

MONITORAMENTO AMBIENTAL DE SARS-CoV-2

Boletim de acompanhamento nº 3

31/08/2020

Instituições Participantes

- Centro Estadual de Vigilância em Saúde - CEVS
- Universidade Feevale;
- Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS
- Fundação Oswaldo Cruz - FIOCRUZ
- Fundação Estadual de Proteção Ambiental - FEPAM
- Secretarias Municipais de Saúde de Alvorada, Cachoeirinha, Canoas, Gravataí, Novo Hamburgo, Porto Alegre e São Leopoldo
- Secretaria Municipal do Meio Ambiente e da Sustentabilidade - SMAMS/PMPA
- Departamento Municipal de Água e Esgoto de Porto Alegre - DMAE
- Companhia Municipal de Saneamento de Novo Hamburgo - COMUSA
- Serviço Municipal de Água e Esgoto de São Leopoldo - SEMAE
- Companhia Riograndense de Saneamento - CORSAN

Monitoramento Ambiental de SARS-CoV-2 no Rio Grande do Sul

Apresentação

Este Boletim de Acompanhamento nº 3 tem como objetivo divulgar os resultados do Projeto de Vigilância Ambiental do SARS-CoV-2 no RS. Este estudo visa disponibilizar aos órgãos de saúde informações sobre a circulação viral em amostras de água coletadas em Estações de Tratamento de Esgoto (ETE), Estações de Bombeamento de Esgoto (EBE), Estações de Bombeamento de Águas Pluviais (EBAP) e mananciais superficiais. Essas amostras são coletadas em diferentes áreas do território avaliado, aumentando a compreensão da dinâmica viral na pandemia e auxiliando na tomada de decisão das medidas de distanciamento, além de fornecer elementos que contribuam para o conhecimento do comportamento do novo coronavírus no ambiente. Trata-se de um projeto multicêntrico, colaborativo, que conta com a participação de órgãos públicos federais, estaduais, municipais e universidades públicas e comunitárias.

No Boletim de Acompanhamento nº 1 (<https://bitly.com/HHwwr>) foram abordados os detalhes do planejamento do estudo, assim como outros detalhes do projeto.

A partir deste Boletim de Acompanhamento nº 3, passamos a emitir alguns resultados em carga viral, tornando mais fácil a compreensão dos resultados encontrados. Essa mudança está sendo feita porque, considerando o forte avanço no número de casos das últimas semanas em todo estado, o resultado positivo nas amostras é esperado. Portanto, para fins de monitoramento e tomada de decisões, faz-se necessário uma análise mais detalhada da quantificação do vírus nas amostras. Com este objetivo, passamos a empregar além da análise qualitativa, expressa em resultados positivos e negativos, a análise quantitativa em “*Cycle Threshold*” (Ct) e em Cópias Genômicas (CG). Como os resultados apresentados em Ct fornecem uma ideia subjetiva da quantidade de partículas virais encontradas, os resultados até então obtidos estão sendo convertidos de Ct para Cópias Genômicas por 100 ml (o que corresponde à carga viral). Dos 02 laboratórios envolvidos nesta pesquisa, um deles (FEEVALE) já está com os equipamentos calibrados para o resultado em cópias genômicas e outro (ICBS - UFRGS) está em vias de calibração, o que explica porque somente parte dos resultados estão apresentados em CG.

Situação no Rio Grande do Sul

Até a Semana Epidemiológica (SE) 34 (calendário epidemiológico disponível em <https://bit.ly/2YMTuSQ>), foram diagnosticados 109.943 casos no estado. Deste total, 11.464 foram notificados como Síndrome Respiratória Aguda Grave (SRAG) com hospitalização confirmada para

COVID-19, e 3.071 evoluíram para óbito, conforme o Boletim Epidemiológico COVID-19 da SE 34 de 2020 do Centro de Operações de Emergência do Rio Grande do Sul/ COERS (<https://bit.ly/2YwODEX>).

Metodologia

Por estarmos agregando um novo formato para apresentação de resultados, retomamos a seguir alguns aspectos e informações quanto à metodologia para auxiliar na compreensão das análises aqui descritas.

Amostragem

As amostras são coletadas de duas maneiras:

- *Simples*: consiste em uma coleta única em um único local . É a forma mais utilizada, por se tratar de uma maneira prática e rápida de coleta, no entanto, é uma amostra menos representativa do ambiente coletado e que pode apresentar resultados “falsos negativos”.
- *Composta*: são várias coletas simples, em um único local, espaçadas em um intervalo de tempo determinado, sendo colocadas em um recipiente maior. Ao final do período de coleta, que varia de 6 a 24 horas neste projeto, é retirada uma amostra única que será analisada. Esta metodologia pode ser realizada de forma manual ou utilizando um amostrador automático. A coleta composta é mais representativa do ambiente coletado, por se tratar de um agregado de amostras individuais ao longo de um período de tempo.

Análise das amostras

O que é PCR em tempo real (qPCR)?

A reação em cadeia da polimerase em tempo real ou quantitativa (qPCR) é uma técnica de biologia molecular que avalia e quantifica a presença de fragmentos do material genético do vírus SARS-CoV-2. Assim, na qPCR, as reações são caracterizadas pelo ponto, durante os sucessivos ciclos que o equipamento faz, quando um alvo (gene do vírus) é detectado pela primeira vez. Quanto maior o número de cópias genômicas iniciais do alvo presentes na amostra, mais cedo é detectado. Este parâmetro representa o limiar de detecção, ou seja, o número mínimo de ciclos para detecção do alvo, denominado “*threshold*”.

Como interpretar um resultado de qPCR?

O ponto onde a amostra cruza com a linha de detecção viral (quando ocorre a amplificação), permite determinar o número de ciclos necessários para o início da amplificação da sequência genética alvo presente na amostra. Este valor é denominado Ct (“*Cycle Threshold*”) e permite a quantificação relativa do material genético de cada amostra. **De maneira mais simplificada: quanto menor o valor de Ct, maior a carga viral**, e quando o Ct é maior do que 40, considera-se a amostra negativa para detecção viral. A técnica RT-qPCR utilizada para avaliação de genomas de RNA, como

é o caso do SARS-CoV-2, é uma variação da qPCR pois permite a conversão do RNA em DNA previamente à detecção (fonte: <https://bit.ly/31rZS3h>).

Dados Epidemiológicos

A partir do Painel Coronavírus RS (<https://ti.saude.rs.gov.br/covid19/>) foram extraídos dados epidemiológicos dos municípios onde foram realizadas as coletas. Os casos foram agrupados por bairros atendidos em cada sistema de esgotamento sanitário. A partir destas tabulações, foram gerados gráficos com os casos considerados ativos, considerando 14 dias após o início dos sintomas (<https://ti.saude.rs.gov.br/covid19/sobre>). Deste modo, optou-se por utilizar apenas casos positivos por exames de RT-qPCR, excluindo-se os demais (teste rápido e outros testes; e casos classificados por critério clínico epidemiológico, clínico ou clínico imagem).

Resultados

Os resultados apresentados neste boletim correspondem à detecção de fragmentos genômicos para os genes alvo E, N1 e N2 de SARS-CoV-2 através da técnica de RT-qPCR nas amostras coletadas no período de 11 de maio a 19 de agosto de 2020, correspondentes às SE 20 a 34. Foram coletadas 116 amostras em 22 locais, dentre eles, Estações de Tratamento de Esgoto (ETE), Estações de Bombeamento de Esgoto (EBE), Estações de Bombeamento de Águas Pluviais (EBAP) e mananciais superficiais altamente impactados, conforme o Quadro 1.

Desde o último boletim, foram acrescentados mais pontos ao monitoramento, dentre eles ETES da CORSAN na região metropolitana de Porto Alegre (Alvorada, Cachoeirinha, Canoas e Gravataí) e mais pontos em arroios do Rio dos Sinos.

Quadro 1: Pontos de coleta e resultados das amostras por Semana Epidemiológica.

