir Crit Care Med* 201:P7–P8
- Guerrero-Latorre L, Ballesteros I, Villacrés-Granda I et al (2020) SARS-CoV-2 in river water: implications in low sanitation countries. *Sci Total Environ* 743:0–4
- Guo M, Tao W, Flavell RA, Zhu S (2021) Potential intestinal infection and faecal–oral transmission of SARS-CoV-2. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 18:269–283
- Hasan SW, Ibrahim Y, Daou M et al (2021) Detection and quantification of SARS-CoV-2 RNA in wastewater and treated effluents:

- surveillance of COVID-19 epidemic in the United Arab Emirates. *Sci Total Environ* 764:142929
- He X, Lau EHY, Wu P et al (2020) Temporal dynamics in viral shedding and transmissibility of COVID-19. *Nat Med* 26:672–675
- Heller L, Mota CR, Greco DB (2020) COVID-19 faecal-oral transmission: are we asking the right questions? *Sci Total Environ* 729:138919
- Hewitt J, Trowsdale S, Armstrong BA et al (2022) Sensitivity of wastewater-based epidemiology for detection of SARS-CoV-2 RNA in a low prevalence setting. *Water Res* 211:118032
- Huang X, Shao X, Xing L et al (2021) The impact of lockdown timing on COVID-19 transmission across US counties. *EclinicalMedicine* 38:101035
- Hufsky F, Lamkiewicz K, Almeida A et al (2021) Computational strategies to combat COVID-19: useful tools to accelerate SARS-CoV-2 and coronavirus research. *Brief Bioinform* 22:642–663
- Kaya D, Niemeier D, Ahmed W, Kjellerup BV (2022) Evaluation of multiple analytical methods for SARS-CoV-2 surveillance in wastewater samples. *Sci Total Environ* 808:152033
- Kitajima M, Ahmed W, Bibby K et al (2020) SARS-CoV-2 in wastewater: State of the knowledge and research needs. *Sci Total Environ* 739:139076
- Kumar M, Joshi M, Patel AK, Joshi CG (2021) Unravelling the early warning capability of wastewater surveillance for COVID-19: a temporal study on SARS-CoV-2 RNA detection and need for the escalation. *Environ Res* 196:110946
- Kumar M, Kuroda K, Joshi M et al (2021) First comparison of conventional activated sludge versus root-zone treatment for SARS-CoV-2 RNA removal from wastewaters: statistical and temporal significance. *Chem Eng J* 425:130635
- Larsen DA, Wigginton KR (2020) Tracking COVID-19 with wastewater. *Nat Biotechnol* 38:1151–1153
- Levine-tiefenbrun M, Yelin I, Katz R et al (2021) Initial report of decreased SARS-CoV-2 viral load after inoculation with the BNT162b2 vaccine. *Nat Med* 27:790–792
- Li L, Mazurowski L, Dewan A et al (2022) Longitudinal monitoring of SARS-CoV-2 in wastewater using viral genetic markers and the estimation of unconfirmed COVID-19 cases. *Sci Total Environ* 817:152958
- Liu J, Zheng X, Tong Q et al (2020) Overlapping and discrete aspects of the pathology and pathogenesis of the emerging human pathogenic coronaviruses SARS-CoV, MERS-CoV, and 2019-nCoV. *J Med Virol* 92:491–494
- Liu J, Li Y, Liu Q et al (2021) SARS-CoV-2 cell tropism and multi-organ infection. *Cell Discov* 7:2–5
- Mercatelli D, Holding AN, Giorgi FM (2021) Web tools to fight pandemics: the COVID-19 experience. *Brief Bioinform* 22:690–700
- Mercatelli D, Triboli L, Fornasari E et al (2021) Coronapp: a web application to annotate and monitor SARS-CoV-2 mutations. *J Med Virol* 93:3238–3245
- Meyerowitz EA, Richterman A, Gandhi RT, Sax PE (2021) Transmission of SARS-CoV-2: a review of viral, host, and environmental factors. *Ann Intern Med* 174:69–79
- Michael-kordatou I, Karaolia P, Fatta-kassinou D (2020) Sewage analysis as a tool for the COVID-19 pandemic response and management: the urgent need for optimised protocols for SARS-CoV-2 detection and quantification. *J Environ Chem Eng* 8:104306
- Monteiro S, Rente D, Cunha MV et al (2022) Discrimination and surveillance of infectious severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 in wastewater using cell culture and RT-qPCR. *Sci Total Environ* 815:152914
- Mota CR, Bressani-Ribeiro T, Araújo JC et al (2021) Assessing spatial distribution of COVID-19 prevalence in Brazil using decentralised sewage monitoring. *Water Res* 202:117388
- Orive G, Lertxundi U, Barcelo D (2020) Early SARS-CoV-2 outbreak detection by sewage-based epidemiology. *Sci Total Environ* 732:139298
- Peccia J, Zulli A, Brackney DE et al (2020) Measurement of SARS-CoV-2 RNA in wastewater tracks community infection dynamics. *Nat Biotechnol* 38:1164–1167
- Pérez-Cataluña A, Chiner-Oms Á, Cuevas-Ferrando E et al (2022) Spatial and temporal distribution of SARS-CoV-2 diversity circulating in wastewater. *Water Res* 211:118007
- Peterson SW, Lidder R, Daigle J et al (2022) RT-qPCR detection of SARS-CoV-2 mutations S 69–70 del, S N501Y and N D3L associated with variants of concern in Canadian wastewater samples. *Sci Total Environ* 810:151283
- Prado T, Fumian TM, Mannarino CF et al (2020) Preliminary results of SARS-CoV-2 detection in sewerage system in niterói municipality, Rio de Janeiro, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 115:1–3
- Prado T, Fumian TM, Mannarino CF et al (2021) Wastewater-based epidemiology as a useful tool to track SARS-CoV-2 and support public health policies at municipal level in Brazil. *Water Res* 191:116810
- Randazzo W, Truchado P, Cuevas-Ferrando E et al (2020) SARS-CoV-2 RNA in wastewater anticipated COVID-19 occurrence in a low prevalence area. *Water Res* 181:115942
- Rose C, Parker A, Jefferson B, Cartmell E (2015) The characterization of feces and urine: a review of the literature to inform advanced treatment technology. *Crit Rev Environ Sci Technol* 45:1827–1879
- Sanches-Neto FO, Dias-Silva JR, KengQueiroz Junior LH, Carvalho-Silva VH (2021) “pySiRC”: machine learning combined with molecular fingerprints to predict the reaction rate constant of the radical-based oxidation processes of aqueous organic contaminants. *Environ Sci Technol* 55:12437–12448
- Sherchan SP, Shahin S, Ward LM et al (2020) First detection of SARS-CoV-2 RNA in wastewater in North America: a study in Louisiana, USA. *Sci Total Environ* 743:140621
- Sherchan SP, Shahin S, Patel J et al (2021) Occurrence of SARS-CoV-2 RNA in six municipal wastewater treatment plants at the early stage of COVID-19 pandemic in the United States. *Pathogens* 10:798
- Westhaus S, Weber F-A, Schiwy S et al (2021) Detection of SARS-CoV-2 in raw and treated wastewater in Germany – suitability for COVID-19 surveillance and potential transmission risks. *Sci Total Environ* 751:1–12
- World Health Organization (2020) WHO Director-General’s opening remarks at the media briefing on COVID-19 - 11 March 2020. WHO Dir. Gen. speeches 4.
- Wu F, Zhang J, Xiao A et al (2020) SARS-CoV-2 titers in wastewater are higher than expected from clinically confirmed cases. *mSystems* 5:1–9
- Wu Y, Guo C, Tang L et al (2020) Prolonged presence of SARS-CoV-2 viral RNA in faecal samples. *Lancet Gastroenterol Hepatol* 5:1–2
- Wu F, Xiao A, Zhang J et al (2021) Wastewater surveillance of SARS-CoV-2 across 40 US states from February to June 2020. *Water Res* 202:117400
- Wurtzer S, Waldman P, Levert M et al (2022) SARS-CoV-2 genome quantification in wastewaters at regional and city scale allows precise monitoring of the whole outbreaks dynamics and variants spreading in the population. *Sci Total Environ* 810:152213
- Zuo T, Liu Q, Zhang F et al (2021) Depicting SARS-CoV-2 faecal viral activity in association with gut microbiota composition in patients with COVID-19. *Gut* 70:276–284

2.1 Artigo Científico 2

“Arboviruses Wastewater Surveillance in Brazil’s Midwest Region: 2 Extending a Predictive Web Application

Adriano Roberto Vieira de Sousa¹ · Lívia do Carmo Silva¹ · Juliana Santana de Curcio¹ · Luiz Henrique Alves Costa¹ · Carlos Eduardo Anunciação² · Flavio Olimpio Sanches Neto³ · Elisângela de Paula Silveira Lacerda¹

¹ Department of Genetics, Institute of Biological Sciences, Federal University of Goiás, Goiânia, Brazil

² Department of Biochemistry and Molecular Biology, Institute of Biological Sciences, Federal University of Goiás, Goiânia, Brazil

³ Institute of Chemistry, Federal Institute of Goiás, Valparaíso, Goiás, Brazil.

Periódico: Brazilian Journal of Microbiology

Fator de Impacto: 1.9

Status: Submetido

Brazilian Journal of Microbiology

Arboviruses Wastewater Surveillance in Brazil's Midwest Region: Extending a Predictive Web Application --Manuscript Draft--

Manuscript Number:		
Full Title:	Arboviruses Wastewater Surveillance in Brazil's Midwest Region: Extending a Predictive Web Application	
Article Type:	Research Paper	
Section/Category:	Medicine and Public Health	
Funding Information:	JBS International (PI04742-2020)	Dr Elisângela de Paula Silveira Lacerda
Abstract:	Arbovirus infections have global environmental, public health, and economic implications. In this context, this study aims to monitor DENV, ZIKV, and CHIKV in the largest wastewater treatment plant in Goiânia, the capital of Goiás State, which processes wastewater from more than 700,000 inhabitants, and to correlate the molecular and clinical data collected. Wastewater samples were collected at Dr. Helio de Seixo Britto's wastewater treatment plant from January to December 2023. Viral concentration was performed with polyethylene glycol before viral RNA extraction. Real-time qPCR was performed to detect and quantify the arboviral RNA present in the samples. The results showed that 92% (36/39) of the samples were positive for any arboviruses, of which 41% (16/39), 51% (20/39), and 23% (9/39) were positive for DENV, ZIKV, and CHIKV, respectively. Our molecular data suggest that underreporting cases may be the reason for the lower number of reported ZIKV clinical cases. Additionally, we updated a user-friendly web application extension (pySewage) to predict the number of people infected with arboviruses based on the detection of viral load present in wastewater samples, which may be applied as a public policy strategy for monitoring ongoing outbreaks.	
Corresponding Author:	Adriano Roberto Vieira de Sousa UFG: Universidade Federal de Goiás BRAZIL	
Corresponding Author Secondary Information:		
Corresponding Author's Institution:	UFG: Universidade Federal de Goiás	
Corresponding Author's Secondary Institution:		
First Author:	Adriano Roberto Vieira de Sousa	
First Author Secondary Information:		
Order of Authors:	Adriano Roberto Vieira de Sousa Lívia do Carmo Silva Juliana Santana de Curcio Luiz Henrique Alves Costa Carlos Eduardo Anunciação Flavio Olimpio Sanches Neto Elisângela de Paula Silveira Lacerda	
Order of Authors Secondary Information:		
Author Comments:	The authors declare no conflicts of interest. We also inform that this manuscript has been posted on a preprint server.	

Arboviruses Wastewater Surveillance in Brazil's Midwest Region: Extending a Predictive Web Application

Adriano Roberto Vieira de Sousa^{a*}, Livia do Carmo Silva^a, Juliana Santana de Curcio^a, Luiz Henrique Alves Costa^a, Carlos Eduardo Anunciação^b, Flavio Olimpio Sanches Neto^c, Elisângela de Paula Silveira Lacerda^a

^aLaboratório de Genética Molecular e Citogenética, Departamento de Genética, Instituto de Ciências Biológicas I, Universidade Federal de Goiás, 74001-970, Goiânia, Goiás, Brazil

^bLaboratório de Diagnóstico Genético e Molecular, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Instituto de Ciências Biológicas II, Universidade Federal de Goiás, 74001-970, Goiânia, Goiás, Brazil.

^cInstituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Goiás, 72876-601 Valparaíso de Goiás-GO, Brazil

*Author for correspondence. E-mail address: adrianoarvs@gmail.com

Abstract

Arbovirus infections have global environmental, public health, and economic implications. In this context, this study aims to monitor DENV, ZIKV, and CHIKV in the largest wastewater treatment plant in Goiânia, the capital of Goiás State, which processes wastewater from more than 700,000 inhabitants, and to correlate the molecular and clinical data collected. Wastewater samples were collected at Dr. Helio de Seixo Britto's wastewater treatment plant from January to December 2023. Viral concentration was performed with polyethylene glycol before viral RNA extraction. Real-time qPCR was performed to detect and quantify the arboviral RNA present in the samples. The results showed that 92% (36/39) of the samples were positive for any arboviruses, of which 41% (16/39), 51% (20/39), and 23% (9/39) were positive for DENV, ZIKV, and CHIKV, respectively. Our molecular data suggest that underreporting cases may be the reason for the lower number of reported ZIKV clinical cases. Additionally, we updated a user-friendly web application extension (pySewage) to predict the number of people infected with arboviruses based on the detection of viral load present in wastewater samples, which may be applied as a public policy strategy for monitoring ongoing outbreaks.

