



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
Centro de Ciências Biológicas
Graduação em Ciências Biológicas
Laboratório de Virologia Aplicada



ESTUDO DA INCIDÊNCIA DE ADENOVÍRUS HUMANO E SUÍNO, NOROVÍRUS HUMANO E CIRCOVÍRUS SUÍNO, EM AMOSTRAS DE ÁGUA DE CONSUMO E DESCEDENTAÇÃO ANIMAL DO MUNICÍPIO DE CONCÓRDIA, SANTA CATARINA

Lucas Ariel Totaro Garcia

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Célia Regina Monte Barardi

Co-orientadora: MSc. Aline Viancelli

Florianópolis

2011

ESTUDO DA INCIDÊNCIA DE ADENOVÍRUS HUMANO E SUÍNO, NOROVÍRUS
HUMANO E CIRCOVÍRUS SUÍNO, EM AMOSTRAS DE ÁGUA DE CONSUMO E
DESCEDENTAÇÃO ANIMAL DO MUNICÍPIO DE CONCÓRDIA, SANTA CATARINA

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Curso de Ciências Biológicas, Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito parcial para obtenção do título de Licenciado e Bacharel em Ciências Biológicas, sob orientação da Prof^ª. Dr^ª. Célia Regina Monte Barardi e MSc. Aline Viancelli.

Florianópolis

2011

Agradecimentos

Primeiramente aos meus pais Carlos e Mônica, sem eles nada seria possível. Obrigado por confiar e apoiar em todos os momentos dessa longa jornada. Junto a eles, agradeço ao meu irmão Leandro, pela companhia, pelas discussões e pelas diversas ajudas, principalmente nos dois anos que moramos juntos.

À Prof^a. Dr^a. Célia Regina Monte Barardi por toda a orientação, ensinamentos e contribuições na minha vida acadêmica. Em especial agradeço a confiança no meu trabalho e a paciência nesses anos juntos.

À Doutoranda Aline Viancelli, minha segunda orientadora, que me acompanhou e me ensinou muito desde o começo até agora. Seria muito mais difícil sem as orientações dela.

À Embrapa – Suínos e Aves (Concórdia/SC), em especial ao Dr. Paulo Augusto Esteves e ao Dr. Airton Kunz por terem aberto as portas para que eu pudesse realizar meu trabalho. Apesar pouco contato entre a gente, reconheço a grande importância deles ao meu trabalho.

Aos membros da banca avaliadora, Dr^a. Caroline Rigotto Borges, Prof^a. Dr^a. Thaís Cristine Marques Sincero e Dr. Paulo Augusto Esteves pela disponibilidade e por todas as sugestões.

À Vanessa Moresco por todos os ensinamentos desde minha chegada ao laboratório. À Carol pelas colaborações durante o trabalho e pelo treinamento na cultura celular. À grande amiga Mariana Rangel Pilotto, também pelo treinamento na cultura celular e acompanhamento do meu trabalho

Aos colegas do Laboratório de Virologia Aplicada, sendo infinitas mulheres e alguns poucos homens, pela ajuda, pela companhia e pela diversão nesses anos de convivência.

À minha namorada Thaís, pela companhia, paciência, carinho e doces.

À todos os meus amigos, por tudo que passamos, pelas companhias e por nunca deixarem de acreditar em mim, estando perto ou longe.

Aos colegas e professores dos laboratórios do 3º andar do MIP pelo apoio e ajuda quando necessário.

Ao Programa PIBIC/CNPq pela concessão da bolsa de Iniciação Científica durante todo o período de meu estágio no laboratório.

Resumo

Os dejetos provenientes da suinocultura e da população podem potencialmente contaminar mananciais de captação de água para consumo, já que esses efluentes nem sempre passam por tratamento adequado. Já a água utilizada para consumo humano geralmente passa por um processo de tratamento, mas este nem sempre é eficiente para remoção de todos os tipos de contaminantes. Dentre os contaminantes que podem estar presentes nessas águas estão o circovírus suíno tipo 2 (PCV2), o adenovírus suíno, PAdV, o adenovírus humanos (HAdV) e o norovírus humano (NoV). Diante da importância desses agentes infecciosos o presente estudo teve por objetivo avaliar a contaminação de águas de consumo humano e descendência animal em Concórdia, na região oeste do Estado de Santa Catarina, por PCV2, PAdV, HAdV e NoV através de técnicas moleculares de PCR quantitativo. As amostras positivas para HAdV foram colocadas em cultura celular *in vitro* para estudos de infecciosidade viral pela técnica de formação de placas de lise (UFP). Das 36 amostras analisadas, a presença do material genético de PAdV e PCV2 foi verificada em todos os pontos de coleta, com prevalência acima de 30% de ambos os vírus, com uma média de 10^2 cg/mL para PAdV e 10^4 cg/mL para PCV2. Para HAdV, 100% das amostras foram positivas com média de 10^4 cg/mL. Contudo, no ensaio de infecciosidade, apenas 13 das 36 amostras apresentaram positividade com uma média de contaminação de 6 UFP/L. Para NoV os resultados de qPCR foram todos negativos. Os resultados obtidos confirmam que há liberação de dejetos suínos em rios e fontes de abastecimento de água de consumo humano, pondo em risco a qualidade das águas de mananciais. Além disso, há contaminação das águas de consumo humano por HAdV, uma vez que algumas amostras apresentaram viabilidade desses vírus, indicando um perigo real de veiculação de doenças.

Palavras-chave: contaminantes virais, água de consumo, qPCR, ensaio de placa de lise

Abstract

Animals and human wastewaters can potentially contaminate the water sources, since these effluents not usually receive proper treatment before discard. The treatment of drinking water may not effective to remove all contaminants. Among the contaminants that can be found in these waters are porcine circovirus type 2 (PVC2), porcine adenovirus (PAdV), human adenovirus (HAdV) and human norovirus (NoV). Given the impact of the infectious agents the present study aimed to evaluate the contamination of water for human and animal consumption from Concordia, in the western state of Santa Catarina, by porcine circovirus type 2 (PCV2), porcine adenovirus (PAdV) human adenovirus (HAdV) and human norovirus (NoV) by molecular techniques using quantitative PCR. HAdV-positive samples were placed in cell culture *in vitro* for viral infectivity by the technique of plaque-forming units assay (PFU). From the 36 samples analyzed, the presence of genetic material of PAdV and PCV2 was detected in all sampling sites, with prevalence above 30% for both viruses, with an average of 10^2 cg/mL for PAdV and 10^4 cg/mL for PCV2. For HAdV, 100% of the samples were positive with an average of 10^4 cg/mL. However, in the infectivity assay, only 13 of 36 samples were positive with an average contamination of 6 PFU/L. For NoV qPCR results were all negative. The results confirm that swine manure has been discharged into rivers and sources of drinking water, endangering the water quality. In addition, it was found to have a contamination of drinking water by viable HAdV, indicating a real risk of water related diseases.

Keywords: viral contaminants, drinking water, qPCR, plaque assay

Sumário

Resumo	I
Abstract	II
1. Introdução.....	7
2. Objetivos.....	15
3. Material e Métodos	16
3.1 Amostras de águas	16
3.2 Filtração da água e concentração viral	18
3.3 Extração de material genômico.....	18
3.4 Quantificação de PCV2, PAdV, HAdV e NoV GI e GII por meio de PCR em tempo real (qPCR) 19	
3.4.1. Reação de transcriptase reversa	19
3.4.2. Quantificação de genomas virais por qPCR	19
3.5 Verificação da viabilidade viral de HAdV através do ensaio de placa de lise em amostras de água 22	
3.5.1. Cultivo das células A549	22
3.5.2. Crescimento e manutenção das células	22
3.5.3. Adenovírus humanos do sorotipo 2.....	22
3.5.4. Avaliação da citotoxicidade das amostras de água concentradas	22
3.5.5. Ensaio de placa de lise para HAdV	23
4. Resultados e Discussão	25
5. Conclusão.....	35
6. Referências Bibliográficas	36

1. Introdução

O equilíbrio e o futuro de nosso planeta dependem da preservação da água. O aumento da população mundial e das atividades que utilizam água, como a agropecuária, comprometem os recursos hídricos, que permanecem constantes.

Um dos principais problemas que surgiram neste século foi a crescente contaminação da água por dejetos humanos e de animais. Despejos industriais e domésticos, quando lançados em córregos ou rios, comprometem seriamente a qualidade dos mananciais de água, alterando o equilíbrio ecológico (LODDER et al., 2010). Grande parte das águas superficiais do Estado de Santa Catarina está localizada sobre o aquífero Guarani, um gigante reservatório de água subterrâneo e ainda de alta qualidade (SEGANFREDO e GIROTTO, 2002). Mas há uma grande preocupação com a possível contaminação de águas subterrâneas, causada por dejetos domésticos e industriais.

A água utilizada no consumo humano geralmente passa por um processo de tratamento para potabilização, mas este nem sempre é eficiente para a remoção de todos os tipos de contaminantes, como bactérias e vírus. Muitas doenças são transmitidas pela ingestão de água e alimentos contaminados, podendo ser fatais em alguns casos (FIGUERAS e BORREGO, 2010). No entanto, muitas localidades ainda não são abastecidas por água tratada (IBGE, 2009), fazendo-se uso de água proveniente de fontes naturais, como nascentes, rios e poços artesianos. Essas águas podem estar contaminadas e não há controle da qualidade dessa água. Em Santa Catarina, a captação e distribuição de água e o tratamento dos esgotos são realizados pela Companhia Catarinense de Águas e Saneamento (CASAN). Essa empresa abastece com água tratada 196 municípios catarinenses e um paranaense, beneficiando 94% da população urbana. Também atua na coleta e no tratamento do

esgoto sanitário, cujo benefício está diretamente ligado à saúde, conforto e qualidade de vida (CASAN, 2011).