Ponto de coleta	Município	SE 28 (05/07 a 11/07)	SE 29 (12/07 a 18/07)	SE 30 (19/07 a 25/07)	SE 31 (26/07 a 01/08)	SE 32 (02/08 a 08/08)	SE 33 (09/08 a 15/08)	SE 34 (16/08 a 22/08)
EBE Baronesa do Gravataí	Porto Alegre	Positivo	NC	Positivo	NC	NC	AR	NC
EBE Ponta da Cadeia	Porto Alegre	Negativo	NC	Positivo	NC	NC	Positivo	NC
EBAP nº 10	Porto Alegre	Negativo	NC	Positivo	NC	NC	Positivo	NC
ETE Serraria	Porto Alegre	NC	Positivo	NC	Positivo	Positivo	Positivo	NC
ETE São João Navegantes	Porto Alegre	Positivo	NC	Positivo	NC	NC	Positivo	NC
ETE Vicentina	São Leopoldo	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	AR	AR	AR
ETE Mato Grande	Canoas	-	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	AR	AR
ETE Freeway	Cachoeirinha	-	-	-	Negativo	Positivo	Positivo	NC
ETE Parque dos Anjos	Gravataí	-	-	-	Positivo	Positivo	NC	NC
ETE Estocolmo	Alvorada	-	-	-	Negativo	Positivo	NC	NC
Arroio Dilúvio	Porto Alegre	Negativo	NC	Positivo	NC	Positivo	NC	NC
Sinos/ Passo da Carioca	Sapucaia do Sul	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC
Sinos/ Arroio João Correia	São Leopoldo	NC	Positivo	NC	Negativo	NC	Positivo	NC
Sinos/ Arroio Pampa	Novo Hamburgo	NC	Positivo	NC	Positivo	NC	Positivo	NC
Sinos/ Captação Corsan	Campo Bom	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC
Sinos/ Arroio Sapucaia	Canoas/ Esteio	NC	NC	NC	Negativo	NC	Negativo	NC
Sinos/ Arroio Peão	São Leopoldo/ Novo Hamburgo	NC	NC	NC	Negativo	NC	Negativo	NC
Sinos/ Arroio Schimidt	Campo Bom	NC	Negativo	NC	Negativo	NC	Negativo	NC
Sinos/ Arroio Luiz Rau	Novo Hamburgo	NC	Positivo	NC	Negativo	NC	Positivo	NC

* NC: Não coletado.

* - : o ponto de coleta ainda não havia sido definido.

* AR: Aguardando Resultado.

Quadro 2: Pontos de coleta e resultados em Ct das amostras por Semana Epidemiológica.

Ponto de coleta	Município	SE 28 (05/07 a 11/07)	SE 29 (12/07 a 18/07)	SE 30 (19/07 a 25/07)	SE 31 (26/07 a 01/08)	SE 32 (02/08 a 08/08)	SE 33 (09/08 a 15/08)	SE 34 (16/08 a 22/08)
EBE Baronesa do Gravataí	Porto Alegre	39	NC	37	NC	NC	AR	NC
EBE Ponta da Cadeia	Porto Alegre	>40	NC	39	NC	NC	32	NC
EBAP nº 10	Porto Alegre	>40	NC	35	NC	NC	35	NC
ETE Serraria	Porto Alegre	NC	32	NC	34	30	30	NC
ETE São João Navegantes	Porto Alegre	37	NC	38	NC	NC	31	NC
ETE Vicentina	São Leopoldo	35	36,5	>40	36	AR	AR	AR
ETE Mato Grande	Canoas	-	33	35	35	30	AR	AR
ETE Freeway	Cachoeirinha	-	-	-	>40	32	32	NC
ETE Parque dos Anjos	Gravataí	-	-	-	39	32	NC	NC
ETE Estocolmo	Alvorada	-	-	-	>40	32	NC	NC
Arroio Dilúvio	Porto Alegre	>40	NC	35	NC	32	NC	NC
Sinos/ Passo da Carioca	Sapucaia do Sul	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC
Sinos/ Arroio João Correia	São Leopoldo	NC	36	NC	>40	NC	35,9	NC
Sinos/ Arroio Pampa	Novo Hamburgo	NC	36,8	NC	38	NC	35,2	NC
Sinos/ Captação Corsan	Campo Bom	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC
Sinos/ Arroio Sapucaia	Canoas/ Esteio	-	-	-	>40	NC	>40	NC
Sinos/ Arroio Peão	São Leopoldo/ Novo Hamburgo	-	-	-	>40	NC	>40	NC
Sinos/ Arroio Schimidt	Campo Bom	-	>40	NC	>40	NC	>40	NC
Sinos/ Arroio Luiz Rau	Novo Hamburgo	-	37	NC	>40	NC	37,9	NC

Escala de Ct



* NC: Não coletado.

* - : o ponto de coleta ainda não havia sido definido.

* AR: Aguardando Resultado.

Figura 1: Quantidade de amostras realizadas por ponto de coleta e classificação dos resultados.

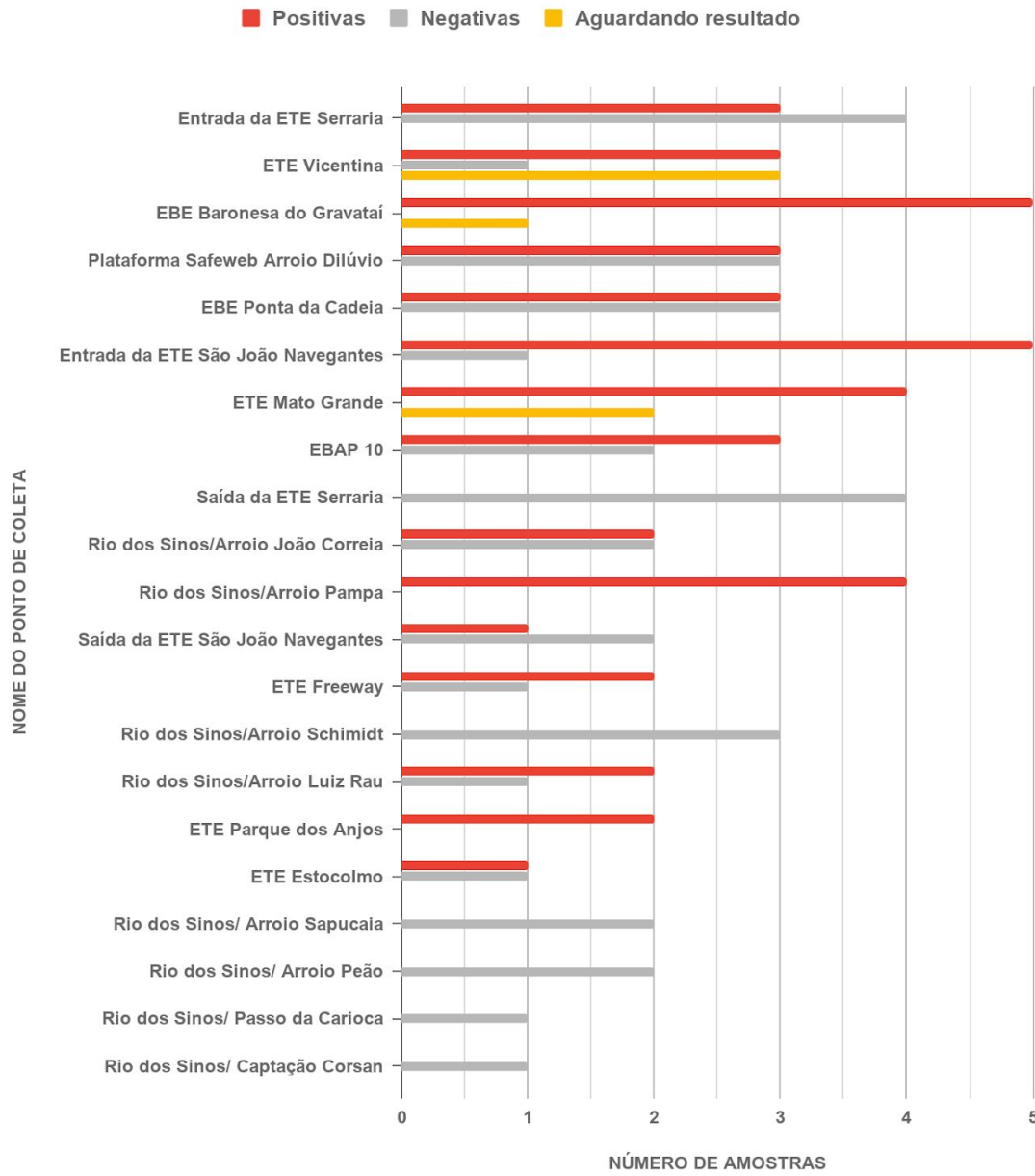
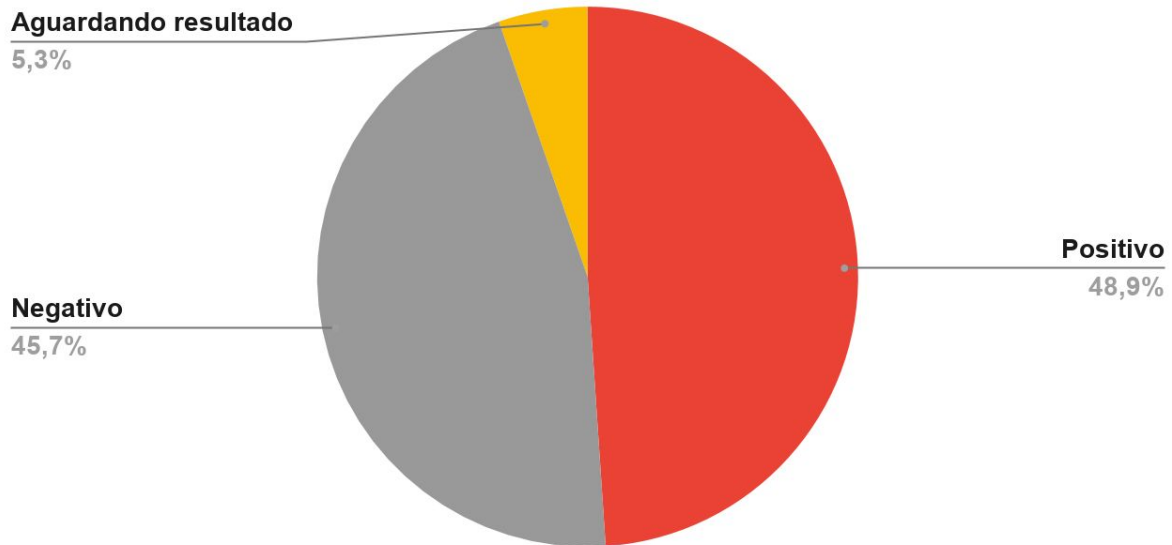


