

Monitoramento de Patógenos Emergentes em Águas Residuais e Ecossistemas Aquáticos

Mayan Press Goldfreind; Gabriele Peçanha Feitosa Lopes; Andressa Silva Gonçalves de Brito; Mariana Magaldi de Souza Lima; Kayo Cesar Bianco Fernandes; Maysa Beatriz Mandetta Clementino

Laboratório de Bactérias e Arqueas - Departamento de Microbiologia

mgoldfreind@aluno.fiocruz.br

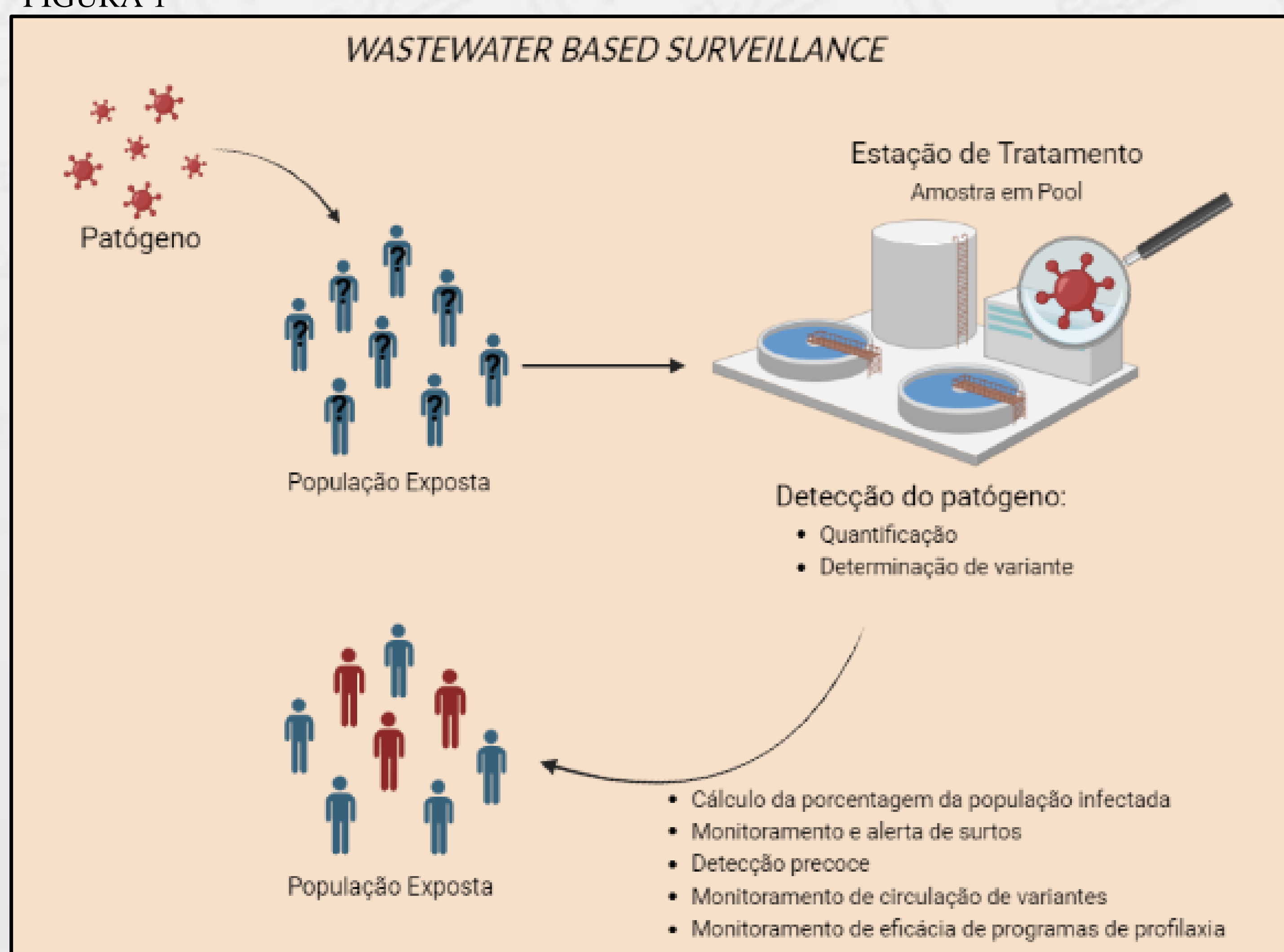
INTRODUÇÃO

A abordagem da Saúde Única traz o conceito de integração da saúde humana, animal e ambiental. Dentro deste conceito, as águas residuais e superficiais podem conter informações valiosas sobre a saúde e o comportamento de comunidades e ambientes de um modo geral. Essas matrizes vêm sendo estudadas por meio da *Wastewater Based Surveillance* (WBS), uma ferramenta da vigilância em saúde que tem se mostrado eficiente no monitoramento de poluentes e patógenos, principalmente os disseminados pelas rotas oro-fecal e renal. Durante a pandemia de COVID-19 a WBS ganhou grande destaque como ferramenta complementar a vigilância clínica, devido seu baixo custo e acurácia na detecção precoce da circulação do SARS-CoV-2. Considerando que indivíduos infectados (sintomáticos e assintomáticos) iniciam a disseminação viral no período de incubação.

Essa ferramenta vem sendo adotada desde o meados de 1800 na detecção e vigilância de diversos outros patógenos, como o poliovírus, o vírus ebola e o vírus dengue. Desta forma, a WBS auxilia na previsão e monitoramento de surtos epidemiológicos (Figura 1) bem como na elaboração estratégica de respostas preventivas, como o programa de vacinação.

Este estudo visa monitorar águas residuais e superficiais do Rio de Janeiro, no que se refere a circulação de SARS-CoV-2 (pós pandemia) e dos vírus da Influenza A e B, tendo em vista os recentes surtos de gripe aviária relatados mundialmente. Para isso será realizada a detecção e quantificação por meio da RT-qPCR dos genes E/N do SARS-CoV-2, M do Influenza A e NS do Influenza B.