Keywords: Dengue, Zika, Chikungunya, SARS-CoV-2, RT-qPCR, Virus detection, Web application, pySewage.

1. Introduction

The increase in human populations and high population density in large urban centers, driven by globalization, contribute to the (re)emergence of infectious diseases. Several viral pathogens and their impacts on human health are associated with climate change, particularly the rise in global temperatures, such as arthropod-borne viruses (arboviruses) [1,2].

Arboviruses comprise several groups of viruses (more than 500 known species) widely geographically distributed of which the genera *Flavivirus* and *Alphavirus* are the most important to cause human pathogenicity including viruses such as dengue (DENV), zika (ZIKV), chikungunya (CHIKV), and yellow fever (YFV) [3,4]. Additionally, they are transmitted to mammalian hosts, typically after blood-feeding by arthropod vectors, including mosquitoes, ticks, and other species. [5–7].

Annually, it is estimated that DENV infects 390 million people worldwide [8]. According to Brazilian health authorities, there was a significant increase in reported DENV cases between the 1st and 12th epidemiological weeks of 2023 and 2024. The number of probable cases rose from 489,000 to 2,3 million, respectively [9]. Moreover, in Goiânia municipality, the probable DENV cases rose from 7,000 to 18,000 during the 1st and 14th epidemiological weeks of 2023 and 2024 [10,11].

Most infections caused by arboviruses are asymptomatic [12,13] On the other hand, patients who present symptoms may vary from light feverish to neurological, articular, and hemorrhagic feverish syndromes [14]. It is worth noting that symptomatic DENV, ZIKV, and CHIKV infections show similar clinical manifestations such as fever, joint pain, myalgia, and skin involvement [15], which makes differential diagnosis a crucial tool in endemic areas or during outbreaks [16,17]. Additionally, the treatment of these viruses is only palliative by reducing the symptoms [18]. However, several new technologies are being developed such as antiviral compounds that interfere in viral replication [19], nanotechnology for the detection and treatment of arbovirus infection [20], and the DENV vaccine currently in clinical phase 3 [21].

In many developing countries, arboviral diseases are neglected as a consequence of the absence of priorities in public health programs, as well as in international research and government policy agendas [22,23]. Furthermore, the emergence of new epidemics both in rural and urban areas underscores the urgency of effective and integrated measures like vector control, health care access, differential diagnosis, vaccine programs, and surveillance monitoring [24,25].

In the context of arboviral diseases, it is crucial to utilize and develop monitoring tools to provide the public health system with epidemiological data, given that DENV, ZIKV, and CHIKV have already been reported to be detected in urine samples [26–28]. Wastewater-based epidemiology (WBE) is an important approach based on the detection of pathogenic nucleic acid fragments in wastewater [13]. This methodology is considered robust and has recently been utilized during the coronavirus disease (COVID-19) pandemic to track the virus [29–32]. Hence, like any biological technique, WBE presents both advantages

and limitations. Some advantages include its low cost and non-invasive nature, the capability to monitor both symptomatic and asymptomatic cases, and the ability to provide early data to health authorities during epidemics, as well as predict infected individuals within a community [30,33,34]. However, the lack of standardized protocols appears to be a limiting factor concerning this technology [29].

The effectiveness of the WBE tool depends on several factors, such as the viral concentration step, the shedding rate of pathogens in biological fluids (urine, stool, saliva), the persistence of pathogens in wastewater matrices, and the detection technique used (RT-qPCR, sequencing, RT-ddPCR) [35]. The viral concentration step is important for recovering pathogens in wastewater samples, and there are several methods available. For instance, these include adsorption-elution with electronegative membranes [36], polyethylene glycol (PEG) precipitation [37], and ultracentrifugation [38], among others. Additionally, knowing the shedding rate in different types of biological specimens plays an important role related to the WBE tool, since they are released into the sewer system [39]. Since wastewater matrices are complex, studies have reported the persistence of arboviruses across a wide range of temperatures, supporting the utilization of the WBE tool [40]. In this context, robust RT-qPCR or sequencing assays with high sensitivity are required [30]. These assays could be employed to identify new variants and assess the geographic distribution of the monitored pathogens [41].

It is proposed that the WBE tool holds promise for detecting arboviruses in wastewater samples [13]. However, only a few studies have attempted to detect arboviruses in wastewater matrices [4,42,43]. Furthermore, during the COVID-19 pandemic, a vast amount of data was generated using the WBE tool, highlighting the essential need for the development of data science and bioinformatics protocols to expedite the monitoring of pathogens within communities [44,45].

Bioinformatics plays an important role in handling the large amount of molecular data produced by new technologies, providing non-computational users with the possibility to analyze data and gain advanced knowledge [29,45]. This phenomenon likely contributes to the observation that, despite few studies being undertaken to monitor arboviruses from wastewater samples, their utilization remains largely confined to a limited cohort of researchers [46]. Moreover, the utilization of web applications designed to automate the data generated by monitoring pathogens such as DENV, ZIKV, and CHIKV in wastewater is crucial for achieving early data outcomes during epidemics [29]. However, to our current understanding, there are no web applications related to the monitoring of arboviral diseases in wastewater with predictive capabilities for estimating the number of infected individuals. Therefore, the focus of this study was to monitor the viral load of DENV, ZIKV, and CHIKV in wastewater samples collected from a large community in Brazil's Midwest region. This was complemented by the development of a user-friendly web application intended to predict the number of infected individuals.

2. Materials and methods

2.1. Sample collection

From January to December 2023, a total of 39 wastewater samples, equivalent to 39 epidemiological weeks, were collected at Dr. Hélio Seixo de Britto Wastewater Treatment Plant (WWTP) located in Goiânia, Goiás, Brazil (Latitude: -16.6799, Longitude: -49.255; 16° 40' 48" South, 49° 15' 18" West). The sample collection involved a grab-sampling method, where samples were stored in sterile bottles, transported to the laboratory in a refrigerated box, and frozen at -80°C until viral concentration. The wastewater treatment plant serves approximately 57% of the population of Goiânia (over 700,000 people) and its treatment consists of chemically enhanced primary treatment with a maximum capacity for wastewater treatment of 2,300 L/s.

2.2. Viral concentration

The viral concentration was performed according to Fongaro *et. al.* (2021) and de Sousa *et. al.* (2022), where 100 mL of sewage was processed. After sample collection, a pre-treatment step was performed wherein the pH of the sample was adjusted to 3.5 with HCl (1M). Then, samples were shaken at 4°C for 30 minutes and centrifuged at 5580 x *g* at 4°C for 30 minutes. The supernatant was discarded, and the pellet was resuspended with 40 mL glycine-NaOH (0.25 M) buffer, pH 9.5, and shaken at 2.65 x *g* at 4°C for 60 minutes. The next step consisted of centrifuging the samples at 5580 x *g* at 4°C for 60 minutes. The pellet was discarded, and the supernatant was homogenized with 10 mL of polyethylene glycol 8% (PEG 6000) by shaking for 120 minutes at 4°C, then centrifuged at 5580 x *g* at 4°C for 180 minutes. The supernatant was discarded, and the pellet formed was eluted with 1 mL of phosphate-buffered saline (PBS 1x - 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, and 1.8 mM KH₂PO₄, pH 7.0). The samples were stored at -80°C until RNA extraction.

2.3. Viral RNA extraction

Arboviral RNA (DENV, ZIKV, and CHIKV) was extracted from 200 µL of the samples using the PureLink™ Viral RNA/DNA Mini Kit (Thermo Fisher Scientific, MA, USA) following the manufacturer's protocol. Samples were eluted with 25 µL and then stored at -80°C until further downstream analysis.

2.4. Real-time polymerase chain reaction (RTqPCR) to detect DENV, ZIKV, CHIKV

The detection of arboviruses involved performing reverse transcription quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) using the AriaMX thermocycler (Agilent, Santa Clara, California, USA). The oligonucleotide sequences and probes used for detecting DENV, CHIKV, and ZIKV (obtained from IDT; Integrated DNA Technologies, Coralville, IA, USA), as described by the Centers for Disease Control and Prevention (CDC), were designed as reported by de Curcio *et. al.* (2022) – see Table 01. The reactions were conducted using

the GoTaq® Probe 1-Step RT-qPCR System kit (Promega, Madison, Wisconsin, USA) following the manufacturer's instructions.

Table 1
Oligonucleotides and probes used in this study.

ZIKV Forward sequence	5'-CCGCTGCCCAACACAAG-3'
ZIKV Reverse sequence	5'-CCACTAACGTTCTTTTGCAGACAT-3'
ZIKV Probe	5'-/56-FAM/AGCCTACCT/ZEN/TGACAAGCAGTCAGACACTCAA/3IABkFQ/-3'
CHIKV Forward sequence	5'-AAAGGGGCAAACCTCAGCTTCAC-3'
CHIKV Reverse sequence	5'-GCCTGGGCTCATCGTTATTC-3'
CHIKV Probe	5'-/56-FAM/CGCTGTGAT/ZEN/ACAGTGTTTCGTGTG/3IABkFQ/-3'
DENV Forward sequence	5'-GGTTAGAGGAGACCCCTCCC-3'
DENV Reverse sequence	5'-GAGACAGCAGGATCTCTGGTCT-3'
DENV Probe	5'-/56FAM/AAACAGCAT/ZEN/ATTGACGCTGGGA/3IABkFQ/3'

The oligonucleotides used in this work are acquired by IDT (Integrated DNA Technologies) as described by CDC [48]

We designed a gBlock (Integrated DNA Technologies, Coralville, IA, USA) containing a synthetic double-stranded partial DNA sequence representing various arboviruses as reported by de Curcio *et. al.* (2022). Synthetic DNA fragments of DENV, ZIKV, and CHIKV were combined and used both as a positive control and to generate standard curves for absolute quantification of RT-qPCR reactions (see Table 2). The specific sequences within the gBlock are recognized by primer and probe pairs designed for amplification of the non-structural polyprotein genes of DENV (GenBank: OK040058.1), ZIKV (GenBank: OK054487.1), and CHIKV (GenBank: MW581885.1) (see Table 1). It is noteworthy that our gBlock encompasses the entire DNA region amplified by these primers. The standard curve for each specific arbovirus was constructed using a log₁₀ dilution series that ranged from 10⁵ to 1 copy per reaction, with each reaction performed in duplicate. The linear equation resulting from the standard curve was used to determine the number of copies of viral genetic material in the wastewater samples. The viral load (viral gene copies/L of wastewater) was determined by Equation (1):

$$\text{Viral Load} = \frac{\text{viral genomic copies } \mu\text{L eluted RNA} \cdot 25\mu\text{L (total volume of eluted RNA)}}{100\text{mL(initial volume of concentrated wastewater sample)} \cdot 10^3} \quad (1)$$

Table 2
gBlock sequence analyses for DENV, CHIKV and ZIKV by RT-qPCR.

Sequence (*)
5'CCGCTGCCCAACACAAGGTGAAGCCTACCTTGACAAGCAATCAGACACTCAATATG TCTGCAAAAGAACGTTAGTGGTTTTGGTTAGAGGAGACCCCTCCCTTACAAATCGCAG CAACAATGGGGGCCCAAGGTGAGATGAAGCTGTAGTCTCACTGGAAGGACTAGAGGT TAGAGGAGACCCCCCGAAATAAAAAACAGCATATTGACGCTGGGAAAGACCAGAGA TCCTGCTGTCTCTTTTAAAGGGCAAACCTCAGCTTCACATGCCGCTGTGATACAGTGGT TTCTTTTGTGCGAGGGCTACGTCGTTAAGAGAATAACGATGAGCCCAGGCTTTTATAG ACGACCTGCAGTCAGTGATGGCGACCCCGACAATGAGTCACGGACATTTTGCCTTC ACACAGATCAGACATGCAGGACTCCAGCTGAGGTGGCAGTCTATCA 3'

This sequence is used to amplify the region nonstructural polyprotein gene of DENV, CHIKV, and ZIKV. Primers were provided by IDT [48].

