

Universidade do Grande Rio “Prof. José de Souza Herdy”

UNIGRANRIO

MANUELA ALVES BATISTA

**MONITORAMENTO DE SARS-COV-2 E VARIANTES VIRAIS EM ÁGUAS
RESIDUAIS DA SUB-BACIA DO CANAL DO CUNHA, RIO DE JANEIRO: UM
MODELO DE VIGILÂNCIA AMBIENTAL EM TERRITÓRIOS COM ALTA
CONCENTRAÇÃO DE AGLOMERADOS SUBNORMAIS E SANEAMENTO
PRECÁRIO**

RIO DE JANEIRO

2023

Universidade do Grande Rio “Prof. José de Souza Herdy”

UNIGRANRIO

MANUELA ALVES BATISTA

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Universidade do Grande Rio “Prof. José de Souza Herdy”, como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharel em Biomedicina.

Orientador: Maria de Lourdes Aguiar Oliveira

Coorientador: Renan da Silva Faustino

RIO DE JANEIRO

2023

MANUELA ALVES BATISTA

MONITORAMENTO DE SARS-COV-2 E VARIANTES VIRAIS EM ÁGUAS RESIDUAIS DA SUB-BACIA DO CANAL DO CUNHA, RIO DE JANEIRO: UM MODELO DE VIGILÂNCIA AMBIENTAL EM TERRITÓRIOS COM ALTA CONCENTRAÇÃO DE AGLOMERADOS SUBNORMAIS E SANEAMENTO PRECÁRIO

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Universidade do Grande Rio “Prof. José de Souza Herdy”, como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharel em Biomedicina.

Orientador: Maria de Lourdes Aguiar Oliveira

Coorientador: Renan da Silva Faustino

Aprovada em:

BARRA DA TIJUCA, _____ de _____ de 2023.

BANCA EXAMINADORA

Dra. Maria de Lourdes Aguiar Oliveira (orientadora)

Giselle Aparecida Fagundes Silva

Dra. Natasha Berendonk Handam

M.Sc. Renan da Silva Faustino (Suplente)

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) e ao PIBIC, pela oportunidade e suporte que foram fundamentais para o desenvolvimento da pesquisa que possibilitou a realização deste trabalho. Também quero agradecer à Universidade Unigranrio e a todo o corpo docente do curso de biomedicina pelo conhecimento oferecido.

Gostaria de agradecer aos meus familiares que até aqui acompanharam minha evolução acadêmica, em especial a meus pais, Kátia Valéria Alves Rezende e Manoel Batista, por proporcionarem, financeiramente, o sonho da graduação. A minha avó Cremilda Alves Rezende e a tia Luciana Alves do Nascimento por me apoiarem, ao meu irmão Arthur Alves Batista, que compreendia minhas angústias e me acolhia em momentos difíceis.

Ao laboratório LVRE, especialmente ao grupo “Águas”, sou grata pela confiança depositada para integrar esse projeto. A minha orientadora Maria de Lourdes, por ser fonte de inspiração e sabedoria. Ao meu coorientador Renan Faustino, sou grata por sempre estar presente para indicar a direção correta e por ter paciência para me instruir, e aos meus amigos de laboratório, Eric Gama, Lara Corrêa e Lisa de Carvalho por me manterem motivada durante todo o processo. A minha melhor amiga Lívia Lamour, quem na maioria das vezes ouvia meus desabafos, segurava a barra para me manter psicologicamente firme e aconselhava a seguir o melhor caminho.

Por fim, aos inúmeros amigos que passaram nessa longa jornada acadêmica, e aos que permaneceram até o fim.

À todos, muito obrigada!

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Pontos amostrais na Sub-Bacia do Canal do Cunha, Rio de Janeiro Agosto de 2020 a fevereiro de 2023.	11
Figura 2. Pontos amostrais na Sub-Bacia do Canal do Cunha, Rio de Janeiro Agosto de 2020 a fevereiro de 2023.	11
Figura 3. Comparação entre a concentração dos genes alvos N1 e N2 das amostras da SBCC entre agosto 2020 e fevereiro 2023	16
Figura 4 Detecção de SARS-CoV-2 VOCs em águas residuais. Sub-Bacia do Canal do Cunha, Rio de Janeiro. Agosto de 2020 a maio de 2022.....	17
Figura 5 Detecção de SARS-CoV-2 em águas residuais de acordo com a data de coleta. Sub-Bacia do Canal do Cunha, Rio de Janeiro. Ago 2020-fev 2023.....	18
Figura 6. Detecção de SARS-CoV-2 VOCs em águas residuais. Sub-Bacia do Canal do Cunha, Rio de Janeiro e distribuição de variantes do SARS-CoV-2 no Rio de Janeiro, segundo os dados da Rede Genômica Fiocruz. Agosto de 2020 a maio de 2022.	189
Figura 7 Detecção de SARS-CoV-2 VOCs em águas residuais. Sub-Bacia do Canal do Cunha, Rio de Janeiro. Agosto de 2020 a maio de 2022.	19

Sumário

1. INTRODUÇÃO	8
2. METODOLOGIA	10
2.1. Amostras ambientais	10
2.2. Concentração viral	12
2.3. Extração de ácidos nucleicos	13
2.4. Detecção molecular de SARS-CoV-2 e BRSV (controle)	13
2.5. Pesquisa de Variantes de Preocupação (VOCs) do SARS-CoV-2 por RT-PCR em tempo real	13
2.6. Bases de dados consultadas	14
2.6.1. DADOS EPIDEMIOLÓGICOS	14
2.6.2. DADOS GENÔMICOS	14
2.7. CEP	14
3. RESULTADOS	15
3.1. Detecção e quantificação de SARS-CoV-2 em águas superficiais e residuais da Sub-Bacia do Canal do Cunha, Rio de Janeiro	15
3.2. Monitoramento de variantes de interesse/preocupação do SARS-CoV-2	18
4. DISCUSSÃO	21
5. CONCLUSÃO	23

MONITORAMENTO DE SARS-COV-2 E VARIANTES VIRAIS EM ÁGUAS RESIDUAIS DA SUB-BACIA DO CANAL DO CUNHA, RIO DE JANEIRO: UM MODELO DE VIGILÂNCIA AMBIENTAL EM TERRITÓRIOS COM ALTA CONCENTRAÇÃO DE AGLOMERADOS SUBNORMAIS E SANEAMENTO PRECÁRIO

Manuela Alves Batista¹

Maria de Lourdes Aguiar Oliveira²

Renan da Silva Faustino³

RESUMO

A epidemiologia baseada em esgoto constitui uma abordagem populacional, estratégica como sistema de alerta para o aumento da incidência da COVID-19. Entretanto, ainda há desafios em sua adoção no contexto da vigilância em saúde, especialmente nos territórios sem sistema de esgotamento sanitário. O presente estudo objetiva o monitoramento de SARS-CoV-2 (SC2) em águas residuais da Sub-Bacia do Canal do Cunha (SBCC), RJ - área com o maior número de aglomerados subnormais do município. Trata-se de estudo transversal, compreendendo 6 pontos da SBCC (N=228), coletadas de agosto de 2020 a fevereiro de 2023. A concentração viral foi realizada por filtração em membrana eletronegativa, seguida de extração direta (kit AllPrep Power Viral DNA/RNA, Qiagen). O SC2 (N1) e a inferência de Variantes de Preocupação (VOCs) foram determinados por RT-PCR em tempo real utilizando kits produzidos por Bio-manguinhos. O RNA viral foi detectado em 76.0% das amostras ambientais, compatível com o cenário epidemiológico. Nos territórios estudados, o aumento da concentração viral em amostras ambientais sistematicamente precedeu em 1-2 semanas o aumento na incidência de casos de COVID-19, bem como a introdução de novas VOCs. Os achados evidenciam que, nas áreas com saneamento precário ou ausente, o monitoramento de SC2 em rios poluídos consiste em estratégia viável para a vigilância. Ainda, os achados em tela reiteram a relevância da vigilância ambiental enquanto sistema de alerta precoce, contribuindo para com a orientação de ações voltadas ao enfrentamento de surtos e epidemias.