A água pode ser captada em mananciais superficiais e subterrâneos, passando por estações de tratamento e redes de distribuição. Na Estação de Tratamento de Água (ETA) ocorre o tratamento da água captada na natureza visando a potabilização para posterior distribuição à população. Os principais mananciais utilizados para captação de água bruta são poços e rios.

O município de Concórdia, localizado no oeste do Estado de Santa Catarina a 480 km de Florianópolis, possui aproximadamente 67 mil habitantes e é abastecido por meio da captação de águas em mananciais de superfície, no Rio Suruvi e Rio Jacutinga. As principais fontes de poluição dos mananciais estão relacionadas com despejos da suinocultura e com atividades agrícolas, tendo como órgão responsável pela fiscalização a Fundação de Amparo à Tecnologia e ao Meio Ambiente (FATMA) (CASAN, 2011). Concórdia é uma das principais cidades produtoras de suínos e aves de Santa Catarina, com empresas de grande e médio porte e um rebanho de mais de 400 mil cabeças suínas (IBGE, 2009), o qual gera um volume elevado de dejetos. Contudo, os dejetos das granjas nem sempre recebem tratamento adequado, podendo contaminar as águas superficiais e subterrâneas. Além disso, nem todo o esgoto doméstico é tratado pela companhia responsável. Dessa forma, as fontes naturais de água da região podem ser contaminadas com despejos humanos e animais.

A suinocultura no município de Concórdia tem uma considerável contribuição socio-econômica. Por isso, qualquer mudança no setor tem reflexos importantes, o que dificulta a adoção de medidas mais rígidas nas questões ambientais (NOTTAR, 2004). É possível aperfeiçoar estes processos a fim de adequar os efluentes líquidos da suinocultura à legislação ambiental vigente e aos padrões de biossegurança.

Existem poucos estudos avaliando e estabelecendo parâmetros de ecotoxicidade do dejetos suíno sob o ponto de vista de saúde pública quando estes são

diretamente descarregados no meio ambiente, submetidos ou não a diferentes níveis de tratamento (FERNANDEZ et al., 2004; SCHMITT et al., 2005). Sendo assim, informações consistentes sobre a qualidade da água envolvendo aspectos microbiológicos precisam ser levantadas e avaliadas (MANCUSO e SANTOS, 2003).

A CASAN, através das Estações de Tratamento de Esgoto (ETE's), coleta e trata os efluentes provenientes da atividade humana. A tecnologia de tratamento utilizada é o tratamento por meio de Lagoas de Estabilização, Lodos Ativados (valos de oxidação, aeração prolongada) e Filtros Biológicos. Em 2008, apenas 7,8% da população da região urbana de Concórdia era atendida com serviços de coleta de esgoto.

O processo de tratamento aplicado para potabilização da água distribuída na região urbana do Município de Concórdia consiste de uma ETA convencional, que contém etapas de clarificação e tratamento final, que consistem em: captação e recalque da água do manancial, clarificação (coagulação, floculação, decantação e filtração), tratamento final (desinfecção, fluoretação e correção de pH), reservação e distribuição (CASAN, 2011).

A CASAN abastece toda a região urbana de Concórdia. No entanto, cerca de 30% da população presente na área rural, utiliza poços artesianos e fontes naturais para o consumo. Em 2002, a Fundação Municipal do Meio Ambiente (Fundema) divulgou resultados de análises da água de poços artesianos, nos quais 87% delas estavam contaminadas com coliformes termotolerantes. Contudo, ainda não existe nenhuma avaliação com relação à presença de vírus nessas águas.

O tratamento e descontaminação de águas de abastecimento requerem que seus parâmetros de qualidade não excedam os valores que ofereçam riscos à saúde. Os padrões microbiológicos tradicionais baseiam-se em número de coliformes totais e termotolerantes, não permitindo a presença dos mesmos em água para consumo humano em toda e qualquer situação, incluindo fontes individuais como poços, minas,

nascentes, dentre outras. Porém, esses padrões não são suficientes para garantir a qualidade da água, pois os contaminantes virais podem permanecer na água após o tratamento. A legislação brasileira do Ministério da Saúde, para água potável (Portaria nº 518, de 25 de março de 2004 do Ministério da Saúde) ainda não contempla padrões de contaminação viral, mas a Associação Brasileira de Engenharia Ambiental (ABES) elaborou recentemente sugestões para a inclusão de outros microorganismos na avaliação da qualidade de água, incluindo vírus entéricos (ABES, 2010).

Dentre os microorganismos presentes no ambiente aquático, os vírus entéricos são importantes patógenos, mundialmente distribuídos e responsáveis por muitas doenças que afetam os seres humanos (KOCWA-HALUCH, 2001). Esses vírus são transmitidos através da ingestão de água e alimentos contaminados, e se replicam no trato gastrointestinal, sendo excretados nas fezes em grandes quantidades pelos indivíduos infectados e podem, com frequência, ser detectados em efluentes de esgotos domésticos (RUSIN et al., 2000).

No meio ambiente, estes vírus são capazes de se agregar rapidamente às partículas sólidas protegendo-se, desta forma, dos agentes físico-químicos de inativação, podendo permanecer viáveis ou potencialmente infectantes durante meses na água ou em esgoto, resistindo a condições ambientais adversas e a processos de tratamento aplicados no controle bacteriano, incluindo a cloração (LECLERC et al., 2002; TREE et al., 2003).

Os vírus entéricos mais prevalentes que são transmitidos ao homem são os vírus da hepatite A e E, norovírus, enterovírus, rotavírus, astrovírus e adenovírus (SCHLINDWEIN et al., 2010). A dose infectante desses agentes é extremamente baixa, variando de uma a dez unidades infecciosas (ASHBOLT, 2004). Desta forma, o grupo dos vírus entéricos é o mais significativo, confiável e eficiente modelo a ser usado para o monitoramento ambiental, segundo a Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (EPA) (YEH et al., 2009).

A identificação da origem da contaminação microbiológica tem um importante papel na busca de estratégias de manejo e remediação. A contaminação microbiológica e química do meio ambiente, e particularmente da água de mananciais, é uma realidade que deve ser enfrentada pelas fazendas de criação de suínos (HUNDESA et al., 2009).

Dentre as enfermidades que podem atingir os animais por ingestão de água contaminada, tem-se a circovirose suína. A síndrome da circovirose suína é a denominação dada ao conjunto de manifestações clínicas causadas pelo circovírus suíno tipo 2 (PCV2), um vírus que está disseminado em rebanhos suínos de todo o mundo. Essa doença foi diagnosticada pela primeira vez no Brasil, no ano 2000. (ZANELLA e MORES, 2003).

Seis formas clínicas ou síndromes estão relacionadas com a circovirose suína, sendo a síndrome multissistêmica do definhamento (SMDS) a mais frequente e a mais bem caracterizada (CHAE, 2005). A SMDS afeta mais frequentemente suínos de cinco a 16 semanas de idade, e a mortalidade e morbidade variam de acordo com a fase em que a doença surge e com o manejo da criação (SEGALES e DOMINGO, 2002). Cerca de 50% dos suínos afetados morrem em menos de oito dias, enquanto os demais animais podem sobreviver; contudo, com provável evolução para o definhamento extremo, sem perspectivas de recuperação (ZANELLA, 2007).

O PCV2 pertence à família *Circoviridae*, é icosaédrico, não envelopado, possui 14 a 26nm de diâmetro, com genoma DNA circular de fita simples (1,7 – 2,3 kb), sendo um dos menores vírus animais. Os circovírus são encontrados com frequência em várias espécies animais, mas os suínos constituem os únicos mamíferos nos quais os vírus já foram isolados (ALLAN e ELLIS, 2000). Entre os dois tipos de circovírus porcinos (PCV) identificados, o PCV2 tem sido associado com doenças potencialmente fatais e pode ser transmitido de forma horizontal e vertical, sendo a

ronasal a via mais frequente de transmissão. O PCV2 é excretado nas fezes por até 13 dias após a infecção (ZANELLA, 2007).

O circovírus é extremamente estável sob condições ambientais, podendo conservar seu potencial infectivo, em cultivo celular, após incubação a altas temperaturas (56 – 70°C), tratamentos em pH ácido (próximo de 3,0) e solvente orgânico (clorofórmio) (ALLAN et al., 1994). Essa resistência à inativação desempenha um importante papel na epidemiologia do agente, implicando no controle das infecções por esses vírus.

Outro vírus extremamente prevalente em águas contaminadas por fezes humanas e de animais é o adenovírus, pertencente à família *Adenoviridae*, que inclui o grupo de vírus icosaédricos não envelopados com genoma DNA dupla fita. Os adenovírus são de transmissão fecal-oral, sendo altamente resistentes à processos de desinfecção por radiação ultravioleta (GERBA et al., 2002; THURSTON-ENRIQUEZ et al., 2003).

Os adenovírus porcinos (PAdV) pertencem ao gênero *Mastadenovirus*, são divididos em seis sorotipos e têm sido registrados como abundantes, altamente prevalentes e de longa estabilidade em fezes, urina e águas residuárias (DE MOTES et al., 2004; HUNDESA et al., 2006). PAdVs são amplamente disseminados na população de suínos mas não produzem doenças clínicas severas, embora tenham sido isolados de suínos com encefalite e pneumoenterite (KASZA, 1966; ISHIBASHI e YASUE, 1984). Animais infectados por PAdVs apresentam excreções com vírus infectivo por meio das fezes e podem potencialmente se infectar por meio da ingestão de água ou alimentos contaminados com fezes (ISHIBASHI e YASUE, 1984).