2.5. Data analysis and procedures

In order to predict the number of infected people (NIP) from wastewater samples, several parameters must be taken into account. These include the viral genome copies per liter of wastewater detected through RT-qPCR (VGC), the flow rate of the wastewater treatment plant (FR), the shedding rate in urine (α) of each target virus (DENV, ZIKV, CHIKV), and the daily urine production per capita (β). As reported by Ahmed *et. al.* (2020) during the COVID-19 pandemic, the estimation of the number of infected people was calculated using Equation (2):

$$NIP = \frac{VGC \cdot FR}{\alpha \cdot \beta \cdot \gamma} \quad (2)$$

To ascertain the flow rate (FR) of the wastewater treatment plant (WWTP), information sourced from health authorities underwent collection and analysis. The estimated daily wastewater flow rate was determined by multiplying the population residing at home within the catchment area, which is approximately 700,000 individuals (capita), by the observed average wastewater generation rate of 177 L/person/day [30]. Furthermore, due to the considerable variability in parameters such as the viral load shedding rate (α), daily urine production per capita (β), and the percentage of infected individuals shedding arboviral RNA in urine (γ), interpreting the results of infection prediction poses challenges. Consequently, a Monte Carlo simulation was conducted in Equation 2 using Python code language. The viral load shedding rates in urine (α) were modeled for DENV, ZIKV, and CHIKV, as a uniform distribution with a range of 2.1 to 3.8 [27], 5.85 to 8.34 [28], and 2.84 to 5.83 [26] $\log_{10}/\text{mL}/\text{urine}$, respectively. The daily urine production per capita (β) was modeled as a normal distribution with a range of 2.7 to 3.4 $\log_{10}/\text{mL}/\text{person}/\text{day}$ [49]. The percentage of infected people that shed arboviruses viral RNA in urine (γ) was modeled with a uniform distribution with a range 25 to 80% [50,51].

2.6. pySewage and epidemiological data

During the COVID-19 pandemic, we developed a user-friendly web application named pySewage, based on the Python language, to automate the prediction of SARS-CoV-2 infection in wastewater samples utilizing the WBE tool (de Sousa *et al.*, 2022). In this study, we have updated and extended this web application to include the prediction of DENV, ZIKV, and CHIKV. Additionally, we collected the arboviral epidemiological data from Goiânia Health Department (available at: <https://saude.goiania.go.gov.br/informe-dengue-chikungunya-zika-e-microcefalia/informe-dengue-2023/t>) to compare with the WBE detections as well as the pySewage predictions.

3. Results and discussion

3.1. Arboviral RNA detection in wastewater samples

In this study, a total of 39 samples corresponding to 39 epidemiological weeks were subjected to screening by DENV, ZIKV, and CHIKV RT-qPCR after viral concentration and RNA extraction steps. Arboviral RNA of DENV, ZIKV, and

CHIKV was detected in 31% (16/51), 39% (20/51), and 17% (9/51) of the samples, respectively. These findings support the proposition to employ the WBE tool for monitoring arbovirus infections within communities [13]. However, further efforts are necessary to enhance this tool, given the limited number of attempts thus far to detect arboviruses in wastewater samples [42,43]. We found a viral load for DENV, ZIKV, and CHIKV ranging from 1.61 to 2.53, 1.75 to 3.04 and 2.05 to 2.82 log₁₀ / genome copies / L sewage, respectively (see Table 03.). Arboviruses having been reported to shed in urine samples within a range of 2.1 to 3.8, 5.85 to 8.34, and 2.84 to 5.83 log₁₀/genome copies/mL for DENV, ZIKV, and CHIKV, respectively [26–28]. Detecting them in wastewater poses a challenge due to the complex matrix of compounds [4,52], with the potential presence of PCR inhibitors [53]. Additionally, the shedding rates of arboviruses in urine differ from the shedding rates of enteric viruses found in feces (like SARS-CoV-2), which appear to influence the overall outcomes of WBE surveillance [13].

It is worth noting that the arboviral shedding rate is not well established in the scientific literature. Furthermore, due to the fact that the arboviruses monitored in this study belong to different genera (*Flavivirus* and *Alphavirus*), it is important to have well-known parameters to enhance the accuracy of WBE detections, such as the shedding rate in urine and other biological fluids (which might contribute to wastewater volumes), especially in asymptomatic infections [13]. Additionally, the persistence of these viruses in complex wastewater matrices is crucial to consider, as it can interfere with detections due to RNA degradation [13,40].

Table 3
DENV, ZIKV, and CHIKV viral load detected by RT-qPCR.

Epi week	Year-month	Genome copies per sewage liter (log ₁₀)		
		DENV	ZIKV	CHIKV
2	2023-Jan	1.88	2.54	2.82
3	2023-Jan	2.49	ND	ND
4	2023-Jan	2.22	ND	2.19
5	2023-Jan	1.97	1.88	ND
6	2023-Feb	ND	2.53	ND
7	2023-Feb	ND	ND	2.05
8	2023-Feb	2.1	ND	ND
9	2023-March	ND	2.82	2.51
10	2023-March	1.82	2.2	ND
11	2023-March	2.53	1.98	ND
12	2023-March	ND	2.38	2.54
13	2023-March	2.28	ND	ND
14	2023-April	ND	2.9	ND
15	2023-April	1.61	ND	2.53
16	2023-April	ND	ND	2.56
17	2023-April	ND	1.89	ND
18	2023-May	ND	2.8	ND
19	2023-May	ND	ND	ND
20	2023-May	2.3	ND	ND
21	2023-May	ND	2.26	ND
22	2023-May	ND	2.89	ND

23	2023-June	ND	ND	ND
24	2023-June	ND	ND	ND
25	2023-June	2.37	ND	2.15
26	2023-June	1.89	ND	ND
27	2023-July	ND	2.02	ND
28	2023-July	2.24	2.44	ND
32	2023-Aug	ND	ND	ND
33	2023-Aug	1.98	ND	ND
34	2023-Aug	ND	2.58	ND
36	2023-Sep	2.07	ND	ND
37	2023-Sep	ND	1.78	2.13
39	2023-Sep	ND	ND	ND
40	2023-Oct	ND	3.04	ND
41	2023-Oct	ND	2.78	ND
45	2023-Nov	ND	2.55	ND
46	2023-Nov	ND	ND	ND
47	2023-Nov	2.09	ND	ND
48	2023-Dec	ND	1.75	ND

Notes: ND (not detected). Due to some unforeseen issues in the WWTP renovation, out of the 48 weeks presented in table 02, we were unable to collect samples during 9 weeks (29, 30, 31, 35, 38, 42, 43, and 44), resulting in a total of 39 weeks analyzed.

3.2. Limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ)

The limit of detection (LOD) and the limit of quantification (LOQ) for each arbovirus were established after a serial dilution of the positive control (gBlock) at 6 points in duplicates and plotted using the line equation (see Figure 01). For DENV, ZIKV, and CHIKV, we obtained a minimum cycle of quantification (Cq) of 37.33, 37.61, and 37.79, respectively. Samples with a Cq lower than the aforementioned Cqs were considered negatives.

Some molecular techniques, such as RT-qPCR and droplet digital PCR (RT-ddPCR), could be used to detect and quantify viral pathogens in wastewater [54]. Additionally, RT-ddPCR is more sensitive in detecting positive signals in rhino pharyngeal swab samples [55]. However, RT-ddPCR is expensive, and more studies are needed to compare its efficiency in wastewater samples (Ciannella et al., 2023).

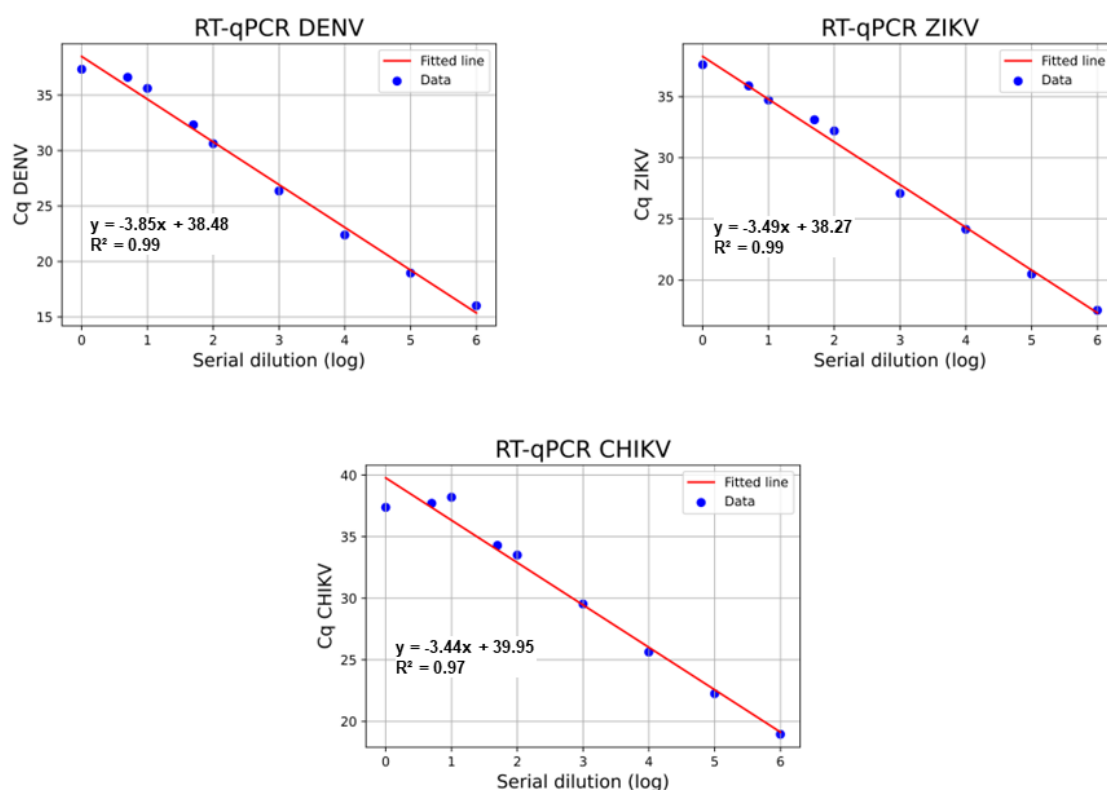


Fig. 1. Calibration curve of DENV, ZIKV, and CHIKV.

3.3. Clinical data and WBE detection

To correlate the clinical data and the WBE detection, epidemiological data were obtained from the Goiânia Health Department. Figure 02 illustrates the correlation between WBE detection for DENV, ZIKV, and CHIKV and the epidemiological data provided by the Goiânia Health Department. To address the underreporting of certain arboviruses, such as ZIKV (only one case reported during 2023), we used the total reports of both arboviruses combined (DENV + ZIKV + CHIKV reports) as a reference which we termed as Arboviral clinical cases.

As mentioned above, despite this study detecting 39% of ZIKV, 35% of DENV, and 17% of CHIKV, the epidemiological data provided by the Goiânia Health Department reported only one probable ZIKV case, with no confirmation during 2023. This low incidence of ZIKV cases may be related to underreporting. During the ZIKV outbreak in 2007 on Yap Island, Micronesia, 80% of the infected people were asymptomatic [56,57]. Additionally, arboviral symptomatic infections (DENV, ZIKV, CHIKV, YFV) present similar symptoms [15,58], making it even more difficult to determine the real prevalence and incidence in populations [8,12,59]. In this context, our data for WBE detection of ZIKV likely indicate asymptomatic ZIKV infections occurring in Goiânia's population. Therefore, differential diagnoses associated with WBE monitoring are indispensable to provide accurate data to manage outbreaks [16].

In 2023, Da Silva et. al. (2024) reported transovarian vertical transmission of arboviruses in *Aedes aegypti* mosquitoes in Goiânia municipality. This suggests that the underreporting of cases may be related to difficulties in

differential diagnosis due to similar symptoms, which corroborate our data related to the detection of CHIKV and ZIKV in wastewater samples.

It is important to note that asymptomatic and mildly symptomatic infections play a substantial role in arboviral dynamics and disease burden, emphasizing the significance of considering these cases in public health strategies. Silent arboviral transmission is defined as transmission resulting in asymptomatic cases or mild symptoms that are typically undetected by routine surveillance systems, serving as a significant contributing factor to the epidemiology of arboviral infections [61,62].

