

DETECÇÃO DE SARS-Cov-2 BASEADA NA ANÁLISE DE ESGOTO DE ARAGUAÍNA: ETAPAS PRELIMINARES

Andreína de Souza Pereira¹, Magna Lopes dos Santos¹, Fabiana Alves do Carmo Araújo², Katiane Pereira Braga³, Sabrina Guimarães Paiva⁴, Priciane Cristina Correa Ribeiro⁵

¹Estudante do Curso de Tecnologia em Gestão da Produção Industrial – IFTO. Bolsista do Programa de Iniciação Científica. e-mail: andreina.pereira@estudante.ifto.edu.br

Estudante do Curso de Tecnologia em Gestão da Produção Industrial - IFTO. Colaboradora do Programa de Iniciação Científica. e-mail: magna.santos@estudante.ifto.edu.br

²Estudante do Curso Técnico Subsequente de Análises Clínicas– IFTO. Bolsista do CNPq. e-mail: fabiana.araujo@estudante.ifto.edu.br

³Professora do Ensino Básico, Técnico e Tecnológico - IFTO. e-mail: katianepb@ifto.edu.br

⁴Professora do Ensino Básico, Técnico e Tecnológico - IFTO. Professora permanente do Programa de Pós-Graduação e Demandas Populares e Dinâmicas Regionais e-mail: sabrinapaiva@ifto.edu.br

⁵Professora do Magistério Superior - Curso de Biologia UFT/UFNT: priciane.ribeiro@uft.edu.br

Resumo: A rede de saneamento básica associada às medidas de educação em saúde tem papel fundamental no controle da transmissão de diversos agentes patogênicos. Diante da grave crise sanitária estabelecida pela pandemia do novo coronavírus (SARS-Cov-2) e a detecção do vírus em diferentes amostras biológicas, levantou-se a possibilidade da transmissão oral-fecal. Contudo, não se tem evidências científicas desse tipo de transmissão a partir do esgoto. Com esse cenário e a limitação de testagem laboratorial da população, o presente artigo tem como objetivo demonstrar as etapas iniciais de desenvolvimento metodológico de um sistema de detecção do de SARS-CoV-2 na rede de esgoto do município de Araguaína. Por meio do mapeamento da rede, foram selecionados pontos estratégicos de interligação e coletadas amostras compostas ao longo das semanas epidemiológicas. As amostras obtidas foram submetidas a análises de pH e temperatura, pasteurização e concentração viral, e na sequência, armazenadas em freezer a -80°C para posterior análise molecular. A técnica de concentração viral foi otimizada de acordo com a literatura e o tempo de amostragem representou um fator crítico na coleta das amostras. As próximas etapas consolidam a implantação do sistema, permitindo a quantificação da carga viral, e a comparação e sobreposição com os dados epidemiológicos do município.

Palavras-chave: Carga viral, Covid-19, Monitoramento; Rede de esgoto

1 INTRODUÇÃO

Desde o início da pandemia da COVID-19, o esforço mundial de geração de informações sobre o novo coronavírus se deu de forma dinâmica e rápida, desde as análises descritivas dos primeiros casos, análises de sequências genômicas, relatos e análises da diversidade de seus aspectos clínicos, bem como alternativas de ferramentas epidemiológicas. Tal cenário criou também um contexto que impõe aos sistemas nacionais de saúde pública o papel de validar seu sistema de vigilância e assistência em saúde quanto à oportunidade de detecção precoce (Lana et al., 2020). Sabe-se que a capacidade de monitorar rapidamente a propagação de doenças infecciosas é essencial para sua prevenção, intervenção e controle. Para Yeo et al. (2020), as fezes de pacientes testados positivos para COVID contêm RNA viral do vírus. Pacientes com amostras fecais positivas (55% do total) apresentaram resultados respiratórios que permaneceram positivos para o RNA do SARS CoV-2 por uma média de 16,7 dias, enquanto que nas amostras fecais os resultados permaneceram positivos por uma média de 27,9 dias após o início dos primeiros sintomas, ou seja, em média 11,2 dias a mais do que nas amostras respiratórias (Wu et al., 2020).

