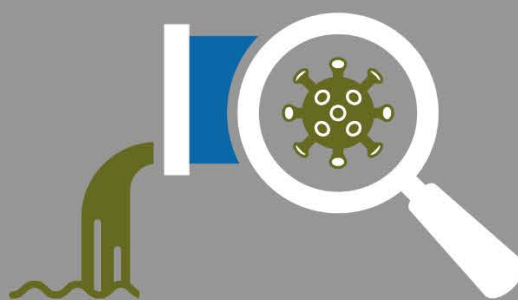




# BOLETIM TEMÁTICO Nº 5

Avaliação de amostragens simples e composta para o monitoramento do SARS-CoV-2 em esgotos



MONITORAMENTO  
COVID ESGOTOS



**Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia – INCT ETEs Sustentáveis**  
etes-sustentaveis.org

**Agência Nacional de Águas e Saneamento Básico – ANA**  
www.ana.gov.br

**Companhia de Saneamento de Minas Gerais – COPASA**  
www.copasa.com.br

**Secretaria de Estado da Saúde de Minas Gerais – SES**  
www.saude.mg.gov.br

**Instituto Mineiro de Gestão das Águas – IGAM**  
www.igam.mg.gov.br

#### **Equipe Técnica**

##### **ANA**

**Supervisão do Projeto**  
Flávio Tröger  
Sérgio Ayrimoraes

##### **Equipe Técnica**

Carlos Perdigão  
Diana Leite  
Marcus Fuckner  
Raylton Alves  
Thamiris Lima  
Thiago Fontenelle

##### **INCT ETEs Sustentáveis**

**Coordenação Geral**  
Carlos Chernicharo

##### **Coordenação Executiva**

Juliana Calábria  
Cesar Mota

##### **Equipe Técnica**

Alyne Duarte  
Ayana Lemos  
Bernardo de Lima  
Gabriel Tadeu  
Izabel Chiodi  
Lariza Azevedo  
Lívia Lobato  
Lucas Chamhum  
Lucas Vassale  
Matheus Pascoal  
Rafael Pessoa  
Thiago Bressani  
Thiago Morandi  
Vera Tainá Mota

##### **Equipe de Laboratório**

Cíntia Leal  
Deborah Leroy  
Elayne Machado  
Luyara Fernandes  
Maria Fernanda Espinosa  
Thiago Leão

##### **COPASA**

**Supervisão do Projeto**  
Marcus Tullius

##### **Equipe Técnica**

David Bichara  
Jorge Luiz Borges  
Gilberto Gomes  
Ronaldo de Melo  
Sérgio Neves  
Solange da Costa

##### **SES**

**Supervisão do Projeto**  
Filipe Laguardia

##### **Equipe Técnica**

Beatriz Carvalho  
Dario Ramalho

##### **SEMAD**

**Supervisão do Projeto**  
Marília Melo

##### **Equipe Técnica**

Katiane Cristina Almeida  
Valquíria Moreira

##### **IGAM**

Marcelo da Fonseca

#### **Equipe Editorial**

##### **Supervisão editorial**

Agência Nacional de Águas e Saneamento Básico

##### **Elaboração dos originais**

INCT ETEs Sustentáveis

##### **Revisão dos originais**

Agência Nacional de Águas e Saneamento Básico

##### **Projeto gráfico, editoração e capa**

Monumenta Comunicação e Estratégias Sociais

##### **Mapas temáticos**

INCT ETEs Sustentáveis

O projeto piloto: *Detecção e quantificação do novo coronavírus em amostras de esgoto nas cidades de Belo Horizonte e Contagem - Monitoramento COVID Esgotos* - é coordenado e executado pelo Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia Estações de Tratamento de Esgotos Sustentáveis (INCT ETEs Sustentáveis) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), com o apoio técnico e financeiro da Agência Nacional de Águas e Saneamento Básico (ANA) e apoio técnico da Companhia de Saneamento de Minas Gerais (COPASA), da Secretaria de Estado de Saúde de Minas Gerais (SES) e do Instituto Mineiro de Gestão das Águas (IGAM). Gestão Financeira: Fundação Christiano Ottoni.

As ilustrações, tabelas e gráficos sem indicação da fonte foram elaborados pelo INCT ETEs Sustentáveis. Todos os direitos reservados. É permitida a reprodução deste texto e dos dados nele contidos, desde que citada a fonte. Reproduções para fins comerciais são proibidas. Disponível também em: <http://www.ana.gov.br>.

## APRESENTAÇÃO

O plano de comunicação estabelecido no âmbito do Projeto-piloto: Detecção e quantificação do novo coronavírus em amostras de esgoto nas cidades de Belo Horizonte e Contagem, previu além de outras iniciativas, a publicação de dois tipos de Boletins, os de Acompanhamento e os Temáticos. Enquanto os Boletins de Acompanhamento têm por objetivo a divulgação regular dos resultados de monitoramento do SARS-CoV-2 nas amostras de esgoto coletadas em diferentes pontos do sistema de esgotamento sanitário de Belo Horizonte e parte de Contagem, os Boletins Temáticos buscam abordar, em maior profundidade, outros aspectos do estudo.

O Projeto-Piloto é uma iniciativa conjunta da Agência Nacional de Águas e Saneamento Básico (ANA) e do Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Estações Sustentáveis de Tratamento de Esgotos (INCT ETEs Sustentáveis – UFMG), em parceria com a Companhia de Saneamento de Minas Gerais (Copasa), o Instituto Mineiro de Gestão das Águas (IGAM) e a Secretaria de Estado de Saúde de Minas Gerais (SES).

Este **Boletim Temático nº 5** visa avaliar a influência de dois métodos de amostragem (simples e composta) e de diferentes tempos de amostragem composta (com duração de 1h, 2h, 3h e 4h) no monitoramento do SARS-CoV-2 no esgoto de diferentes sub-bacias de esgotamento sanitário de Belo Horizonte.

A vigilância ambiental do SARS-CoV-2 por meio de sua detecção no esgoto é bastante útil e traz informações valiosas sobre a circulação deste vírus em uma determinada região. Entretanto, ainda existem dúvidas sobre como deve ser realizada a coleta da amostra, para que as concentrações de SARS-CoV-2 no esgoto sejam representativas da circulação do vírus na população. Tendo em vista que as vazões flutuam continuamente nas redes de esgotamento sanitário, é importante compreender se essas variações de vazão correspondem também a variações consideráveis nas concentrações de SARS-CoV-2.

A amostragem composta, em um período de 24 horas, é considerada o tipo de amostragem mais desejável, pois pode incluir excretas eliminadas em momentos diversos do dia, resultando em amostras mais representativas da população. Este tipo de amostragem é comumente realizado em ETEs de médio a grande porte, frequentemente com o uso de amostradores automáticos. Porém, a realização de amostragem composta, por longos períodos (maior que 4 horas) torna-se impraticável, seja manualmente ou com o uso de amostradores automáticos, quando realizada fora da ETE, ou seja, em coletores, interceptores, canais ou estações elevatórias localizados em áreas públicas.