Palavras-chave: COVID-19. SARS-CoV-2. Vigilância ambiental. Variantes virais de interesse/preocupação

ABSTRACT

The epidemiology based on wastewater constitute a population approach, strategy used as an alert system for COVID-19 increase incidence. Nevertheless, still have challenges to embrace it in the context of health surveillance, especially in territories where it doesn't have sewage system. The objective of the following study is monitoring SARS-CoV-2 (SC2) in wastewater from Canal do Cunha sub-basin (CCSB), Rio de Janeiro, area with most number of subnormal clusters. It is a transversal study with 6 sampling locations from CCSB (N=234), the samples were collected from august 2020 until February 2023. The viral concentration was realized on filtration electronegative membranes, following straight extraction (kit AllPrep Power Viral DNA/RNA, Qiagen). The SC2 (N1) and the inference of concern variants were (VOCs) determined by real time RT-PCR using kits produced by Bio-manguinhos. The viral RNA was detected on 76.0% of the environmental samples, compatible with the epidemiological scenario. In the studied territory, the increase viral concentration systematically precedes in 1-2 weeks the increase in reported COVID-19 cases and aligned to the introduction of new viral variants. Since wastewater monitoring consist on a valuable alert system, this course would add relevant knowledge on complementary analysis in the environmental context and geographical/temporal dispersion of SARS-CoV-2 VOCs, in order to tailor public health interventions

Keywords: COVID-19. SARS-CoV-2. Environmental surveillance. Variants of Concern

¹ Graduando(a) do curso de Biomedicina na Universidade do Grande Rio – UNIGRANRIO.

² Doutora em Biologia celular – Fiocruz

³ Mestre em Patologia - UFF

1. INTRODUÇÃO

O SARS-CoV-2, agente etiológico responsável pela pandemia corona vírus 2019 (COVID-19), é um vírus envelopado de RNA fita simples positivo pertencente à família *Coronaviridae* e gênero Betacoronavírus. Após a identificação dos primeiros casos de Wuhan em dezembro de 2019 (WU et al., 2020; ZHOU et al., 2020) o vírus se disseminou globalmente em poucos meses (CARROLL et al., 2021). O cenário epidemiológico varia entre diferentes países, segundo a fase epidêmica, a emergência de novas variantes virais e medidas de intervenção (KOELLE et al., 2022). Até o dia 08 de novembro de 2023, 771.820.175 de casos e 6.978.175 de óbitos foram reportados. No Brasil, foram mais de 38 milhões de casos e 707 mil óbitos cumulativos, com taxas de incidência e mortalidade por 100 mil habitantes da ordem de 18093,2 e 333,2, respectivamente (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2023).

O Rio de Janeiro foi um dos municípios mais afetados pela pandemia. Em 2022, foram confirmados 757.581.594 casos e 2808 óbitos. Nos 10 meses de 2023 foram confirmados 2,877,595 casos/100mil habitantes, sendo 77,635 óbitos por 100 mil habitantes. A taxa de incidência e mortalidade (por 100 mil) figuram como 16,667 e 450, sendo a taxa de letalidade de 2.70% (SVS RIO DE JANEIRO, 2023)

Desde o início da pandemia, foi possível observar diferentes picos epidêmicos (abril de 2020, final de 2020, março e agosto de 2021, janeiro de 2022, maio de 2022, outubro de 2022 e março de 2023) no município do Rio de Janeiro. Esses picos epidêmicos – que ocasionaram picos de internações, estiveram principalmente associados à circulação da variantes virais, Zeta, Gamma, Delta e Ômicron (SECRETARIA MUNICIPAL DE SAÚDE DO RIO DE JANEIRO, 2022; FIOCRUZ, 2023). No final de 2021, o cenário indicava o arrefecimento da epidemia com redução expressiva no número de novos casos nas últimas semanas epidemiológicas. Entretanto, um novo pico foi ocasionado pela entrada da variante Ômicron, e mesmo com a vacinação avançada, causou a explosão do número de novos casos no Rio de Janeiro, outros estados do Brasil (*Conselho nacional de secretários de saúde, 2021*) e vários países (SONI et al., 2022).

Até novembro de 2023 foram aplicadas no município do Rio de Janeiro um total de 20576.413 doses da vacina, entre doses de reforço e reforço bivalente. Contudo, a dinâmica do cenário epidemiológico destaca a necessidade de vigilância sistemática, ainda que nos períodos de redução de novos casos contínuo e sustentado, baixa taxa de

transmissibilidade e alta cobertura vacinal, como atualmente observado no Rio de Janeiro (SVS RIO DE JANEIRO, 2023)

O SARS-CoV-2 é capaz de infectar diferentes tecidos e pode causar de infecção assintomática à doença multisistêmica e óbito, com relevante impacto sobre os serviços de saúde (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2020b; CEBAN et al., 2022). O vírus têm quatro proteínas estruturais, denominadas proteínas S, envelope (E), membrana (M) e nucleocapsídeo (N), e uma dessas proteínas está associada a capacidade de infecção e escape imunológico: a proteína de superfície *Spike*, uma glicoproteína em forma de espícula que com afinidade substancial pela enzima conversora da angiotensina 2 (ECA2), expressa de forma abundante em células endoteliais de diversos órgãos e sistemas, facilitando a infecção sistêmica (SCHOLZ et al., 2020). Os fragmentos denominados N1 e N2, correspondem ao gene que codifica a proteína do nucleocapsídeo viral. O vírus é eliminado no excremento humano, posteriormente, despejado no esgotamento sanitário, e quando as condições são precárias de saneamento, o esgoto é lançado sem tratamento nos rios, contaminando o ambiente (YANG et al., 2023).

A epidemiologia baseada em esgoto tem sido usada com sucesso para a detecção e monitoramento de patógenos virais (OMS, 2003; LA ROSA et al., 2014; PREVOST et al., 2015; LA ROSA et al., 2020). Essa abordagem tem constituído um instrumento estratégico, agregando informações sobre a circulação viral, incluindo pré/pós-bloqueio e vacinação. Além de precoce, a concentração viral em águas residuais encontra-se associada ao aumento da incidência de COVID-19. Esses estudos revelaram alta taxa de detecção de RNA em diferentes matrizes, como esgoto, lodo e rios poluídos (AGUIAR-OLIVEIRA et al., 2020; MEDEMA et al., 2020). Uma investigação conduzida em Quito no Equador, evidenciou a detecção viral em rio urbano que recebe o lançamento direto de esgoto (GUERRERO-LATORRE et al., 2020). Achados semelhantes foram relatados na Itália (RIMOLDI et al., 2020) e Austrália (AHMED et al., 2020a). Esses resultados sugerem que rios poluídos podem ser uma fonte alternativa para vigilância ambiental – estratégia central nos locais onde o sistema de esgotamento sanitário é precário ou ausente, como observado em áreas do Rio de Janeiro.

A sub-bacia hidrográfica do Canal do Cunha (SBCC) faz parte da Bacia da Baía de Guanabara, com área estimada em 70,2km² e compreende 36 bairros e uma alta concentração de aglomerados subnormais (133 comunidades e 24 loteamentos

irregulares). A SBCC recolhe água de nascentes e rios que cruzam áreas densamente povoadas, o que também contribui para a contaminação dos rios através da descarga direta de esgoto não tratado e resíduos sólidos. Agravando o cenário, parte da população possui acesso limitado a testagem para COVID-19 e outros serviços médicos de qualidade.

O presente projeto justifica-se pela necessidade de implementação da vigilância baseada em esgoto como sistema de alerta precoce em áreas de vulnerabilidade socioeconômica. Essa abordagem populacional emerge como um sistema complementar a vigilância baseada em casos clínicos, com potencial para auxiliar as ações em saúde pública.