Embora não se tenha evidências científicas da transmissão oral-fecal, pesquisadores sugeriram uma dispersão viral prolongada pelas fezes, por quase cinco semanas após as amostras respiratórias dos

pacientes terem resultado negativo para RNA do SARS-CoV-2. No caso do SARS-CoV-2, diante das limitações práticas e econômicas de aplicação dos testes clínicos em massa, pesquisadores ao redor do mundo, incluindo o Brasil, tem sugerido o uso da Epidemiologia do Esgoto como estratégia para apoiar o monitoramento da propagação da COVID-19 (Medema et al., 2020; Wu et al., 2020a, Peccia et al., 2020; Ahmed et al., 2020; Ahmed et al., 2020b; La Rosa et al., 2020) e no Brasil (Chernicharo et al., 2020; Prado et al., 2020; Chernicharo et al., 2021). No Brasil, a Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) iniciou o monitoramento em Belo Horizonte e Contagem, que se expandiu para uma rede de cidades e regiões metropolitanas, como Ceará, Pernambuco, Rio de Janeiro, Paraná e Distrito Federal (Boletim de apresentação – Rede de Monitoramento de esgoto, 2021). No Rio de Janeiro, o monitoramento foi iniciado pela Fiocruz (Prado et al., 2021). Há outros trabalhos como este no estado de Santa Catarina (Fongaro et al., 2021).

De acordo com os Boletins Epidemiológicos, Araguaína registrou em diversas semanas epidemiológicas, número de casos confirmados de COVID-19 superiores aos números da capital do Tocantins (Palmas), despontando como o município com maior incidência de casos no estado do Tocantins, mesmo com uma população numericamente inferior a capital. Um dos motivos destacados para que Araguaína chegasse nessa condição seria sua localização, situar-se no entroncamento urbano e rodoviário com importante interação com outros centros locais e sub-regionais, como Marabá e Imperatriz (Aguiar, et al. 2020). Nesse contexto, buscando estratégias de vigilância em saúde, a Câmara Técnica do Comitê de Bacias em articulação com diversas instituições, têm centralizado suas ações em projetos que visam o monitoramento e a prevenção da contaminação dos recursos hídricos nos limites da Bacia que atua, além de projetos voltados para a saúde pública da população de Araguaína e região. O presente estudo, surgiu da articulação de várias instituições, e tem como objetivo descrever as etapas preliminares de desenvolvimento de um sistema de detecção de alerta rápido para Covid-19 na rede de esgoto do município de Araguaína – TO.

2 METODOLOGIA

O município de Araguaína é uma cidade média com estimativa de 186 245 habitantes, que como grande parte dos municípios brasileiros da região norte não apresenta uma ampla cobertura de rede de esgoto (Sanchez, 2021); sua cobertura atual atende cerca de 30% da população municipal, tendo a concentração da rede na região central, localidade com maior fluxo de pessoas na cidade. Para o delineamento do estudo foi sugerido a formação de uma equipe com membros das quatro instituições: BRK Ambiental, Secretaria Municipal de Saúde, Universidade Federal do Tocantins/Universidade Federal do Norte do Tocantins e Instituto Federal do Tocantins. A partir da discussão interinstitucional, foram selecionados os pontos de coleta de amostras de esgoto e a padronização do delineamento metodológico, assim determinando a participação de cada instituição. Inicialmente foram selecionados