Figura 2: Distribuição dos resultados de amostragem.



Os mapas apresentados nas figuras 3 a 12 mostram, por Semana Epidemiológica, como foram os resultados em cada município, bem como as bacias hidrográficas presentes na região próxima. A partir deste tipo de análise e de futuras quantificações das amostras, objetiva-se correlacionar os resultados com a população que reside próxima aos arroios ou que são atendidas pelas ETes.

Figura 3: Mapeamento das coletas no município de Novo Hamburgo na SE 29.

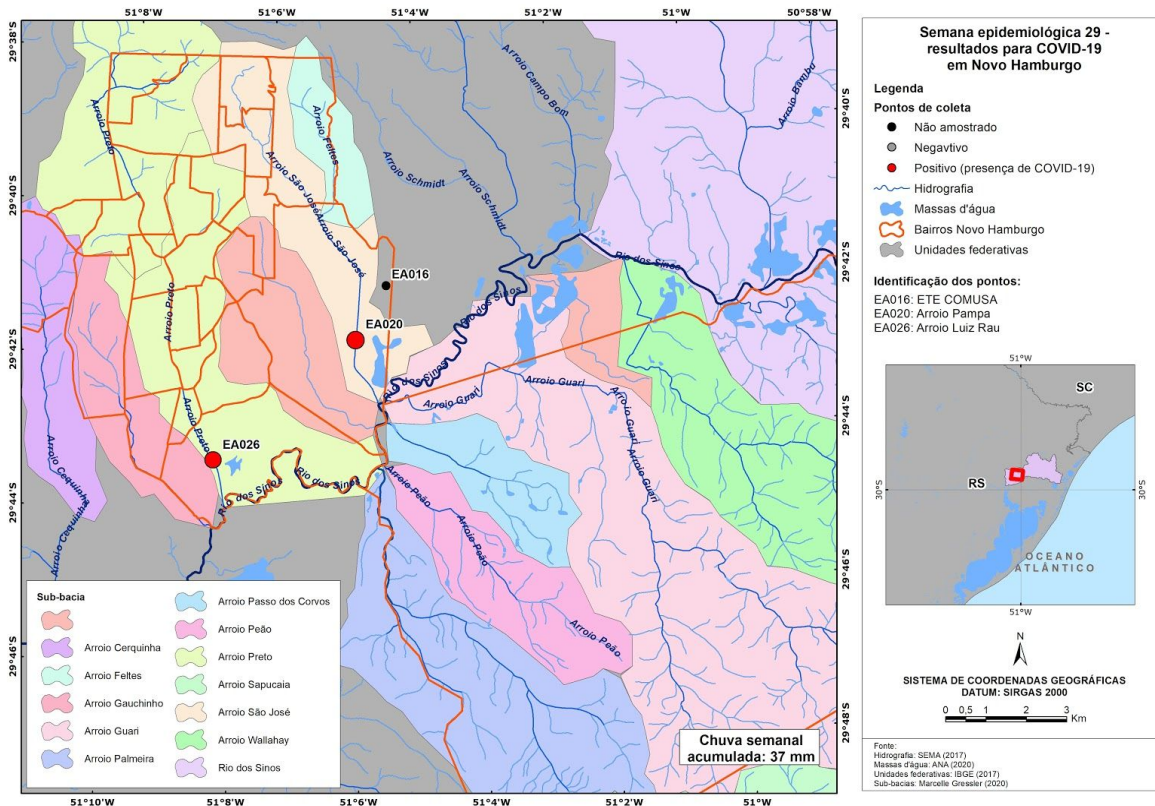


Figura 4: Mapeamento das coletas no município de Novo Hamburgo na SE 31.

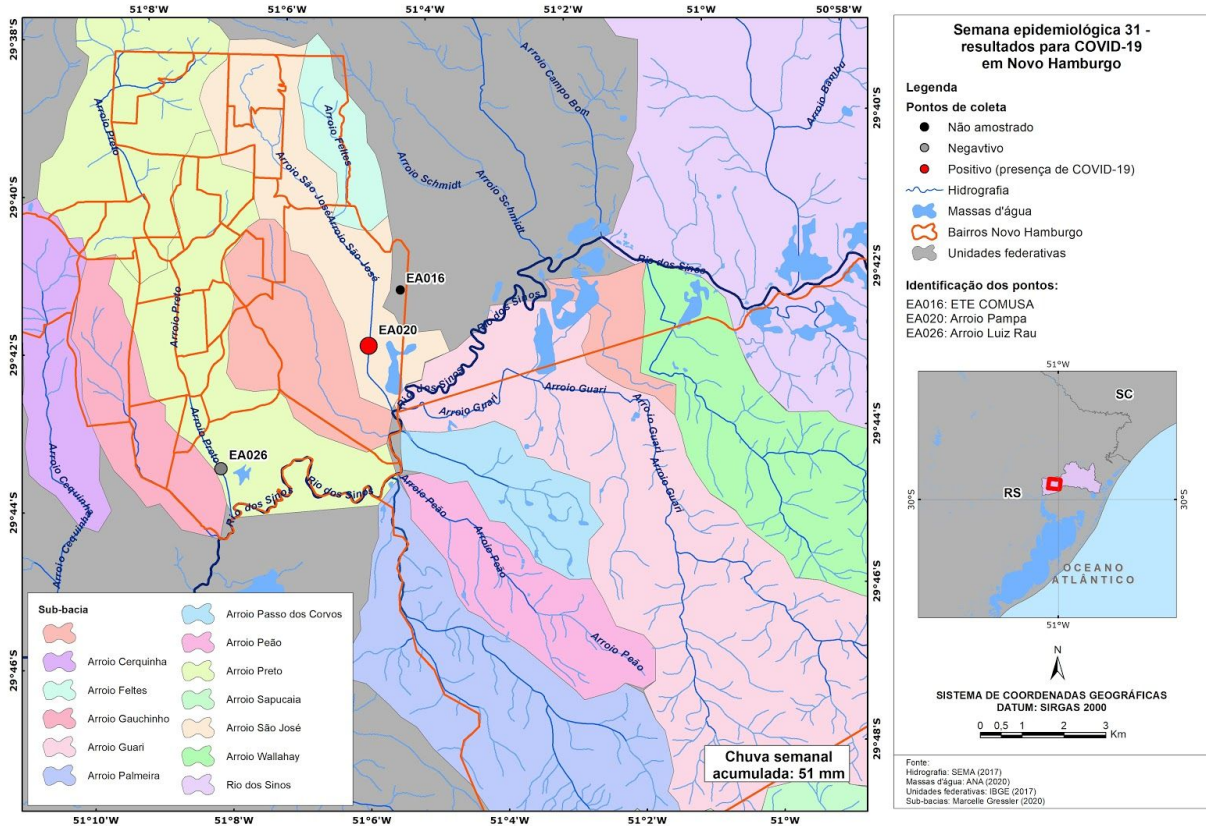


Figura 5: Mapeamento das coletas no município de Porto Alegre na SE 28.