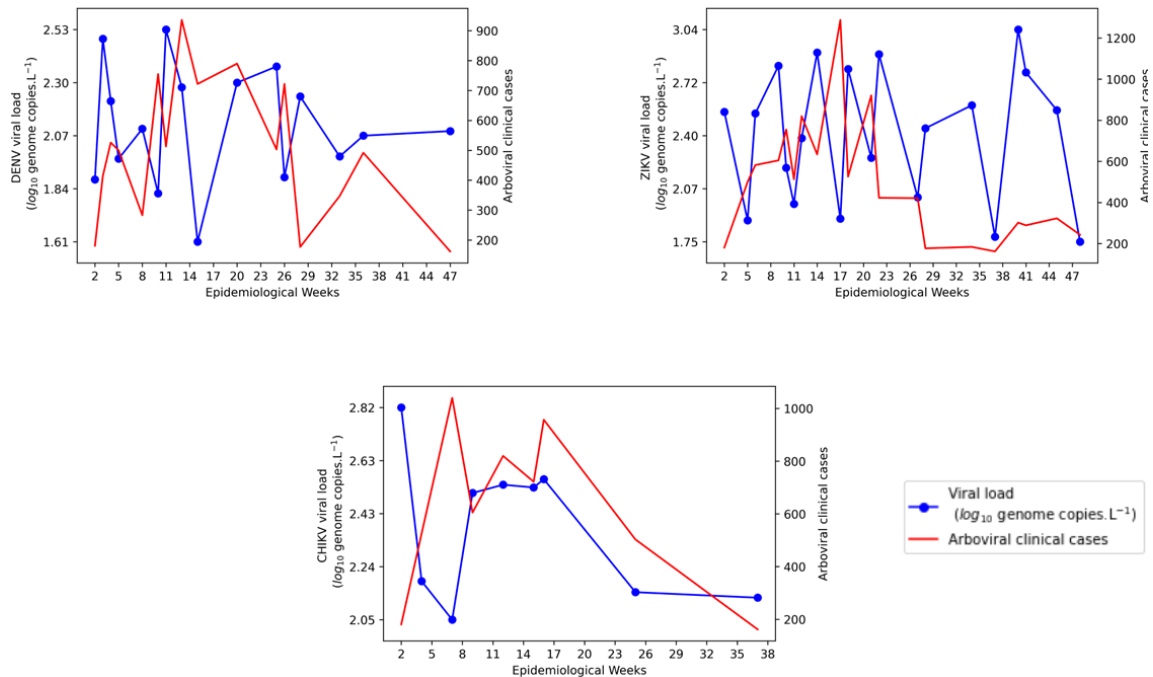


Fig. 2. Correlation between the viral load detected in wastewater and the clinical data provided by Health Authorities.

3.4. pySewage and epidemiological data

Throughout the COVID-19 pandemic, we developed our web tool, pySewage (de Sousa et al., 2022), to monitor and forecast the prevalence of SARS-CoV-2 infections. This software, built on the Python language, enables the analysis of vast datasets. Integrating bioinformatics into the WBE tool can significantly enhance its utility in tracking infections from wastewater samples within a community. In this study, we updated our pySewage web application (available at: www.pysewage.com.br) to automatize the prediction of arboviral-infected people (DENV, ZIKV, and CHIKV) based on several parameters (see Equation 2). Additionally, it can be utilized as a decentralized monitoring tool for spatial distribution and prevalence of infections [63].

Our web application results show predictions about the number of people infected with DENV, ZIKV, and CHIKV, ranging from 270 to 619, 59 to 422, and 411 to 888 persons, respectively (see Figure 03). Ahmed et. al. (2020) found 122 to 1090 infected people in the context of the COVID-19 pandemic. The integration of WBE and clinical data is crucial for developing guidelines during outbreaks and

366 pandemics, just as the use and development of other computational tools, such
367 as machine learning, will be of utmost relevance in the clinical-epidemiological
368 control of these pathogens [64]. However, performing WBE detections demands
369 expertise in molecular biology, along with access to appropriate laboratory
370 equipment, which can be time-intensive and sometimes unavailable, especially
371 in developing countries like Brazil. In this context, WBE should be seen as an
372 indispensable public policy by the government, as it can provide early and real-
373 time data about outbreaks, endemics, and pandemics [29].

374 The results of predicting arboviral infections through wastewater samples,
375 plotted for all arboviruses (see Figure 03), reveal a detection rate of 92% (36/39)
376 for any arbovirus over 39 epidemiological weeks. These data indicate the co-
377 circulation of DENV, ZIKV, and CHIKV in the Goiânia's population during the
378 analyzed period. Silvera-Lacerda et. at., (2021), reported the co-circulation of
379 DENV and MAYV (Mayaro virus) in the Goiânia's population during 2017-2018.
380 Additionally, clinical data suggest that DENV cases are overreported compared
381 to CHIKV and ZIKV. In 2023, the Goiânia Health Department reported a total of
382 23,180 cases of DENV, 572 cases of CHIKV, and only 1 case of ZIKV. Sanchez
383 et. at., (2018), demonstrated the misdiagnosis of infected individuals, with
384 underreported cases of CHIKV and overreported cases of DENV during an
385 outbreak in Costa Rica in 2015-2016. On the other hand, the underreporting of
386 DENV cases is prevalent in numerous countries [66]. Several factors contribute
387 to this issue, including the tendency of individuals or caregivers to avoid seeking
388 treatment for mild febrile illnesses unless absolutely necessary, potentially
389 increased underreporting among older demographics, possible misdiagnosis with
390 other infectious diseases, and logistical challenges in maintaining adherence to
391 surveillance protocols despite legal requirements for DENV reporting. [67].
392 Therefore, our web application (pySewage) associated with WBE monitoring can
393 be used to aim the health authorities regarding the clinical-epidemiological data.

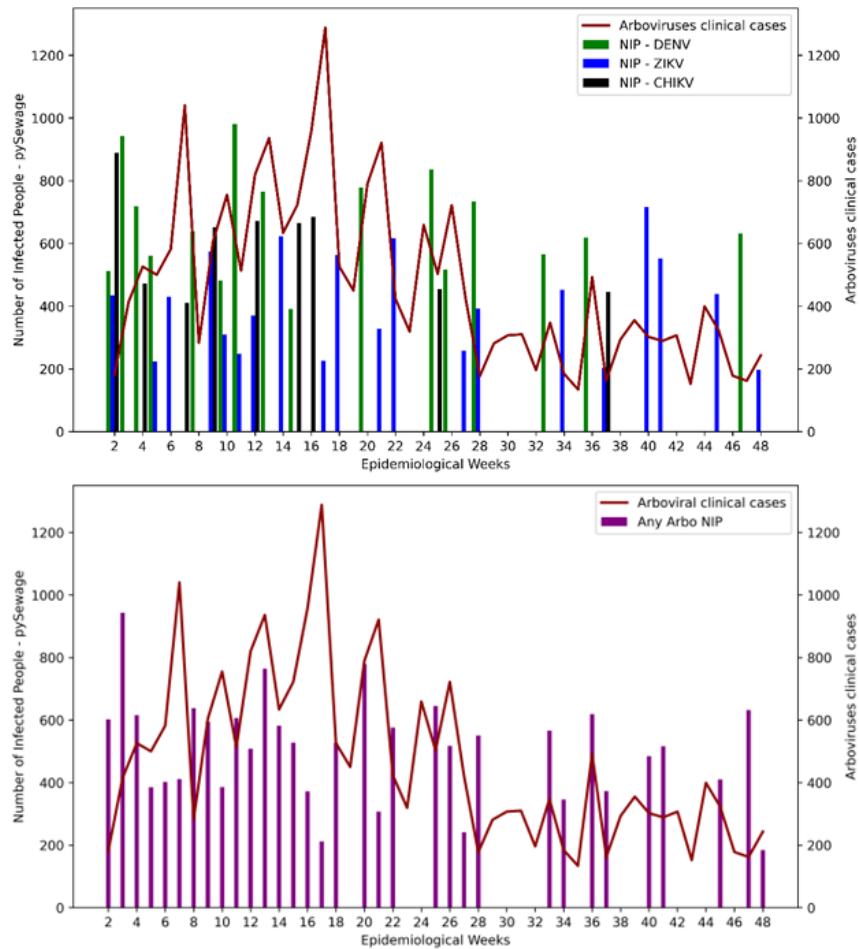


Fig. 3. Correlation between the predicted number of infected people (pySewage) and the clinical data provided by Health Authorities.

4. Conclusion

Originally designed for predicting SARS-CoV-2 infections, we extended its capabilities in this study to include the prediction of DENV, ZIKV, and CHIKV infections. Our findings underscore the potential of WBE in detecting arboviral RNA in wastewater samples, revealing detection rates for DENV, ZIKV, and CHIKV. These results support the utility of WBE as a tool for community-level surveillance of arbovirus infections. However, further research is essential to refine and optimize WBE methodologies, particularly in terms of viral concentration steps, arboviral shedding rates, persistence in wastewater matrices, and the impact of PCR inhibitors. Integrating clinical data from health authorities, despite the challenges of underreporting and asymptomatic infections, has provided valuable insights into the prevalence and incidence of arboviral infections within the Goiânia population. Differential diagnoses, coupled with WBE monitoring, are imperative for accurately managing outbreaks. The pySewage web application demonstrates its versatility and adaptability, offering real-time predictions of arboviral infections based on multiple parameters. By harnessing the power of bioinformatics and computational tools like machine learning, we can further enhance the clinical-epidemiological control of these pathogens. In conclusion, pySewage, in conjunction with WBE, serves as a vital tool for analyzing large datasets and providing timely epidemiological data to

health authorities. Also, it should be used with the integration of clinical data available within a community. Therefore, it should be an important component of public health policy, particularly in the context of outbreaks, endemics, and pandemics.

Acknowledgment

We are grateful to Dr. Gislaine Fongaro for the experimental support of the viral concentration protocol, to Laboratório de Biotecnologia (LaBiotec) da Universidade Estadual de Goiás for the support of, and to SANEAGO for allowing the collection of wastewater samples at the Dr. Helio de Seixo Britto wastewater treatment plant.

Author contribution

Adriano Roberto Vieira de Sousa contributed to conceptualization, methodology, validation, formal analysis, writing – original draft, writing – review & editing, investigation, and data curation. Lívia do Carmo Silva contributed to methodology, investigation, data curation, and writing – review & editing. Juliana Santana de Curcio contributed to methodology, investigation, data curation, and writing – review & editing. Luiz Henrique Alves Costa contributed to the methodology. Carlos Eduardo Anunciação contributed to conceptualization, methodology, and investigation. Flávio Olimpio Sanches Neto contributed to formal analysis, data curation, and writing – review & editing. Elisângela de Paula Silveira Lacerda contributed to conceptualization, methodology, validation, formal analysis, writing – original draft, writing – review & editing, investigation, data curation, supervision, project administration, and funding acquisition.

Conflict of interest statement

On behalf of all authors, the corresponding author states that there is no conflict of interest.

Funding

This work was performed at Universidade Federal de Goiás supported by CAPES, JBS-Swift Foods Company – PI04742-2020, and by Academic Cooperation Program in National Defense (PROCAD) – 88887.387750/2019-00.

Data availability

The datasets used and/or analyzed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

Declarations

The authors declare that ethics approval and consent to participate were not applicable. Similarly, consent for publication was not applicable. The authors also declare no competing interests.

REFERENCES

1. Mora C, Spirandelli D, Franklin EC, Lynham J, Kantar MB, Miles W, et al. Broad threat to humanity from cumulative climate hazards intensified by greenhouse gas emissions. *Nat. Clim. Chang.* [Internet] 2018;8:1062–71. doi: <http://dx.doi.org/10.1038/s41558-018-0315-6>doi: 10.1038/s41558-018-0315-6
2. Mora C, McKenzie T, Gaw IM, Dean JM, von Hammerstein H, Knudson TA, et al. Over half of known human pathogenic diseases can be aggravated by climate change. *Nat. Clim. Chang.* 2022;12:869–75. doi: 10.1038/s41558-022-01426-1
3. Kraemer MUG, Sinka ME, Duda KA, Mylne AQN, Shearer FM, Barker CM, et al. The global distribution of the arbovirus vectors *Aedes aegypti* and *Ae. Albopictus*. *Elife* 2015;4:1–18. doi: 10.7554/eLife.08347
4. Chandra F, Armas F, Kwok G, Chen H, Desmond Chua FJ, Leifels M, et al. Comparing Recovery Methods for Wastewater Surveillance of Arthropod-Borne and Enveloped Viruses. *ACS EST Water* 2023;3:974–83. doi: 10.1021/acsestwater.2c00460
5. Conway MJ, Colpitts TM, Fikrig E. Role of the Vector in Arbovirus Transmission. *Annu. Rev. Virol.* [Internet] 2014;1:71–88. doi: <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev-virology-031413-085513>doi: 10.1146/annurev-virology-031413-085513
6. Gubler DJ. The Global Emergence/Resurgence of Arboviral Diseases As Public Health Problems. *Arch. Med. Res.* 2002;33:330–42. doi: 10.1016/S0188-4409(02)00378-8
7. Madewell ZJ. Arboviruses and their vectors. *South. Med. J.* 2020;113:520–3. doi: 10.14423/SMJ.0000000000001152
8. Bhatt S, Gething PW, Brady OJ, Messina JP, Farlow AW, Moyes CL, et al. The global distribution and burden of dengue. *Nature* [Internet] 2013;496:504–7. doi: <http://dx.doi.org/10.1038/nature12060>doi: 10.1038/nature12060
9. Brasil. Informe Semanal. Cent. Operação Emergências 2024;1–12.
10. Brasil. Boletim epidemiológico arboviroses SE 14/2024. Secr. Munic. Saúde 2024;
11. Brasil. Boletim epidemiológico arboviroses SE 14/2023. Secr. Munic. Saúde 2023;
12. Eppes C, Rac M, Dunn J, Versalovic J, Murray KO, Suter MA, et al. Testing for Zika Virus (ZIKV) Infection in Pregnancy: Key Concepts to Deal with an Emerging Epidemic. *Am. J. Obstet. Gynecol.* [Internet] 2017;3:209–25. doi: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28126366><http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0002937817301278>doi: 10.1016/j.ajog.2017.01.020
13. Lee WL, Gu X, Armas F, Leifels M, Wu F, Chandra F, et al. Monitoring human arboviral diseases through wastewater surveillance: Challenges, progress and future opportunities [Internet]. *Water Res.* 2022;223:118904. doi: <https://doi.org/10.1016/j.watres.2022.118904>doi: 10.1016/j.watres.2022.118904
14. Donalisio MR, Freitas ARR, Zuben APB Von. Arboviruses emerging in Brazil: challenges for clinic and implications for public health. *Rev. Saude*