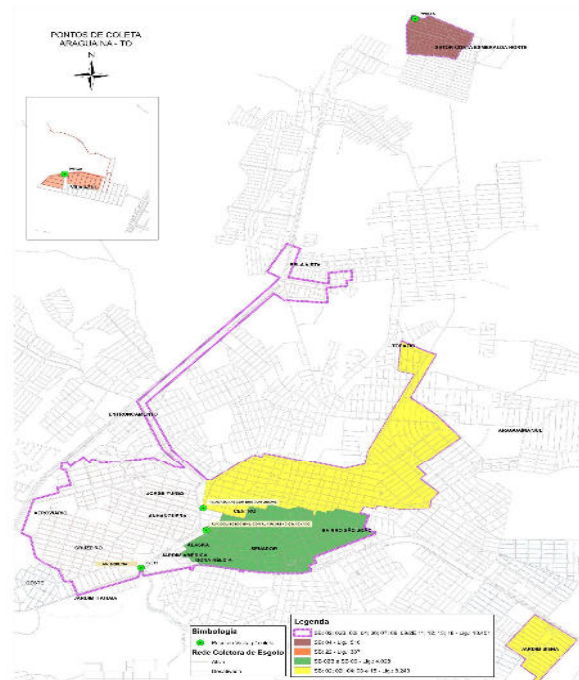
quatro pontos e posteriormente, por questões técnicas e operacionais, foram então elencados dois pontos principais situados na área central da cidade, pontos relacionados à maior circulação de pessoas. A Figura 1 apresenta os pontos de visita da rede de esgotamento sanitário selecionados para o estudo.

Uma vez selecionados os pontos de visitas, foi elaborado um plano de monitoramento, que consistiu na coleta de amostras compostas por um técnico da BRK ambiental e o acompanhamento dos membros da equipe pesquisadora nos pontos da malha urbana selecionados. As amostras compostas foram coletadas manualmente em frascos de vidro autoclavados de 1 litro. Embora o volume de amostra necessário para a concentração do vírus em laboratório seja muito pequeno, ainda assim é desejável que o volume da amostra composta para cada ponto da rede de monitoramento não seja inferior a 1 litro, a fim de possibilitar melhor representatividade durante o período de amostragem. A coleta de amostras compostas ocorre no período da tarde/manhã, usualmente entre 8hs às 12hs e 13hs às 17hs, ambas em volumes correspondentes a 200 mL a cada 16 minutos, totalizando aproximadamente 3 litros ao término de um período de 4 horas de amostragem. O frasco coletor previamente autoclavado é mantido envolto pelo gelo durante todo o período de amostragem. A primeira amostra coletada é submetida à medição de pH e temperatura (Figura 2).

Ao término da amostragem, as amostras do esgoto são transportadas até o Centro de Ciências da Saúde (CCS) da UFNT, onde o material é armazenado em geladeira até o processamento (com um intervalo máximo de até 48h após a coleta em campo). Todos os métodos e procedimentos adotados no presente estudo foram baseados nas publicações recentes e nos métodos adotados pelo grupo de pesquisa da UFMG (publicados em notas técnicas e boletins no site do Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em ETEs Sustentáveis (INCT) (<https://etes-sustentaveis.org/rede-monitoramento-covid-esgotos/>)).

Antes da etapa de concentração viral, foi realizado o processo de pasteurização a 60°C por 90 minutos como medida de biossegurança laboratorial, com a finalidade de reduzir a carga microbiana e “inativar” os vírus das amostras de esgoto coletadas (Wu et al., 2020; Prado et al., 2021). A etapa inicial de processamento das amostras consiste na concentração das partículas virais, pois amostras de água e esgoto costumam apresentar concentrações virais relativamente baixas. O método utilizado no projeto é uma modificação do método de adsorção- eluição em membranas eletronegativas de Katayama et al. (2002) e Symonds et al. (2014). Nesse método, não se realiza eluição do vírus retidos na membrana, mas faz-se a extração do material genético diretamente da membrana, usando kit comercial para extração de ácidos nucleicos virais. Por questões de biossegurança, o processo de concentração viral apresenta etapas que requerem o uso da capela de fluxo de laminar.

Figura 1 - Delimitação de Pontos de Visita (PV) estratégicos para o Monitoramento da Carga Viral do Esgoto em Araguaína - TO



Fonte: BRK-Ambiental (2021)

Figura 2 – pHmetro, um medidor de potencial hidrogeniônico (pH) e amostragem manual por um técnico devidamente treinado para manipulação de redes sanitárias da empresa BRK Ambiental.