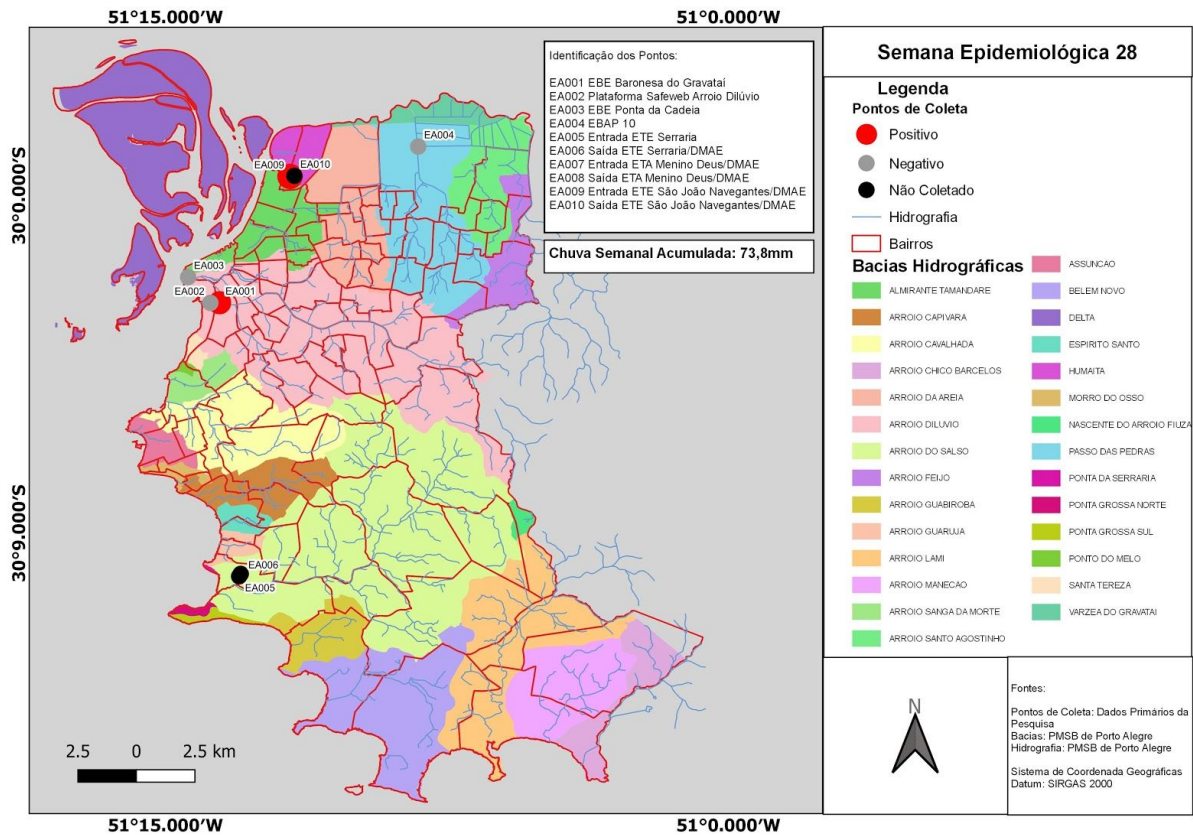


Figura 6: Mapeamento das coletas no município de Porto Alegre na SE 29.

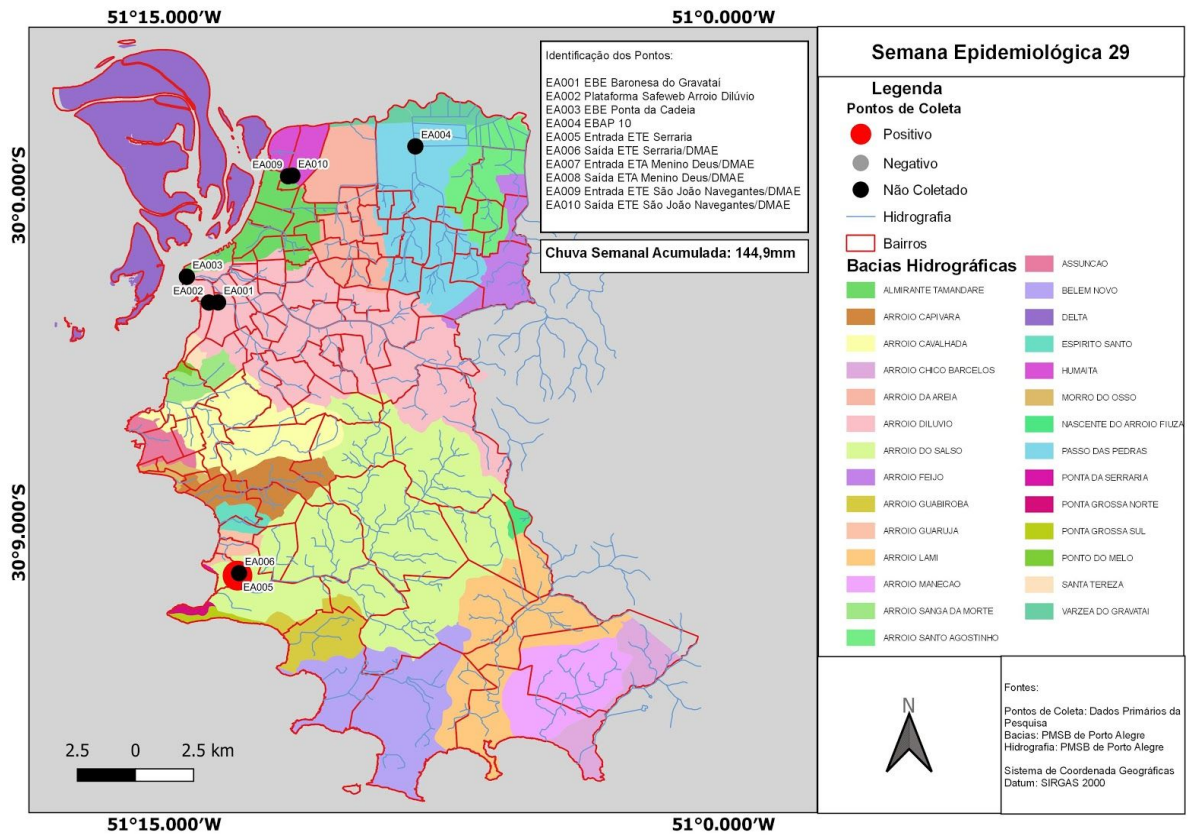


Figura 7: Mapeamento das coletas no município de Porto Alegre na SE 30.