Em tais situações, o risco de furto do equipamento e o custo de mão de obra podem ser muito elevados. Assim, surgem algumas questões: (i) a amostragem simples é adequada para monitorar as concentrações do SARS-CoV-2 no esgoto ou é necessária a realização de amostragem composta?; (ii) a amostragem composta é representativa se for realizada apenas durante um período do dia (p. ex.: pela manhã ou pela tarde)?; no caso da amostra simples ser adequada, existe um melhor horário do dia para se proceder a amostragem do esgoto?

O plano de amostragem e a coleta de amostras para a detecção do SARS-CoV-2 no esgoto devem levar em consideração alguns fatores. O primeiro é avaliar qual é o objetivo do monitoramento, que pode ser, por exemplo: (a) avaliar as tendências na ocorrência do SARS-CoV-2 no esgoto, monitorando a

circulação do vírus na população ao longo do tempo; (b) emitir alerta precoce da ressurgência da circulação do vírus em locais específicos ou até mesmo na cidade como um todo; (c) rastrear a prevalência da doença em uma determinada comunidade, identificando áreas onde a situação é mais preocupante, bem como áreas que são menos afetadas pelo vírus; ou (d) rastrear a presença e prevalência de variantes genéticas do SARS-CoV-2 que são consideradas de preocupação à saúde pública. Além dos objetivos do estudo, outros fatores devem ser levados em consideração durante a elaboração dos planos de amostragem, a saber (WEF, 2020):

- (i) Segurança do trabalhador: é sabido, atualmente, que as medidas recomendadas para a proteção dos trabalhadores do setor de saneamento durante os procedimentos de coleta e manuseio das amostras de esgoto são suficientes para garantir sua segurança com relação ao SARS-CoV-2. Não há evidências de que a transmissão do vírus possa ocorrer por meio do contato com o esgoto. Mais detalhes sobre o assunto podem ser obtidos no *Protocolo de Segurança e proteção individual em operações que envolvam a coleta e o manuseio de amostras de esgoto*.
- (ii) Metodologia adotada para a coleta, preservação e transporte da amostra: deve haver consistência no método de amostragem, por isso é importante que haja um protocolo a ser seguido e que a equipe responsável pela coleta, preservação e transporte da amostra até o laboratório seja devidamente treinada. Mais informações sobre a metodologia adotada para a coleta, preservação e transporte das amostras de esgoto durante o Projeto Piloto podem ser encontradas na nota técnica *Contribuição para a elaboração de planos de monitoramento da ocorrência do novo coronavírus no esgoto*.
- (iii) Possibilidade de análise de parâmetros adicionais: a coleta de dados adicionais é importante, pois pode fornecer informações sobre o contexto em que a amostra foi coletada e auxiliar na interpretação dos dados de concentração viral. Dentre os parâmetros adicionais que podem ser considerados para avaliação estão a temperatura da amostra no momento da coleta e na chegada ao laboratório, a demanda química de oxigênio (DQO), e a concentração de amônia. Estes dois últimos parâmetros podem, por exemplo, auxiliar na determinação da população associada a cada ponto de amostragem, especialmente se a vazão puder ser determinada, sendo frequentemente utilizados em estudos epidemiológicos baseados no esgoto (Rico *et al.*, 2017).

No que diz respeito à metodologia adotada para a coleta, cabe aqui salientar os tipos de amostragem (simples ou composta) que podem ser utilizados, visto que é o tema central deste Boletim Temático. A amostragem composta pode ser realizada por meio de amostrador automático ou manualmente. O emprego de amostradores automáticos está associado a uma série de vantagens, como por exemplo, maior segurança para o operador, maior confiabilidade na composição e preservação das amostras e menor tempo despendido na coleta. Entretanto, nem sempre os amostradores automáticos estão disponíveis e, nesse caso, é possível que a coleta composta seja realizada manualmente, coletando amostras em intervalos de tempo regulares e transferindo cada alíquota coletada para um mesmo frasco.

A amostragem composta, seja por meio de amostradores automáticos ou manual, é geralmente considerada mais adequada do que a amostragem simples. Todavia, em alguns casos, a amostragem simples pode ser considerada aceitável, por exemplo, quando a amostragem composta não for factível na prática. A coleta de amostras simples pode facilitar o trabalho, quando o objetivo é monitorar vários

pontos dentro de uma determinada área, por exemplo. A coleta de amostras simples pode ser também a única abordagem possível para o monitoramento de comunidades pequenas, comunidades rurais e locais que não são atendidos por estações de tratamento de esgotos centralizadas e/ou que não possuem os equipamentos ou equipes disponíveis para a realização de amostragem composta (WEF, 2020). No caso de amostragens simples realizadas em cidades de maior porte, com estações de tratamento centralizadas, é importante ainda considerar o tempo de percurso do esgoto na rede coletora, visto que a coleta em determinado ponto do sistema de esgotamento sanitário pode refletir as condições do esgoto gerado em momento distinto.

Apesar das vantagens associadas à praticidade da coleta simples, a coleta composta de 24 horas vem sendo reportada em vários estudos (Medema *et al.*, 2020; Ahmed *et al.*, 2020; Wu *et al.*, 2020; Sherchan *et al.*, 2020; La Rosa *et al.*, 2020; Lodder e Husman, 2020) e considerada mais representativa das concentrações do material genético do SARS-CoV-2 no esgoto (Curtis *et al.*, 2020; WEF, 2020; Rafiee *et al.*, 2021; Nemudryi *et al.*, 2020). Na prática, entretanto, períodos de coleta acima de 6-8 horas têm se mostrado inviáveis no contexto brasileiro, especialmente quando é necessário monitorar vários pontos ao longo do sistema de esgotamento sanitário.

Dessa forma, coletas de amostras compostas com duração de 2 a 8 horas também têm sido consideradas adequadas (WEF, 2020). Experiências do presente Projeto Piloto têm demonstrado que, para o monitoramento de sub-bacias de esgotamento sanitário, no caso de amostras tomadas diretamente da rede coletora e interceptora de esgoto, a amostragem por um período de 4 horas no turno da manhã tem sido representativa das cargas virais eliminadas pelas pessoas infectadas pelo SARS-CoV-2, uma vez que as cargas virais detectadas têm seguido as tendências da situação reportada para as regiões monitoradas, em termos de agravamento ou abrandamento da pandemia de Covid-19 ao longo do tempo.