Fonte: Pereira e Araújo (2021) Registro fotográfico das coletas de campo.

Iniciando a concentração, transferiu-se um volume de 100mL da amostra de esgoto para um becker contendo uma barra magnética, ambos previamente esterilizados por autoclavação. Adicionou-se então na amostra, 1 ml de $MgCl_2$ (2.5 M), para obter a concentração final de 25mm. Homogeneizou-se a amostra durante 3 minutos e depois mediu-se o pH (fita de reagente). Acidificou-se a amostra usando ácido acético (1 M) até pH entre 3 e 3,5. Esse tratamento de acidificação da água, maximiza a interação dos vírus com a membranas eletronegativas durante filtração. Ressalta-se a importância em filtrar o maior volume possível, até a membrana colmatar (ponto de saturação da membrana), o que significa alcançar o máximo de recuperação de material viral. Na sequência, removeu-se a membrana do suporte do filtro com pinça estéril. Colocou-se a membrana (dobrada) dentro do tubo específico do

kit de extração de DNA a ser utilizado nas próximas etapas do estudo, AllPrep Power Viral DNA/RNA (Qiagen, Hilden, Alemanha). Adicionou-se 600µL da solução PM1 e 6µL de 2-mercaptoetanol, a fim de minimizar riscos de degradação do RNA, uma molécula quimicamente muito instável. Este passo deve ser realizado dentro da capela de exaustão, pois o 2-mercaptoetanol é volátil, com odor intensamente característico. Por fim, armazenou-se a membrana à 20°C até posterior extração do RNA. A sequência dos procedimentos é apresentada na Figura 3.

Figura 3 Sequência dos procedimentos após filtração e recuperação das partículas virais em membrana



Fonte: Araújo (2021) Registro fotográfico dos procedimentos laboratoriais.

3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

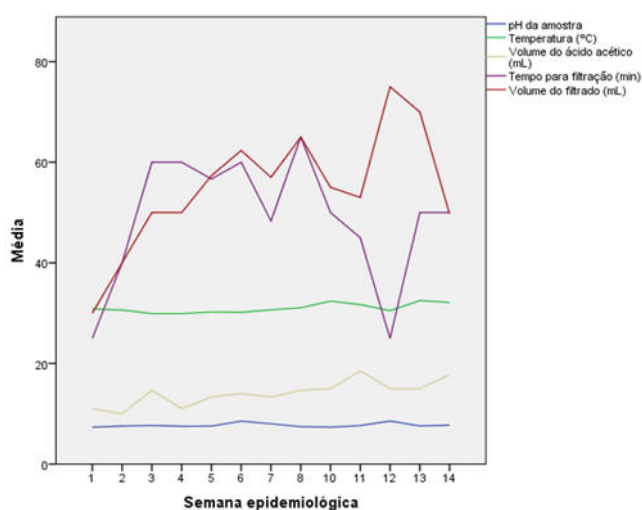
Na Tabela 1 são apresentados os parâmetros verificados ao longo do processo de amostragem e a otimização da concentração viral, com o objetivo principal de verificar a variação da amostra ambiental, variação relacionada aos diferentes pontos da rede, e possivelmente variação por inibidores e variáveis externas na amostra coletada. Ressalta-se que a amostra ambiental, quando comparada às amostras biológicas, apresenta uma ampla instabilidade em relação à composição. Observou-se que o tempo de coleta e o volume do filtrado apresentaram maior variação. Esses resultados, implicaram em maior conhecimento do padrão amostral da rede de esgoto da cidade, permitindo ajustes nos protocolos, bem como direcionando a necessidade de ajustes posteriores nos protocolos da quantificação molecular.

Considerando uma distribuição temporal, os parâmetros pH, temperatura e volume de acético se mantiveram constantes, contudo, o tempo de filtração e o volume do filtrado oscilaram ao longo das semanas epidemiológicas estudadas, o que possivelmente pode ser justificado pelas amostras diluídas coletadas nas últimas semanas com maior frequência de chuvas e, também, pela variação intrínseca de amostras de águas residuais. Essa variação temporal dos parâmetros avaliados é apresentada na Figura 4.