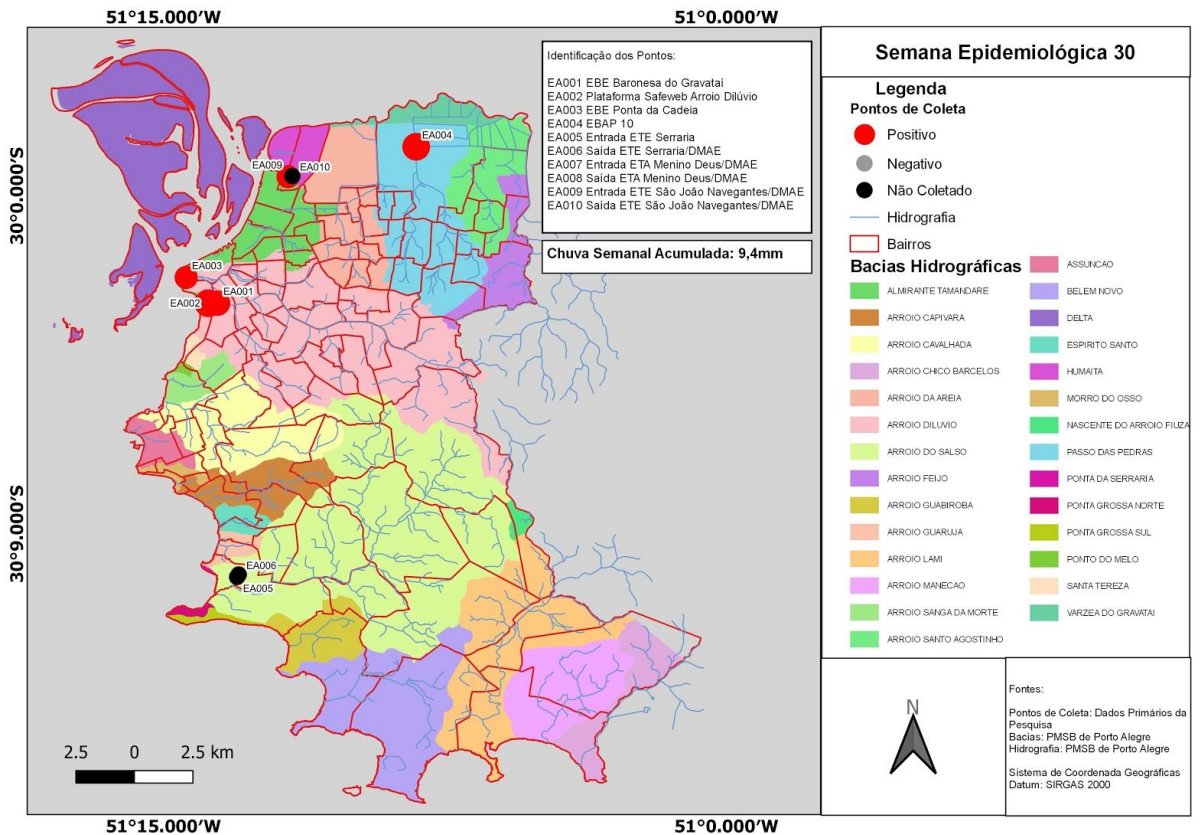


Figura 8: Mapeamento das coletas no município de Porto Alegre na SE 31.

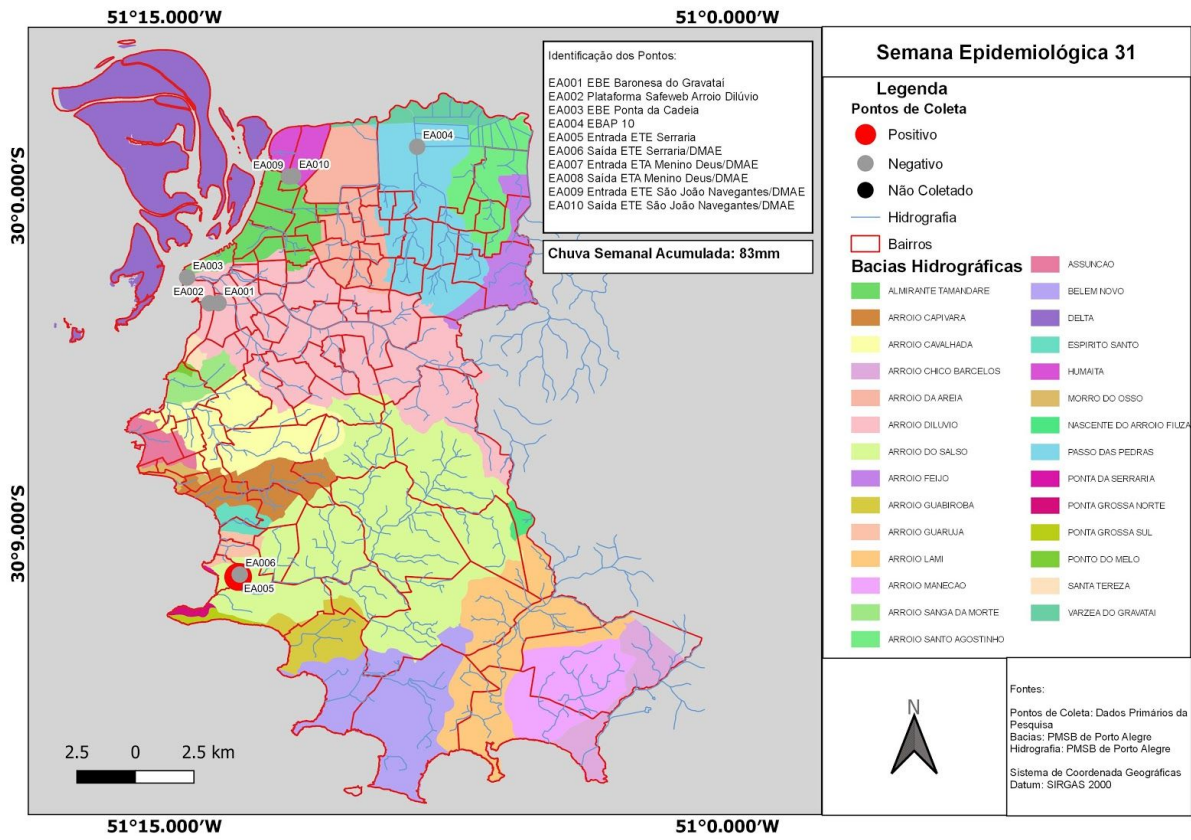


Figura 9: Mapeamento das coletas no município de São Leopoldo na SE 28.

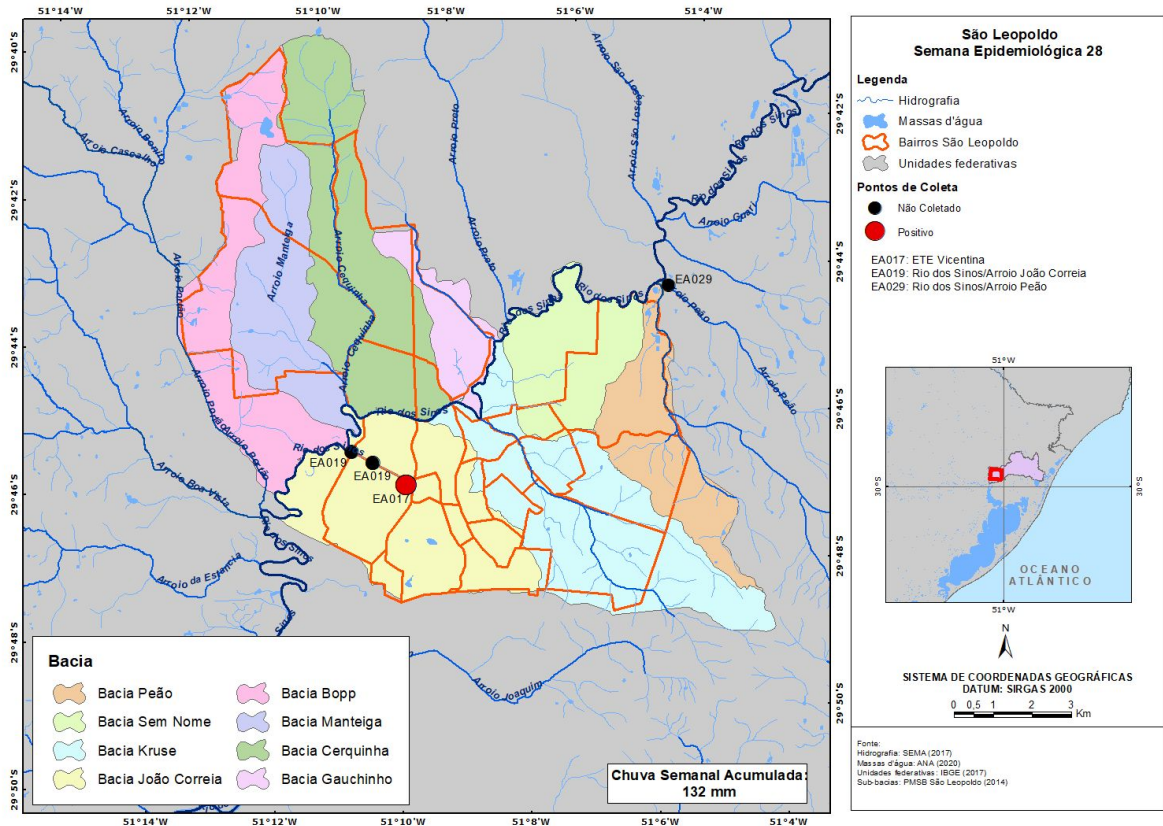


Figura 10: Mapeamento das coletas no município de São Leopoldo na SE 29.