O adenovírus humano (HAdV) é extremamente prevalente em águas contaminadas por fezes humanas (BOSCH et al., 2008). Já foram identificados 52 sorotipos de adenovírus humano e quase todos podem se replicar no trato gastrointestinal sem exibir sintomas, sendo subsequentemente excretados nas fezes

(HORWITZ, 2001), podendo contaminar o ambiente aquático (SCHLINDWEIN et al., 2010). Por não serem eliminados em processos de tratamento de esgoto e de água de consumo, aumentam o risco de contaminação da população (ENRIQUEZ et al., 1995).

Os principais modos de contaminação por adenovírus ocorrem pela via respiratória e pela ingestão de água e alimentos contaminados (ALLARD et al., 2001; AVELLON et al., 2001). As infecções por HAdV ocorrem durante o ano com pequena ou nenhuma variação sazonal na liberação deste vírus para o meio ambiente e causa uma variedade de doenças infecciosas sintomáticas, podendo afetar o sistema respiratório (faringite, doença respiratória aguda e pneumonia), o trato gastrointestinal (gastroenterites), o sistema nervoso central (meningoencefalite), além de doenças oculares (conjuntivites) e genitais (uretrite e cervicite) (CRABTREE et al., 1997).

Outro importante vírus humano entérico de transmissão fecal-oral é o norovírus (NoV). Pertencente à família *Caliciviridae* é um vírus não envelopado que possui RNA de fita simples. Já foram descritos 3 genogrupos (G) que infectam humanos, sendo eles GI, GII e GIV. Por terem grande resistência a condições ambientais, os norovírus são frequentemente encontrados em água de consumo e alimentos (TAVARES et al., 2005), sendo os principais causadores de gastroenterites não bacterianas em todo o mundo, apresentando aproximadamente 23 milhões de casos por ano nos Estados Unidos da América (GENTRY et al., 2009).

Atualmente, o estudo de vírus entéricos no ambiente é feito por meio de aplicação de técnicas moleculares para a detecção e quantificação de genomas virais. No entanto, a simples detecção do material genético viral não permite distinguir partículas infecciosas de não infecciosas (BOSCH et al., 2008). Dessa forma, é de fundamental importância a aplicação de técnicas que possibilitem verificar a presença de vírus viáveis a fim de ter uma maior sensibilidade e credibilidade aos resultados, e possibilitar futuros estudos de análises de riscos.

Uma das técnicas comumente aplicadas na detecção de partículas infecciosas é o ensaio de formação de placas de lise, que verifica a capacidade dos vírus presentes na amostra de infectar células permissivas, provocando a formação de pontos de lise, os quais podem ser visualizados e quantificados após coloração da monocamada celular (HERZOG et al., 2008).

Diante desse cenário, o presente trabalho teve por objetivo avaliar a possível contaminação das águas superficiais e subterrâneas, pelos vírus acima citados, causada pelo despejo dos dejetos domésticos e da suinocultura, além da possível contaminação da água fornecida à população humana e aos rebanhos de suínos

2. Objetivos

Objetivo Geral: Avaliar a contaminação de águas de consumo humano e descendentação animal no município de Concórdia, Santa Catarina, por circovírus suíno tipo 2 (PCV2), adenovírus suíno (PAdV), adenovírus humano (HAdV) e norovírus humano (NoV) GI e GII, por meio de técnicas moleculares de PCR quantitativo (qPCR), e estudar a viabilidade de HAdV presentes nessas águas por ensaio de formação de placa de lise.

Objetivos específicos:

- Coletar mensalmente, por um período de seis meses, amostras de água de consumo humano e descendentação de suínos em locais previamente selecionados, na cidade de Concórdia, Santa Catarina;
- Quantificar os genomas de circovírus suíno tipo 2 (PCV2), adenovírus suíno (PAdV), adenovírus humano (HAdV) e norovírus humano (NoV) GI e GII presentes nas amostras coletadas por meio da técnica de qPCR;
- Avaliar a viabilidade de HAdV por ensaio de placas de lise nas amostras de águas positivas por qPCR.

3. Material e Métodos

3.1 Amostras de águas

A amostragem foi realizada mensalmente durante os meses de agosto de 2010 a janeiro de 2011 na cidade de Concórdia, SC, através da coleta de dois litros de água em cada ponto de amostragem. Foram avaliados seis pontos, três referentes à água de consumo humano e três de água para descendentação de suínos (Figura 1):

Ponto 1: Água utilizada para descendentação de animais em granja de suínos da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Embrapa Suínos e Aves. A água utilizada é proveniente de uma fonte natural localizada na Embrapa que passa por um sistema de tratamento da própria empresa, igual ao da CASAN.

Ponto 2: Água pós-tratada para consumo humano, distribuída pela CASAN à população urbana. Essa água foi coletada da torneira em uma residência próxima à CASAN, sem passagem por caixa d'água.

Ponto 3: Água proveniente de poço artesiano utilizada para descendentação de animais em granja de suínos em uma propriedade rural de médio porte.

Ponto 4: Água do Rio Pinhal, que passa por diversas propriedades rurais onde se desenvolve produção de suínos.

Ponto 5: : Água de poço artesiano utilizada para consumo humano, coletada em uma escola da área rural, sem tratamento prévio.

Ponto 6: Água do Rio Jacutinga, onde é feita a captação da CASAN, para posterior tratamento e distribuição.



Fonte: wikimapia.org

Figura 1. Ilustração do município de Concórdia e foto de satélite com indicação dos pontos de coleta. Ponto 1: água de descendação de suínos em granja da EMBRAPA; Ponto 2: água pós-tratada para consumo humano; Ponto 3: água de descendação de suíno em granja de médio porte; Ponto 4: água do Rio Pinhal; Ponto 5: água de poço artesiano; Ponto 6: água do Rio Jacutinga

3.2 Filtração da água e concentração viral

O processo de filtração da água e concentração das partículas virais foi baseado no protocolo descrito por Katayama et al. (2002).

Cada amostra de 2L dos diferentes pontos foi processada separadamente. Primeiramente foi verificado o pH de cada e ajustado (com HCl 1N) para pH entre 5 e 6. Em seguida, a amostra foi filtrada por papel filtro, para remoção de grandes partículas sólidas. Após, foi adicionado 25mL de $MgCl_2$ aos 2L de água para alteração das cargas virais, seguido pela filtração por meio de um sistema a vácuo com uma membrana carregada negativamente (Nihon Millipore) com 90mm de diâmetro e 0,45 μ m de tamanho dos poros. Após a filtração, a membrana foi lavada com uma solução de H_2SO_4 (pH 3,0) para remoção dos íons e inibidores e seguida pela eluição com NaOH (pH 10,0) por 10min sob agitação. O eluato foi neutralizado com uma solução de 50mM de H_2SO_4 e tampão Tris-EDTA 100x (pH 8,0), num volume final de 10mL.

Subsequentemente, o eluato de 10mL foi reconcentrado utilizando Centriprep YM 50 (Millipore) e centrifugação a 1.500Xg por 5min a 4°C. O volume de concentrado obtido (4,0mL) foi dividido em 2 alíquotas de 2,0mL, sendo que uma destas alíquotas foi processada para extração do genoma viral e as outras estocadas a -80°C.

3.3 Extração de material genômico

Para a extração do genoma viral foi utilizado o kit comercial QIAamp RNA Mini-kit e DNA Mini kit (QiagenTM) de acordo com as instruções do fabricante, que permite a extração do material genético de vírus tanto de genomas DNA como RNA. O método baseia-se na retenção por afinidade de cargas dos ácidos nucleicos a uma matriz

constituída por sílica. Para tanto, partiu-se de um volume de 200µL de amostra obtendo-se, ao final da extração, o ácido nucléico contido num volume de 60µL.

3.4 Quantificação de PCV2, PAdV, HAdV e NoV GI e GII por meio de PCR em tempo real (qPCR)

3.4.1. Reação de transcriptase reversa

Para a obtenção de DNA complementar (cDNA) para realizar o qPCR de NoV, foi feita uma reação de transcrição reversa (RT), utilizando-se um iniciador randômico em presença da enzima transcriptase reversa (RT). A reação foi feita num volume final de 25µL, contendo 5,0µL do RNA. Antes de adicionar os reagentes, o RNA foi primeiramente desnaturado a 97°C por 5min e resfriado por 2min em gelo, sendo posteriormente adicionado à mistura da reação contendo 20pmol de iniciador randômico (Promega), 0,6mM de cada dNTP, 100U da enzima transcriptase reversa (MMLV-Promega), 20U de inibidor de RNase (RNAsin-Promega) e incubação a 37°C por 60min em termociclador. Após a etapa de RT, as amostras foram submetidas ao qPCR para quantificação específica de genomas de NoV.

3.4.2. Quantificação de genomas virais por qPCR

O número de cópias genômicas (cg) virais detectadas para PCV2, PAdV, HAdV e NoV GI e GII foi realizada por PCR quantitativo utilizando o Kit TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems) que contém a maioria dos reativos indispensáveis para a reação de PCR em tempo real, como a enzima Taq DNA Polimerase, oligonucleotídeos, além das condições salinas adequadas, sendo necessário apenas a adição dos iniciadores, da sonda TaqMan e das amostras. As

reações de qPCR foram realizadas separadamente para cada vírus. Utilizou-se uma reação com volume final de 25µL, sendo 12,5µL da Master Mix (2x), iniciadores e sondas específicos (Quadro 1) e protocolos descritos por Hernroth et al. (2002), Hundesa et al. (2009), Opriessnig et al. (2003) e Kageyama et al. (2003) para os respectivos vírus HAdV, PAdV, PCV2 e NoV GI e GII.