- Publica [Internet] 2017;51:1–6. doi:
http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-89102017000100606&lng=en&tlng=endoi: 10.1590/s1518-8787.2017051006889
15. Ananth S, Shrestha N, Treviño C. JA, Nguyen US, Haque U, Angulo-Molina A, et al. Clinical symptoms of arboviruses in Mexico. *Pathogens* 2020;9:1–16. doi: 10.3390/pathogens9110964
 16. Silveira-Lacerda E de P, Laschuk Herlinger A, Tanuri A, Rezza G, Anunciação CE, Ribeiro JP, et al. Molecular epidemiological investigation of Mayaro virus in febrile patients from Goiania City, 2017–2018. *Infect. Genet. Evol.* 2021;95. doi: 10.1016/j.meegid.2021.104981
 17. Piantadosi A, Kanjilal S. Diagnostic approach for arboviral infections in the United States. *J. Clin. Microbiol.* 2020;58. doi: 10.1128/JCM.01926-19
 18. Rodriguez AK, Muñoz AL, Segura NA, Rangel HR, Bello F. Molecular characteristics and replication mechanism of dengue, zika and chikungunya arboviruses, and their treatments with natural extracts from plants: An updated review. *EXCLI J.* 2019;18:988–1006. doi: 10.17179/excli2019-1825
 19. Dong S, Dimopoulos G. Antiviral compounds for blocking arboviral transmission in mosquitoes. *Viruses* 2021;13. doi: 10.3390/v13010108
 20. Duarte JL, Filippo LD Di, Araujo VHS, Oliveira AEM de FM, de Araújo JTC, Silva FB da R, et al. Nanotechnology as a tool for detection and treatment of arbovirus infections. *Acta Trop.* 2021;216. doi: 10.1016/j.actatropica.2021.105848
 21. Kallás EG, Cintra MAT, Moreira JA, Patiño EG, Braga PE, Tenório JC V., et al. Live, Attenuated, Tetravalent Butantan-Dengue Vaccine in Children and Adults. *N. Engl. J. Med.* 2023;390:397–408.
 22. World Health Organization. Managing epidemics. 2018.
 23. Labeaud AD. Why Arboviruses Can Be Neglected Tropical Diseases. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2008;2:e247. doi: 10.1371/journal.pntd.0000247
 24. Girard M, Nelson CB, Picot V, Gubler DJ. Arboviruses: A global public health threat. *Vaccine* 2020;38:3989–94. doi: 10.1016/j.vaccine.2020.04.011
 25. Cabral-Castro MJ, Cavalcanti MG, Peralta RHS, Peralta JM. Molecular and serological techniques to detect co-circulation of DENV, ZIKV and CHIKV in suspected dengue-like syndrome patients. *J. Clin. Virol.* [Internet] 2016;82:108–11. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcv.2016.07.017>doi: 10.1016/j.jcv.2016.07.017
 26. Familiar-Macedo D, Gama BE, Emmel VE, Vera-Lozada G, Abdelhay E, Martins IS, et al. Molecular aspects of Chikungunya virus infections in cancer patients. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 2022;117:1–8. doi: 10.1590/0074-02760210383
 27. Andries AC, Duong V, Ly S, Cappelle J, Kim KS, Lorn Try P, et al. Value of Routine Dengue Diagnostic Tests in Urine and Saliva Specimens. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2015;9. doi: 10.1371/journal.pntd.0004100
 28. Gourinat AC, O'Connor O, Calvez E, Goarant C, Dupont-Rouzeyrol M. Detection of Zika Virus in Urine. *Emerg. Infect. Dis.* 2015;21:84–6. doi: 10.3201/eid2101.140894
 29. de Sousa ARV, do Carmo Silva L, de Curcio JS, da Silva HD, Eduardo Anunciação C, Maria Salem Izacc S, et al. “pySewage”: a hybrid

- approach to predict the number of SARS-CoV-2-infected people from wastewater in Brazil. *Environ. Sci. Pollut. Res.* [Internet] 2022;doi: <https://doi.org/10.1007/s11356-022-20609-z> doi: 10.1007/s11356-022-20609-z
30. Ahmed W, Angel N, Edson J, Bibby K, Bivins A, O'Brien JW, et al. First confirmed detection of SARS-CoV-2 in untreated wastewater in Australia: A proof of concept for the wastewater surveillance of COVID-19 in the community. *Sci. Total Environ.* [Internet] 2020;728:1–8. doi: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.138764> doi: 10.1016/j.scitotenv.2020.138764
 31. Prado T, Fumian TM, Mannarino CF, Resende PC, Motta FC, Eppinghaus ALF, et al. Wastewater-based epidemiology as a useful tool to track SARS-CoV-2 and support public health policies at municipal level in Brazil. *Water Res.* [Internet] 2021;191:116810. doi: <https://doi.org/10.1016/j.watres.2021.116810> doi: 10.1016/j.watres.2021.116810
 32. Tran DPH, You B-C, Liu C-W, Chen Y-N, Wang Y-F, Chung S-N, et al. Identifying spatiotemporal trends of SARS-CoV-2 RNA in wastewater: From the perspective of upstream and downstream wastewater-based epidemiology (WBE). *Environ. Sci. Pollut. Res.* [Internet] 2023;doi: <https://doi.org/10.1007/s11356-023-31769-x> doi: 10.1007/s11356-023-31769-x
 33. Hasan SW, Ibrahim Y, Daou M, Kannout H, Jan N, Lopes A, et al. Detection and quantification of SARS-CoV-2 RNA in wastewater and treated effluents: Surveillance of COVID-19 epidemic in the United Arab Emirates. *Sci. Total Environ.* [Internet] 2021;764:142929. doi: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.142929> doi: 10.1016/j.scitotenv.2020.142929
 34. Henriques TB, Cassini ST, de Pinho Keller R. Contribution of wastewater-based epidemiology to SARS-CoV-2 screening in Brazil and the United States. *J. Water Health* 2023;21:343–53. doi: 10.2166/wh.2023.260
 35. Ciannella S, González-fernández C, Gomez-pastora J. Recent progress on wastewater-based epidemiology for COVID-19 surveillance : A systematic review of analytical procedures and epidemiological modeling. *Sci. Total Environ.* [Internet] 2023;878:162953. doi: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.162953> doi: 10.1016/j.scitotenv.2023.162953
 36. Calderón-Franco D, Orschler L, Lackner S, Agrawal S, Weissbrodt DG. Science of the Total Environment Monitoring SARS-CoV-2 in sewage : Toward sentinels with analytical accuracy. *Sci. Total Environ.* 2022;804:150244. doi: 10.1016/j.scitotenv.2021.150244
 37. Dimitrakopoulos L, Kontou A, Strati A, Galani A, Kostakis M, Kapes V, et al. Evaluation of viral concentration and extraction methods for SARS-CoV-2 recovery from wastewater using droplet digital and quantitative RT-PCR. *Case Stud. Chem. Environ. Eng.* [Internet] 2022;6:100224. doi: <https://doi.org/10.1016/j.cscee.2022.100224> doi: 10.1016/j.cscee.2022.100224
 38. Boogaerts T, Jacobs L, Roeck N De, Bogaert S Van Den, Aertgeerts B, Lahousse L, et al. An alternative approach for bioanalytical assay optimization for wastewater-based epidemiology of SARS-CoV-2. *Sci.*

- Total Environ. [Internet] 2021;789:148043. doi:
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.148043>
39. Schmitz BW, Innes GK, Prasek SM, Betancourt WQ, Stark ER, Foster AR, et al. Enumerating asymptomatic COVID-19 cases and estimating SARS-CoV-2 fecal shedding rates via wastewater-based epidemiology. *Sci. Total Environ.* [Internet] 2021;801:149794. doi: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.149794>
 40. Chandra F, Lee WL, Armas F, Leifels M, Gu X, Chen H, et al. Persistence of Dengue (Serotypes 2 and 3), Zika, Yellow Fever, and Murine Hepatitis Virus RNA in Untreated Wastewater. *Environ. Sci. Technol.* 2021;8:785–91. doi: 10.1021/acs.estlett.1c00517
 41. Peterson SW, Lidder R, Daigle J, Wonitowy Q, Dueck C, Nagasawa A, et al. RT-qPCR detection of SARS-CoV-2 mutations S 69--70 del, S N501Y and N D3L associated with variants of concern in Canadian wastewater samples. *Sci. Total Environ.* 2022;810:151283.
 42. Wolfe MK, Paulos AH, Zulli A, Duong D, Sheldon B, White BJ, et al. Wastewater Detection of Emerging Arbovirus Infections: Case Study of Dengue in the United States. *Environ. Sci. Technol. Lett.* 2023;9–15. doi: 10.1021/acs.estlett.3c00769
 43. Thakali O, Raya S, Malla B, Tandukar S, Tiwari A, Sherchan SP, et al. Pilot study on wastewater surveillance of dengue virus RNA: Lessons, challenges, and implications for future research. *Environ. Challenges* [Internet] 2022;9:100614. doi: <https://doi.org/10.1016/j.envc.2022.100614>
 44. Mercatelli D, Holding AN, Giorgi FM. Web tools to fight pandemics: the COVID-19 experience. *Brief. Bioinform.* 2021;22:690–700.
 45. Hufsky F, Lamkiewicz K, Almeida A, Aouacheria A, Arighi C, Bateman A, et al. Computational strategies to combat COVID-19: useful tools to accelerate SARS-CoV-2 and coronavirus research. *Brief. Bioinform.* 2021;22:642–63.
 46. Sanches-Neto FO, Dias-Silva JR, Keng Queiroz Junior LH, Carvalho-Silva VH. “pySiRC”: Machine Learning Combined with Molecular Fingerprints to Predict the Reaction Rate Constant of the Radical-Based Oxidation Processes of Aqueous Organic Contaminants. *Environ. Sci. & Technol.* 2021;55:12437–48.
 47. Fongaro G, Hermes P, Sobral D, Souza M, Carlos E, Elisa M, et al. The presence of SARS-CoV-2 RNA in human sewage in Santa Catarina, Brazil, November 2019. *Sci. Total Environ.* 2021;778:146198. doi: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.146198>
 48. de Curcio JS, Salem-Izacc SiM, Neto LMP, Nunes EB, Anunciação CE, Silveira-Lacerda E de P. Detection of Mayaro virus in *Aedes aegypti* mosquitoes circulating in Goiânia-Goiás-Brazil. *Microbes Infect.* 2022;24:104948. doi: 10.1016/j.micinf.2022.104948
 49. Rose C, Parker A, Jefferson B, Cartmell E. The characterization of feces and urine: A review of the literature to inform advanced treatment technology. *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* 2015;45:1827–79. doi: 10.1080/10643389.2014.1000761