Tabela 1 – Parâmetros físico-químicos verificados ao longo do processo de amostragem e otimização da concentração viral.

	N	Mínimo	Máximo	Média	Desvio Padrão
Tempo de coleta (min)	35	60	200	152,74	50,22
Volume da amostra(L)	38	1	2	1,79	0,41
pH da amostra	39	6,70	9,45	7,66	0,53
Temperatura(C)	39	29,0	32,8	30,94	1,19
Volume ácido acético (ml)	37	8	20	13,92	3,09
Tempo para filtração (min)	37	25	75	49,46	14,66
Volume filtrado (ml)	38	30	80	52,63	12,59

Figura 4 - Oscilação dos parâmetros físico-químicos das amostras da rede de esgoto da cidade de Araguaína, TO, ao longo das semanas epidemiológicas estudadas.



Vale ressaltar que os volumes filtrados estão adequados a outros protocolos e que os objetivos técnicos dentro dessa etapa preliminar estão sendo obtidos. Posteriormente será concluído o processo de extração do material genético do vírus. Por meio dessa nova ferramenta metodológica, os estudos em virologia ambiental vêm alcançando um considerável papel na construção de indicadores socioambientais (PRADO et al., 2021).

Em relação aos dados epidemiológicos, o levantamento do montante dos infectados vêm ocorrendo no município de Araguaína, principalmente, por meio da testagem dos casos sintomáticos, permitindo ao setor municipal de saúde rastrear os setores de maior prevalência da doença conforme disponibilizado pela prefeitura Municipal de Araguaína. Segundo o Boletim Informativo Covid-19 11/11, foram registradas 19 confirmações para Covid-19, dia 10 de novembro, dez mulheres e nove homens. Um óbito foi registrado, um homem de 85 anos. Com esses registros, o município chega a 36.484 casos confirmados, sendo desses 68 casos ativos da doença, 35.869 recuperados e 547 óbitos.

Embora a vigilância epidemiológica tenha como base a identificação clínico-laboratorial da infecção, um fator que dificulta a detecção rápida do novo coronavírus SARS-CoV-2 em uma população,

é o fato de as pessoas infectadas com a COVID-19 não apresentarem sintomas ou os apresentarem de formas mais leves ou até mesmo inespecíficos. Assim, a detecção só é feita após serem reportados os casos clínicos ou quando é disponibilizado o teste. Esse intervalo entre a infecção e a detecção é um dos fatores decisivos para o sucesso no controle da doença e medidas efetivas em saúde pública (Soares et al., 2020). Estudos indicam que a vigilância a partir do esgoto tem se mostrado como uma eficiente alternativa para detecção rápida da circulação do vírus, bem como de seu mapeamento socioespacial em regiões metropolitanas (CHERNICHARO et al., 2020; MOTA et al., 2021; PRADO et al., 2021), porém não identificamos até o momento estudos similares em cidades médias.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O aumento da circulação do vírus na população potencialmente aumenta a carga viral nos sistemas de esgoto das cidades, logo, o conhecimento da rede sanitária da cidade permite identificar áreas com maior presença do vírus, prevendo possíveis surtos e contribuindo em ações regionalizadas. Como estamos em um momento de arrefecimento da pandemia da COVID-19, relacionado principalmente à expansão da imunização, vislumbramos a possibilidade de decaimento da carga viral na rede de esgoto, porém apontamos o sistema de detecção como uma possível ferramenta de alerta rápido da circulação viral. O estudo segue em fase de coleta de amostras, conforme cronograma, previstas para término até novembro de 2021. Após esta fase, prosseguiremos com a análise das amostras, os resultados permitirão descrever se há ou não detecção do coronavírus na rede de esgoto, e também fornecerá subsídios para um estudo comparativo com os resultados obtidos nas notificações de casos da vigilância epidemiológica do município.