Para HAdV e PAdV foram adicionados à Master Mix iniciadores específicos senso (*Forward-F*) e antisenso (*Reverse-R*) para cada vírus na concentração final de 0,9µM e sonda TaqMan (*Probe-P*) na concentração final de 0,225µM. Para PCV2, as concentrações finais dos iniciadores (PCV2 F e PCV2 R) e da sonda (PCV2 P) foram de 0,4µM e 0,2µM, respectivamente. O perfil de temperaturas utilizado no qPCR para os três vírus foi de 2min a 50°C, seguido de 10min a 95°C, seguido por 45 ciclos de desnaturação a 95°C por 15s, e anelamento dos iniciadores e sonda e extensão, ambos à mesma temperatura de 60°C por 1min.

Para NoV foram usadas concentrações finais de 0,25µM para os iniciadores e 0,6µM para as sondas. O perfil de temperaturas utilizado no qPCR para os dois genogrupos foi de 2min a 50°C, seguido de 10min a 95°C, e 45 ciclos de desnaturação a 94°C por 20s, e de 56°C por 1min tanto para anelamento dos iniciadores e sonda quanto para extensão dos iniciadores.

Quadro 1. Iniciadores e sondas utilizados para quantificação de cópias genômicas de PAdV, PCV2, HAdV e NoV GI e GII para qPCR

Iniciadores e sondas	Sequência 5' - 3'	Referência
PAdV F	AACGGCCGCTACTGCAAG	Hundesda et al., 2009
PAdV R	AGCAGCAGGCTCTTGAGG	
PAdV P	6-FAM-CACATCCAGGTGCCGC-TAMRA	
PCV2 F	TGGCCCGCAGTATTCTGATT	Opriessnig et al., 2003
PCV2 R	CAGCTGGGACAGCAGTTGAG	
PCV2 P	6-FAM-CCAGCAATCAGACCCCGTTGGAATG-TAMRA	
HAdV F	C(AT)TACATGCACATC(GT)C(CG)GG	Hernroth et al., 2002
HAdV R	C(AG)CGGGC(GA)AA(CT)TGCACCAG	
HAdV P	6-FAM-CCGGGCTCAGGTACTCCGAGGCGTCC-TAMRA	
NoV GI F	CGYTGGATGCGNTTYCATGA	Kageyama et al., 2003
NoV GI R	CTTAGACGCCATCATCATTYAC	
NoV GI aP	6-FAM-AGATYCGGATCYCCTGTCCA-TAMRA	
NoV GI bP	6-FAM-AGATCGGGTCTCCTGTCCA-TAMRA	
NoV GII F	CARGARBCNATGTTYAGRTGGATGAG	
NoV GII R	TCGACGCCATCTTCATTCACA	
NoV GII P	6-FAM-TGGGAGGGCGATCGCAATCT-TAMRA	

6-FAM, fluoróforo 6-carboxifluoresceína; TAMRA, quencher não fluorescente na região 3' carboxitrametilrodamina
R = A/G, B = C/G/T, Y = C/T e N = A/C/T/G

Os ensaios foram realizados em duplicatas com amostras diluídas 1:10, para evitar inibição, em placas de 96 cavidades (MicroAmp Applied Biosystems). Em cada placa, também foram adicionados DNAs padrão clonados em plasmídeos disponíveis no Laboratório de Virologia Aplicada, pré-quantificados com número de cópias genômicas variando entre 10^2 a 10^6 e em duplicata. Esses DNAs padrão já estava Controlados negativos (sem adição de ácidos nucleicos nas reações) também foram adicionados em todas as reações. A adição dos reagentes foi realizada em ambiente livre de DNA, sendo que ao final eram aplicadas as amostras em outro ambiente. Para os padrões plasmidiais um ambiente exclusivo para manipulação de plasmídeos foi utilizado. A placa foi devidamente selada com filme óptico (Applied Biosystems) e inserida no aparelho StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems).

3.5 Verificação da viabilidade viral de HAdV através do ensaio de placa de lise em amostras de água

3.5.1. Cultivo das células A549

Foram utilizadas células de linhagem A549 originárias de carcinoma alveolar basal humano, gentilmente doadas pela Dra. Rosina Girones da Universidade de Barcelona. Essas células são permissivas à infecção *in vitro* por adenovírus humanos.

3.5.2. Crescimento e manutenção das células

As células A549 foram mantidas em garrafas de 75cm² contendo meio DMEM com alto teor de glicose (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) suplementado com 5% de soro fetal bovino (SFB) (Gibco), 1% de antibiótico PSA [penicilina G (100U/mL), sulfato de estreptomicina (100µg/mL) e anfotericina B (0,025µg/mL) (Cultilab)] e 1% de piruvato de sódio. As células foram armazenadas em estufa a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂.

3.5.3. Adenovírus humanos do sorotipo 2

Como controle positivo de todos os ensaios, foi utilizado o adenovírus humano sorotipo 2 (HAdV2), mantido no Laboratório de Virologia Aplicada e titulado à 2x10⁸ unidades formadoras de placas por mL (UFP/mL) e diluído a 10⁻⁶.

3.5.4. Avaliação da citotoxicidade das amostras de água concentradas

As células A549 foram cultivadas na densidade de 2x10⁵ células/mL em placas de 24 cavidades por 24h, período necessário para atingirem confluência. Após esse período, o meio de cultivo foi retirado e as células lavadas com solução salina tamponada com fosfato (PBS 1X). Após, foram adicionados 200µL da amostra concentrada de água não diluída e também diluídas seriadamente em base dois em

DMEM com alto teor de glicose e sem suplementação de SFB. Tanto as amostras quanto o meio de diluição foram tratados previamente com 1% de PSA e 1% anfotericina B. A placa foi incubada a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂, durante 60min com homogeneização a cada 15min. Após o período de incubação, as amostras foram aspiradas e adicionado 1,0mL de DMEM com alto teor de glicose suplementado com 5% de SFB, 1% de piruvato de sódio, 1% de PSA.

Após 72h de incubação a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂, as células foram observadas ao microscópio invertido para visualizar possíveis alterações morfológicas celulares provocadas pelas amostras testadas. A placa foi então corada pela adição de 250µL de corante preto de naftaleno (0,1%) (Sigma), homogeneizadas por 15min e aspirado o excedente. A diluição escolhida da amostra de água foi aquela que não provocou danos ao tapete celular após as 72h de incubação.

3.5.5. Ensaio de placa de lise para HAdV

As células A549 foram cultivadas na densidade de $2,5 \times 10^5$ células/mL em placas de 6 cavidades. Após 24h de incubação a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂, o meio de cultivo dessas células foi aspirado e cada poço foi lavado duas vezes com PBS 1X. Depois da lavagem, adicionou-se 250µL das amostras concentradas de água na menor diluição que não apresentou citotoxicidade no ensaio descrito no item 3.5.4. Novamente, as amostras e o meio de diluição foram tratados com 1% de PSA e 1% de anfotericina B. A placa foi mantida a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂, por 60 min. com homogeneização a cada 15 min. Após, as amostras foram aspiradas e adicionados 2,5mL de DMEM 2X com alto teor de glicose [suplementado com 4% de SBF, 0,2% de PSA, 0,2% de piruvato de sódio e 5% de cloreto de magnésio (1M)] juntamente com Bacto™-agar (BD Biosciences) em solução aquosa a 0,6% liquefeito na proporção 1:1, na temperatura de aproximadamente 50°C. Após a polimerização do Bacto™-agar, a placa foi incubada a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂, por 120h.

Após, a camada de ágar foi retirada e a monocamada de células da placa fixada e corada com 2mL de cristal violeta liquefeito em etanol puro (diluído 1:5 em água). As placas de lise formadas foram contadas e a partir do número de unidades formadoras de placas (UFP), foi inferido o número de partículas virais potencialmente infecciosas por litro de água pelo cálculo a seguir:

Número de placas x recíproca da diluição x recíproca do volume em L

4. Resultados e Discussão

Foram coletadas 36 amostras de água, sendo seis de cada ponto. Após concentração e extração de ácidos nucleicos dessas, foi realizado o qPCR para os respectivos vírus. Os resultados obtidos para PAdV, PCV2 e HAdV por meio de qPCR estão apresentados na Tabela 1 e a média de cópias genômicas por mL (cg/mL) em cada ponto de coleta é apresentado na Figura 2.

Todos os pontos apresentaram ao menos um resultado positivo para todos os vírus analisados. Para PAdV, 30% das amostras foram positivas e a média de cópias genômicas/mL (cg/mL) foi de $2,06 \times 10^2$. Já para PCV2, foi observada uma maior positividade (41%) e maior quantidade, com uma média de $7,91 \times 10^4$ cg/mL.

Para PAdV e PCV2 é possível visualizar que os pontos de coleta apresentaram semelhança em relação ao número de amostras contendo genomas virais, sendo que a maioria dos pontos apresentou duas positivas. O ponto 2 (amostra de água pós-tratada) foi o que apresentou maior positividade para PCV2 (4/6) e uma das maiores quantidades de cg/mL de PAdV ($1,48 \times 10^3$). Já a água de poço artesiano (ponto 5), teve apenas uma amostra positiva para PAdV e três para PCV2.

A pesquisa de genomas virais de PCV2 em amostras de água de consumo, pelo que nos é conhecido, ainda não foi relatada na literatura. Ainda assim, é possível conceber que se trata de um vírus que pode estar presente em águas de consumo humano e animal em grandes quantidades, sendo até mesmo mais prevalente que o adenovírus porcino. Dessa forma, o PCV2 poderia ser indicado como um novo marcador de contaminação de dejetos da suinocultura em amostras ambientais

Tabela 1. Média aritmética e intervalo do número de cópias genômicas por mililitro (cg/mL) de PAdV, PCV2 e HAdV detectados nos ensaios de qPCR em amostras de água coletadas em diferentes pontos em Concórdia, SC, no período de agosto de 2010 a janeiro de 2011.