2. METODOLOGIA

2.1. Amostras ambientais

Trata-se de estudo transversal em amostras de água superficial contaminada do Rio de Janeiro, compreendendo 6 pontos da Sub Bacia do Canal do Cunha/RJ, coletados de agosto de 2020 a fevereiro de 2023 (**Figura 1 e 2**). As coordenadas dos pontos de coleta estão apresentadas na **Quadro 1**. Para cada ponto foram coletados 600 mL de amostras ambientais, em tubos estéril de fundo cônico de 50ml, identificados pelo ponto de coleta segundo a coordenada geográfica, número da coleta e data. 200 mL foram imediatamente submetidos à concentração viral e os demais tubos foram congelados a -80°C. Todo o procedimento foi realizado de acordo com o POP LVRS TA-001 “coleta de águas superficiais que recebem águas residuais”

Figura 1. Pontos amostrais na Sub-Bacia do Canal do Cunha, Rio de Janeiro Agosto de 2020 a fevereiro de 2023.

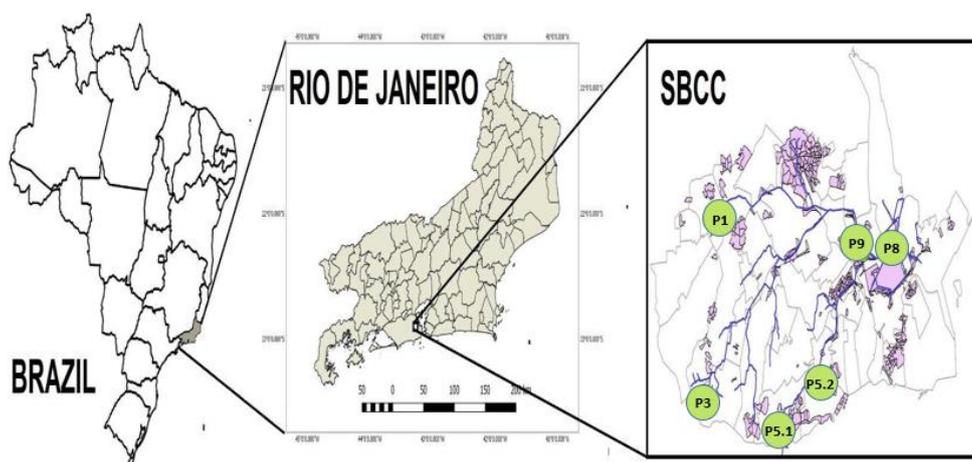


Figura 1.

Mapa do Brasil, do Estado do Rio de Janeiro e da sub-bacia do canal do Cunha na cidade do Rio de Janeiro.

Figura 2. Pontos amostrais na Sub-Bacia do Canal do Cunha, Rio de Janeiro Agosto de 2020 a fevereiro de 2023.



Figura 2

Fotos dos seis pontos de coleta da sub-bacia do canal do Cunha na cidade do Rio de Janeiro.

Quadro 1. Coordenadas geográficas dos pontos de coleta da SBCC, Rio de Janeiro

Sigla	Coordenadas	Bairro	Rio/Canal
P1	S 22° 52' 21.5" W 43° 18' 45.5"	Cavalcanti	Timbó
P3	S 22° 54' 24.2" W 43° 13' 52.3"	Água Santa	Faria

P5.1	S 22° 55' 10.6" W 43° 17' 01.04"	Floresta do Lins	Jacaré
P5.2	S 22° 54' 31.4" W 40° 16.2' 21.6"	Engenho de Dentro	Jacaré
P8	S 22° 52' 45.1" W 43° 14' 21"	Manguinhos	Canal do Cunha
P9	S 22° 52' 42.8" W 43° 15' 00.7"	Manguinhos	Faria Timbó

2.2. Concentração viral

A concentração viral nas amostras de água de superfície foi realizada por filtração em membrana eletronegativa, seguida de extração do RNA viral diretamente da membrana, uma modificação do método de adsorção-eluição em membranas eletronegativas de Katayama (KATAYAMA; SHIMASAKI; OHGAKI, 2002) e Symonds (SYMONDS et al., 2014), que tem demonstrado resultados mais eficientes para vírus com envoltório (AHMED et al., 2020b). Neste método, não se realiza a eluição dos vírus retidos na membrana, mas faz-se a extração do material genético diretamente da membrana. O procedimento é realizado de acordo com o POP LVR5 TA-002, “método de concentração viral em amostras ambientais por filtração em membrana”. A vacina Inforce 3 contém vírus sincicial respiratório bovino (BRSV) e é utilizada para o controle do processo de filtração.

Após adição de 200µL de controle BRSV a cada 200mL de amostra, incubada a 4 °C por 30 min, seguido por filtração em filtros de 0.8µM para retirada de sujidades. É adicionado à amostra 2mL de MgCl₂ (2.5M). Depois de homogeneizar durante 3 min e medir o pH as amostras foram acidificadas com ácido acético (1M) até pH entre 3 e 3,5. As amostras foram filtradas através de membrana, HAWP04700 de éster de celulose, com poro de 0,45µm, diâmetro de 47mm (MILLIPORE, Darmstadt, Alemanha), conectada ao sistema de filtração. A membrana é removida do suporte do filtro com pinça e introduzida à um tubo PowerBead do kit de extração de DNA, AllPrep PowerViral DNA/RNA (Qiagen®, Hilden, Alemanha) previamente identificado com o número da amostra. Adiciona-se 600µL da solução PM1 do kit de extração AllPrep PowerViral DNA/RNA (Qiagen®, Hilden, Alemanha) e 6µL de 2-mercaptoetanol a cada tubo, a fim de minimizar

a degradação do RNA. Após vortexar por 30 seg. e incubar por 5 minutos à T.A. a membrana é armazenada (no tubo com as soluções) à -80°C até a extração do RNA.

2.3. Extração de ácidos nucléicos

As extrações de ácidos nucléicos foram realizadas utilizando o kit AllPrep PowerViral DNA/RNA (Qiagen®, Hilden, Alemanha), conforme as instruções do fabricante utilizando o equipamento QIAVAC (Qiagen). O processo está descrito no POP LVRS TA-003 “extração de DNA/RNA – kit AllPrep PowerViral DNA/RNA”

2.4. Detecção molecular de SARS-CoV-2 e BRSV (controle)

A detecção molecular do SARS-CoV-2 por RT-PCR em tempo real baseia-se na pesquisa dos alvos N1 e N2, utilizando-se o kit de Bio-manguinhos e seguindo rigorosamente o manual de instruções e utilizando os POPs: POP LVRS TA-004 “protocolo TAQMAN de RT-PCR para detecção e quantificação de vírus SARS-CoV-2 (N1+N2) em amostras ambientais (kit bio-manguinhos) e POP LVRS TA-005 “protocolo de RT-PCR em tempo real para a detecção de vírus sincicial respiratório bovino (BRSV) em amostras ambientais – KIT GoTAQ”. O mix foi composto pela mistura de PCR contendo tampão e enzimas e oligonucleotídeos. Após pipetar 5ul de ácido nucléico, a reação de transcrição reversa ocorreu a 50oC por 15 min, seguida por 1 ciclo de 95oC por 2 min para a ativação da enzima. A fase de amplificação ocorre em 45 ciclos de 95oC por 20 seg. e 58oC por 30 seg. A amostra é considerada positiva na presença de curva de amplificação para os alvos N1 ou N2.

Para cálculo da concentração viral em copias/ml, é utilizado o padrão comercial 1 2019-nCoV_N_Positive Control (IDT), que consiste em plasmídeo do vírus, na concentração de 200.000 copias/μl. Para a curva de quantificação, é feita cinco diluições (10E1-10E5) do padrão, testadas juntamente com as amostras. Com base no valor de Ct, é estimada a concentração viral em cada amostra frente à curva padrão, aplicando a fórmula obtida na curva de regressão. Cada diluição do padrão é testada em triplicata e cada amostra ambiental é testada em duplicata. Para a detecção de BRSV, utilizamos o protocolo descrito por Boxus et al (2005) (BOXUS; LETELLIER; KERKHOFS, 2005).