Para entender melhor o impacto da coleta de amostras simples e compostas na determinação das concentrações do SARS-CoV-2 no esgoto, esses dois tipos de amostragens foram comparados para o monitoramento de quatro sub-bacias de esgotamento sanitário de Belo Horizonte. A metodologia utilizada e os resultados obtidos são apresentados a seguir.

## Comparação entre amostragem simples e composta para a determinação de SARS-CoV-2 no esgoto de Belo Horizonte

### 1. Escolha dos pontos de amostragem para a realização do estudo

As coletas foram realizadas em quatro sub-bacias de esgotamento sanitário com características distintas, principalmente em termos de extensão e tempo de percurso do esgoto na rede coletora e interceptora da cidade de Belo Horizonte, conforme é apresentado na Tabela 1. Na Figura 1 é apresentada a localização dos pontos de monitoramento com suas respectivas áreas de contribuição.

**Tabela 1** – Identificação e características das sub-bacias de esgotamento sanitário contempladas no estudo

Identificação	Descrição	Equivalente populacional	Vazão média estimada (L/s)	Tempo de percurso do esgoto na rede (h)
SBA-04	Ribeirão Arrudas (margem esquerda) - Sub-bacia do Ribeirão Arrudas	286.191	470	2,81
SBA-05	Córrego Pastinho - Sub-bacia do Ribeirão Arrudas	43.297	71	0,47
SBO-01	Córrego Ressaca/Sarandi - Sub-bacia do Ribeirão Onça	328.948	513	0,58
SBO-02	Córregos Mergulhão/Tijuco - Sub-bacia do Ribeirão Onça	10.341	16	0,53

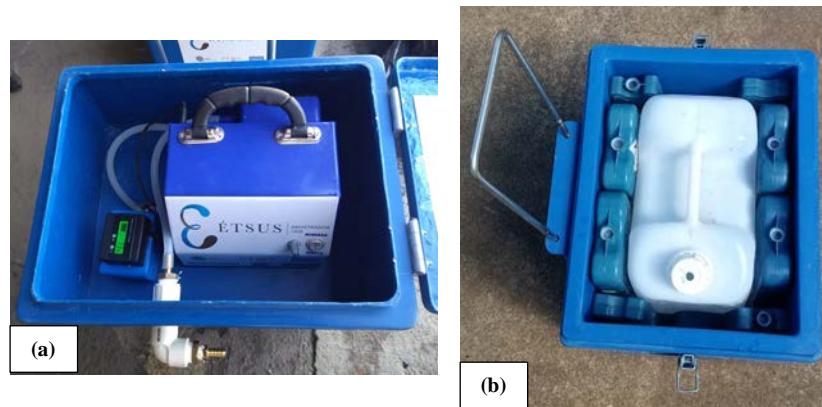


**Figura 1** – Sub-bacias de esgotamento sanitário contempladas no estudo

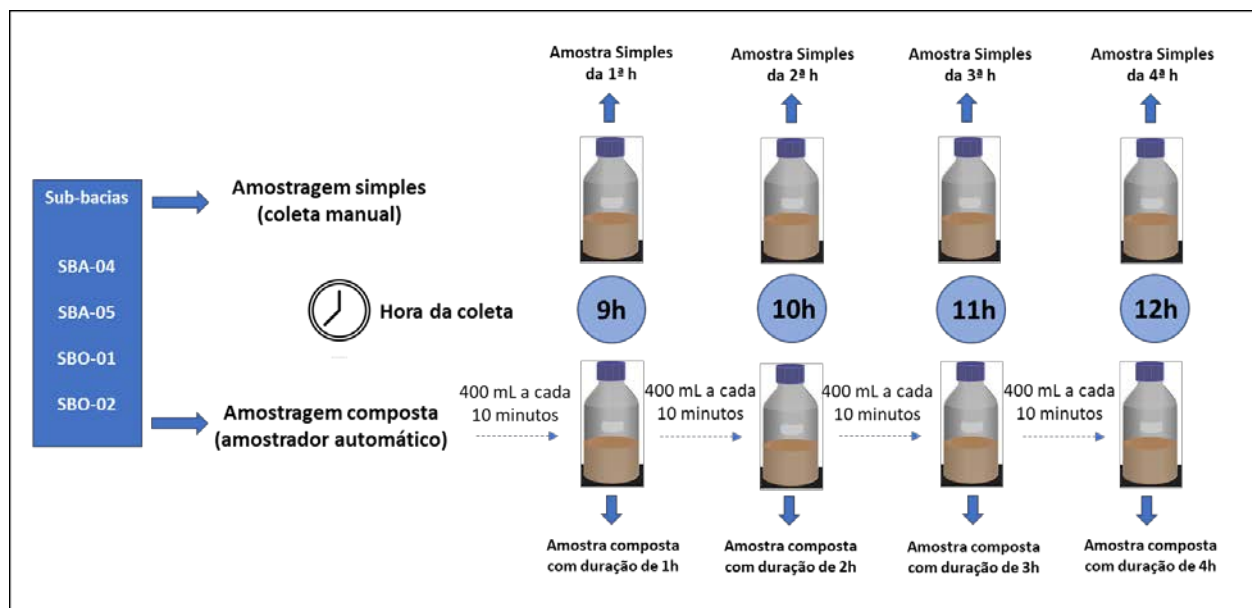
## 2. Amostragem e processamento das amostras

Para os quatro pontos de monitoramento foram realizadas amostragens simples e compostas. As campanhas de amostragem foram realizadas em três semanas consecutivas nos meses de agosto e setembro de 2020, nas semanas epidemiológicas 35, 36 e 37 de 2020. As coletas ocorreram no período da manhã, das 8h até as 12h. As coletas das amostras compostas tiveram duração de 1, 2, 3 e 4 horas, e foram realizadas por meio de um amostrador automático (Figura 2), que coletava 400 mL a cada intervalo de 10 minutos, perfazendo um volume total de aproximadamente 2,4 L para cada hora de operação. Durante todo o período da amostragem composta, as amostras foram mantidas sob refrigeração com a utilização de placas de gelo. As coletas simples foram realizadas manualmente, de

hora em hora, quatro vezes. Em cada amostragem simples, 1 L de esgoto era coletado. O esgoto coletado pelos dois tipos de amostragem foi acondicionado em um isopor com gelo e transferido até o laboratório. A Figura 3 apresenta a representação esquemática das amostragens simples e compostas.



**Figura 2** – Amostrador automático utilizado para a coleta de amostras compostas: (a) com detalhe do compartimento interno superior; e (b) do compartimento interno inferior.



**Figura 3** – Esquema das amostragens simples e compostas realizadas para o estudo

Ao ingressarem no Laboratório de Microbiologia do Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental da UFMG, as amostras foram submetidas à análise para detecção e quantificação do SARS-CoV-2 (utilizando a região alvo N1) por RT-qPCR, seguindo a metodologia descrita na nota técnica *Metodologia para concentração do novo coronavírus em amostras de água e esgoto por técnicas moleculares*.