- 669 50. Hirayama T, Mizuno Y, Takeshita N, Kotaki A, Tajima S, Omatsu T, et al.
670 Detection of Dengue Virus Genome in Urine by Real-Time Reverse
671 Transcriptase PCR : a Laboratory Diagnostic Method Useful after
672 Disappearance of the Genome in Serum. *J. Clin. Microbiol.*
673 2012;50:2047–52. doi: 10.1128/JCM.06557-11
- 674 51. Van den Bossche D, Cnops L, Van Esbroeck M. Recovery of dengue
675 virus from urine samples by real-time RT-PCR. *Eur. J. Clin. Microbiol.*
676 *Infect. Dis.* 2015;34:1361–7. doi: 10.1007/s10096-015-2359-0
- 677 52. Claro ICM, Cabral AD, Augusto MR, Duran AFA, Graciosa MCP, Fonseca
678 FLA, et al. Long-term monitoring of SARS-COV-2 RNA in wastewater in
679 Brazil: A more responsive and economical approach. *Water Res.*
680 [Internet] 2021;203:117534. doi:
681 <https://doi.org/10.1016/j.watres.2021.117534>doi:
682 10.1016/j.watres.2021.117534
- 683 53. Kitajima M, Ahmed W, Bibby K, Carducci A, Gerba CP, Hamilton KA, et
684 al. SARS-CoV-2 in wastewater: State of the knowledge and research
685 needs [Internet]. *Sci. Total Environ.* 2020;739:139076. doi:
686 <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.139076>doi:
687 10.1016/j.scitotenv.2020.139076
- 688 54. Gonzalez R, Curtis K, Bivins A, Bibby K, Weir MH, Yetka K, et al. COVID-
689 19 surveillance in Southeastern Virginia using wastewater-based
690 epidemiology. *Water* 2020;186:116296.
- 691 55. Falzone L, Musso N, Gattuso G, Bongiorno D, Palermo CI, Scalia G, et al.
692 Sensitivity assessment of droplet digital PCR for SARS-CoV-2 detection.
693 *Int. J. Mol. Med.* 2020;46:957–64. doi: 10.3892/ijmm.2020.4673
- 694 56. Duffy MR, Chen T-H, Hancock WT, Powers AM, Kool JL, Lanciotti RS, et
695 al. Zika Virus Outbreak on Yap Island, Federated States of Micronesia. *N.*
696 *Engl. J. Med.* 2009;360:2536–43.
- 697 57. Haby MM, Pinart M, Elias V, Reveiz L. Prevalence of asymptomatic Zika
698 virus infection: A systematic review. *Bull. World Health Organ.*
699 2018;96:402-413D. doi: 10.2471/BLT.17.201541
- 700 58. Gulati S, Maheshwari A. Dengue fever-like illnesses: How different are
701 they from each other? *Scand. J. Infect. Dis.* 2012;44:522–30. doi:
702 10.3109/00365548.2012.669044
- 703 59. Nasci RS. Movement of Chikungunya Virus into the Western Hemisphere.
704 *Emerg. Infect. Dis.* 2014;20:1394–5. doi: 10.3201/eid2008.140333
- 705 60. Da Silva DMF, de Curcio JS, Silva L do C, de Sousa FB, Anunciação CE,
706 Furlaneto SMSI, et al. Detection of arboviruses in *Aedes aegypti* through
707 transovarian analysis: A study in Goiânia, Goiás. *Rev. Soc. Bras. Med.*
708 *Trop.* 2024;57:e0280-2023. doi: 10.1590/0037-8682-0280-2023
- 709 61. Santos LMB, Mutsaers M, Garcia GA, David MR, Pavan MG, Petersen
710 MT, et al. High throughput estimates of Wolbachia, Zika and chikungunya
711 infection in *Aedes aegypti* by near-infrared spectroscopy to improve
712 arbovirus surveillance. *Commun. Biol.* [Internet] 2021;4. doi:
713 <http://dx.doi.org/10.1038/s42003-020-01601-0>doi: 10.1038/s42003-020-
714 01601-0
- 715 62. ten Bosch QA, Clapham HE, Lambrechts L, Duong V, Buchy P, Althouse
716 BM, et al. Contributions from the silent majority dominate dengue virus
717 transmission. *PLoS Pathog.* 2018;14:82–6. doi:
718 10.1371/journal.ppat.1006965

63. Mota CR, Bressani-Ribeiro T, Araújo JC, Leal CD, Leroy-Freitas D, Machado EC, et al. Assessing spatial distribution of COVID-19 prevalence in Brazil using decentralised sewage monitoring. *Water Res.* 2021;202:117388. doi: 10.1016/j.watres.2021.117388
64. Gagliano E, Biondi D, Roccaro P. Wastewater-based epidemiology approach: The learning lessons from COVID-19 pandemic and the development of novel guidelines for future pandemics. *Chemosphere* [Internet] 2023;313:137361. doi: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.137361>doi: 10.1016/j.chemosphere.2022.137361
65. Sanchez F, Barboza LA, Burton D, Cintrón-Arias A. Comparative analysis of dengue versus chikungunya outbreaks in Costa Rica. *Ric. di Mat.* [Internet] 2018;67:163–74. doi: <https://doi.org/10.1007/s11587-018-0362-3>doi: 10.1007/s11587-018-0362-3
66. Shepard DS, Coudeville L, Halasa YA, Zambrano B, Dayan GH. Economic impact of dengue illness in the Americas. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2011;84:200–7. doi: 10.4269/ajtmh.2011.10-0503
67. Sarti E, L’Azou M, Mercado M, Kuri P, Siqueira JB, Solis E, et al. A comparative study on active and passive epidemiological surveillance for dengue in five countries of Latin America. *Int. J. Infect. Dis.* 2016;44:44–9. doi: 10.1016/j.ijid.2016.01.015

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo demonstrou que metodologia baseada em águas residuárias é uma ferramenta promissora na detecção de patógenos que acometem a saúde das populações humanas. A partir do trabalho desenvolvido foi possível monitorar os casos de infecção por SARS-CoV-2 e arboviroses como DENV, ZIKV e CHIKV a partir de amostras de águas residuárias da maior estação de tratamento de esgoto Dr. Hélio de Seixo Britto, na cidade de Goiânia, Goiás, Brasil. Além disso, o trabalho desenvolveu um aplicativo *web* de fácil utilização para lidar com o alto número de dados moleculares disponíveis nas metodologias de águas residuárias, automatizando assim a predição do número de pessoas infectadas, auxiliando as autoridades em saúde no trato dos surtos destes patógenos. A partir do uso combinado da metodologia baseada em águas residuárias e do aplicativo *web*, também é possível monitorar em tempo real os casos de infecção destes patógenos, quando utilizado continuamente com os laboratórios que trabalham com esta metodologia e os órgãos de saúde, tornando os dados epidemiológicos mais robustos e precisos. Por fim, são necessários estudos futuros para uma maior padronização desta metodologia, objetivando elucidar com maior entendimento as lacunas e incertezas que ainda dificultam o seu uso em larga escala.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abushouk AI, Negida A, Ahmed H (2016) An updated review of Zika virus. *J Clin Virol* 84:53–58. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2016.09.012>
- Acosta-Ampudia Y, Monsalve DM, Rodríguez Y, et al (2018) Mayaro: an emerging viral threat? *Emerg Microbes Infect* 7:1–11. <https://doi.org/10.1038/s41426-018-0163-5>
- Adhikari S, Halden RU (2022) Opportunities and limits of wastewater-based epidemiology for tracking global health and attainment of UN sustainable development goals. *Environ. Int.* 163:107217
- Ahmed W, Angel N, Edson J, et al (2020a) First confirmed detection of SARS-CoV-2 in untreated wastewater in Australia: A proof of concept for the wastewater surveillance of COVID-19 in the community. *Sci Total Environ* 728:1–8. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.138764>
- Ahmed W, Angel N, Edson J, et al (2020b) First confirmed detection of SARS-CoV-2 in untreated wastewater in Australia: A proof of concept for the wastewater surveillance of COVID-19 in the community. *Sci Total Environ* 728:1–8
- Ahmed W, Bertsch PM, Bivins A, et al (2020c) Comparison of virus concentration methods for the RT-qPCR-based recovery of murine hepatitis virus, a surrogate for SARS-CoV-2 from untreated wastewater. *Sci Total Environ* 739:1–9
- Ahmed W, Tschärke B, Bertsch PM, et al (2021) SARS-CoV-2 RNA monitoring in wastewater as a potential early warning system for COVID-19 transmission in the community: A temporal case study. *Sci Total Environ* 761:144216. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.144216>
- Ali A, Vijayan R (2020) Dynamics of the ACE2 – SARS - CoV - 2 / SARS - CoV spike protein interface reveal unique mechanisms. *Sci Rep* 14214. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-71188-3>
- Amoatey P, Sicard P, De Marco A, Khaniabadi YO (2020) Long-term exposure to ambient PM_{2.5} and impacts on health in Rome, Italy. *Clin Epidemiol Glob Heal* 8:531–535. <https://doi.org/10.1016/j.cegh.2019.11.009>
- Asghar H, Diop OM, Weldegebriel G, et al (2014) Environmental Surveillance for Polioviruses in the Global Polio Eradication Initiative. *J Infect Dis* 210:S294-303. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiu384>
- Bai C, Zhong Q, Gao GF (2022) Overview of SARS-CoV-2 genome-encoded proteins. *Sci China Life Sci* 65:280–294
- Barril PA, Pianciola LA, Mazzeo M, et al (2021) Evaluation of viral concentration methods for SARS-CoV-2 recovery from wastewaters. *Sci Total Environ* 756:1–7
- Bedi JS, Vijay D, Dhaka P, et al (2021) Emergency preparedness for public health threats , surveillance , modelling & forecasting. *Indian J Med Res* 287–298. <https://doi.org/10.4103/ijmr.IJMR>
- Bivins A, North D, Ahmad A, et al (2020) Wastewater-Based Epidemiology: Global

- Collaborative to Maximize Contributions in the Fight Against COVID-19. *Environ Sci Technol* 54:7754–7757. <https://doi.org/10.1021/acs.est.0c02388>
- Bo Y, Guo C, Lin C, et al (2021) Effectiveness of non-pharmaceutical interventions on COVID-19 transmission in 190 countries from 23 January to 13 April 2020. *Int J Infect Dis* 102:247–253. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2020.10.066>
- Brandt WE, McCown JM, Gentry MK, Russell PK (1982) Infection Enhancement of Dengue Type 2 Virus in the U-937 Human Monocyte Cell Line by Antibodies to Flavivirus Cross-Reactive Determinants. *Infect Immun* 36:1036–1041
- Braut V, Mallein, Rupprecht JF (2021) Group testing as a strategy for COVID-19 epidemiological monitoring and community surveillance. *PLoS Comput Biol* 17:1–25. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1008726>
- Brooks SK, Webster RK, Smith LE, et al (2020) The psychological impact of quarantine and how to reduce it: rapid review of the evidence. *Lancet* 395:912–920. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30460-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30460-8)
- Cao-Lormeau VM, Blake A, Mons S, et al (2016) Guillain-Barré Syndrome outbreak associated with Zika virus infection in French Polynesia: A case-control study. *Lancet* 387:1531–1539. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)00562-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)00562-6)
- Castelli F, Sulis G (2017) Migration and infectious diseases. *Clin Microbiol Infect* 23:283–289. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2017.03.012>
- CDC (2012) Morbidity and Mortality Weekly Report (MMWR). *Glob. Heal. Surveill.* 15–19
- Cervantes-Avilés P, Moreno-Andrade I, Carrillo-Reyes J (2021) Approaches applied to detect SARS-CoV-2 in wastewater and perspectives post-COVID-19. *J Water Process Eng* 40:10. <https://doi.org/10.1016/j.jwpe.2021.101947>
- Chandra F, Lee WL, Armas F, et al (2021) Persistence of Dengue (Serotypes 2 and 3), Zika, Yellow Fever, and Murine Hepatitis Virus RNA in Untreated Wastewater. *Environ Sci Technol* 8:785–791. <https://doi.org/10.1021/acs.estlett.1c00517>
- Chen LH, Wilson ME (2004) Transmission of Dengue Virus without a Mosquito Vector: Nosocomial Mucocutaneous Transmission and Other Routes of Transmission. *Clin Infect Dis* 39:e56–e60. <https://doi.org/10.1086/423807>
- Choi PM, Tschärke BJ, Donner E, et al (2018) Wastewater-based epidemiology biomarkers: Past, present and future. *TrAC - Trends Anal Chem* 105:453–469. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2018.06.004>
- Ciannella S, González-fernández C, Gomez-pastora J (2023) Recent progress on wastewater-based epidemiology for COVID-19 surveillance : A systematic review of analytical procedures and epidemiological modeling. *Sci Total Environ* 878:162953. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.162953>
- Coccia M (2021a) High health expenditures and low exposure of population to air pollution as critical factors that can reduce fatality rate in COVID-19 pandemic crisis: a global analysis. *Environ Res* 199:111339. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2021.111339>
- Coccia M (2021b) Effects of the spread of COVID-19 on public health of polluted cities:

- results of the first wave for explaining the déjà vu in the second wave of COVID-19 pandemic and epidemics of future vital agents. *Environ Sci Pollut Res* 28:19147–19154. <https://doi.org/10.1007/s11356-020-11662-7>
- Coccia M (2020) How (Un)sustainable environments are related to the diffusion of covid-19: The relation between coronavirus disease 2019, air pollution, wind resource and energy. *Sustain* 12:1–12. <https://doi.org/10.3390/su12229709>
- Coccia M (2021c) The relation between length of lockdown, numbers of infected people and deaths of Covid-19, and economic growth of countries: Lessons learned to cope with future pandemics similar to Covid-19 and to constrain the deterioration of economic system. *Sci Total Environ* 775:145801. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.145801>
- Conway MJ, Colpitts TM, Fikrig E (2014) Role of the Vector in Arbovirus Transmission. *Annu Rev Virol* 1:71–88. <https://doi.org/10.1146/annurev-virology-031413-085513>
- Crank K, Chen W, Bivins A, et al (2022) Contribution of SARS-CoV-2 RNA shedding routes to RNA loads in wastewater. *Sci Total Environ* 806:150376. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.150376>
- Cui G, Si L, Wang Y, et al (2021) Antibody-dependent enhancement (ADE) of dengue virus: Identification of the key amino acid that is vital in DENV vaccine research. *J Gene Med* 23:1–15. <https://doi.org/10.1002/jgm.3297>
- da Silva SJR (2021) arrumei a citacao. 12:2020–2022. <https://doi.org/10.1016/j.onehlt.2020.100205>
- de Curcio JS, Salem-Izacc SiM, Neto LMP, et al (2022) Detection of Mayaro virus in *Aedes aegypti* mosquitoes circulating in Goiânia-Goiás-Bazil. *Microbes Infect* 24:104948. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2022.104948>
- De Maria A, Varese P, Dentone C, et al (2020) High prevalence of olfactory and taste disorder during SARS - CoV - 2 infection in outpatients. *J M* 92:2310–2311. <https://doi.org/10.1002/jmv.25995>
- de Sousa ARV, do Carmo Silva L, de Curcio JS, et al (2022) “pySewage”: a hybrid approach to predict the number of SARS-CoV-2-infected people from wastewater in Brazil. *Environ Sci Pollut Res*. <https://doi.org/10.1007/s11356-022-20609-z>
- Duffy MR, Chen T-H, Hancock WT, et al (2009) Zika Virus Outbreak on Yap Island, Federated States of Micronesia. *N Engl J Med* 360:2536–2543
- Dulgheroff ACB, Vieira LC, Costa LTF, et al (2015) Zika Vírus: O Estado da Arte. *Rev Científica do ITPAC* 9:34–41
- Eppes C, Rac M, Dunn J, et al (2017) Testing for Zika Virus (ZIKV) Infection in Pregnancy: Key Concepts to Deal with an Emerging Epidemic. *Am J Obstet Gynecol* 3:209–225. <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2017.01.020>
- Esakandari H, Nabi-afjadi M, Fakkari-afjadi J, et al (2020) A comprehensive review of COVID-19 characteristics. *Biol Proced Online* 2:1–10
- Folasole A (2023) DATA ANALYTICS AND PREDICTIVE MODELLING APPROACHES FOR IDENTIFYING EMERGING ZOONOTIC INFECTIOUS