2.5. Pesquisa de Variantes de Preocupação (VOCs) do SARS-CoV-2 por RT-PCR em tempo real

A determinação de VOCs virais por RT-PCR em tempo real foi realizada utilizando-se o Conjunto de Reagentes de pesquisa para detecção 4Plex de SARS-CoV2 e Triagem de VOCs, desenvolvido no LVRS em conjunto com Bio-manguinhos. O procedimento é realizado de acordo com o POP LVRS TA-006 “reação de RT-PCR em tempo real para inferência de VOCS do vírus SARS-CoV-2 em águas residuais – kit 4PLEX de biomanguinhos”. O ensaio apresenta um formato quadriplex (detecção de 4 alvos), utilizando sondas TaqMan e é capaz de detectar o vírus SC2 através da amplificação de uma região alvo no gene N, e simultaneamente, triar amostras com perfis sugestivos para as diferentes VOCs através da combinação de resultados obtidos (presença ou ausência) das deleções (Del) S106, G107 e F108, no gene ORF1a (nsp6) e Del. H69 e V70 no gene Spike das amostras testadas. Este protocolo associa a detecção e a triagem inicial das VOCs Alfa, Beta, Gama, Delta e Ômicron. Como controle interno (CI), o ensaio detecta uma região do gene constitutivo humano, RNaseP (RP). As instruções do Manual do fabricante foram rigorosamente seguidas. Após pipetar 10ul de RNA à mistura de PCR e mix Mix SC2/VOC, a reação de RT ocorre a 50oC por 15 min, seguida por 1 ciclo de 95oC por 2 min para a ativação da enzima. A fase de amplificação ocorre em 40 ciclos de 95oC por 20 seg e 61oC por 30 seg.

2.6. Bases de dados consultadas

2.6.1. DADOS EPIDEMIOLÓGICOS

Os dados epidemiológicos do município do Rio de Janeiro foram obtidos à partir da base de dados Painel COVID da Secretaria Municipal de Saúde do Rio de Janeiro (*EpiRio,2020*). Disponível em: <https://www.epirio.svs.rio.br/>.

2.6.2. DADOS GENÔMICOS

Os dados genômicos foram obtidos a partir da base da Rede Genômica Fiocruz (*FIOCRUZ,2020*). Disponível em: <http://www.Genomahcov.fiocruz.br/>.

2.7. CEP

Este projeto compõe o estudo piloto de monitoramento de COVID-19 em águas da SVS/MS e a Rede de Águas Residuais/MCTI (sub-estudo da Rede One Health de monitoramento genômico, CNPq 402457/2020-0). Foi aprovado pelo CEP FIOCRUZ/IOC (Parecer 2.453.470).

3. RESULTADOS

3.1. Detecção e quantificação de SARS-CoV-2 em águas superficiais e residuais da Sub-Bacia do Canal do Cunha, Rio de Janeiro

Entre agosto de 2020 e fevereiro de 2023, foram realizados ensaios de RT-qPCR para os genes alvo N1 e N2 para a quantificação do SARS-CoV-2 em 228 amostras da SBCC, observando-se variações entre os pontos e semanas epidemiológicas. A prevalência de N1 (75,9%; $p < 0,0001$) foi maior nos pontos de amostragem p5.2 (85%), p8 (85%) e p9 (89,2%). As concentrações do gene N1 também foram significativamente ($p = 0,0004$) maiores nesses três pontos, com médias de 778,5, 993,8 e 858,4 gc/L, respectivamente (Tabela 2). Não foram observadas diferenças significativas na positividade de N2 entre os pontos amostrais. Contudo, a concentração média do gene N2 foi significativamente ($p < 0,0001$) distinta entre os pontos, sendo observada a maior concentração nos pontos p5.2 e p8 e p5.1. Os resultados estão detalhados na Tabela 1

Tabela 1. Detecção de SARS-CoV-2 em águas residuais da Sub-Bacia do Canal do Cunha. Rio de Janeiro, ago 2020-fev 2023

<i>Parâmetros/ Pontos</i>	P1 (37)	P3 (39)	P5.1 (35)	P5.2 (40)	P8 (40)	P9 (37)	SBCC (228)	<i>P-valor</i>
SARS-CoV-2								
<i>N1 positividade, n (%)</i>	27 (73.0)	31 (79.0)	14 (40.0)	34 (85.0)	34 (85.0)	33 (89.2)	173 (75.9)	<0.0001
<i>N2 positividade, n (%)</i>	23 (62.2)	20 (51.3)	19 (54.3)	27 (67.5)	29 (72.5)	25 (67.6)	143 (62.7)	0.34
<i>N1 gc/L, média ± DP</i>	750.6 ± 776.8	652.2 ± 828.9	260.4 ± 442.8	778.5 ± 1218	993.8 ± 1236	858.4 ± 1110	715.4 ± 632.8	0.0004
<i>N2 gc/L, média ± DP</i>	6.2 ± 9.2	5.7 ±9.5	361.7 ± 722.9	641.8 ± 1421	671.3 ± 1185	13.5 ± 27.9	308.1 ± 527.6	<0.0001

Tabela: Os dados são apresentados como n (%) ou média ± DP. (*). Os valores de p foram calculados por ANOVA ou Kruskal-Wallis de acordo com testes de normalidade. Variáveis categóricas foram analisadas por qui-quadrado. Valores de $p \leq 0,05$ foram considerados significativos.

Ao longo do estudo foi comparada a concentração dos genes alvo N1 e N2 (figura 3) nas amostras. Concordando com a literatura (HUTCHISON et al., 2022), foi possível observar uma maior consistência do gene N1, com maiores taxas de positividade e maior concentração média ($p < 0,05$), além de significativamente maior nos pontos P1 ($p < 0,001$), P3 ($p < 0,001$) e p9 ($p < 0,001$).

Figura 3 - Comparação entre a concentração dos genes alvos N1 e N2 das amostras da SBCC entre agosto 2020 e fevereiro 2023