5 AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq) e BRK-ambiental.

REFERÊNCIAS

- AGUIAR, V. G.; RAMOS JÚNIOR, D. V.; COSTA, K. G.; DIAS, R. S. D. L. S. Notificando o medo: cartografia e percepção da COVID-19 na malha rodoviária na porção norte dos vales dos Rios Araguaia e Tocantins. *Hygeia Revista Brasileira de Geografia Médica e da Saúde*, v. 16, n. Edição Especial: COVID-19, p. 153-163, 2020.
- AHMED W., Angel N., Edson J., Bibby K., Bivins A., O'Brien J. W., Choi P. M., Kitajima M., Simpson S. L., Li, J., Tschärke, B., Verhagen, R., Smith, W. J. M., Zaugg, J., Dierens, L., Hugenholtz, P., Thomas, K. V., Mueller, J. F. 2020a. First confirmed detection of SARS-CoV-2 in untreated wastewater in Australia: A proof of concept for the wastewater surveillance of COVID-19 in the community. *Science of the Total Environment*, 728(138764),1-8. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2020.138764.
- AHMED W., Bertsch P.M., Bivins A., Bibby K., Farkas K., Gathercole A., Haramoto E., Gyawali P., Korajkic A., McMinn B. R., Mueller J. F., Simpson S. L., Smith W. J. M., Symonds E. M., Thomas K. V., Verhagen R., Kitajima M. 2020b 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*, 739(139960), 1-8. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2020.139960
- AHMED W., Harwood V.J., Gyawali P., Sidhu J. P. S., Toze S. 2015 Comparison of concentration methods for quantitative detection of sewage-associated viral markers in environmental waters. *Applied and Environmental Microbiology*, 81(6), 2042-2049. DOI: 10.1128/AEM.03851-14.

CHERNICHARO, C.A.L.; Araújo, J.C.; Mota Filho, C.R.; Bressani-Ribeiro, T. ; Chamhum-Silva, L. A.; Leal, C.D. ; Leroy, D. ; Machado, E.; Cordero, M.F.E. ; Azevedo, L. S.; Fernandes, L.; Leão, T.; Laguardia, F.2 ; Reis, M.T.P. 3 ; Melo, M.C.; Ayrimoraes, S.R. 2020. Monitoramento do Esgoto como ferramenta de vigilância epidemiológica para controle da COVID-19: Estudo de caso na cidade de Belo Horizonte. ESA-edição especial-Covid-19, 31 de julho de 2020. Espinosa M. F. Occurrence and removal of enteric viruses, SARS-CoV-2 and viral and fecal indicators in wastewater treatment plants. Tese de Doutorado (em preparação).

CHERNICHARO C., MOTA C ARAÚJO J. Covid-19 e o Saneamento no Brasil. <https://etes-sustentaveis.org/> Acesso em: 21 Out 2021.

FONGARO G, Stoco PH, Souza DSM, Grisard EC, Magri ME, Rogovski P, Schörner MA, Barazzetti FH, Christoff AP, de Oliveira LFV, Bazzo ML, Wagner G, Hernández M, Rodríguez-Lázaro D. The presence of SARS-CoV-2 RNA in human sewage in Santa Catarina, Brazil, November 2019. *Sci Total Environ.* 2021 Jul 15;778:146198. doi: 10.1016/j.scitotenv.2021.146198. Epub 2021 Mar 8. PMID: 33714813; PMCID: PMC7938741.

KATAYAMA, H., Shimasaki, A., Ohgaki, S., 2002. Development of a virus concentration method and its application to detection of enterovirus and Norwalk virus from coastal seawater. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 1033–1039. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.3.1033-1039.2002>.

LANA, Raquel Martins et al. Emergência do novo coronavírus (SARS- Cov-2) e o papel de uma vigilância nacional em saúde oportuna e efetiva. 3. ed. Rio de Janeiro: Cad. Saúde Pública, vol. 36 13 de março 2020.