### 3. Campanhas de amostragem adicionais realizadas para a sub-bacia SBO-02 do Ribeirão Onça

Com intuito de ampliar a investigação sobre as diferenças entre as metodologias de amostragem simples e composta, entre dezembro de 2020 e janeiro de 2021 foram realizadas cinco novas campanhas de amostragem (nas semanas epidemiológicas 50/2020 e entre 1 e 4/2021), na sub-bacia SBO-02 do

Ribeirão Onça (Córregos Mergulhão/ Tijuco). As coletas foram realizadas no período da manhã. As amostras simples, foram tomadas na por volta de 9h da manhã e as amostras compostas tiveram duração de 4 horas, sendo coletadas por volta das 12h. O motivo da escolha da sub-bacia SBO-02 para este ensaio adicional está associado a esta ser uma pequena sub-bacia de esgotamento sanitário, para a qual esperava-se menor influência dos seguintes fatores intervenientes na característica do esgoto: (i) tempo de deslocamento do esgoto na rede; e (ii) presença de efluentes de natureza não-doméstica. A amostragem simples foi realizada por volta de 9h da manhã, com intuito de representar o esgoto gerado no início da manhã, tendo em vista que o tempo de percurso do esgoto na rede para esta sub-bacia é baixo (aproximadamente meia hora – vide Tabela 1). Outro motivo para a escolha desta sub-bacia foi a elevada prevalência de casos confirmados de Covid-19 durante o período do estudo.

Para a análise dos dados e comparação entre as amostragens simples e compostas, foram também considerados os resultados obtidos para as três primeiras campanhas de amostragem nesta sub-bacia, realizadas em agosto e setembro de 2020. Os dados de concentração obtidos foram submetidos a um teste de normalidade (Teste Shapiro-Wilk) a um nível de significância de 5%. Como foi constatado que os dados não seguiam uma distribuição normal, foi realizado um teste não paramétrico para comparação entre as medianas (Teste U de Mann-Whitney) das concentrações obtidas para a amostragem simples e composta, a um nível de significância de 5%. As análises estatísticas foram realizadas utilizando a plataforma R (<https://www.r-project.org>).

## RESULTADOS

### 1. Comparação entre a amostragem simples e composta

Para avaliar as diferenças entre amostragens simples e compostas, primeiramente analisou-se a presença ou ausência do SARS-CoV-2 nas diferentes amostragens realizadas. Das 48 amostras simples coletadas durante as três campanhas de amostragem, 46 (96%) foram positivas para o SARS-CoV-2 e 28 (58%) apresentaram concentração de SARS-CoV-2 superior ao limite de detecção (LD) do método (igual a 3,6 cópias/mL). Das 48 amostras compostas, 47 (98%) foram positivas para a presença do material genético do vírus e 34 amostras (71%) apresentaram concentração viral superior ao LD (Tabela 2).

Importante mencionar que a única amostra composta que apresentou resultado negativo para a presença do vírus (coletada no ponto SBA-05, com duração de 2 horas), teve sua amostra simples correspondente (coletada na mesma hora) também negativa. Dessa forma, foi observado que tanto a coleta simples, quanto a coleta composta foi capaz de detectar a presença do SARS-CoV-2 na grande maioria das amostragens realizadas. Entretanto, boa parte das amostras simples que foram positivas para o SARS-CoV-2 apresentaram concentrações abaixo do limite de detecção do método, o que foi observado em menor proporção para as amostras compostas (Tabela 2).



**Tabela 2** – Detecção do SARS-CoV-2 nas amostras de esgoto coletas pelos métodos de amostragem simples e composta

Método de amostragem	Nº amostras positivas/ Nº amostras testadas					Frequência de amostras positivas (%)
	Campanha de amostragem	SBA-04	SBA-05	SBO-01	SBO-02	
<b>Simple</b>	1	4/4	4/4	4/4	4/4	96
	2	4/4	3/4	4/4	3/4	
	3	4/4	4/4	4/4	4/4	
<b>Composta</b>	1	4/4	4/4	4/4	4/4	98
	2	4/4	3/4	4/4	4/4	
	3	4/4	4/4	4/4	4/4	

Método de amostragem	Nº de amostras positivas acima do LD*/ Nº de amostras testadas					Frequência de amostras positivas (%)
	Campanha de amostragem	SBA-04	SBA-05	SBO-01	SBO-02	
<b>Simple</b>	1	4/4	4/4	4/4	3/4	58
	2	4/4	1/4	2/4	1/4	
	3	1/4	1/4	2/4	1/4	
<b>Composta</b>	1	4/4	4/4	4/4	4/4	71
	2	3/4	1/4	3/4	3/4	
	3	3/4	3/4	0/4	2/4	

\* LD (Limite de detecção) = 3,6 cópias/ mL

Para comparação entre os tipos de amostragens, as concentrações virais detectadas nas amostras simples coletadas após cada hora (1<sup>a</sup>, 2<sup>a</sup>, 3<sup>a</sup> e 4<sup>a</sup> hora) foram comparadas com as concentrações obtidas para as amostras compostas correspondentes (que tiveram duração de 1, 2, 3 e 4 horas). A Figura 4 (a-d) apresenta as concentrações de SARS-CoV-2 medidas nos pontos de amostragem durante as três campanhas de amostragem (nas semanas epidemiológicas 35, 36 e 37). Dentre as amostras compostas analisadas, considerando todos os pontos de monitoramento, a maioria (32 de 48 amostras – 67%), apresentou concentração viral 20% superior em relação a sua amostra simples correspondente (coletada na mesma hora).