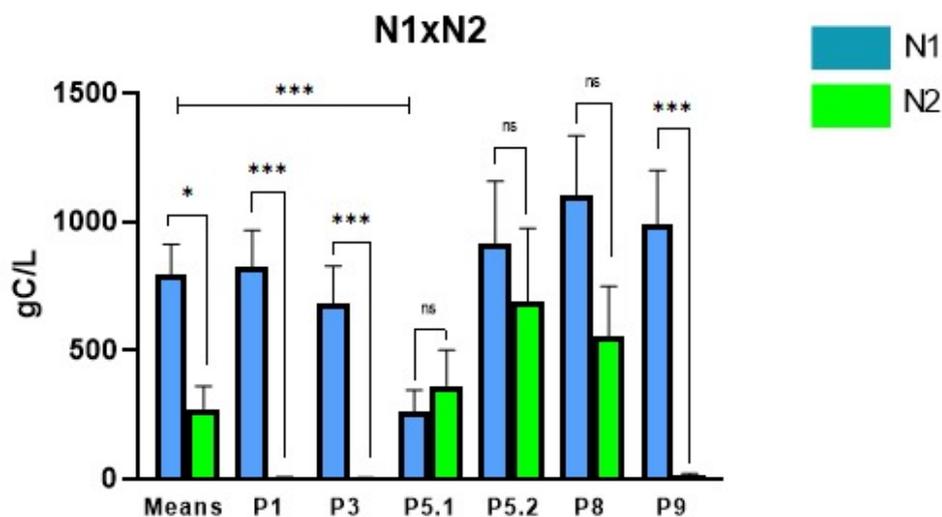


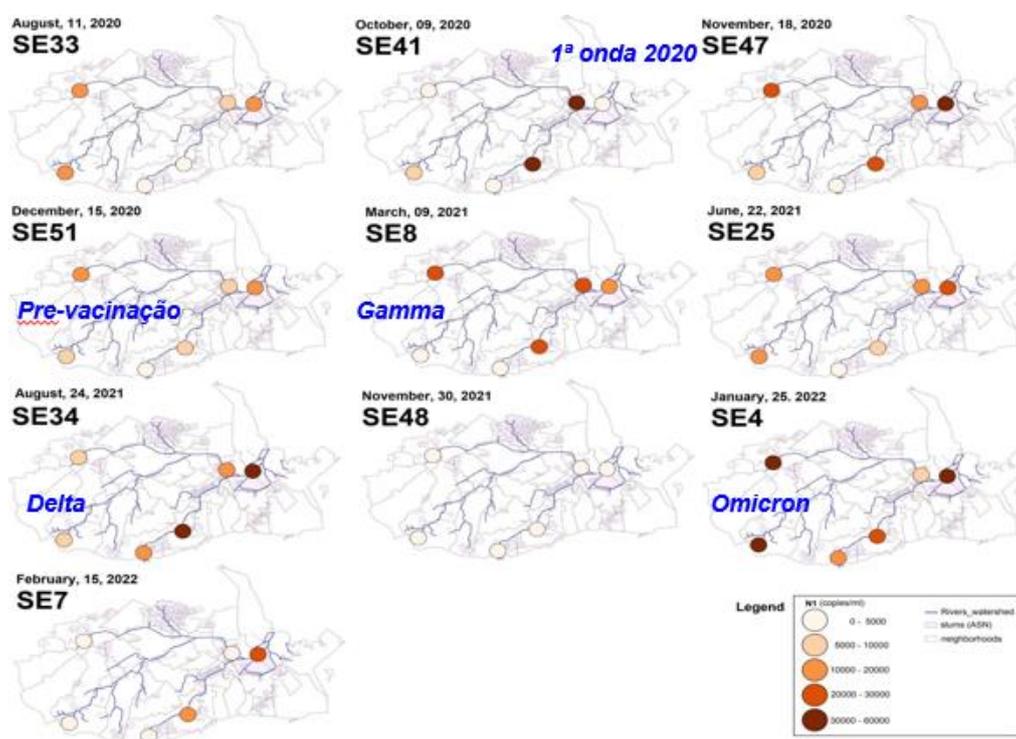
Figura 3.

Gc/L = cópias genômicas por Litro. Os dados são apresentados como n (%) ou média \pm DP. (*). Os valores de p foram calculados por comparação múltipla de Kruskal-Wallis de acordo com testes de normalidade. Valores de $p \leq 0,05$ foram considerados significativos.

Nas semanas epidemiológicas (SE) 41 e 47 foram observados o primeiros dois picos de detecção em águas residuais, precedendo o pico epidêmico de casos em dezembro de 2020 (SE 49). Os pontos de coleta em Manguinhos, Engenho de Dentro e Cavalcanti apresentaram alta carga viral nas amostras ambientais, com redução significativa na SE 51, que precedeu o início da vacinação no município. Na SE 8-2021, é percebido um novo pico de detecção na água, especialmente nos bairros acima mencionados, onde o esgotamento sanitário é diretamente despejado nos rios. Esse aumento de concentração viral aparentemente não encontrou-se traduzido em aumento significativo no número de casos nem nos bairros da SBCC e nem no município. Interessantemente, coincidiu com a circulação da variante Gamma no estado do Rio de Janeiro, com base no monitoramento realizado pela rede Genômica Fiocruz. Contexto semelhante foi observado na SE 2021-34, com a circulação da variante Delta, quando encontrado o aumento de carga viral em todos os pontos de coleta. Na SE 2021-48, a incidência de casos no município encontrava-se drasticamente reduzida, em comparação

com períodos anteriores, refletida igualmente na detecção viral nos rios estudados. Contudo, em dezembro de 2021, quando a incidência ainda se mantinha controlada, foi detectado um aumento significativo de concentração viral nas amostras de águas residuais coletadas, compatível com o observado em 2020 no período pre vacinação, e já sinalizando a explosão de novos casos em janeiro de 2022, ocasionados pela entrada da Ômicron. A carga viral encontrada nas amostras ambientais na SE 4 – representativa do mês de janeiro de 2022 – foi a maior encontrada em todo o período investigado e evidente em todos os pontos de coleta, inclusive na Floresta do Lins, o ponto controle do estudo. Todos esses dados estão representados na figura 4.

Figura 4. Detecção de SARS-CoV-2 VOCs em águas residuais. Sub-Bacia do Canal do Cunha, Rio de Janeiro. Agosto de 2020 a maio de 2022.



Os círculos nos locais de coleta acima referenciados representam a concentração viral em cada ponto de acordo com a semana epidemiológica. Os círculos brancos indicam a ausência ou concentração menor que 500 cópias por litro e marrom escuro concentrações superiores a 3000 cópias por litro.

Figura 4

A detecção de SARS-CoV-2 em águas residuais da Sub-Bacia do Canal do Cunha, segundo a semana epidemiológica está representada na figura 6. A detecção de N1 em águas residuais foi compatível com a distribuição do número de casos de COVID-19 nos bairros coletados da SBCC, bem como do total de casos por semana epidemiológica do

município do Rio de Janeiro. Nota-se que, sistematicamente, o acúmulo da concentração média do RNA (N1) viral precede o aumento do número de casos. Em destaque, a concentração viral pré-ômicon (25/01/2022) era maior ou igual aos períodos pré-vacinais mesmo antes da explosão de casos notificados.

Figura 5. Detecção de SARS-CoV-2 em águas residuais de acordo com a data de coleta. Sub-Bacia do Canal do Cunha, Rio de Janeiro. Ago 2020-fev 2023.