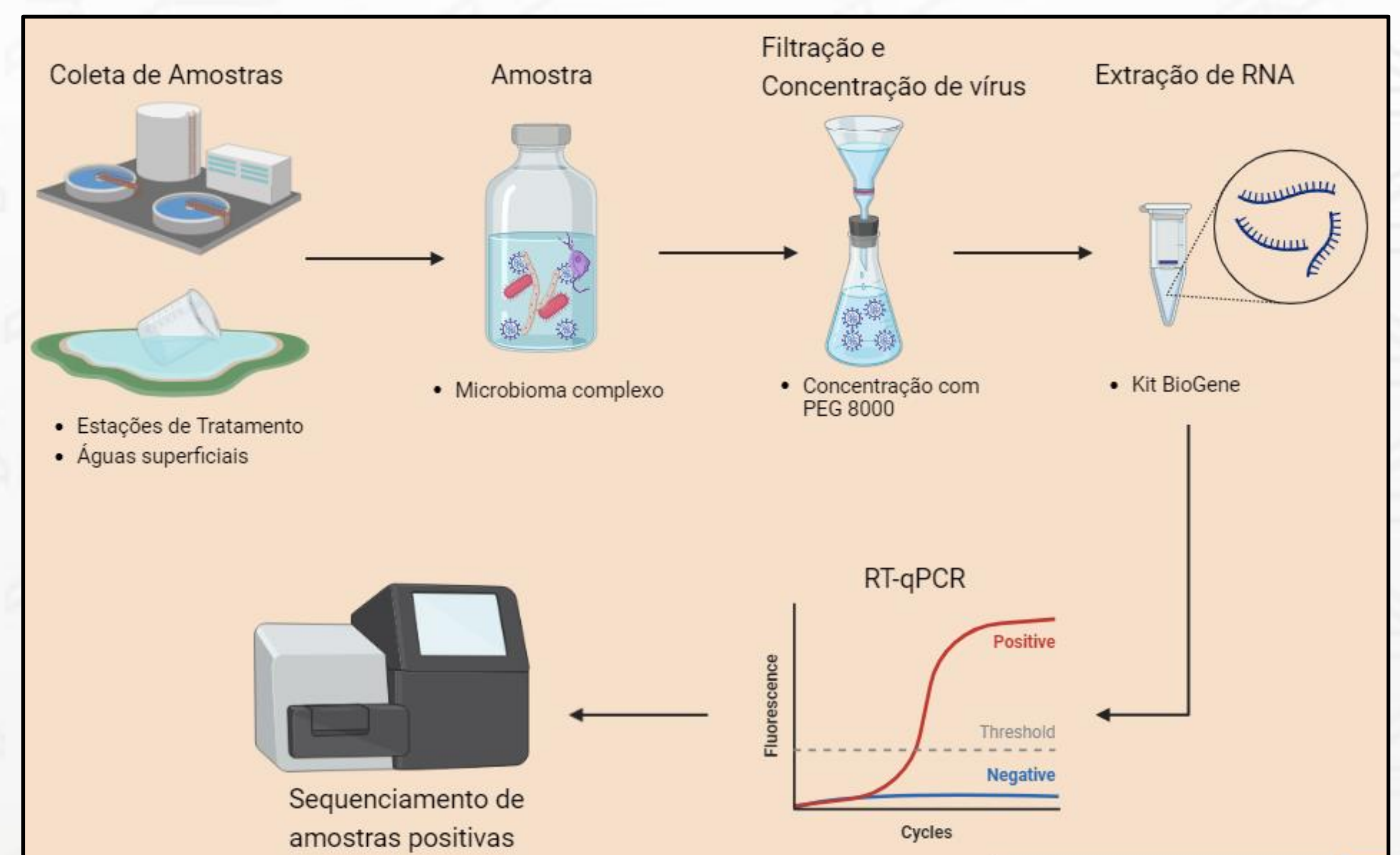
FIGURA 1



MATERIAIS E MÉTODOS

Os locais de coleta são: Lagoa Rodrigo de Freitas - LRF (seis pontos); Praia de Ipanema (dois pontos); Jardim de Alah (dois pontos); Estações de Tratamento de Efluente Hospitalar (entrada e saída); Estação de Tratamento de Efluente Misto (entrada e saída); Estação de Tratamento Industrial 1 (entrada e saída); Estação de Tratamento Industrial 2 (entrada e saída). Até o momento, foram coletadas 31 amostras que estão sendo processadas (Figura 2).

FIGURA 2



RESULTADOS E DISCUSSÃO

Baseado em estudo anterior (Gonçalves-Brito, 2023), verificamos a necessidade de adaptar o protocolo convencional de sequenciamento de SARS-CoV-2 de origem clínica, para amostras ambientais. Até o momento, obtivemos sucesso na detecção e amplificação de fragmentos que compõem o genoma completo do COVID-19, a proteína Spike e um fragmento menor que inclui a área do *Receptor Binding Domain* (RBD).

Na primeira tentativa de sequenciamento no MiSeq (Illumina), testamos cinco combinações diferentes de alvos amplificados e iniciadores: amplificação da spike com iniciadores randômicos; spike com iniciadores específicos da spike; RBD com iniciadores randômicos; RBD com iniciadores específicos da spike; genoma com iniciadores do genoma completo. Não obtivemos sucesso nestes testes devido a baixa concentração de SARS-CoV-2 na amostra ambiental. Foram realizados