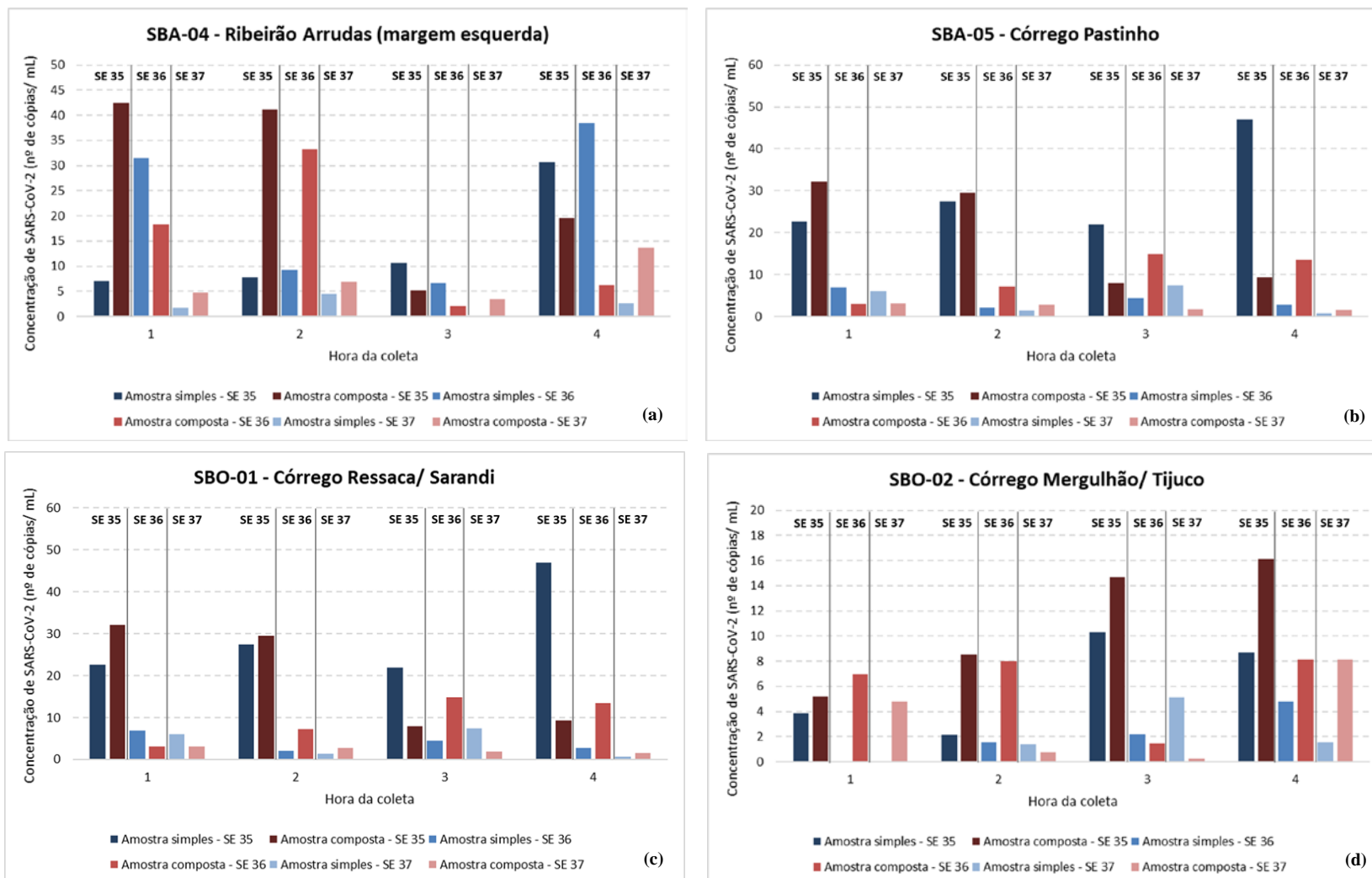
No caso dos pontos SBA-04 (margem esquerda do Ribeirão Arrudas) e SBO-01 (Córrego Ressaca/Sarandi), as maiores sub-bacias avaliadas, isso ocorreu para 58% e 50%, respectivamente das amostragens realizadas. Para o ponto SBA-05 (Córrego Pastinho), em 83%, e para o ponto SBO-02 (Córrego Mergulhão/ Tijuco), em 75% das amostras analisadas. As maiores concentrações detectadas nas amostras compostas, quando comparadas às amostras simples correspondentes, na maioria das amostragens realizadas, pode indicar certa superioridade do método de amostragem composta em captar o material genético do SARS-CoV-2 no esgoto.

No presente estudo foi observado que nas menores sub-bacias (SBA-05 e SBO-02) ficou mais evidenciada a superioridade da amostragem composta em relação à simples, visto que as amostras compostas foram capazes de detectar o SARS-CoV-2 em maiores concentrações na grande maioria dos eventos de amostragem. Especialmente em sub-bacias menores, a presença do material genético viral no esgoto pode ser esporádica e as concentrações virais podem variar consideravelmente ao longo do tempo e com as variações de vazão ao longo do dia. Em regiões onde há menor população servida, a variação

esperada dos hábitos de ir ao banheiro da população tende a ser mais acentuada, e conseqüentemente, mais acentuadas serão as variações dos parâmetros do esgoto ao longo do dia. Dessa forma, para o monitoramento de regiões pequenas, a amostragem composta tende a ser mais representativa.

Outro aspecto importante a ser considerado, é o tempo de percurso do esgoto na rede de esgotamento. Especialmente em bacias muito extensas, com tempos de percurso do esgoto na rede muito elevados (acima de 1 hora), provavelmente a amostragem realizada em determinada hora do dia não representará o esgoto que está sendo produzido nesta mesma hora. Isso ocorre principalmente quando se utiliza a amostragem simples.

No presente estudo, foi possível observar que na sub-bacia SBA-04 do Ribeirão Arrudas (Ribeirão Arrudas – margem esquerda), que é a bacia que apresenta maior tempo de percurso do esgoto na rede dentre as bacias monitoradas (aproximadamente 3 horas), houve tendência de se detectar maiores concentrações de SARS-CoV-2 na última coleta simples (4ª hora, realizada por volta de 12h) (Figura 4a). Possivelmente isso ocorreu, pois a coleta simples da 4ª hora representa a contribuição de esgoto das primeiras horas da manhã nesta sub-bacia (em função do tempo de percurso na rede até o ponto de coleta), período em que se espera ter uma maior utilização das peças sanitárias pela população.



**Figura 4** – Concentrações de SARS-CoV-2 para as amostras simples e compostas, por hora, durante as três campanhas de amostragem realizadas (Semanas epidemiológicas 35, 36 e 37) para os pontos de monitoramento (a) SBA-04 – Ribeirão Arrudas (margem esquerda), (b) SBA-05 (Córrego Pastinho), (c) SBO-01 Córrego Ressaca/ Sarandi e (d) SBO-02 Córrego Mergulhão/ Tijuco.

A Tabela 3 apresenta a estatística descritiva das concentrações obtidas para o SARS-CoV-2 durante as três campanhas de amostragem para os quatro pontos de monitoramento. Para a sub-bacia SBA-04 (Ribeirão Arrudas – Margem esquerda) as médias das concentrações de SARS-CoV-2 das amostras simples variaram entre 5,8 e 24 cópias/ mL e das amostras compostas entre 3,5 e 27,2 cópias/ mL, durante o período de amostragem. Considerando as três campanhas, a variabilidade das concentrações virais obtidas foi elevada tanto para as amostras simples, quanto para as amostras compostas, como pode ser observado pelos elevados valores nos desvios-padrão e nos coeficientes de variação (CV). Quando se comparam as amostras compostas com suas amostras simples correspondentes, observa-se que a variabilidade é menor para as amostras compostas. Exceção ocorreu para as amostras coletadas durante a 2ª hora, nesta sub-bacia (SBA-04). Os CV para as amostras compostas foram iguais a 87,5%, 66,1%, 45,3% e 51,3% e para as amostras simples foram iguais a 118,1%, 34,7%, 90,3% e 78,7%, na 1ª, 2ª, 3ª e 4ª horas de coleta, respectivamente (Tabela 3).