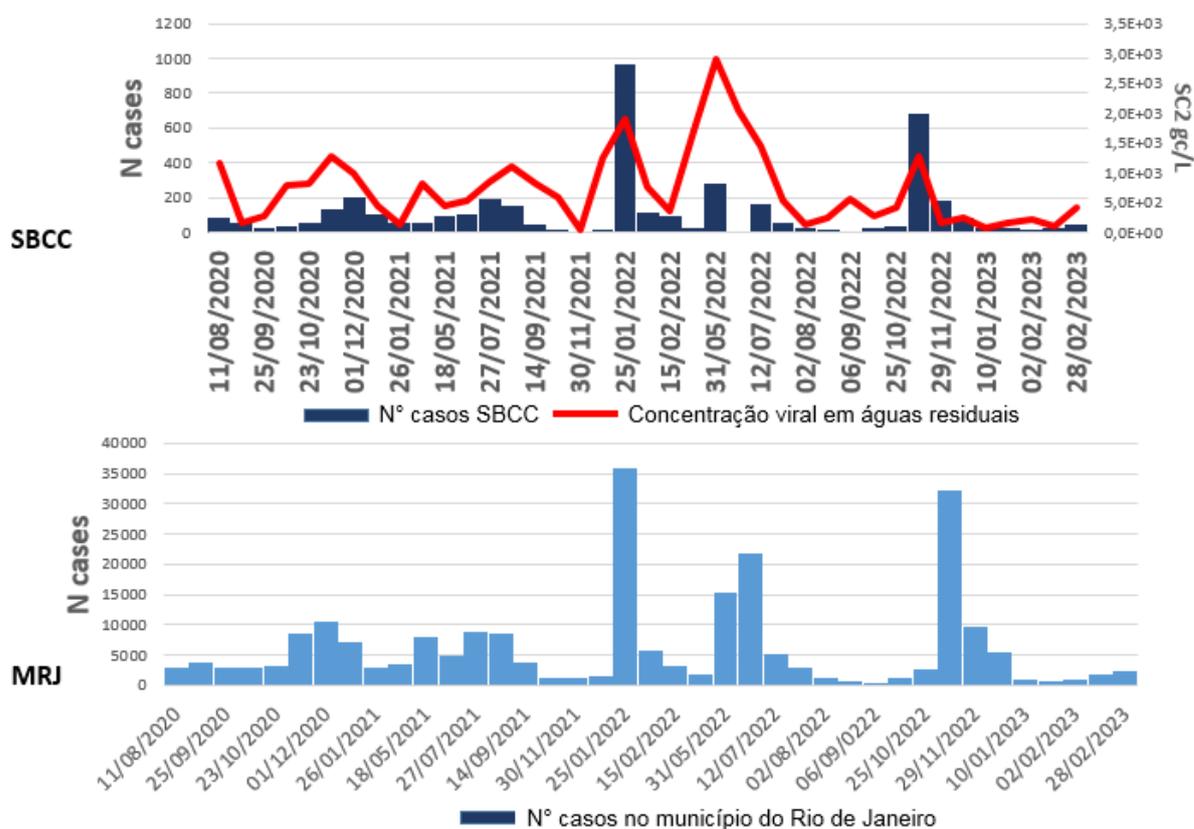


Figura 5

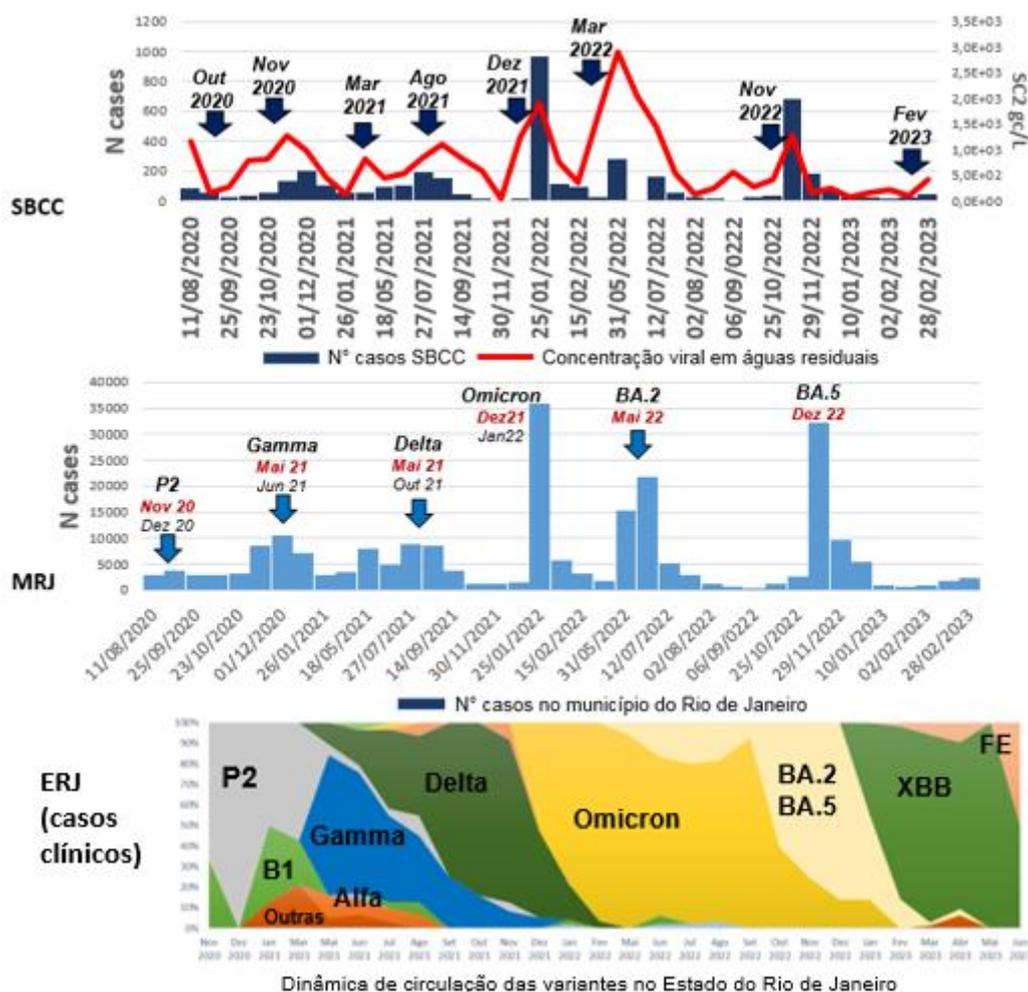
Concentração do RNA viral em águas residuais (linha vermelha) e número de casos dos bairros da SBCC e no município do Rio de Janeiro (barras azuis) ao longo do período de estudo.

3.2. Monitoramento de variantes de interesse/preocupação do SARS-CoV-2

A detecção de SARS-CoV-2 VOCs em águas residuais da SBCC e a distribuição de variantes do SARS-CoV-2 no Rio de Janeiro encontra-se representada na Figura 6. Conforme é possível observar, a introdução de cada variante no território é precedida pelo aumento da concentração de RNA viral nas águas residuais, ocorrido em outubro de 2020 (antes da introdução da variante P2 em novembro), em março de 2021 (precedendo a identificação da variante Gamma em casos humanos), em agosto de 2021 (com aumento da circulação da variante Delta em outubro) e notoriamente com a introdução da variante

Omicron, cujos casos explodiram em janeiro de 2022. Em dezembro de 2021, já se observava um pico de concentração de RNA importante nas águas residuais, compatível com os níveis pre-vacinação. A partir de março de 2022, novo pico foi observado nas águas residuais, possivelmente atribuível à circulação de inúmeras variantes da Omicron.

Figura 6. Detecção de SARS-CoV-2 VOCs em águas residuais. Sub-Bacia do Canal do Cunha, Rio de Janeiro e distribuição de variantes do SARS-CoV-2 no Rio de Janeiro, segundo os dados da Rede Genômica Fiocruz. Agosto de 2020 a maio de 2022.



Concentração do RNA viral em águas residuais (linha vermelha) e número de casos dos bairros da SBCC e no município do Rio de Janeiro (barras azuis) ao longo do período de estudo. Setas indicam as datas de introdução das VOCs baseada em casos clínicos. Abaixo, gráfico de área com base nas variantes virais identificadas em amostras clínicas no estado do Rio de Janeiro

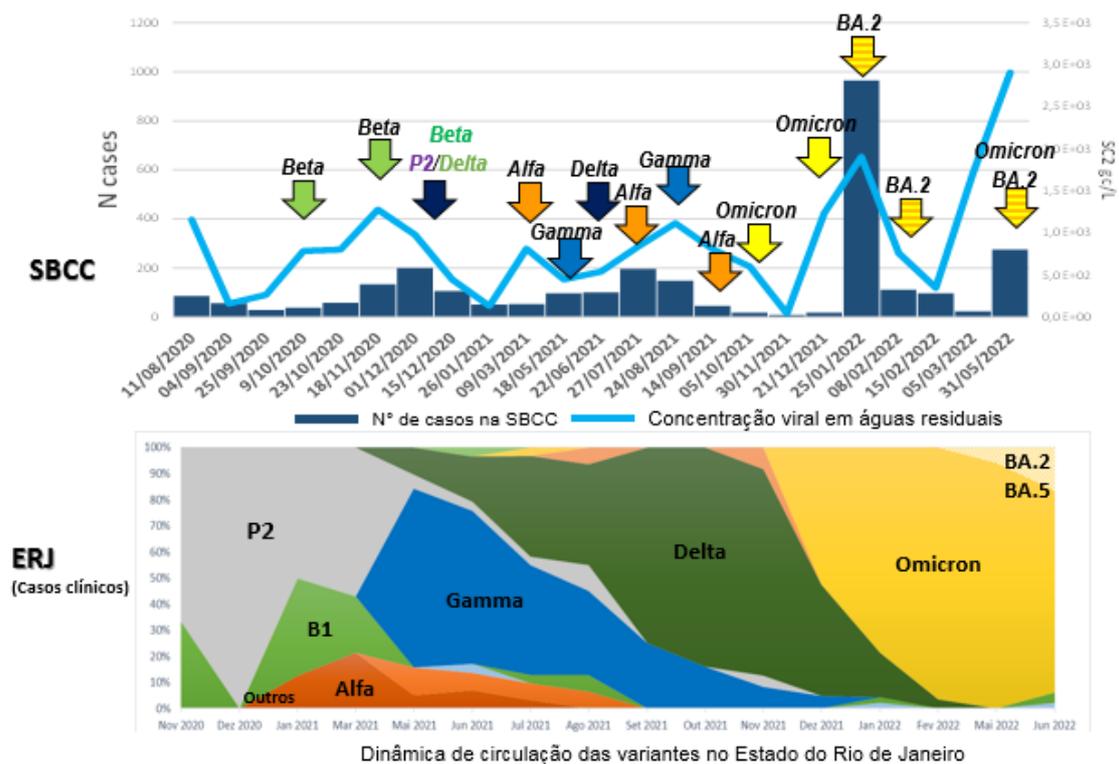
Figura 6

Os resultados da inferência de Variantes de Preocupação (VOCs) do SARS-CoV-2 em amostras ambientais da SBCC, com base em ensaio de RT-PCR em tempo real

encontram-se representados na figura 7. Foram selecionadas algumas amostras com concentração viral >10gc/ul e que ainda tivessem RNA em volume disponível. Do total de 71 amostras testadas, 29 apresentaram VOC identificável.