Pontos de Coleta	PAdV (cg/mL) Média^h	Intervaloⁱ	PCV2 (cg/mL) Média	Intervalo	HAdV (cg/mL) Média	Intervalo
Ponto 1 ^a	4,40x10 ² (2/6)	1,15x10 ³ - 1,49x10 ³	1,08x10 ⁵ (2/6)	1,14x10 ³ - 6,47x10 ⁵	1,55x10 ⁴ (6/6)	7,58x10 ³ – 2,43x10 ⁴
Ponto 2 ^b	2,49x10 ² (2/6)	1,56x10 ¹ - 1,48x10 ³	4,74x10 ⁴ (4/6)	2,30x10 ³ - 2,20x10 ⁵	3,67x10 ⁴ (6/6)	6,95x10 ³ – 1,53x10 ⁵
Ponto 3 ^c	1,43x10 ² (2/6)	1,48x10 ¹ - 8,41x10 ²	1,66x10 ⁵ (2/6)	1,28x10 ⁴ - 9,86x10 ⁵	1,36 x10 ⁴ (6/6)	9,36x10 ³ – 1,70x10 ⁴
Ponto 4 ^d	1,35x10 ² (2/6)	1,08x10 ¹ - 7,97x10 ²	7,75x10 ⁴ (2/6)	2,47x10 ³ - 4,63x10 ⁵	1,48 x10 ⁴ (6/6)	1,30x10 ³ – 3,18x10 ⁴
Ponto 5 ^e	1,46x10 ² (1/6)	0 - 8,73x10 ²	2,14x10 ⁴ (3/6)	2,24x10 ³ - 1,21x10 ⁵	1,30x10 ⁴ (6/6)	6,89x10 ³ – 2,73x10 ⁴
Ponto 6 ^f	1,25x10 ² (2/6)	2,07x10 ¹ - 7,32x10 ²	5,38x10 ⁵ (2/6)	4,10x10 ³ - 1,66x10 ⁵	1,60 x10 ⁴ (6/6)	6,11x10 ³ – 3,55x10 ⁴
TOTAL^g	11/36		15/36		36/36	

^a Água de descendentação de suínos em granja da EMBRAPA

^b Água pós-tratada para consumo humano

^c Água de descendentação de suíno em granja de médio porte

^d Água do Rio Pinhal

^e Água de poço artesiano

^f Água do Rio Jacutinga

^g Total de amostras positivas

^h Média aritmética dos valores detectados nas seis coletas

ⁱ Intervalo dos valores detectados (menor – maior)

Entre parênteses após as médias, o número de amostras positivas do total de seis coletas.

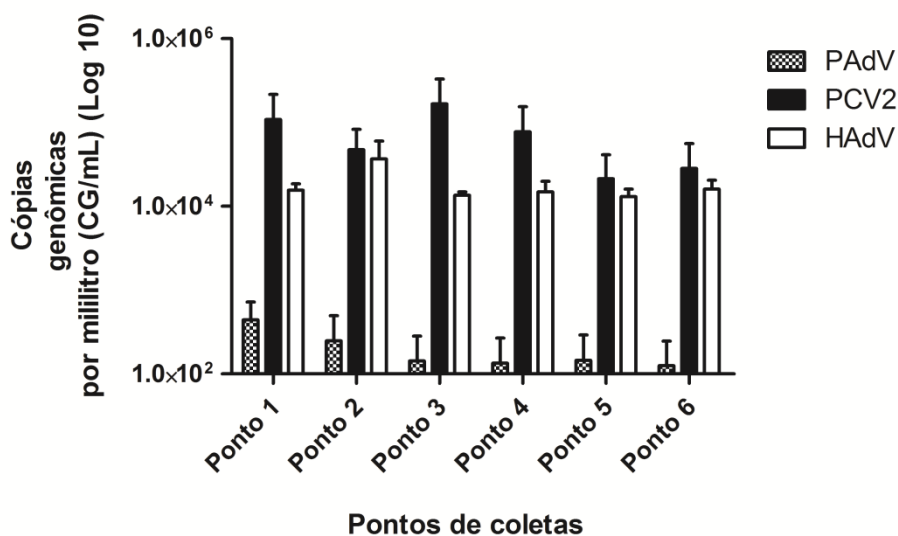


Figura 2. Média de cópias genômicas por mililitro (cg/mL) por ponto de coleta referente aos seis meses amostrados para PAdV (barras quadriculadas), PCV2 (barras pretas) e HAdV (barras brancas). Ponto 1: água de descendação de suínos em granja da EMBRAPA; Ponto 2: água pós-tratada para consumo humano; Ponto 3: água de descendação de suíno em granja de médio porte; Ponto 4: água do Rio Pinhal; Ponto 5: água de poço artesiano; Ponto 6: água do Rio Jacutinga

Os resultados obtidos para PAdV corroboram com os de Hundesa et al. (2006), que pesquisaram a presença desse vírus em amostras de dejetos suínos e água de rio, encontrando 100% e 77% de positividade para PAdV, respectivamente. Em 2009, Hundesa et al. encontraram aproximadamente 9×10^1 cg/L em amostras de água de rio. Por não causar doenças conhecidas e ser prevalente, o PAdV também se mostra um bom modelo para indicar contaminação da água por dejetos suínos.

Para o adenovírus humano, 100% das amostras foram positivas, com quantidades médias de $1,83 \times 10^4$ cg/mL de água. O ponto 2 foi o que apresentou uma maior média, além de ter apresentado o maior valor de cópias genômicas detectado, chegando até $1,53 \times 10^5$ cg/mL. É possível notar que em nenhuma amostra analisada para HAdV a quantificação foi menor do que 10^3 cg/mL. Das 36 amostras testadas, todas foram negativas para norovírus humano, tanto para GI como para GII.

A ausência de norovírus humano nas amostras de água era esperada para as amostras de águas tratadas (pontos 1 e 2), visto que esses vírus são de genoma RNA simples fita e mais susceptíveis aos métodos tradicionais de tratamento de água por

cloração. Entretanto, esse resultado não era esperado para os pontos 3 e 5 (poços artesianos) e 4 e 6 (rios), uma vez que estudos anteriores detectaram a presença de NoV GI e GII em água subterrâneas (HILL et al., 2010), em amostras de afluentes e efluentes de estação de tratamento de esgoto humano (LA ROSA et al., 2010) e em água de rios (LODDER e DE RODA HUSMAN, 2005). Talvez a quantidade de água coletada (2L) não tenha sido suficiente para a detecção desse vírus e seja necessária a coleta de maiores volumes de água para realizar a pesquisa de norovírus. Além disso, alguns métodos moleculares de detecção podem apresentar melhores resultados em relação a outros, sendo menos susceptíveis à ação dos inibidores presentes nas amostras ou apresentando uma maior especificidade na detecção do genogrupo GI ou GII ou a ambos por meio da utilização de sondas e iniciadores que apresentem maior sensibilidade na detecção (RUTJES et al., 2006; LAMHOUEB et al., 2008). Outro fator que pode influenciar a detecção por qPCR de NoV é o processo de RT-PCR. Qualquer erro na realização desse procedimento pode gerar um resultado falso-negativo.

Em diversos países existe o relato de uma grande contaminação de HAdV em águas de rios. Os resultados obtidos no presente trabalho para esse vírus são semelhantes a outros já relatados. No Japão, Haramoto et al. (2010) encontraram adenovírus por qPCR em 61% das amostras de água de rios, em quantidade média de 10^4 cg/L. Em rios e esgotos da Espanha, foram detectados também HAdV em quantidades médias de 10^2 e 10^3 cg/L, respectivamente (HUNDESA et al., 2009). Outro trabalho detectou grandes quantidades (aproximadamente 10^7 cg/mL) de adenovírus humano em amostras de afluentes e efluentes em uma estação de tratamento de esgoto (LA ROSA et al., 2010). Os efluentes das estações de tratamento de esgoto são comumente despejados no ambiente, podendo chegar aos corpos d'água, que posteriormente serão usados como fonte de abastecimento para a

população, podendo representar um risco para as pessoas que fazem uso dessa água (ALBINANA-GIMENEZ et al., 2009).

Em um estudo de fontes de água de consumo na África, Verheyen et al. (2009) detectou HAdV em 14% das amostras coletadas em águas de poços artesianos. A presença de adenovírus humano em águas subterrâneas pode ser explicada pela planta de construção e posterior manutenção dos poços, onde pode ocorrer contaminação devido à migração de vírus para o subsolo, por meio de chuvas e rios contaminados e descarte ou armazenamento inadequado de resíduos nesses locais, com posterior contaminação da água subterrânea (EPA, 2002; VERHEYEN et al., 2009).

A Figura 3 mostra o número de cópias genômicas detectadas em cada ponto durante os meses de coleta para PAdV, PCV2 e HAdV. Nota-se que somente em outubro de 2010, foram detectados genomas de PCV2 em todos os pontos e também maior quantidade de cg/mL. PAdV, por sua vez, foi detectado em cinco pontos e em maior quantidade na coleta 5 (dezembro de 2010), sendo esta mesma coleta a única na qual foi detectado PAdV na água de poço artesiano da escola (ponto 5). Pode-se observar que em agosto de 2010 não foi detectado PCV2 em nenhuma coleta. PAdV foi ausente na coleta do mês de outubro de 2010. Apenas uma amostra (ponto 2, em dezembro de 2010) durante os seis meses de coleta apresentou positividade para ambos os vírus suínos. O HAdV não apresentou grande variação no período estudado.