Para a sub-bacia SBA-05 do Ribeirão Arrudas (Córrego Pastinho), as médias das concentrações variaram entre 5,9 e 40,7 cópias/ mL para as amostras simples e entre 32,2 e 71,1 cópias/ mL para as amostras compostas ao longo das 4 horas de coleta. A variabilidade das concentrações obtidas foi bastante elevada para essa sub-bacia, considerando os três dias de ensaio. Na comparação entre os métodos de amostragem, as concentrações das amostras compostas coletadas com 1 e 4 horas apresentaram menor variabilidade em relação às suas amostras simples correspondentes, como pode ser observado pelos CV iguais a 165,0% e 99,7% calculados para amostras compostas de 1 e 4 horas, em detrimento dos CV iguais a 167,0% e 104,4% calculados para as amostras simples, para as coletas da 1ª e 4ª horas, respectivamente. Ao contrário do que era esperado, as concentrações das amostras compostas de 2 e 3 horas foram mais variáveis, apresentando CV iguais a 164,8% e 165,6%, respectivamente, em detrimento do método de amostragem simples, cujas concentrações tiveram CV iguais a 147,0% e 161,1%, na 2ª e 3ª hora de coleta, respectivamente (Tabela 3).

Na sub-bacia SBO-01 do Ribeirão Onça (Córrego Ressaca/ Sarandi) as médias das concentrações do SARS-CoV-2 variaram entre 10,3 e 16,8 cópias/mL utilizando o método de amostragem simples e entre 8,1 e 13,2 cópias/ mL utilizando o método de amostragem composta ao longo das 4 horas de coleta. Comparando-se os CV das amostras compostas com suas amostras simples correspondentes, é possível observar que, novamente, as amostras compostas apresentaram menor variabilidade. Os CV das amostras compostas de 2, 3 e 4 horas de coleta, com valores iguais a 112,8%, 79,3% e 74,1%, respectivamente, foram menores do que os CV das amostras simples correspondentes, iguais a 144,3%, 83,1% e 155,4%, respectivamente (Tabela 3).

Para a sub-bacia SBO-02 do Ribeirão Onça (Córrego Mergulhão/Tijuco), as médias das concentrações virais variaram entre 1,32 e 5,89 cópias/ mL para as amostras simples e entre 5,5 e 10,8 cópias/mL para as amostras compostas, durante as 4 horas de coleta, nas três campanhas de amostragem. A variabilidade dos dados foi menor para as amostras compostas com duração de 1 e 4 horas, com CV iguais a 20,7% e 42,8%, respectivamente, quando comparadas às suas respectivas amostras simples, com CV iguais a 29,9% e 71,6%, respectivamente (Tabela 3). A mesma tendência foi observada para a sub-bacia SBA-05 do Ribeirão Arrudas.

De maneira geral, é possível afirmar que houve uma maior variabilidade dos resultados quando utilizado o método de amostragem simples. Além disso, as médias das concentrações virais obtidas também foram menores para as amostras simples quando comparadas as suas amostras compostas correspondentes

(coletadas na mesma hora). Esse resultado corrobora resultados de outros estudos em que foram comparadas as coletas simples e compostas para detecção de SARS-CoV-2 (Curtis *et al.*, 2020; Rafiee *et al.*, 2021).

Importante mencionar que a amostragem simples pode ser utilizada para a vigilância epidemiológica do SARS-CoV-2 no esgoto, especialmente quando a amostragem composta não é viável (WEF, 2020). No entanto, é importante levar em consideração que a acurácia e representatividade deste método de amostragem pode ser menor, especialmente quando a prevalência de indivíduos infectados na região monitorada é baixa, visto que a concentração viral pode ser diluída no esgoto a níveis que dificultem a sua detecção quando de apenas uma tomada amostral (Curtis *et al.*, 2020; Rafiee *et al.*, 2021).

**Tabela 3** – Estatística descritiva das concentrações de SARS-CoV-2 por hora nas três campanhas de amostragem realizadas.

**SBA-04 – Ribeirão Arrudas (margem esquerda)**

Horas	Amostras simples (concentração – nº cópias/ mL)						Amostras compostas (concentração – nº cópias/ mL)					
	Média ± DP	Mín	Máx	25%	75%	CV (%)	Média ± DP	Mín	Máx	25%	75%	CV (%)
1	13,4 ± 15,9	1,8	31,5	4,4	19,3	118,1	21,9 ± 19,1	4,7	42,5	11,5	30,4	87,5
2	7,1 ± 2,5	4,4	9,3	6,1	8,5	34,7	27,2 ± 17,9	7,0	41,2	20,1	37,3	66,1
3	5,8 ± 5,3	0,2	10,6	3,4	8,6	90,3	3,5 ± 1,6	2,0	5,2	2,7	4,3	45,3
4	24,0 ± 18,9	2,7	38,5	16,7	34,6	78,7	13,2 ± 6,8	6,2	19,6	10,0	16,7	51,3

**SBA-05 – Córrego Pastinho**

Horas	Amostras simples (concentração – nº cópias/ mL)						Amostras compostas (concentração – nº cópias/ mL)					
	Média ± DP	Mín	Máx	25%	75%	CV (%)	Média ± DP	Mín	Máx	25%	75%	CV (%)
1	40,7 ± 68,0	1,2	119,3	1,5	60,5	167,0	51,8 ± 85,4	0,2	150,4	2,5	77,5	165,0
2	14,2 ± 20,8	0,00	38,1	2,2	21,2	147,0	71,1 ± 117,1	0,0	206,2	3,5	106,6	164,8
3	5,9 ± 9,5	0,2	16,8	0,4	8,7	161,1	52,0 ± 86,1	1,1	151,5	2,3	77,5	165,7
4	10,4 ± 10,8	2,7	22,7	4,2	14,2	104,4	32,2 ± 32,1	13,5	69,2	13,7	41,5	99,7

**SBO-01 – Córrego Ressaca/ Sarandi**

Horas	Amostras simples (concentração – nº cópias/ mL)						Amostras compostas (concentração – nº cópias/ mL)					
	Média ± DP	Mín	Máx	25%	75%	CV (%)	Média ± DP	Mín	Máx	25%	75%	CV (%)
1	11,9 ± 9,3	6,0	22,6	6,5	14,7	78,6	12,8 ± 14,3	3,0	32,2	3,1	17,6	112,3
2	10,3 ± 14,9	1,4	27,4	1,7	14,7	144,3	13,2 ± 14,9	2,8	29,5	5,0	18,4	112,8
3	11,2 ± 9,3	4,4	21,9	5,9	14,6	83,1	8,2 ± 6,5	1,8	14,8	4,9	11,4	79,3
4	16,8 ± 26,2	0,7	47,0	1,7	24,9	155,4	8,1 ± 6,0	1,6	13,5	5,5	11,4	74,1