No ano de 2020, a variante Beta foi identificada predominantemente nas águas residuais investigadas, em contraste com os dados da Rede Genômica Fiocruz - que se baseia em casos clínicos e que evidenciaram a circulação majoritária da variante P2 no período em tela. Em dezembro de 2020, já era detectado precocemente a variante Delta em águas residuais. Com a introdução da variante Ômicron e sua diversificação posterior, os resultados apresentaram-se mais consistentes com aqueles observados no sequenciamento de casos clínicos.

Figura 7. Detecção de SARS-CoV-2 VOCs em águas residuais. Sub-Bacia do Canal do Cunha, Rio de Janeiro. Agosto de 2020 a maio de 2022.



Concentração do RNA virais em águas residuais (linha azul claro) e número de casos dos bairros da SBCC e no município do Rio de Janeiro (barras azuis) ao longo do período de estudo. Setas indicam o resultado da inferência VOCs por RT-PCR em tempo real. Abaixo, gráfico de área com base nas variantes virais identificadas em amostras clínicas no estado do Rio de Janeiro

Figura 7

4. DISCUSSÃO

Na COVID-19, a maioria dos casos são assintomáticos (GE et al., 2020b), favorecendo a subnotificação e subestimação da carga da doença. O mesmo conceito se aplica à abordagem genômica, cujas amostras são majoritariamente referenciadas com base no diagnóstico clínico. Portanto, abordagens que permitam estimar a incidência ou monitorar variantes virais no nível populacional são estratégicas para implementar a nossa capacidade de monitoramento. A epidemiologia baseada em águas residuais permite tal abordagem. Assim, a vigilância ambiental é estratégica para o monitoramento da dinâmica epidemiológica e evolutiva viral (DAUGHTON, 2020; MEDEMA et al., 2020).

A positividade e concentração média do RNA viral variou ao longo do tempo e fases epidemiológicas. Os pontos mais populosos (p5.2;p8;p9) apresentaram maior positividade e maior concentração média de RNA, possivelmente associado com o maior volume de despejo de resíduos residenciais nos corpos hídricos (YANIV et al., 2021). O ponto 5.1, localizado próximo a nascente do rio e com baixa densidade demográfica, apresentou resultados expressivos durante as grandes ondas de contágio como a Ômicron e variantes (BA.5, BA.4, BA.2). Este dado demonstra a possibilidade do uso dessa ferramenta para o monitoramento de pequenas populações em locais remotos. Futuramente para reforçar e aperfeiçoar modelos matemáticos faz-se necessário métodos de normalização da carga fecal nos diferentes pontos (HOLM et al., 2022). Contudo, tais limitações não diminuem o impacto do trabalho. Os dados longitudinais corroboram a possibilidade do uso desta abordagem populacional mesmo em locais com saneamento precário ou ausente (AGUIAR-OLIVEIRA et al., 2020).

Os resultados evidenciaram que o aumento da concentração viral em água residual precede o aumento da incidência de casos de COVID-19, bem pontuado nas semanas epidemiológicas. O aumento da concentração viral também reflete as infecções assintomáticas, reitando a importância do monitoramento baseado em esgoto para a identificação precoce de *hotspots*. Semanas antes do pico de casos associados a Ômicron (Janeiro 2022) e suas variantes (Maio e Dezembro de 2022) foi expressivo o aumento da concentração do material genético nas águas superficiais. Por vezes, o aumento dos casos clínicos não traduziu linearmente o aumento prévio da concentração viral. O entendimento sobre o impacto de algumas variáveis como taxa de excreção viral entre as diferentes ondas, efeitos da vacinação e baixa testagem clínica são um desafio (TOLEDO

et al., 2022; RECTOR et al., 2023). Os resultados deste estudo piloto corroboram com os achados em esgoto e reiteram a importância do monitoramento do vírus em águas residuais para a intensificação das atividades de vigilância epidemiológica nos territórios (MAO et al., 2020; SIMS; KASPRZYK-HORDERN, 2020; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2020a).

Embora inicialmente desenvolvido para outro fim (amostras clínicas), o ensaio de inferência das VOC por RT-PCR demonstrou boa concordância com as variantes majoritárias dos períodos em tela. Ainda, foi possível observar a presença de variantes minoritárias em algumas amostras como a Alfa. É possível que essas diferenças possam ser parcialmente explicadas por um padrão geográfico diferenciado no âmbito do território específico, pela diferença de eficiência do ensaio na inferência das variantes virais em amostras ambientais vs. amostras clínicas ou, ainda, que a abordagem populacional permita a identificação de variantes aparentemente sub representadas na amostra de casos clínicos sequenciados. O pico relacionado à variante alfa em março, julho e outubro de 2021, onde havia maior prevalência das variantes Gamma e Delta em circulação no Rio de Janeiro, complementam as observações anteriores.

Esse contexto reforça a relevância da vigilância genômica para fins de monitoramento sistemático das variantes virais tanto em amostras humanas quanto em águas residuais. Entretanto, a complexidade das matrizes ambientais, a alta diluição dos vírus nessas amostras e o fato de que os ensaios para detecção e sequenciamento viral são desenhados e calibrados para uso em amostras clínicas – onde a carga viral é efetivamente muito superior – impõem desafios relevantes nesse contexto (AHMED et al., 2022; XU et al., 2023). Ainda, cabe destacar que a baixa testagem em vários momentos da epidemia teve impacto direto sobre a representatividade dos casos clínicos sequenciados, o que pode ter introduzido vieses na distribuição das variantes num dado território. Infelizmente, não há como selecionar os dados genômicos no nível dos municípios ou mesmo bairros, para que tenhamos maior precisão de análise e interpretação. Esses contextos são fundamentais para melhor entendermos a dinâmica de introdução e circulação de variantes nos territórios.

Com isso, as amostragens e testes sistemáticos de águas residuais são uma forma complementar e não invasiva de monitorar a presença do vírus. O mesmo conceito se aplica à abordagem genômica, cujas amostras são majoritariamente referenciadas com base no diagnóstico clínico. Portanto, abordagens que permitam estimar a incidência, e

evidências adicionais sobre o vírus em circulação na população, incluindo sua presença ou ausência e monitorar variantes virais no nível populacional são estratégias para implementar a nossa capacidade de monitoramento. A epidemiologia baseada em águas residuais permite tal abordagem. Assim, a vigilância ambiental é estratégica para o monitoramento da dinâmica epidemiológica e evolutiva viral.

5. CONCLUSÃO

- Nas áreas com saneamento precário ou ausente, o monitoramento de SARS-CoV-2 em rios poluídos constitui uma estratégia viável de vigilância ambiental
- O aumento da concentração viral em água residual precede o aumento da incidência de casos de COVID-19 e reiteram a importância da vigilância ambiental para a identificação precoce de hotspots e intensificação da vigilância epidemiológica nos territórios, como sistema de alerta.
- A circulação de novas variantes virais parece estar associada ao aumento prévio da carga viral em água residual, reforçando a relevância da vigilância genômica, em amostras humanas e em águas residuais.