DISEASES: SURVEILLANCE TECHNIQUES, PREDICTION ACCURACY, AND PUBLIC HEALTH IMPLICATIONS. *Int J Eng Technol Res Manag* 07:292–306

- Fongaro G, Hermes P, Sobral D, et al (2021) The presence of SARS-CoV-2 RNA in human sewage in Santa Catarina, Brazil, November 2019. *Sci Total Environ* 778:146198. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.146198>
- Franklinos LHV, Jones KE, Redding DW, Abubakar I (2019) The effect of global change on mosquito-borne disease. *Lancet Infect Dis* 19:e302–e312. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(19\)30161-6](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(19)30161-6)
- Gould E, Pettersson J, Higgs S, et al (2017) Emerging arboviruses : Why today ? *One Heal* 4:1–13. <https://doi.org/10.1016/j.onehlt.2017.06.001>
- Graham Carlos W, Dela Cruz CS, Cao B, et al (2020) Novel Wuhan (2019-NCoV) coronavirus. *Am J Respir Crit Care Med* 201:P7–P8. <https://doi.org/10.1164/rccm.2014P7>
- Gubler DJ (2002) The Global Emergence/Resurgence of Arboviral Diseases As Public Health Problems. *Arch Med Res* 33:330–342. [https://doi.org/10.1016/S0188-4409\(02\)00378-8](https://doi.org/10.1016/S0188-4409(02)00378-8)
- Gubler DJ (1998) Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever. *Clin Microbiol Rev* 11:480–496
- Gubler DJ (1997) Epidemic Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever: a Global Public Health Problem in the 21st Century. In: *Dengue Bulletin*. pp 1–14
- Gulati S, Maheshwari A (2012) Dengue fever-like illnesses: How different are they from each other? *Scand J Infect Dis* 44:522–530. <https://doi.org/10.3109/00365548.2012.669044>
- Gupta S, Parker J, Smits S, et al (2020) Persistent viral shedding of SARS-CoV-2 in faeces – a rapid review. *Color Dis* 22:611–620. <https://doi.org/10.1111/codi.15138>
- Gushulak BD, Macpherson DW (2004) Globalization of Infectious Diseases : The Impact of Migration. *Clin Infect Dis* 38:1742-
- Gyurech D, Schilling J, Schmidt-Chanasit J, et al (2016) False positive dengue NS1 antigen test in a traveller with an acute Zika virus infection imported into Switzerland. *Swiss Med Wkly* 146:1–3. <https://doi.org/10.4414/smw.2016.14296>
- Hao X, Chen J, Xu M, et al (2022) Separation and purification of enveloped and non-enveloped viruses from water samples using an aqueous two-phase system. *Process Biochem* 119:58–67. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.procbio.2022.05.014>
- Henriques TB, Cassini ST, de Pinho Keller R (2023) Contribution of wastewater-based epidemiology to SARS-CoV-2 screening in Brazil and the United States. *J Water Health* 21:343–353. <https://doi.org/10.2166/wh.2023.260>
- Hernandez R, Brown DT, Paredes A (2014) Structural Differences Observed in Arboviruses of the Alphavirus and Flavivirus Genera. 2014:2–19. <https://doi.org/10.1155/2014/259382>
- Hewitt J, Trowsdale S, Armstrong BA, et al (2022) Sensitivity of wastewater-based epidemiology for detection of SARS-CoV-2 RNA in a low prevalence setting.

- Water Res 211:118032. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2021.118032>
- Iezadi S, Id KG, Azami-aghdash S, Ghiasi A (2021) Effectiveness of non-pharmaceutical public health interventions against COVID-19: A systematic review and meta-analysis. *PLoS One* 1–19. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0260371>
- Jones DL, Baluja MQ, Graham DW, et al (2020) Shedding of SARS-CoV-2 in feces and urine and its potential role in person-to-person transmission and the environment-based spread of COVID-19. *Sci Total Environ* 749:1–17. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.141364>
- Jose J, Kuhn RJ (2009) A structural and functional perspective of alphavirus replication and assembly. *Future Microbiol* 4:1–30. <https://doi.org/10.2217/fmb.09.59.A>
- Kelly-cirino CD, Nkengasong J, Kettler H, et al (2019) Importance of diagnostics in epidemic and pandemic preparedness. *BMJ Glob Heal* 4:1–8. <https://doi.org/10.1136/bmjgh-2018-001179>
- Koyama T, Parida L (2020) Variant analysis of SARS-CoV-2 genomes. *Bull World Heal Organization* 2:495–504
- Kulkarni R (2020) Antibody-Dependent Enhancement of Viral Infections. In: Bramhachari PV (ed) *Dynamics of Immune Activation in Viral Diseases*. Springer Singapore, Singapore, pp 9–41
- Labeaud AD (2008) Why Arboviruses Can Be Neglected Tropical Diseases. *PLoS Negl Trop Dis* 2:e247. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000247>
- Lalle E, Colavita F, Iannetta M, et al (2018) Prolonged detection of dengue virus RNA in the semen of a man returning from Thailand to Italy, January 2018. *Eurosurveillance* 23:1–3. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2018.23.18.18-00197>
- Larsen DA, Wigginton KR (2020) Tracking COVID-19 with wastewater. *Nat Biotechnol* 38:1151–1153. <https://doi.org/10.1038/s41587-020-0690-1>
- Lee WL, Gu X, Armas F, et al (2022) Monitoring human arboviral diseases through wastewater surveillance: Challenges, progress and future opportunities. *Water Res*. 223:118904
- Lewis GD, Metcalf TG (1988) Polyethylene glycol precipitation for recovery of pathogenic viruses, including hepatitis A virus and human rotavirus, from oyster, water, and sediment samples. *Appl Environ Microbiol* 54:1983–1988. <https://doi.org/10.1128/aem.54.8.1983-1988.1988>
- Li C, Deng Y-Q, Zu S, et al (2018) Zika virus shedding in the stool and infection through the anorectal mucosa in mice. *Emerg Infect Dis* 7:2–10
- Lu R, Zhao X, Li J, et al (2020) Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding. *Lancet* 395:565–574. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30251-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30251-8)
- Mao K, Zhang H, Pan Y, Yang Z (2021) Biosensors for wastewater-based epidemiology for monitoring public health. *Water Res* 191:. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2020.116787>

- Markosian C, Mirzoyan N (2019) Wastewater-based epidemiology as a novel assessment approach for population-level metal exposure. *Sci Total Environ* 689:1125–1132. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.06.419>
- McCarthy M (2016) US health officials investigate sexually transmitted Zika virus infections. *Br Med J* 352:1–1. <https://doi.org/10.1136/bmj.i1180>
- Mercatelli D, Holding AN, Giorgi FM (2021a) Web tools to fight pandemics: the COVID-19 experience. *Brief Bioinform* 22:690–700
- Mercatelli D, Triboli L, Fornasari E, et al (2021b) Coronapp: A web application to annotate and monitor SARS-CoV-2 mutations. *J Med Virol* 93:3238–3245
- Meyerowitz EA, Richterman A, Gandhi RT, Sax PE (2021) Transmission of SARS-CoV-2: A Review of Viral, Host, and Environmental Factors. *Ann Intern Med* 174:69–79. <https://doi.org/10.7326/M20-5008>
- Michael-kordatou I, Karaolia P, Fatta-kassinou D (2020) Sewage analysis as a tool for the COVID-19 pandemic response and management: the urgent need for optimised protocols for SARS-CoV-2 detection and quantification. *J Environ Chem Eng* 8:104306. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jece.2020.104306>
- Milby KM, Atallah AN, Rocha-Filho CR, et al (2020) SARS-CoV-2 and arbovirus infection : a rapid systematic review. *Sao Paulo Med J* 138:498–504
- Milunovich GJ, Magalhães RJS, Hu W (2015) Role of big data in the early detection of Ebola and other emerging infectious diseases. *Lancet Glob Heal* 3:e20–e21. [https://doi.org/10.1016/S2214-109X\(14\)70356-0](https://doi.org/10.1016/S2214-109X(14)70356-0)
- Monteiro S, Rente D, Cunha M V, et al (2022) A wastewater-based epidemiology tool for COVID-19 surveillance in Portugal. *Sci Total Environ* 804:150264. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.150264>
- Mora C, McKenzie T, Gaw IM, et al (2022) Over half of known human pathogenic diseases can be aggravated by climate change. *Nat Clim Chang* 12:869–875. <https://doi.org/10.1038/s41558-022-01426-1>
- Mora C, Spirandelli D, Franklin EC, et al (2018) Broad threat to humanity from cumulative climate hazards intensified by greenhouse gas emissions. *Nat Clim Chang* 8:1062–1071. <https://doi.org/10.1038/s41558-018-0315-6>
- Mota CR, Bressani-Ribeiro T, Araújo JC, et al (2021) Assessing spatial distribution of COVID-19 prevalence in Brazil using decentralised sewage monitoring. *Water Res* 202:117388. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2021.117388>
- Musso D, Gubler DJ (2016) Zika Virus. *Clin Microbiol Infect* 11:1–3. <https://doi.org/10.1128/CMR.00072-15.Address>
- PAHO/WHO (2021) Epidemiological Update for Dengue, Chikungunya and Zika in 2021 - Annual Arbovirus Bulletin
- Perkins MD, Dye C, Balasegaram M, et al (2017) Diagnostic preparedness for infectious disease outbreaks. *Lancet* 390:11–14. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)31224-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)31224-2)
- Powell JR, Tabachnick WJ (2013) History of domestication and spread of *Aedes aegypti*--a review. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 108:11–17.