**SBO-02 – Córrego Mergulhão/ Tijuco**

Horas	Amostras simples (concentração – nº cópias/ mL)						Amostras compostas (concentração – nº cópias/ mL)					
	Média ± DP	Mín	Máx	25%	75%	CV (%)	Média ± DP	Mín	Máx	25%	75%	CV (%)
1	1,3 ± 0,4	0,0	3,9	0,1	2,0	29,9	5,7 ± 1,2	4,8	7,0	5,0	6,1	20,7
2	1,7 ± 0,4	1,4	2,1	1,5	1,9	23,3	5,8 ± 4,4	0,8	8,5	4,4	8,3	75,5
3	5,9 ± 4,1	2,2	10,3	3,7	7,7	70,0	5,5 ± 8,0	0,2	14,7	0,8	8,1	147,1
4	5,0 ± 3,6	1,6	8,7	3,2	6,7	71,5	10,8 ± 4,6	8,1	16,1	8,1	12,1	42,8

\*DP: Desvio Padrão; Mín: Mínimo; Máx: Máximo; 25%: Percentil 25%; 75%: Percentil 75%; CV: Coeficiente de variação, calculado pelo desvio-padrão dividido pela média e multiplicado por 100.

## 2. Comparação entre diferentes tempos de amostragem composta

A fim de avaliar como diferentes tempos de amostragem composta poderiam impactar na quantificação de SARS-CoV-2 no esgoto, amostras compostas de 1, 2, 3 e 4 horas foram coletadas nos quatro pontos monitorados durante as três campanhas de amostragem (meses de agosto e setembro de 2020, correspondente às semanas epidemiológicas 35, 36 e 37). Esta análise teve o intuito de avaliar possíveis tendências de aumento, diminuição ou estabilidade das concentrações de SARS-CoV-2 ao longo do tempo da amostragem composta. A Figura 5 (a-d) apresenta a variação temporal das concentrações de SARS-CoV-2 das amostras compostas ao longo do tempo.

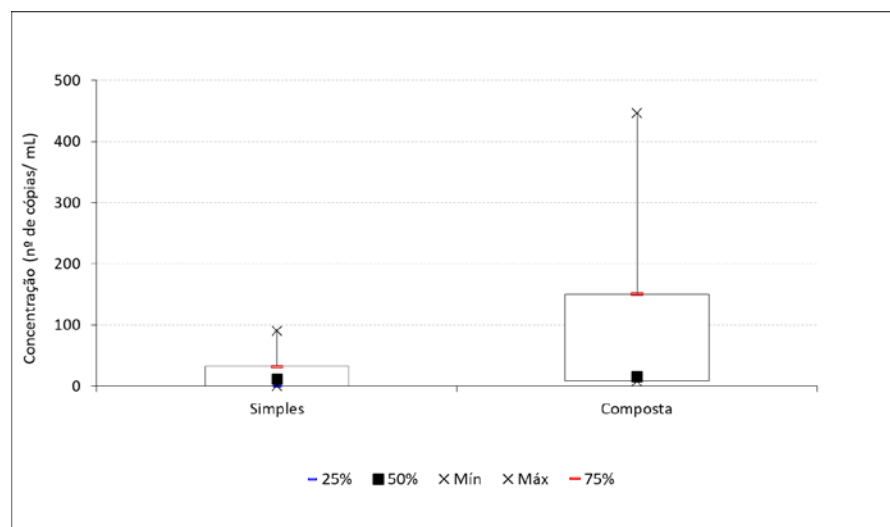
Não foram encontradas correlações fortes entre o tempo de amostragem e as concentrações virais para a maioria dos ensaios realizados. Exceção ocorreu para os ensaios realizados na sub-bacia SBO-01 do Ribeirão Onça (Córrego Ressaca/ ETAF), em que na primeira (SE 35) e terceira (SE 37) campanhas de amostragem foram observadas fortes correlações negativas entre as concentrações virais e o tempo da amostragem composta, de acordo com os valores dos coeficientes determinação ( $R^2$ ) e de correlação ( $r$ ) obtidos ( $R^2=0,8159$ ;  $r=-0,9032$  e  $R^2=0,9373$ ;  $r=-0,9681$ , para as semanas epidemiológicas 35 e 37, respectivamente). Ou seja, houve tendência de redução das concentrações virais com o aumento do tempo de coleta. Entretanto, na segunda campanha de amostragem (SE 36) nesta mesma sub-bacia foi encontrada forte correlação positiva entre as concentrações virais e o tempo de coleta ( $R^2=0,8335$ ;  $r=0,913$ ), com tendência de aumento das concentrações virais em função do aumento do tempo da coleta (Figura 5c). Foi encontrada forte correlação positiva entre as concentrações de SARS-CoV-2 e o tempo também na 1ª campanha (SE 35) realizada na sub-bacia de esgotamento SBO-02 do Ribeirão Onça ( $R^2=0,9524$ ;  $r=0,975$ ; Figura 5d).



**Figura 5** – Variação das concentrações de SARS-CoV-2 nas amostras compostas em função do tempo de coleta para os pontos (a) SBA-04 Ribeirão Arrudas (margem esquerda), (b) SBA-05 Córrego Pastinho, (c) SBO-01 Córrego Ressaca/ Sarandi e (d) SBO-02 Córrego Mergulhão/ Tijuco durante as três campanhas de amostragem realizadas nas semanas epidemiológicas 35, 36 e 37.

### 3. Comparação entre amostragem simples e composta na sub-bacia O-2 do Ribeirão Onça

A Figura 6 apresenta a estatística descritiva dos resultados obtidos para as análises adicionais realizadas na sub-bacia SBO-02 do Ribeirão Onça (Córrego Mergulhão/ Tijuco), com intuito de comparar as amostras simples (amostra coletada manualmente na primeira hora da campanha de amostragem) e as amostras compostas com duração de 4 horas (tempo de amostragem que foi utilizado para as coletas compostas no decorrer do Projeto Piloto).