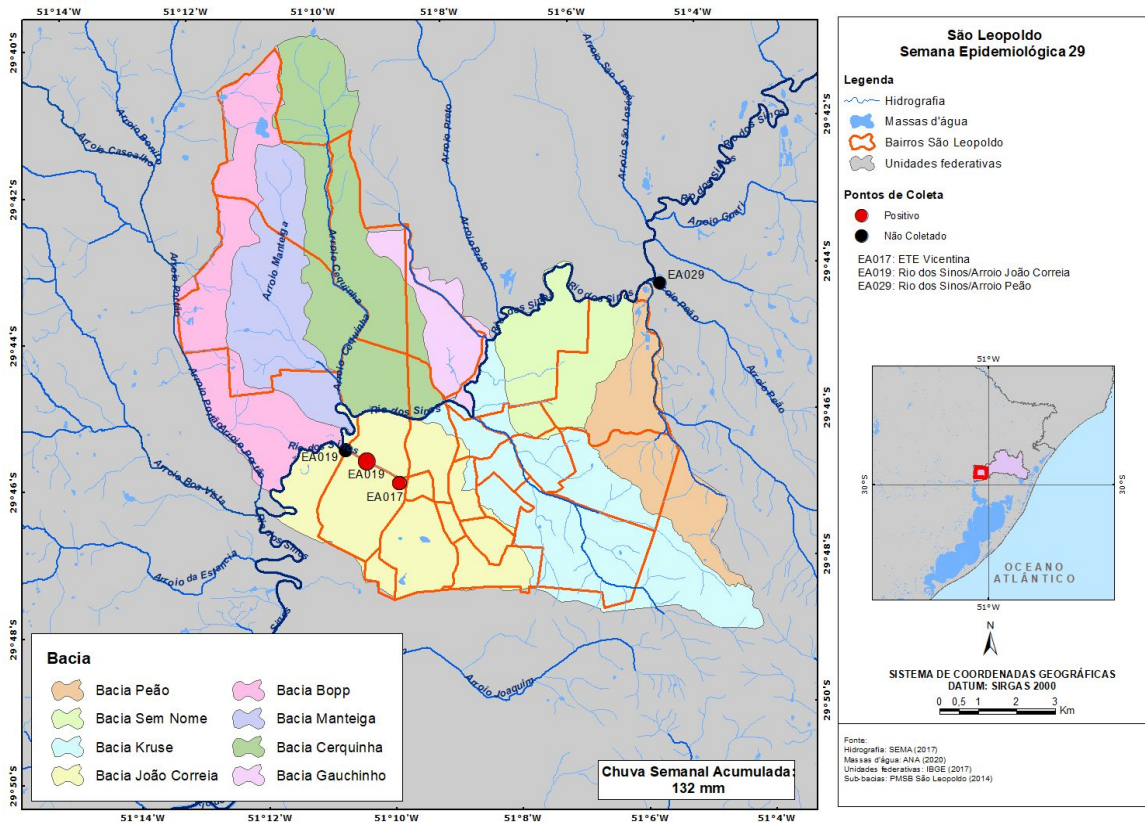


Figura 11: Mapeamento das coletas no município de Novo Hamburgo na SE 30.

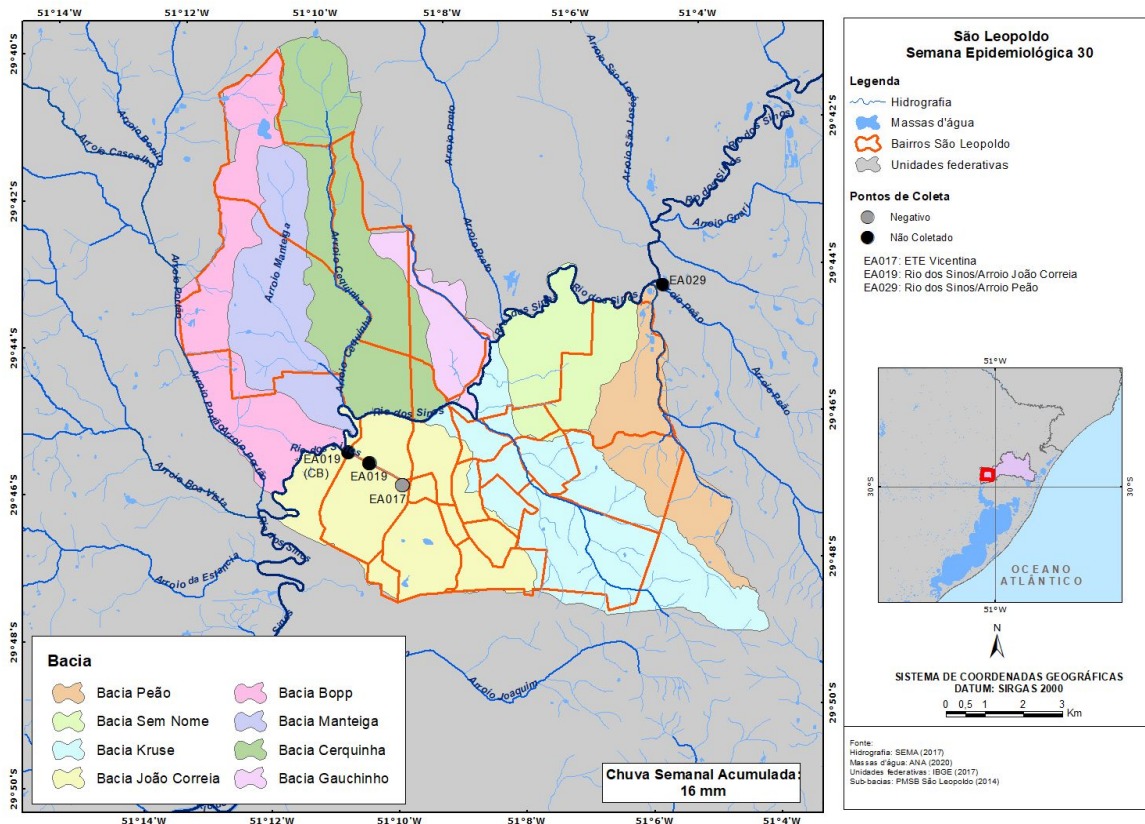


Figura 12: Mapeamento das coletas no município de São Leopoldo na SE 31.