<https://doi.org/10.1590/0074-0276130395>

- Prado T, Fumian TM, Mannarino CF, et al (2020) Preliminary results of SARS-CoV-2 detection in sewerage system in niterói municipality, Rio de Janeiro, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 115:1–3. <https://doi.org/10.1590/0074-02760200196>
- Prado T, Fumian TM, Mannarino CF, et al (2021) Wastewater-based epidemiology as a useful tool to track SARS-CoV-2 and support public health policies at municipal level in Brazil. *Water Res* 191:116810. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2021.116810>
- Prado T, Rey-Benito G, Miagostovich MP, et al (2023) Wastewater-based epidemiology for preventing outbreaks and epidemics in Latin America – Lessons from the past and a look to the future. *Sci Total Environ* 865:. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.161210>
- Roos YH (2020) Water and Pathogenic Viruses Inactivation — Food Engineering Perspectives. *Food Eng Rev* 12:251–267
- Sato T, Ueha R, Goto T, et al (2021) Expression of ACE2 and TMPRSS2 Proteins in the Upper and Lower Aerodigestive Tracts of Rats: Implications on COVID 19 Infections. *Laryngoscope* 131:932–939. <https://doi.org/10.1002/lary.29132>
- Schmitz BW, Innes GK, Prasek SM, et al (2021) Enumerating asymptomatic COVID-19 cases and estimating SARS-CoV-2 fecal shedding rates via wastewater-based epidemiology. *Sci Total Environ* 801:149794. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.149794>
- Senanayake MP, Lamabadusuriya SP, Gunasena S, et al (2009) Vertical transmission in chikungunya infection. *Ceylon Med J* 54:47–50. <https://doi.org/10.4038/cmj.v54i2.865>
- Shen SH, Stauft CB, Gorbatshevych O, et al (2015) Large-scale recoding of an arbovirus genome to rebalance its insect versus mammalian preference. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112:4749–4754. <https://doi.org/10.1073/pnas.1502864112>
- Sherchan SP, Shahin S, Ward LM, et al (2020) First detection of SARS-CoV-2 RNA in wastewater in North America: A study in Louisiana, USA. *Sci Total Environ* 743:140621. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.140621>
- Silveira-Lacerda E de P, Laschuk Herlinger A, Tanuri A, et al (2021) Molecular epidemiological investigation of Mayaro virus in febrile patients from Goiania City, 2017–2018. *Infect Genet Evol* 95:. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2021.104981>
- Sims N, Kasprzyk-hordern B (2020) Future perspectives of wastewater-based epidemiology: Monitoring infectious disease spread and resistance to the community level. *Environ Int* 139:105689. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2020.105689>
- Tabachnick WJ (2016) Climate Change and the Arboviruses: Lessons from the Evolution of the Dengue and Yellow Fever Viruses. *Annu Rev Virol* 3:125–145. <https://doi.org/10.1146/annurev-virology-110615-035630>
- Torii S, Oishi W, Zhu Y, et al (2022) Comparison of five polyethylene glycol precipitation procedures for the RT-qPCR based recovery of murine hepatitis virus, bacteriophage phi6, and pepper mild mottle virus as a surrogate for SARS-

- CoV-2 from wastewater. *Sci Total Environ* 807:150722. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.150722>
- Tzenios N, Tazanios ME, Chahine M (2023) Better Strategies For Coronavirus (COVID-1). *Spec J Med Acad other Life Sci* 1:
- Van den Bossche D, Cnops L, Van Esbroeck M (2015) Recovery of dengue virus from urine samples by real-time RT-PCR. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 34:1361–1367. <https://doi.org/10.1007/s10096-015-2359-0>
- World Health Organization (2020a) WHO Director-General's opening remarks at the media briefing on COVID-19 - 11 March 2020. WHO Dir. Gen. speeches 4
- World Health Organization (2020b) COVID-19 Dashboard
- World Health Organization (2018) Managing epidemics
- Wu F, Zhang J, Xiao A, et al (2020a) SARS-CoV-2 Titers in Wastewater Are Higher than Expected from Clinically Confirmed Cases. *mSystems* 5:1–9. <https://doi.org/https://doi.org/10.1128/mSystems.00614-20>
- Wu F, Zhao S, Yu B, et al (2020b) A new coronavirus associated with human respiratory disease in China. *Nature* 579:265–269. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2008-3>
- Wu Y, Guo C, Tang L, et al (2020c) Prolonged presence of SARS-CoV-2 viral RNA in faecal samples. *Lancet Gastroenterol Hepatol* 5:1–2. [https://doi.org/10.1016/S2468-1253\(20\)30083-2](https://doi.org/10.1016/S2468-1253(20)30083-2)
- Yan G, Lee CK, Lam LTM, et al (2020) Covert COVID-19 and false-positive dengue serology in Singapore. *Lancet Infect. Dis.* 20:536
- Ye Y, Ellenberg RM, Graham KE, Wigginton KR (2016) Survivability, Partitioning, and Recovery of Enveloped Viruses in Untreated Municipal Wastewater. *Environ Sci Technol* 50:5077–5085. <https://doi.org/10.1021/acs.est.6b00876>
- Zuccato E, Chiabrando C, Castiglioni S, et al (2005) Cocaine in surface waters: A new evidence-based tool to monitor community drug abuse. *Environ Heal A Glob Access Sci Source* 4:1–7. <https://doi.org/10.1186/1476-069X-4-14>
- Zuo T, Liu Q, Zhang F, et al (2021) Depicting SARS-CoV-2 faecal viral activity in association with gut microbiota composition in patients with COVID-19. *Gut* 70:276–284. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2020-322294>

ANEXOS

Participações e Apresentações em Congressos, Palestras e Monitorias

- 1- Certificamos que **ADRIANO ROBERTO VIEIRA DE SOUSA** participou do Simpósio Ciência, Arte e Educação em tempos de pandemia, realizado pelas instituições públicas de ensino superior do estado de Goiás, de 8 a 16 de junho de 2020, total de 12 horas. Goiânia, 16 de junho de 2020.
- 2- Certificamos que **ADRIANO ROBERTO VIEIRA DE SOUSA** participou como ouvinte no 17o CONPEEX - Congresso de Pesquisa, Ensino e Extensão, no período de 19 a 23 de outubro de 2020, promovido pela Universidade Federal de Goiás, Regional Goiânia, no total de 30 horas.
- 3- Certificamos que, o(a) Discente **ADRIANO ROBERTO VIEIRA DE SOUSA**, MATRÍCULA 2019100764, participou da Ação de Extensão I SEMINÁRIO COEX: OS DESAFIOS DA EXTENSÃO UNIVERSITÁRIA A PARTIR DA COVID-19, com carga horária de 10 hora(s), coordenada pelo(a) Professor(a) FLAVIA MARIA CRUVINEL, promovida pelo(a) PRO REITORIA DE EXTENSAO E CULTURA, na função de Monitor, totalizando 10 hora(s) no período de 13 de Junho de 2020 a 15 de Junho de 2020. Goiânia, 22 de Dezembro de 2020.
- 4- DETECÇÃO DE SARS-COV-2 EM ÁGUAS RESIDUÁRIAS COMO FERRAMENTA DE PREDIÇÃO DE INFECTADOS DE UMA CAPITAL DA REGIÃO CENTRO-OESTE DO BRASIL dos autores: **ADRIANO ROBERTO VIEIRA DE SOUSA**; LÍVIA DO CARMO SILVA; JULIANA SANTANA DE CURCIO; HUGO DELLEON; CARLOS EDUARDO ANUNCIAÇÃO; SILVIA MARIA SALÉM IZACC FURLANETO; OLIMPIO SANCHES NETO; GISLAINE FONGARO; , ELISÂNGELA DE PAULA SILVEIRA LACERDA, foi apresentado na modalidade Pôster Impresso (Físico), no evento XXII Congresso Brasileiro de Infectologia ocorrido de 14 a 17 de dezembro de 2021, no Centro de Convenções de Goiânia em Goiânia/GO. 17 de dezembro de 2021.
- 5- We certify that **ADRIANO ROBERTO VIEIRA DE SOUSA** presented the lecture "Detection of SARS-CoV-2 in wastewater as a tool for predicting infected people in a capital in the Midwest region of Brazil" in the International Symposium on Biological Sciences (November 3rd to 5th, 2021), promoted by the Graduate Program in Biological Sciences of the Federal University of Goiás, Goiânia, Goiás.

6- “pySewage”: a hybrid approach to predict the number of SARS-CoV-2 infected people from wastewater in Brazil” ministrada no primeiro semestre de 2022 na disciplina Temas em Ciências Biológicas do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Goiás.

7- Certificamos que o trabalho intitulado "pySewage": a hybrid approach to predict the number of SARS-CoV-2 infected people from wastewater in Brazil, de autoria de **Adriano Roberto Vieira de Sousa**; Livia Do Carmo Silva ; Juliana Santana de Curcio; Hugo Delleon; Carlos Eduardo Anunciação; Silvia Maria Salem Izacc; Flavio Olimpio Sanches Neto; Elisângela de Paula Silveira Lacerda foi apresentado durante o GENÉTICA 2022, evento técnico-científico promovido pela Sociedade Brasileira de Genética na cidade de Natal - RN durante o período de 12 a 15 de setembro de 2022.

8- Apresentação oral em língua inglesa do trabalho “pySewage”: a hybrid approach to predict the number of SARS-CoV-2-infected people from wastewater in Brazil, **Adriano Roberto Vieira de Sousa**. Goiânia 10 de novembro de 2022.

9- Desenvolvedor do web aplicativo pySewage: <https://www.pysewage.com.br>

Trabalhos Não Relacionados com a Tese

1- Título: The presence of antibiotics and multidrug-resistant *Staphylococcus aureus* reservoir in a low-order stream spring in central Brazil

Autores Igor Romeiro Dos Santos, Isabela Náthaly Machado da Silva, Jerônimo Raimundo de Oliveira Neto, Naiara Raica Lopes de Oliveira, Adriano Roberto Vieira de Sousa, Anielly Monteiro de Melo, Joelma Abadia Marciano de Paula, Cátia Lira do Amaral, Elisângela de Paula Silveira-Lacerda, Luiz Carlos da Cunha, Elisa Flávia Luiz Cardoso Bailão

Data de publicação 2023/4/22

Publicações Brazilian Journal of Microbiology

Páginas 1-11

Editora Springer International Publishing

2- Título: Diagnostic performance of the bioline dengue duo rapid test on symptomatic patients assisted at Armed Forces Hospital (Hfa) in Brasília, Brazil

Autores Leani Falcão Gomes, Júlia Viegas Mundim, Lívia do Carmo Silva, Juliana Santana de Curcio, **Adriano Roberto Vieira de Sousa**, Marco Tulio Garcia-Zapata, Carlos Eduardo Anunciação, Juliana Ramos do Carmo, Elisângela de Paula Silveira-Lacerda

Data de publicação 2024/5/6

Publicações Brazilian Journal of Microbiology

Brazilian Journal of Microbiology

Páginas 1-9

Editora Springer International Publishing

3- Título: Molecular detection of multiple arboviruses in the city of Goiânia-Goiás-Brazil

Autores: Jordana Farias Correa, Silvia Maria Salem-Izacc, **Adriano Roberto Vieira de Sousa**, Elisângela Gomes da Silva, Gabrielly Regis Abrantes, Hugo Delleon da Silva, Marina Machado Santos, Juliana Pires Ribeiro, Marco Túlio Garcia-Zapata, Natália Santana do Nascimento, Carlos Eduardo Anunciação, Sandra Maria Brunini, Elisângela de Paula Silveira Lacerda

Data de publicação: aprovado para publicação em 2024/4/1

Journal of the Brazilian Society of Tropical Medicine

Aulas ministradas na Pós Graduação da Universidade Estadual de Goiás

- 1- “Uso da técnica de q-RTPCR no estudo da toxicidade”, ministrada no dia 26 de novembro de 2021 junto a disciplina de Ecotoxicologia do Programa de Pós-Graduação em Recursos Naturais do Cerrado na Universidade Estadual de Goiás.
- 2- “Técnicas de PCR Convencional e em Tempo Real”, aula ministrada no dia 09 de setembro de 2022 junto a disciplina de Ecotoxicologia do Programa de Pós-Graduação em Recursos Naturais do Cerrado na Universidade Estadual de Goiás.
- 3- “Aula prática de PCR em Tempo Real na detecção de SARS-CoV-2 utilizando o kit molecular KIT MOLECULAR SARS-CoV-2 (EDx) – Biomanguinhos”, ministrada junto a disciplina de Ferramentas Moleculares no dia 10 de abril de 2023, na Universidade Estadual de Goiás, Programa de Pós-Graduação em Recursos Naturais do Cerrado.

- 4- “Aula prática de extração de ácidos nucleicos e PCR convencional na detecção de dois genes NUC e mecA de *Staphylococcus aureus*”, ministrada junto a disciplina de Ferramentas Moleculares no dia 10 de maio de 2023, na Universidade Estadual de Goiás, Programa de Pós-Graduação em Recursos Naturais do Cerrado.
- 5- Aula prática de PCR em Tempo Real na detecção de SARS-CoV-2 utilizando o kit molecular KIT MOLECULAR SARS-CoV-2 (EDx) – Biomanguinhos”, ministrada junto a disciplina de Ferramentas Moleculares no dia 01 de abril de 2024, na Universidade Estadual de Goiás, Programa de Pós-Graduação em Recursos Naturais do Cerrado.

Demais ações e atividades

- 1- Pesquisador convidado do projeto “Monitoramento de *Staphylococcus aureus* resistentes a metilina (MRSA) em matrizes ambientais e biológicas” submetida na Chamada CNPq/MCTI/CT-Saúde Nº 52/2022 - Ações em Ciência, Tecnologia e Inovação para o enfrentamento da Resistência Antimicrobiana (RAM).
- 2- Certificamos que Adriano Roberto Vieira de Sousa participou do minicurso FUNDAMENTOS E MÉTODOS PARA O ESTUDO DA EXPRESSÃO GENICA EM BACTÉRIAS, durante a GENÉTICA 2022, evento técnico-científico promovido pela Sociedade Brasileira de Genética na cidade de Natal - RN durante o período de 12 a 15 de setembro de 2022 com carga horária de 3 horas.
- 3- Comissão de Organização do Congresso: IX EEPEX – Ciência no Campus Central da Universidade Estadual de Goiás – 9 de maio de 2023 das 8h às 21h.
- 4- Desenvolvedor e Administrador do site do Laboratório de Biotecnologia (LaBiotec) da Universidade Estadual de Goiás:
<https://sites.google.com/ueg.br/labiotec>
- 5- Servidor Efetivo – Técnico do Laboratório de Biotecnologia (LaBiotec) da Universidade Estadual de Goiás – início 01 de março de 2021 até a presente data
- 6- Tutor de 05 discentes bolsistas desenvolvimento institucional da Universidade Estadual de Goiás - período setembro de 2023 a agosto de 2024.