LA ROSA, G., M. Iaconelli, P. Mancini, Ferraro, G.B., Veneri, C., Bonadonna L., Lucentini, L., Suffredini, E. 2020 First detection of SARS-CoV-2 in untreated wastewaters in Italy. *Science of the Total Environment* 2020, <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.139652>

MEDEMA, G., Heijnen, L., Elsinga, G., Italiaander, R., 2020. Presence of SARS-Coronavirus-2 RNA in sewage and correlation with reported COVID-19 prevalence in the early stage of the epidemic in the Netherlands. *Environ. Sci. Technol. Lett.* <https://doi.org/10.1021/acs.estlett.0c00357>.

MOTA, C.R. *et al.* Assessing spatial distribution of COVID-19 prevalence in Brazil using decentralised sewage monitoring. *Water Research*, 202, 2021.

PECCIA, J., Zulli, A., Brackney, D.E. et al. 2020. Measurement of SARS-CoV-2 RNA in wastewater tracks community infection dynamics. *Nat. Biotechnol.* Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/s41587-020-0684-z/>>

PRADO, T., Fumian, T., Mannarino, C., Maranhão, A., Siqueira M., Miagostovich, M.P. 2020. Preliminary results of SARS-CoV-2 detection in sewerage system in Niterói municipality, Rio de Janeiro, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, Vol. 115: e200196.

PRADO T, Fumian TM, Mannarino CF, Resende PC, Motta FC, Eppinghaus ALF, Chagas do Vale VH, Braz RMS, de Andrade JDSR, Maranhão AG, Miagostovich MP. Wastewater-based epidemiology as a useful tool to track SARS-CoV-2 and support public health policies at municipal level in Brazil. *Water Res.* 2021 Mar 1;191:116810. doi: 10.1016/j.watres.2021.116810. Epub 2021 Jan 5. PMID: 33434709; PMCID: PMC7832254.

PRADO T., MIAGOSTOVICH M., P. Virologia ambiental e saneamento no Brasil uma revisão narrativa https://oasisbr.ibict.br/vufind/Record/FIOCRUZ5_765a79fdaa215d84f8eab33d5452528#:~:text=Os%20servi%C3%A7os%20de%20saneamento%20b%C3%A1sico,causar%20gastroenterites%20agudas%20e%20hepatites. Acesso em: 30 Out 2021.

SANCHES H.,N. Desigualdades socioespaciais e seus reflexos na Saúde Pública: Aspectos epidemiológicos das doenças diarreicas agudas (DDA) na cidade de Araguaína. Acesso em : 05 Nov 2021.

SOARES et al., 2020. Vigilância do sistema de esgotamento sanitário e o novo coronavírus (SARS-CoV-2) no Brasil: uma discussão necessária. Artigo submetido para publicação.

SYMONDS, E. M., Verbyla, M. E., Lukasik, J. O., Kafle, R. C., Breitbart, M., Mihelcic, J. R. 2014 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 Res.* 65, 257–270.

WU, F., Xiao, A., Zhang, J., Gu, X., Lee, W., Kauffman, K., Hanage, W., Matus, M., Ghaeli, N., Endo, N., Duvallet, C., Moniz, K., Erickson, T., Chai, P., Thompson, J., Alm, E., 2020a. SARS-CoV-2 titers in wastewater are higher than expected from clinically confirmed cases. *medRxiv.* <https://doi.org/10.1101/2020.04.05.20051540>

WU, Y.; Guo, C.; Tang, L.; Hong, Z.; Zhou, J.; Dong, X.; Yin, H.; Xiao, Q.; Tang, Y.; Qu, X.; Kuang, L.; Fang, X.; Mishra, N.; Lu, J.; Shan, H.; Jiang, G.; Huang, X.; *Lancet Gastroenterol. Hepatol.* 2020, 5, 434.

YEO, C.; KAUSHAL, S.; YEO, D. Enteric involvement of coronaviruses: is faecal oral transmission of SARS - CoV - 2 possible? *Lancet Gastroenterol Hepatol*, vol. 5, 335:337,2020. Disponível em:<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7130008/>> . Acesso em: 4 maio 2020.