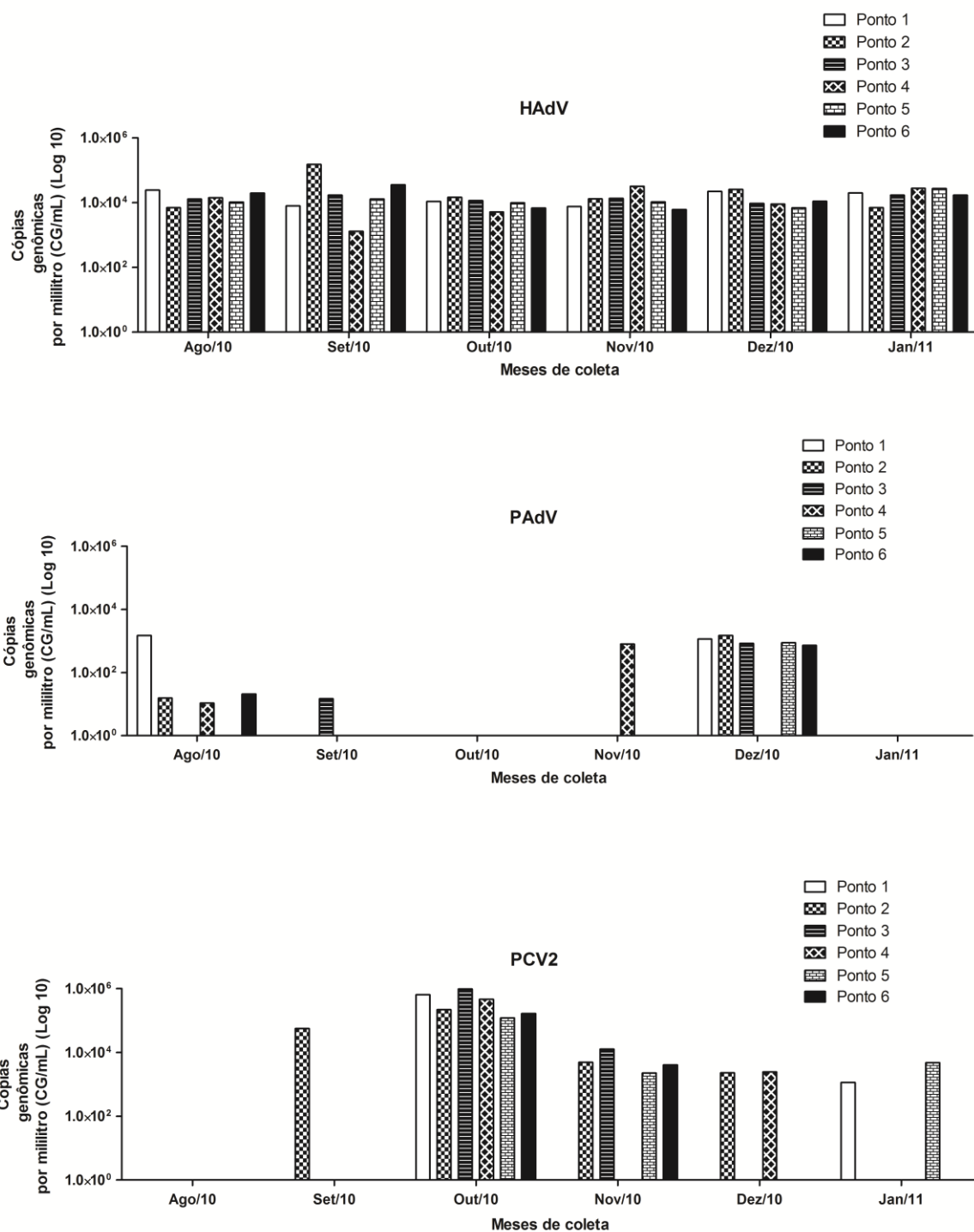


Figura 3. Número de cópias genômicas por mililitro (cg/mL) de HAdV, PAdV e PCV2 detectados nos ensaios de qPCR em amostras de água coletadas em diferentes pontos no período de agosto de 2010 a janeiro de 2011. Ponto 1: água de descendação de suínos em granja da EMBRAPA; Ponto 2: água pós-tratada para consumo humano; Ponto 3: água de descendação de suíno em granja de médio porte; Ponto 4: água do Rio Pinhal; Ponto 5: água de poço artesiano; Ponto 6: água do Rio Jacutinga

A coleta realizada em dezembro de 2010 foi precedida de fortes chuvas nos dois dias anteriores (18 e 52mm, respectivamente) (EMBRAPA, 2011), o que pode explicar a detecção em cinco pontos e em maior quantidade para PAdV, além da única detecção desse vírus no ponto 5. A relação entre a presença de vírus em amostras ambientais e os níveis de precipitação foram relatados por Maalouf et al. (2010) e pela CETESB (2011), nos quais se observou maior incidência de amostras positivas quando houve maiores níveis de precipitação. Contudo, essa explicação não se pode aplicar aos dados de PCV2, que foi detectado em todos os pontos e em maior quantidade em outubro de 2010, período que não ocorreu chuva nos dias precedentes à coleta. Além disso, pode-se inferir que não há relação entre a detecção de PAdV e de PCV2, uma vez que apenas em uma amostra foi detectado ambos os vírus.

Embora os resultados apresentados sejam positivos para PAdV, PCV2 e HAdV, é necessário enfatizar que o método de qPCR utilizado apenas quantifica a presença de material genômico dos vírus, mas não analisa a viabilidade ou infectividade dos mesmos. Assim, mesmo com a detecção de material genético viral, não é possível inferir e afirmar que há virions capazes de infectar células nessas águas.

Dessa forma, após a quantificação, todas as amostras positivas para HAdV foram submetidas ao teste de citotoxicidade e posterior viabilidade por ensaio de placa de lise. Primeiramente averiguou-se, por meio do ensaio descrito no item 3.5.4, qual a diluição mínima para que as amostras de água não fossem citotóxicas às células em cultivo celular. Foram utilizadas para a sequência dos ensaios amostras diluídas 1:2 em DMEM com alto teor de glicose sem suplementação com SFB.

O ensaio de viabilidade por placa de lise para HAdV apresentou positividade em 13 das 36 amostras coletadas (36%), tal como exemplificado na Figura 4. O número de unidades formadoras de placas por litro (UFP/L) das amostras positivas, bem como a média em cada ponto e em cada mês está mostrado na Tabela 2. Em setembro de 2010 foi a coleta em que mais se detectou partículas virais viáveis, verificados por

maior número de UFP/L. Os pontos 1, 4 e 6 foram os que apresentaram maior frequência de partículas virais viáveis, sendo desses, o do Rio Pinhal (ponto 4) aquele em que se observou a maior quantidade. Ainda na Tabela 2, percebe-se que o ponto 5 não apresentou partículas virais viáveis em nenhuma das coletas.

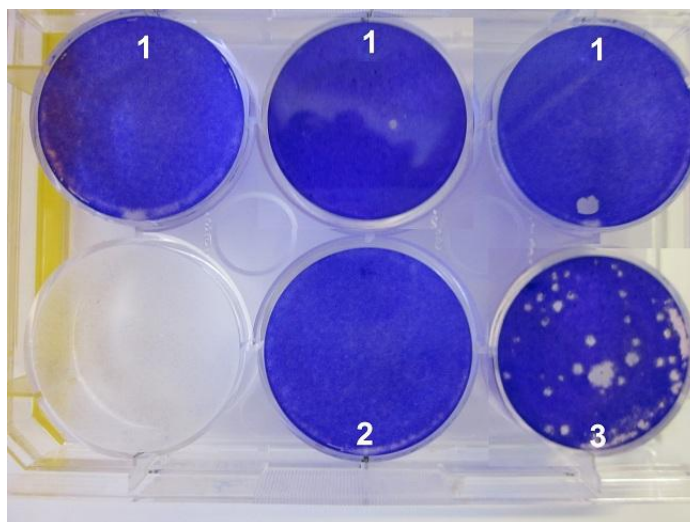


Figura 4. Foto de uma placa que apresentou positividade na avaliação da viabilidade por placa de lise para HAdV. 1: amostra de água; 2: controle celular; 3: controle positivo

Tabela 2. Determinação da viabilidade de HAdV em amostras de águas coletadas em diferentes pontos em Concórdia, SC, no período de agosto de 2010 a janeiro de 2011, através de ensaios de placa de lise (UFP/L).

Pontos de Coleta	(UFP/L)					
	Ago/10	Set/10	Out/10	Nov/10	Dez/10	Jan/11
Ponto 1 ^a	0	22	9	0	4	0
Ponto 2 ^b	0	36	0	4	0	0
Ponto 3 ^c	58	0	9	0	0	0
Ponto 4 ^d	9	27	0	0	22	0
Ponto 5 ^e	0	0	0	0	0	0
Ponto 6 ^f	0	4	31	4	0	0

^a Água de descendentação de suínos em granja da EMBRAPA

^b Água pós-tratada para consumo humano

^c Água de descendentação de suíno em granja de médio porte

^d Água do Rio Pinhal

^e Água de poço artesiano

^f Água do Rio Jacutinga

Os resultados apresentados nesse trabalho mostram que há vírus viáveis em 36% das amostras testadas. Como a amplificação gênica utilizou iniciadores que amplificam uma região conservada de todos os adenovírus humanos, e a técnica de placas de lise

só verifica a presença de adenovírus respiratórios e não de adenovírus entéricos (sorotipos 40 e 41), não foi possível concluir se havia um número maior de amostras positivas no qPCR que poderiam estar contaminadas com adenovírus entéricos (CROMEANS et al., 2008).