REFERÊNCIAS

- AGUIAR-OLIVEIRA, M. D. L. et al. Wastewater-Based Epidemiology (WBE) and Viral Detection in Polluted Surface Water: A Valuable Tool for COVID-19 Surveillance—A Brief Review. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 17, n. 24, p. 9251, 10 dez. 2020.
- AHMED, W. 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. **Science of The Total Environment**, v. 728, p. 138764, ago. 2020a.
- AHMED, W. et al. Comparison of virus concentration methods for the RT-qPCR-based recovery of murine hepatitis virus, a surrogate for SARS-CoV-2 from untreated wastewater. **Science of The Total Environment**, v. 739, p. 139960, out. 2020b.
- AHMED, W. et al. Minimizing errors in RT-PCR detection and quantification of SARS-CoV-2 RNA for wastewater surveillance. **Science of The Total Environment**, v. 805, p. 149877, 20 jan. 2022.
- BOXUS, M.; LETELLIER, C.; KERKHOFS, P. Real Time RT-PCR for the detection and quantitation of bovine respiratory syncytial virus. **Journal of Virological Methods**, v. 125, n. 2, p. 125–130, maio 2005.
- CARROLL, D. et al. Preventing the next pandemic: the power of a global viral surveillance network. **BMJ**, v. 372, p. n485, 12 mar. 2021.
- CEBAN, F. et al. Fatigue and cognitive impairment in Post-COVID-19 Syndrome: A systematic review and meta-analysis. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 101, p. 93–135, mar. 2022.
- CONSELHO NACIONAL DE SECRETÁRIOS DE SAÚDE. **Painel CONASS - COVID-19**. Disponível em: <<https://www.conass.org.br/painelconasscovid19/>>. Acesso em: 28 mar. 2021.
- DAUGHTON, C. G. Wastewater surveillance for population-wide Covid-19: The present and future. **Science of The Total Environment**, v. 736, p. 139631, set. 2020.
- DI GENNARO, F. et al. Coronavirus Diseases (COVID-19) Current Status and Future Perspectives: A Narrative Review. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 17, n. 8, p. 2690, 14 2020.
- FIOCRUZ, R. G. **Rede Genômica Fiocruz**. Disponível em: <<https://www.genomahcov.fiocruz.br/>>. Acesso em: 16 nov. 2023.
- GE, H. et al. The epidemiology and clinical information about COVID-19. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 39, p. 1–9, 14 abr. 2020a.
- GE, H. et al. The epidemiology and clinical information about COVID-19. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 39, n. 6, p. 1011–1019, jun. 2020b.
- GUERRERO-LATORRE, L. et al. SARS-CoV-2 in river water: Implications in low sanitation countries. **Science of The Total Environment**, v. 743, p. 140832, nov. 2020.
- HOLM, R. H. et al. Surveillance of RNase P, PMMoV, and CrAssphage in wastewater as indicators of human fecal concentration across urban sewer neighborhoods, Kentucky. **FEMS microbes**, v. 3, p. 1–12, 29 jan. 2022.
- HUTCHISON, J. M. et al. Improving correlation of wastewater SARS-CoV-2 gene copy numbers with COVID-19 public health cases using readily available biomarkers. **FEMS Microbes**, v. 3, p. xtac010, 1 abr. 2022.
- KATAYAMA, H.; SHIMASAKI, A.; OHGAKI, S. Development of a virus concentration method and its application to detection of enterovirus and norwalk virus from coastal seawater. **Applied and environmental microbiology**, v. 68, n. 3, p. 1033–1039, mar. 2002.
- KOELLE, K. et al. The changing epidemiology of SARS-CoV-2. **Science (New York, N.Y.)**, v. 375, n. 6585, p. 1116–1121, 11 mar. 2022.
- LA ROSA, G. et al. Surveillance of hepatitis A virus in urban sewages and comparison with cases notified in the course of an outbreak, Italy 2013. **BMC Infectious Diseases**, v. 14, n. 1, p. 419, dez. 2014.
- LA ROSA, G. et al. First detection of SARS-CoV-2 in untreated wastewaters in Italy. **Science of The Total Environment**, v. 736, p. 139652, set. 2020.
- MAO, K. et al. The potential of wastewater-based epidemiology as surveillance and early warning of infectious disease outbreaks. **Current Opinion in Environmental Science & Health**, 11 maio 2020.
- MEDEMA, G. et al. Implementation of environmental surveillance for SARS-CoV-2 virus to support public health decisions: Opportunities and challenges. **Current Opinion in Environmental Science & Health**, v. 17, p. 49–71, out. 2020.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE, M. DA S. **Coronavírus Brasil**. Disponível em: <<https://covid.saude.gov.br/>>. Acesso em: 16 nov. 2023.
- OMS, O. **Guidelines for Environmental Surveillance of Poliovirus Circulation .pdf**. Disponível em: <https://polioeradication.org/wp-content/uploads/2016/07/WHO_V-B_03.03_eng.pdf>. Acesso em: 31 ago. 2023.

PREVOST, B. et al. Large scale survey of enteric viruses in river and waste water underlines the health status of the local population. **Environment International**, v. 79, p. 42–50, jun. 2015.

RECTOR, A. et al. Monitoring of SARS-CoV-2 concentration and circulation of variants of concern in wastewater of Leuven, Belgium. **Journal of Medical Virology**, v. 95, n. 2, p. e28587, fev. 2023.

RIMOLDI, S. G. et al. Presence and infectivity of SARS-CoV-2 virus in wastewaters and rivers. **Science of The Total Environment**, v. 744, p. 140911, nov. 2020.

SCHOLZ, J. R. et al. COVID-19, Sistema Renina-Angiotensina, Enzima Conversora da Angiotensina 2 e Nicotina: Qual a Inter-Relação? **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 115, n. 4, p. 708–711, 2020.

SECRETARIA MUNICIPAL DE SAÚDE DO RIO DE JANEIRO. **Boletim Epidemiológico COVID-19. 26 de março de 2022.** , 2022. Disponível em: <<https://coronavirus.rio/boletim-epidemiologico/>>. Acesso em: 5 abr. 2022

SIMS, N.; KASPRZYK-HORDERN, B. Future perspectives of wastewater-based epidemiology: Monitoring infectious disease spread and resistance to the community level. **Environment International**, v. 139, p. 105689, jun. 2020.

SONI, V. et al. Surveillance of omicron variants through wastewater epidemiology: Latest developments in environmental monitoring of pandemic. **The Science of the Total Environment**, v. 843, p. 156724, 15 out. 2022.

SVS RIO DE JANEIRO. **Painéis Epidemiológicos Painel Rio covid-19. EpiRio**, 2023. Disponível em: <<https://epirio.svs.rio.br/painel/painel-rio-covid-19/>>. Acesso em: 16 nov. 2023

SYMONDS, E. M. et al. A case study of enteric virus removal and insights into the associated risk of water reuse for two wastewater treatment pond systems in Bolivia. **Water Research**, v. 65, p. 257–270, 15 nov. 2014.

TOLEDO, D. M. et al. Wastewater-Based SARS-CoV-2 Surveillance in Northern New England. **Microbiology Spectrum**, v. 10, n. 2, p. e0220721, 27 abr. 2022.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Status of environmental surveillance for SARS-CoV-2 virus: scientific brief, 5 August 2020.** Disponível em: <<https://apps.who.int/iris/handle/10665/333670>>. Acesso em: 10 out. 2020a.

WORLD HEALTH ORGANIZATION, W. H. O. **WHO Coronavirus (COVID-19) Dashboard.** Disponível em: <<https://covid19.who.int>>. Acesso em: 4 ago. 2023b.

WU, F. et al. A new coronavirus associated with human respiratory disease in China. **Nature**, v. 579, n. 7798, p. 265–269, 12 mar. 2020.

XU, X. et al. Wastewater genomic sequencing for SARS-CoV-2 variants surveillance in wastewater-based epidemiology applications. **Water Research**, v. 244, p. 120444, 1 out. 2023.

YANG, K. et al. SARS-CoV-2 surveillance in medical and industrial wastewater-a global perspective: a narrative review. **Environmental Science and Pollution Research International**, v. 30, n. 23, p. 63323–63334, maio 2023.

YANIV, K. et al. City-level SARS-CoV-2 sewage surveillance. **Chemosphere**, v. 283, p. 131194, 1 nov. 2021.

ZHOU, P. et al. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. **Nature**, v. 579, n. 7798, p. 270–273, 12 mar. 2020.