ajustes no protocolo, como a alterações nos programas da PCR no termociclador, que revelaram a presença de bandas no gel de agarose. Entretanto, junto foi observada a amplificação de uma banda inespecífica maior que 3.000 kb. Ajustamos a etapa de purificação, alterando as proporções de bead por amostra. Estas tentativas não apresentaram resultados satisfatórios, a banda maior continuou a aparecer no gel. Seguimos o protocolo retirando do gel a banda de interesse seguida pela purificação de DNA usando coluna de sílica. Esta tentativa apresentou um resultado satisfatório na quantificação de DNA e estas amostras serão sequenciadas no MiSeq (Illumina).

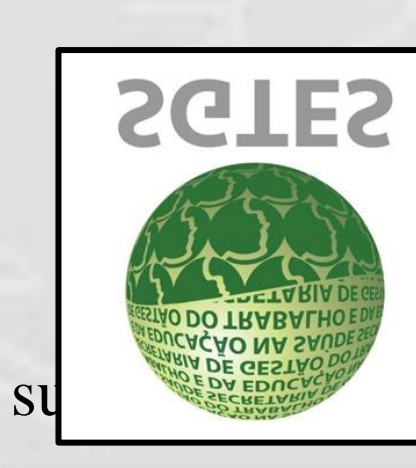
CONCLUSÃO

O sequenciamento de SARS-CoV-2 em amostras ambientais é desafiador por se tratar de uma matriz complexa, onde o patógeno está diluído e sofre ações de diversos agentes externos, químicos, físicos e biológicos, que danificam e fragmentam o seu material genético, o que dificulta sua detecção e caracterização. Neste cenário, buscamos estabelecer um protocolo de sequenciamento eficaz, que traga resultados consistentes capazes de diferenciar as variantes encontradas. Encontramos algumas soluções promissoras, mas que ainda precisam ser validadas pelos resultados no MiSeq (Illumina).

AGRADECIMENTOS

REFERÊNCIA

GONÇALVES-BRITO, A. S. Envio



Secretaria de Gestão do Trabalho e Saúde
Secretaria de Vigilância em Saúde