Já a Figura 5 relaciona o número médio de cópias genômicas com o número de UFP/L de todos os pontos para HAdV em cada mês de coleta. Nota-se que nos três primeiros meses de coleta foram observados os maiores números de partículas virais viáveis, enquanto que no mês de janeiro de 2011 (último mês de coleta) nenhum resultado positivo foi observado. Observa-se que na coleta de setembro de 2010 há um pequeno aumento tanto para o número de cg/mL detectadas, quanto para o número de UFP/L.

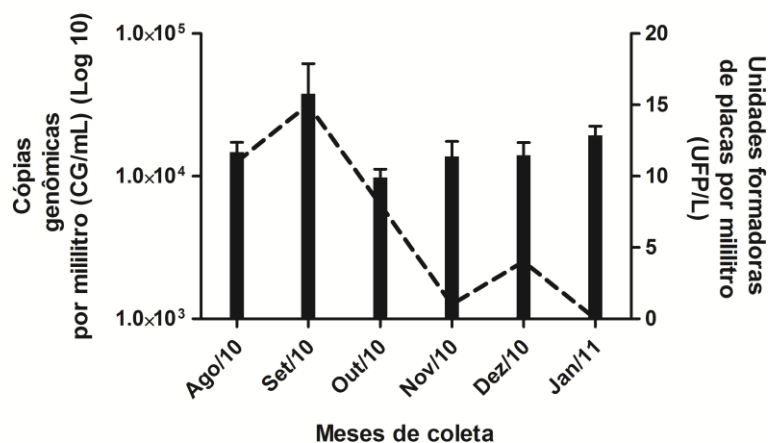


Figura 5. Média de cópias genômicas (barras pretas) e de UFP/L (linha tracejada) de todos os pontos para HAdV em cada mês de coleta, no período de agosto de 2010 a janeiro de 2011, detectados nos ensaios de placa de lise

A presença de um número superior de adenovírus viáveis nos três primeiros meses de coleta pode estar relacionada à menor temperatura nessa época do ano, o que torna a água mais fria, preservando a integridade e potencial infectividade do vírus. Nos períodos mais quentes, houve um visível decaimento na viabilidade viral nas amostras de água, sendo que em janeiro de 2011 nenhuma placa de lise foi formada.

Essa relação de sobrevivência do HAdV com a temperatura foi observado por Rigotto et al. (2011) e pode estar relacionado com uma maior inativação viral por meio de radiação ultravioleta do sol (THURSTON-ENRIQUEZ et al., 2003).

Sabe-se que os vírus entéricos perdem viabilidade em água subterrâneas devido a diversos fatores, como temperatura, oxigênio dissolvido, pH, turbidez, concentração de cloreto, condutividade e presença de outros microorganismos (GORDON e TOZE, 2003). É possível que haja uma perda da viabilidade viral de HAdV na água de poço artesiano na escola (ponto 5), visto que não foram detectadas placas de lise em nenhuma coleta. Maiores informações sobre os parâmetros físico-químicos e microbiológicos dessa água poderiam ajudar a discutir com mais propriedade os resultados.

A detecção de HAdV nas amostras de água de consumo humano tratada é preocupante e já foi relatada em outros estudos (VAN HEERDEN et al., 2003; VAN HEERDEN et al., 2005). Apesar da cloração realizada nas estações de tratamento de água ser um fator capaz de inativar o HAdV (PAGE et al., 2009; KAHLER et al., 2010), o vírus ainda está presente e viável na água tratada (ponto 2). Pode-se inferir que o tempo de cloração ou concentração de cloro para desinfecção da água não foi suficiente, não sendo efetivo para inativação dos vírus, ou há contaminação no próprio sistema de tratamento ou na distribuição dessa água à população, uma vez que algumas amostras de água do ponto de captação apresentaram quantidade menor de cópias genômicas do que a água tratada.

Como decorrência do presente estudo, é necessário incrementar meios de descarte apropriado dos dejetos suínos, que não tenha contato direto com os rios, evitando a contaminação das águas superficiais e subterrâneas, potenciais vias transmissoras de doenças. Além disso, se torna evidente a necessidade de técnicas mais eficazes para eliminação de vírus em esgotos e águas de consumo humano, juntamente com a inclusão dos parâmetros virológicos para atestar a qualidade da água.

5. Conclusão

- A presença do material genômico de PAdV e PCV2 em todos os pontos de coleta indica um possível contato dos dejetos suínos com águas de mananciais, necessitando de um maior cuidado no tratamento e na disposição desses dejetos nas granjas, pois águas de superfícies e subterrâneas estão sendo contaminadas;
- O genoma de NoV não foi detectado em nenhuma amostra analisada;
- Para HAdV, em todas as amostras foi detectado seu genoma viral e em grandes quantidades indicando que há contaminação dos mananciais e da água de consumo pelos dejetos domésticos;
- Os ensaios de placas de lise mostraram que há adenovírus humanos viáveis nas amostras estudadas, inclusive em águas tratadas, o que sugere a ineficiência no tratamento da água de consumo para esse vírus;
- A contaminação de rios e águas de consumo humano por adenovírus humanos é preocupante, tornando urgente a implementação de métodos mais eficientes na remoção de vírus no tratamento de esgotos e de água de abastecimento.

6. Referências Bibliográficas

ABES - Associação Brasileira de Engenharia Sanitária. Subsídios para a legislação nacional de água para consumo humano. ano 1, v. 1, n.1. 2010.

ALBINANA-GIMENEZ, N.; CLEMENTE-CASARES, P.; CAGUA, B.; HUGUET, J. M.; COURTOIS, S. e GIRONES, R. Comparison of methods for concentrating human adenoviruses, polyomavirus JC and noroviruses in source waters and drinking water using quantitative PCR. Journal of Virological Methods, v.158, n.1-2, p.104-109. 2009.

ALLAN, G. M. e ELLIS, J. A. Porcine circoviruses: a review. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation, v.12, n.1, p.3-14. 2000.

ALLAN, G. M.; PHENIX, K. V.; TODD, D. e MCNULTY, M. S. Some biological and physico-chemical properties of porcine circovirus. Journal of Veterinary Medicine, Series B, v.41, n.1-10, p.17-26. 1994.

ALLARD, A.; ALBINSSON, B. e WADELL, G. Rapid typing of human adenoviruses by a general PCR combined with restriction endonuclease analysis. Journal of Clinical Microbiology, v.39, n.2, p.498-505. 2001.

ASHBOLT, N. J. Microbial contamination of drinking water and disease outcomes in developing regions. Toxicology, v.198, n.1-3, p.229-238. 2004.

AVELLON, A.; PEREZ, P.; AGUILAR, J. C.; DE LEJARAZU, R. O. e ECHEVARRIA, J. E. Rapid and sensitive diagnosis of human adenovirus infections by a generic polymerase chain reaction. Journal of Virological Methods, v.92, n.2, p.113-120. 2001.

BOSCH, A.; GUIX, S.; SANO, D. e PINTO, R. M. New tools for the study and direct surveillance of viral pathogens in water. Current Opinion in Biotechnology, v.19, n.3, p.295-301. 2008.

CASAN - Companhia Catarinense de Águas e Saneamento. Disponível em: <<http://www.casan.com.br>>. Acesso em 13 de junho de 2011.

CHAE, C. A review of porcine circovirus 2-associated syndromes and diseases. Veterinary Journal, v.169, n.3, p.326-336. 2005.

CRABTREE, K. D.; GERBA, C. P.; ROSE, J. B. e HAAS, C. N. Waterborne adenovirus: A risk assessment. Water Science and Technology, v.35, n.11-12, p.1-6. 1997.

CROMEANS, T. L.; LU, X. Y.; ERDMAN, D. D.; HUMPHREY, C. D. e HILL, V. R. Development of plaque assays for adenoviruses 40 and 41. Journal of Virological Methods, v.151, n.1, p.140-145. 2008.

DE MOTES, C. M.; CLEMENTE-CASARES, P.; HUNDESA, A.; MARTIN, M. e GIRONES, R. Detection of bovine and porcine adenoviruses for tracing the source of fecal contamination. Applied and Environmental Microbiology, v.70, n.3, p.1448-1454. 2004.

EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Disponível em: <<https://www.cnpsa.embrapa.br/macuco/meteor/phpmet.php>>

ENRIQUEZ, C. E.; HURST, C. J. e GERBA, C. P. Survival of the enteric adenovirus-40 and adenovirus-41 in tap, sea and waste-water. Water Research, v.29, n.11, p.2548-2553. 1995.

FERNANDEZ, C.; ALONSO, C.; BABIN, M. M.; PRO, J.; CARBONELL, G. e TARAZONA, J. V. Ecotoxicological assessment of doxycycline in aged pig manure using multispecies soil systems. Science of the Total Environment, v.323, n.1-3, p.63-69. 2004.

FIGUERAS, M. J. e BORREGO, J. J. New perspectives in monitoring drinking water microbial quality. International Journal of Environmental Research and Public Health, v.7, n.12, p.4179-4202. 2010.

GENTRY, J.; VINJÉ, J. e LIPP, E. K. A rapid and efficient method for quantitation of genogroups I and II norovirus from oysters and application in other complex environmental samples. Journal of Virological Methods, v.156, n.1-2, p.59-65. 2009.

GERBA, C. P.; GRAMOS, D. M. e NWACHUKU, N. Comparative inactivation of enteroviruses and adenovirus 2 by UV light. Applied and Environmental Microbiology, v.68, n.10, p.5167-5169. 2002.