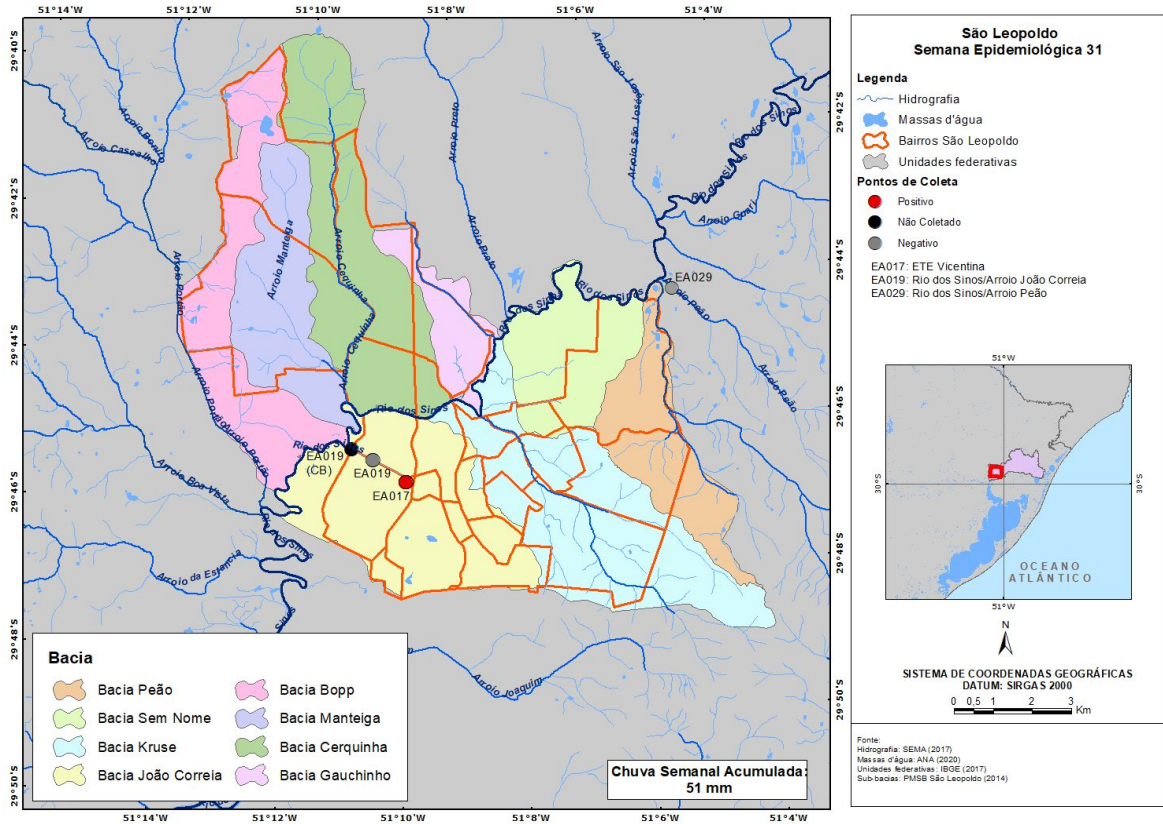
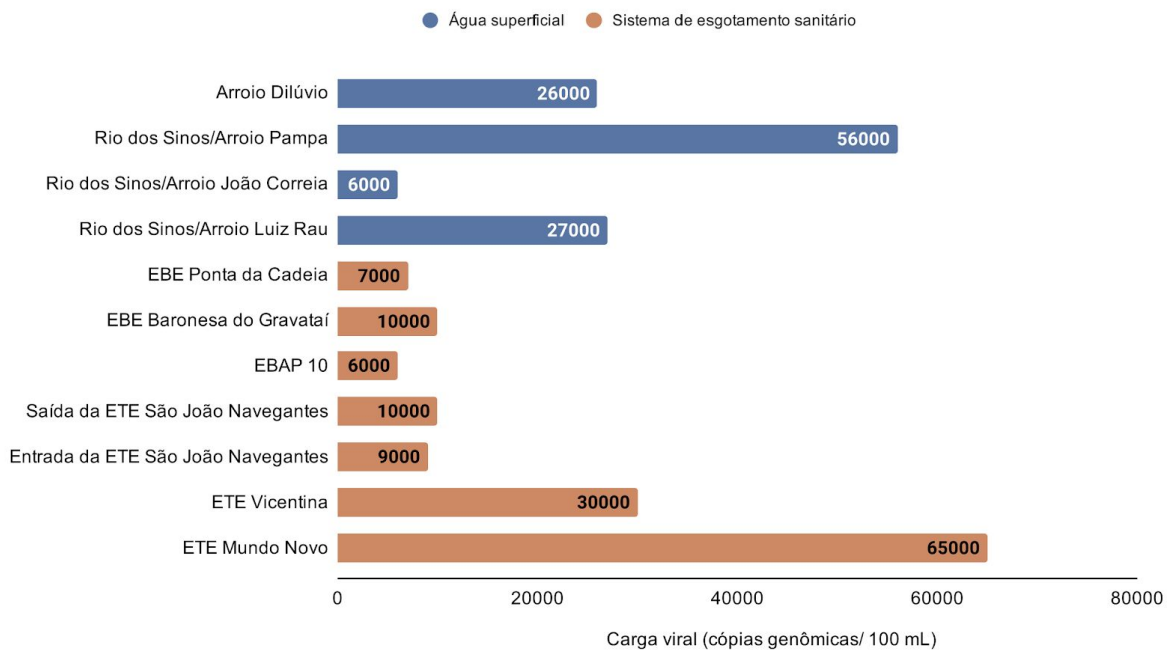


Figura 13: Maior carga viral encontrada em amostras classificadas em água superficial e SES.

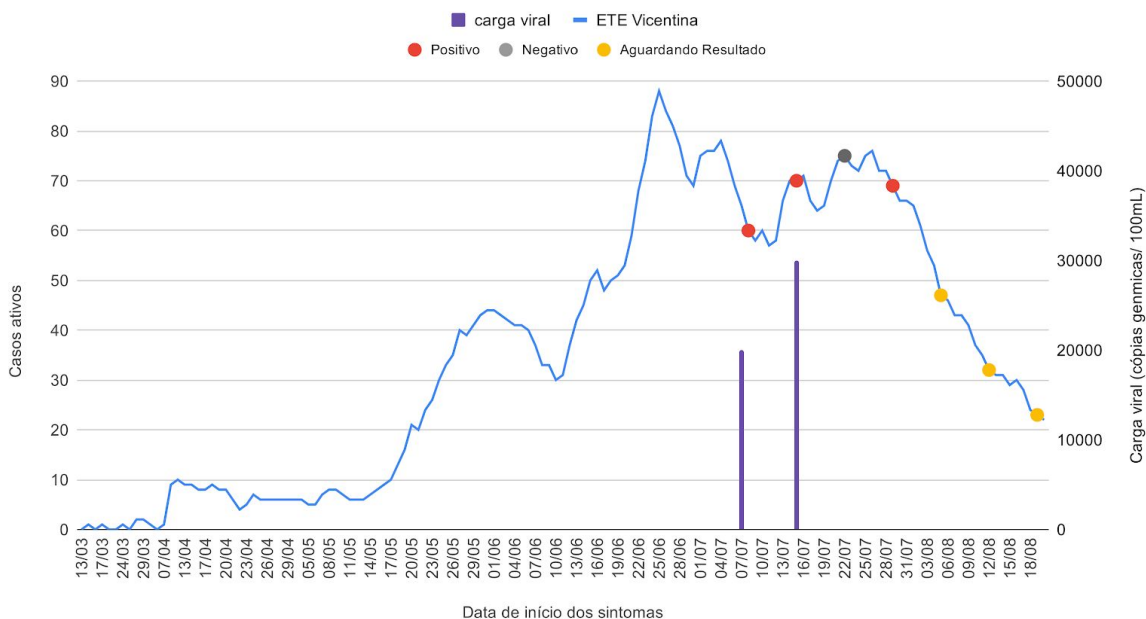


Considerações

A análise comparativa entre a detecção de SARS-CoV-2 em amostras ambientais e o número de casos ativos a partir do Painel Coronavírus RS deve levar em conta a natureza dinâmica quanto à coleta de dados epidemiológicos. Estas variações ocorrem devido às constantes atualizações, além do fluxo do processo de notificação dos casos novos (busca por atendimento, realização do exame, resultado do exame, atualização da notificação). Existe ainda um atraso entre a confirmação e o registro dos casos. Este fenômeno pode ser observado através da curva de casos ativos, que parece estar diminuindo, embora isso não seja condizente com a realidade. Além disso, não há como identificar com exatidão todos os acometidos pela COVID-19, já que muitos são assintomáticos ou com sintomas leves que não foram diagnosticados/notificados.

Embora algumas ETEs não tenham apresentado títulos virais detectáveis no esgoto no momento em que foram amostradas, novos casos clínicos foram relatados nos locais atendidos por essas ETEs durante a semana da amostragem. Em São Leopoldo, por exemplo, analisando a curva de casos nos bairros atendidos pela ETE Vicentina (Figura 14), nota-se que uma das amostras resultou negativa para a presença de SARS-CoV-2 (dia 22/07/2020).

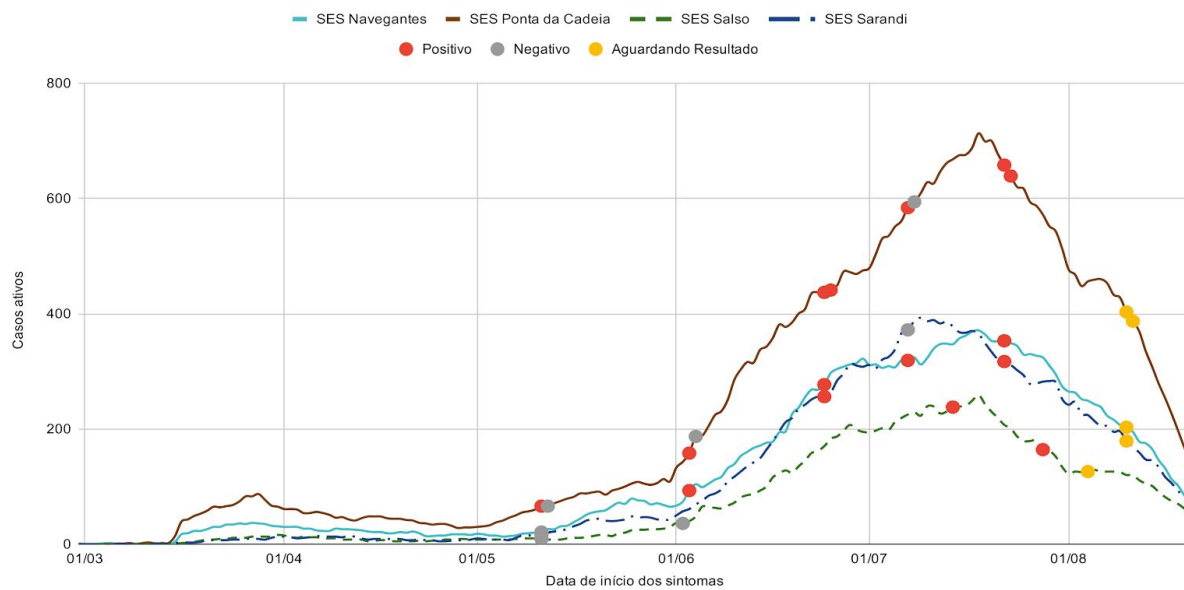
Figura 14: Casos ativos de COVID-19 por data de início de sintomas nos bairros atendidos pela ETE Vicentina em São Leopoldo e resultados das coletas realizadas.