**Figura 6** – Box-plot das concentrações de SARS-CoV-2 obtidas para a amostragem simples e composta no ensaio adicional realizado para a sub-bacia SBO-02 do Ribeirão Onça (Córrego Mergulhão/ Tijuco)

As medianas das concentrações obtidas foram iguais a 16,0 e 12,5 cópias/ mL para a amostragem composta e simples, respectivamente. Não foram identificadas diferenças significativas entre as medianas obtidas para a amostragem simples e composta, a um nível de significância de 5%. Dessa forma, no caso da avaliação realizada nesta sub-bacia, a coleta simples pareceu ser tão representativa quanto a coleta composta de 4 horas. Cabe ressaltar que nesta campanha adicional de amostragem as amostras simples foram tomadas durante a primeira hora de coleta, visto que a sub-bacia SBO-02 é uma sub-bacia pequena, com pequeno tempo de percurso no esgoto, de aproximadamente meia hora. Dessa forma, objetivou-se captar as contribuições do início da manhã, quando geralmente há maior utilização dos banheiros por um maior número de pessoas. Assim, salienta-se que informações sobre a vazão, bem como sobre o tempo de percurso do esgoto na rede devem ser levadas em consideração, principalmente quando a coleta simples for adotada, a fim de definir qual o melhor horário para a realização da coleta.



## DESTAQUES DO BOLETIM

1. Ambos os métodos de amostragem (simples e composta) foram capazes de detectar o SARS-CoV-2 na grande maioria das amostragens analisadas. Entretanto, foi observada frequência superior de amostras compostas (71%) com concentração acima do limite de detecção do método (igual a 3,6 cópias/mL), em comparação com as amostras simples (58%) analisadas.
2. Quando foram comparadas as concentrações virais obtidas a partir das amostras simples em relação às amostras compostas correspondentes (coletadas na mesma hora), observou-se que as amostras compostas resultaram em concentrações maiores de SARS-CoV-2, com 66% do total de amostras compostas com concentração 20% superior em relação as suas amostras simples correspondentes.
3. Para as menores sub-bacias (SBA-05 – Córrego Ressaca/ Sarandi e SOB-02 – Córrego Mergulhão/Tijuco) investigadas, a porcentagem de amostras compostas com concentração superior à simples foi ainda mais acentuada (83% para SBA-05 e 75% para SOB-02). Sugerindo que a amostragem composta é mais indicada e representativa, nos casos das sub-bacias menores.
4. Considerando as três campanhas de amostragem, observou-se grande variação das concentrações virais ao longo do tempo, tanto para as amostras simples, quanto para as amostras compostas. Entretanto, maior variabilidade entre as três campanhas realizadas foi observada para as amostras simples, quando comparadas as suas amostras compostas correspondentes (coletadas na mesma hora).
5. A avaliação das variações temporais das amostras compostas não permitiu a observação de correlações entre o tempo da amostragem composta e as concentrações de SARS-CoV-2.
6. Na campanha de amostragem adicional realizada na sub-bacia SBO-02 do Ribeirão Onça, não foram identificadas diferenças significativas nas concentrações de SARS-CoV-2 entre as amostras simples (coletadas na primeira hora da amostragem) e as amostras compostas de 4 horas. Dessa forma, observou-se que a coleta simples foi capaz de representar as concentrações virais no esgoto tanto quanto as amostras compostas. No entanto, é importante considerar o tempo de percurso do esgoto na rede para a definição de qual seria o melhor horário para a realização da coleta.
7. Por fim, é importante salientar a possibilidade da utilização da amostragem simples para o monitoramento do SARS-CoV-2 no esgoto, quando não há recursos disponíveis para a realização de amostragem composta. Quando a amostragem composta for possível recomenda-se sua utilização.

## REFERÊNCIAS

- AHMED, W.; ANGEL, N.; EDSON, J.; BIBBY, K.; BIVINS, A.; O'BRIEN, J. W.; CHOI, P. M.; KITAJIMA, M.; SIMPSON, S. L.; LI, J.; TSCHARKE, B.; VERHAGEN, R.; SMITH, W. J. M.; ZAUGG, J.; DIERENS, L.; HUGENHOLTZ, P.; THOMAS, K. V.; MUELLER, J. F. 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 (138764), 1-8, 2020. DOI:10.1016/j.scitotenv.2020.138764.
- CURTIS, K.; KEELING, D.; YETKA, K.; LARSON, A.; GONZALEZ, R. Wastewater SARS-CoV-2 RNA Concentration and Loading Variability from Grab and 24-Hour Composite Samples. 2020 medRxiv. DOI: <https://doi.org/10.1101/2020.07.10.20150607>.
- LA ROSA, G.; IACONELLI, M.; MANCINI, P.; BONANNO FERRARO, G.; VENERI, C.; BONADONNA, L.; LUCENTINI, L.; SUFFREDINI, E. First detection of SARS-CoV-2 in untreated wastewaters in Italy. *Sci. Total Environ.* 736, 139652, 2020. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2020.139652.
- LODDER, W.; HUSMAN, A. M. R. SARS-CoV-2 in wastewater: potential health risk, but also data source. *Lancet Gastroenterol Hepatol.*, 5(6), 533-534, 2020. DOI: 10.1016/S2468-1253(20)30087-X.
- 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.*, 7, 7, 511-516, 2020. DOI: 10.1021/acs.estlett.0c00357.
- RAFIEE, M.; ISAZADEH, S.; MOHSENI-BANDPEI, A.; MOHEBI, S. R.; JAHANGIRI-RAD, M.; ESLAMI, A.; DABIRI, H.; ROOSTAEI, K.; TANHAEI, M. AMEREH, F. 2021. Moore swab performs equal to composite and outperforms grab sampling for SARS-CoV-2 monitoring in wastewater. *Science and the Total Environment*, 790, 148205, 2021. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2021.148205.
- RICO., M.; ANDRÉS-COSTA, M. J.; PICO, Y. Estimating population size in wastewater-based epidemiology. Valencia metropolitan area as a case study. *J. Hazard. Mater.*, 323 (Pt A), 156-165, 2017. DOI: 10.1016/j.jhazmat.2016.05.079.
- SHERCHAN, S. P.; SHAHIN, S.; WARD, L. M.; TANDUKAR, S.; AW, T. G.; SCHIMITZ, B.; AHMED, W.; KITAJIMA, M. First Detection of SARS-COV-2 RNA in wastewater in North America: A study in Louisiana, USA. *Sci. Total Environ.* 15, 743, 140621, 2020. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2020.140621.
- The Water Research Foundation (WRF). Wastewater surveillance of the Covid-19 genetic signal in sewersheds. Recommendations from global experts. 2020. 27 p.
- WU, F.; XIAO, A.; ZHANG, J.; GU, X.; LEE, W.; KAUFFMAN, K.; HANAGE, W. P.; MATUS, M. GHAELI, N.; ENDO N.; DUVALLET C.; MONIZ K.; ERICKSON T. B.; CHAI, P. R.; THOMPSON, J.; ALM E. J. SARS-CoV-2 titers in wastewater are higher than expected from clinically confirmed cases. *mSystems*, 5 (4), 2020. DOI: 10.1101/2020.04.05.20051540.

Minas Gerais, 11 de novembro de 2021.