GORDON, C. e TOZE, S. Influence of groundwater characteristics on the survival of enteric viruses. Journal of Applied Microbiology, v.95, n.3, p.536-544. 2003.

HARAMOTO, E.; KITAJIMA, M.; KATAYAMA, H. e OHGAKI, S. Real-time PCR detection of adenoviruses, polyomaviruses, and torque teno viruses in river water in Japan. Water Research, v.44, n.6, p.1747-1752. 2010.

HERNROTH, B. E.; CONDÉN-HANSSON, A. C.; REHNSTAM-HOLM, A. S.; GIRONES, R. e ALLARD, A. K. Environmental factors influencing human viral pathogens and their potential indicator organisms in the blue mussel, *Mytilus edulis*: the first Scandinavian report. Appl Environ Microbiol, v.68, n.9, p.4523-33. 2002.

HERZOG, P.; DROSTEN, C. e MULLER, M. A. Plaque assay for human coronavirus NL63 using human colon carcinoma cells. Virology Journal, v.5, 2008.

HILL, V. R.; MULL, B.; JOTHIKUMAR, N.; FERDINAND, K. e VINJE, J. Detection of GI and GII noroviruses in ground water using ultrafiltration and TaqMan real-time RT-PCR. Food and Environmental Virology, v.2, n.4, p.218-224. 2010.

HUNDESA, A.; DE MOTES, C. M.; ALBINANA-GIMENEZ, N.; RODRIGUEZ-MANZANO, J.; BOFILL-MAS, S.; SUNEN, E. e GIRONES, R. R. Development of a qPCR assay for the quantification of porcine adenoviruses as an MST tool for swine fecal contamination in the environment. Journal of Virological Methods, v.158, n.1-2, p.130-135. 2009.

HUNDESA, A.; DE MOTES, C. M.; BOFILL-MAS, S.; ALBINANA-GIMENEZ, N. e GIRONES, R. Identification of human and animal adenoviruses and polyomaviruses for determination of sources of fecal contamination in the environment. Applied and Environmental Microbiology, v.72, n.12, p.7886-7893. 2006.

KAGEYAMA, T.; KOJIMA, S.; SHINOHARA, M.; UCHIDA, K.; FUKUSHI, S.; HOSHINO, F. B.; TAKEDA, N. e KATAYAMA, K. Broadly reactive and highly sensitive assay for Norwalk-like viruses based on real-time quantitative reverse transcription-PCR. Journal of Clinical Microbiology, v.41, n.4, p.1548-1557. 2003.

KAHLER, A. M.; CROMEANS, T. L.; ROBERTS, J. M. e HILL, V. R. Effects of Source Water Quality on Chlorine Inactivation of Adenovirus, Coxsackievirus, Echovirus, and Murine Norovirus. Applied and Environmental Microbiology, v.76, n.15, p.5159-5164. 2010.

KATAYAMA, H.; SHIMASAKI, A. e OHGAKI, S. Development of a virus concentration method and its application to detection of enterovirus and Norwalk virus from coastal seawater. Applied and Environmental Microbiology, v.68, n.3, p.1033-1039. 2002.

KOCWA-HALUCH, R. Waterborne enteroviruses as a hazard for human health. Polish Journal of Environmental Studies, v.10, n.6, p.485-487. 2001.

LA ROSA, G.; POURSHABAN, M.; IACONELLI, M. e MUSCILLO, M. Quantitative real-time PCR of enteric viruses in influent and effluent samples from wastewater treatment plants in Italy. Annali Dell Istituto Superiore Di Sanita, v.46, n.3, p.266-273. 2010.

LAMHOUEB, S.; FLISS, I.; NGAZOA, S. E. e JEAN, J. Evaluation of the persistence of infectious human noroviruses on food surfaces by using real-time nucleic acid sequence-based amplification. Applied and Environmental Microbiology, v.74, n.11, p.3349-3355. 2008.

LECLERC, H.; SCHWARTZBROD, L. e DEI-CAS, E. Microbial agents associated with waterborne diseases. Critical Reviews in Microbiology, v.28, n.4, p.371-409. 2002.

LODDER, W. J. e DE RODA HUSMAN, A. M. Presence of noroviruses and other enteric viruses in sewage and surface waters in The Netherlands. Applied and Environmental Microbiology, v.71, n.3, p.1453-1461. 2005.

LODDER, W. J.; VAN DEN BERG, H.; RUTJES, S. A. e HUSMAN, A. M. D. Presence of enteric viruses in source waters for drinking water production in the Netherlands. Applied and Environmental Microbiology, v.76, n.17, p.5965-5971. 2010.

MAALOUF, H.; POMMEPUY, M. e LE GUYADER, F. S. Environmental conditions leading to shellfish contamination and related outbreaks. Food and Environmental Virology, v.2, n.3, p.136-145. 2010.

OPRIESSNIG, T.; YU, S.; GALLUP, J. M.; EVANS, R. B.; FENAUX, M.; PALLARES, F.; THACKER, E. L.; BROCKUS, C. W.; ACKERMAN, M. R.; THOMAS, P.; MENG, X. J. e HALBUR, P. G. Effect of vaccination with selective bacterins on conventional pigs infected with type 2 porcine circovirus. Veterinary Pathology, v.40, n.5, p.521-529. 2003.

PAGE, M. A.; SHISLER, J. L. e MARINAS, B. J. Kinetics of adenovirus type 2 inactivation with free chlorine. Water Research, v.43, n.11, p.2916-2926. 2009.

PUIG, M.; JOFRE, J.; LUCENA, F.; ALLARD, A.; WADELL, G. e GIRONES, R. Detection of adenoviruses and enteroviruses in polluted waters by nested PCR amplification. Applied and Environmental Microbiology, v.60, n.8, p.2963-2970. 1994.

RIGOTTO, C.; HANLEY, K.; ROCHELLE, P. A.; DE LEON, R.; BARARDI, C. R. M. e YATES, M. V. Survival of adenovirus types 2 and 41 in surface and ground waters measured by a plaque assay. Environmental Science & Technology, v.45, n.9, p.4145-4150. 2011.

RUSIN, P.; ENRIQUEZ, C. E.; JOHNSON, D.; GERBA, C. P. Environmentally Transmitted pathogens. In: MAIER, R. M.; PEPPER, I. L.; GERBA, C. P. Environmental Microbiology. San Diego: Academic Press, p.447-485. 2000.

RUTJES, S. A.; VAN DEN BERG, H.; LODDER, W. J. e HUSMAN, A. M. D. Real-time detection of noroviruses in surface water by use of a broadly reactive nucleic acid sequence-based amplification assay. Applied and Environmental Microbiology, v.72, n.8, p.5349-5358. 2006.

SCHLINDWEIN, A. D.; RIGOTTO, C.; SIMOES, C. M. O. e BARARDI, C. R. M. Detection of enteric viruses in sewage sludge and treated wastewater effluent. Water Science and Technology, v.61, n.2, p.537-544. 2010.

SCHMITT, H.; HAAPAKANGAS, H. e VAN BEELEN, P. Effects of antibiotics on soil microorganisms: time and nutrients influence pollution-induced community tolerance. Soil Biology & Biochemistry, v.37, n.10, p.1882-1892. 2005.

SEGALES, J. e DOMINGO, M. Postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in pigs. A review. Veterinary Quarterly, v.24, n.3, p.109-124. 2002.

THURSTON-ENRIQUEZ, J. A.; HAAS, C. N.; JACANGELO, J. e GERBA, C. P. Chlorine inactivation of adenovirus type 40 and feline calicivirus. Applied and Environmental Microbiology, v.69, n.7, p.3979-3985. 2003.

THURSTON-ENRIQUEZ, J. A.; HAAS, C. N.; JACANGELO, J.; RILEY, K. e GERBA, C. P. Inactivation of feline calicivirus and adenovirus type 40 by UV radiation. Applied and Environmental Microbiology, v.69, n.1, p.577-582. 2003.

TREE, J. A.; ADAMS, M. R. e LEES, D. N. Chlorination of indicator bacteria and viruses in primary sewage effluent. Applied and Environmental Microbiology, v.69, n.4, p.2038-2043. 2003.

VAN HEERDEN, J.; EHLERS, M. M.; HEIM, A. e GRABOW, W. O. K. Prevalence, quantification and typing of adenoviruses detected in river and treated drinking water in South Africa. Journal of Applied Microbiology, v.99, n.2, p.234-242. 2005.

VAN HEERDEN, J.; EHLERS, M. M.; VAN ZYL, W. B. e GRABOW, W. O. K. Incidence of adenoviruses in raw and treated water. Water Research, v.37, n.15, p.3704-3708. 2003.

VERHEYEN, J.; TIMMEN-WEGO, M.; LAUDIEN, R.; BOUSSAAD, I.; SEN, S.; KOC, A.; UESBECK, A.; MAZOU, F. e PFISTER, H. Detection of adenoviruses and rotaviruses in drinking water sources used in rural areas of Benin, West Africa. Applied and Environmental Microbiology, v.75, n.9, p.2798-2801. 2009.

YEH, H. Y.; YATES, M. V.; CHEN, W. e MULCHANDANI, A. Real-time molecular methods to detect infectious viruses. Seminars in Cell & Developmental Biology, v.20, n.1, p.49-54. 2009.

ZANELLA, J. R. C. Circoviridae. In: Eduardo Furtado Flores. (Org.). Virologia Veterinária. 1ed. Santa Maria: Editora da UFSM, v. 1, p.363-374. 2007.

ZANELLA, J. R. C. e MORES, N. Diagnostic of Post-Weaning Multisystemic Wasting Syndrome (PMWS) in Swine in Brazil caused by porcine Circovirus type 2 (PCV2). Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia. v.55, n.2, p.522-527. 2003.