O mesmo fenômeno foi percebido na SE 28 do município de Porto Alegre (Figura 15). Estes resultados apontam para existência de outros fatores que interferem na detecção do vírus no esgoto,

uma vez que a curva de casos ativos não estava em queda ou em um patamar menor do que nos dias das outras coletas. Um desses fatores é a diversidade das amostras de esgoto, que podem conter substâncias ou outros microorganismos que interferem na detecção do vírus SARS-CoV-2.

Figura 15: Casos ativos de COVID-19 por data de início de sintomas nos bairros agrupados por Sistemas de Esgotamento Sanitário em Porto Alegre e resultados das coletas.



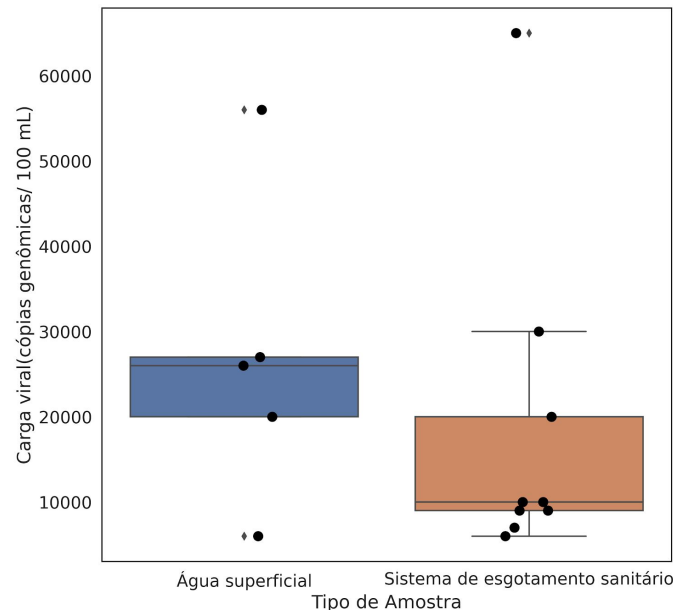
Quanto às novas ETEs acrescentadas ao monitoramento (todas operadas pela CORSAN), instaladas nas cidades de Alvorada, Cachoeirinha, Canoas e Gravataí, a correlação da situação epidemiológica aos resultados encontrados no esgoto deve levar em conta que algumas fazem parte de sistemas integrados de esgotamento sanitário, atendendo a mais de um município. Caso da ETE Freeway, situada em Cachoeirinha e que atende também ao município de Gravataí e da ETE Estocolmo, de Alvorada e que também atende a Viamão. Pretendemos, em breve, discriminar detalhadamente as regiões atendidas por cada sistema de esgotamento.

Das pontos amostrados no Rio dos Sinos, alguns mostraram-se com elevado percentual de amostras positivas (Arroio Pampa, Arroio João Correia, Arroio Luiz Rau), enquanto outros negativaram em todas as coletas (Arroio Sapucaia, Arroio Peão, Arroio Schmidt). Esta discrepância pode estar relacionada às diferentes cargas orgânicas despejadas em cada um dos arroios, assim como as diferenças demográficas das comunidades em suas proximidades. Outro fator importante a salientar é que nesses locais são realizadas coletas simples, que são menos representativas do corpo hídrico amostrado.

A análise do gráfico comparativo (Boxplot) das cargas virais das amostras provenientes de águas superficiais e de Sistemas de Esgotamento Sanitário (SES) demonstra que os resultados obtidos

a partir de águas superficiais apresentam distribuição de carga viral superior quando comparadas às amostras de SES (Figura 16). Nos arroios, 75% dos resultados apresentam valores de carga viral acima de 20.000 CG/100 ml, já nos SES esses valores oscilaram entre 10.000 e 20.000 CG/100ml.

Figura 16: Gráfico comparativo: quantificação da carga viral por tipo de amostra.



Observações relevantes

- Porto Alegre: desde o dia 11/05, é possível verificar um crescimento gradativo no percentual de amostras positivas do município, sendo 12,5% (SE 20), 42,9% (SE 23), 83,3% (SE 26), 40,0% (SE 28), 100% (SE 30 a 33).
- Porto Alegre: o único ponto de coleta que não havia apresentado resultado positivo para presença do SARS-CoV-2, até a divulgação do Boletim de Acompanhamento nº 2, era a ETE Serraria. No entanto, a partir do dia 14/07/2020 todas as coletas realizadas no local tiveram resultado positivo.
- Porto Alegre: nas SE 32 e 33 notam-se valores de Ct decrescentes em relação às semanas anteriores, o que indica a elevação na concentração de partículas virais nessas amostras. Em concordância, o número de casos da capital, segundo os dados de casos confirmados, seguiu em crescimento durante as semanas 28 a 33.
- Todas as amostras coletadas até o momento na EBE Baronesa do Gravataí (Porto Alegre), no Arroio Pampa (Novo Hamburgo), na ETE Mato Grande (Canoas) e ETE Freeway (Cachoeirinha) tiveram diagnóstico positivo para a presença do novo coronavírus.
- Com relação às amostras coletadas nas ETES da CORSAN, Canoas e Gravataí apresentaram 100% das análises positivas para presença do vírus, Cachoeirinha 66,7% e Alvorada 50%.

- Observa-se que na SE 32, os resultados de Ct foram os mais baixos do período aqui analisado, indicando altas concentrações de cópias genômicas nesta semana nos pontos de amostragem.
- Nas SE 32 e 33 observamos resultados de Ct mais baixos em ETEs do que em águas superficiais (conforme Quadro 2).
- Das amostras que já tiveram resultado convertido para quantificação de carga viral, as que apresentaram maiores valores de concentração foram de pontos coletados no município de Novo Hamburgo (ETE Mundo Novo e Arroio Pampa/Rio dos Sinos). Foi coletada apenas uma amostra nesta ETE, em 17/06/2020.
- As coletas dos dias 08/07/2020 e 15/07/2020 na ETE Vicentina foram quantificadas, apresentando respectivamente 20.000 e 30.000 CG/ 100 mL. Observando a curva de casos ativos do município de São Leopoldo no mesmo período, é possível verificar que a quantidade de cópias virais segue a mesma tendência de crescimento de casos ativos - aqueles confirmados pelo exame de RT-PCR (Figura 14).
- Nota-se que nos arroios amostrados (exemplo: Arroio Dilúvio, Arroio Pampa e demais) foram encontrados valores de carga viral com a mesma ordem de grandeza ou até maiores que os valores encontrados nas ETEs. Isto significa que existe quantidade significativa de esgoto cloacal que chega nestes arroios nas suas bacias hidrográficas . E apesar do esgoto cloacal que chega nestes corpos hídricos ser diluído pela própria água do arroio, ainda assim estas cargas virais relativamente elevadas foram detectadas (Figura 16).
- Os resultados negativos em locais onde a curva de casos ativos não estava em queda apontam para a importância do estudo longitudinal e das amostras seriadas, neste modelo de monitoramento que está sujeito a incertezas relativas ao meio ambiente

Continuidade do monitoramento

A fim de verificar o impacto na carga viral que uma comunidade tem, será realizada uma nova proposta de amostragem nos pontos de coleta em arroios.

A curva epidemiológica para outros pontos também vai ser produzida, possibilitando uma maior compreensão de mais municípios além dos aqui mostrados.

Posteriormente, o projeto tem a ambição de criar um modelo que relacione a carga viral de SARS-CoV-2 no esgoto com o número de casos ativos na região pertencente ao sistema de esgotamento sanitário analisado.

Links úteis

Boletins anteriores pelo endereço <https://bit.ly/3l6yUpL>

Mapas em alta resolução: <https://bit.ly/3gEXPwZ>