

Gislaine Fongaro

**ESTUDO DA INCIDÊNCIA DE VÍRUS HUMANOS DE  
VEICULAÇÃO HÍDRICA EM ÁGUAS DE MANANCIAIS**

Dissertação apresentada ao  
Programa de Pós Graduação em  
Biotecnologia e Biociências da  
Universidade Federal de Santa  
Catarina para a obtenção do Grau de  
Mestre em Biotecnologia e  
Biociências. Orientadora: Prof. Dr.<sup>a</sup>.  
Célia Regina Monte Barardi

Florianópolis  
2012

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,  
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Fongaro, Gislaine Fongaro  
Estudo da incidência de vírus humanos de veiculação  
hídrica em águas de mananciais superficiais [dissertação] /  
Gislaine Fongaro Fongaro ; orientadora, Célia Regina Monte  
Barardi Barardi - Florianópolis, SC, 2012.  
139 p. ; 21cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa  
Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-  
Graduação em Biotecnologia e Biociências.

Inclui referências

1. Biotecnologia e Biociências. 2. Vírus humanos de  
veiculação hídrica. 3. Integridade e infecciosidade de HAdV.  
4. ICC-et-RT-qPCR. I. Barardi, Célia Regina Monte Barardi.  
II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-  
Graduação em Biotecnologia e Biociências. III. Título.

**“Estudo da incidência de vírus humanos  
de veiculação hídrica em águas de  
mananciais”**

por

**Gislaine Fongaro**

Dissertação julgada e aprovada em sua  
forma final pelos membros titulares da  
Banca Examinadora (Port.  
14/PPGBTC/2012) do Programa de Pós-  
Graduação em Bioquímica - UFSC,  
composta pelos Professores Doutores:

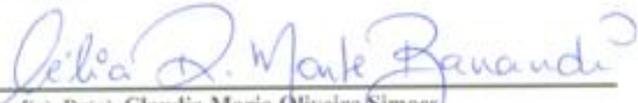
Banca Examinadora:

  
\_\_\_\_\_  
Prof(a) Dr(a) Célia Regina Monte Barardi (MIB/CCE/UFSC)

  
\_\_\_\_\_  
Prof(a) Dr(a) Caroline Rigotto Borges (Biotecnologia/FEEVALE/Novo  
Hamburgo)

  
\_\_\_\_\_  
Prof(a) Dr(a) Mauricio Mello Petrucio (ECZ/CCE/UFSC)

  
\_\_\_\_\_  
Prof(a) Dr(a) Paulo Augusto Esteves (Empresa Brasileira de Pesquisa  
Agropecuária)

  
\_\_\_\_\_  
Prof(a) Dr(a) Claudia Maria Oliveira Simoes  
p/ Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e  
Bióciências.

Florianópolis, 01 de Novembro de 2012.



*Dedico com todo meu amor à minha família:  
Cristel, Marlens, Trisecila, Mateus e Jamir.*



## AGRADECIMENTOS

É muito bom poder agradecer, pois percebo o quanto fui auxiliada, amada, respeitada e compreendida durante este período tão importante da minha vida.

Início agradecendo **a força celestial**, ao pai, que chamo de “DEUS” e a todos os bons espíritos de luz, que abrem portas, me dão respostas, equilíbrio, confiança e que principalmente colocam pessoas, atitudes e palavras em minha frente.

Meus agradecimentos especiais são para:

**Minha família:** meus queridos pais, obrigada pela educação, confiança, presença, pelo amor e por todos os momentos; à minha irmã e amiga Priscila, e, ao meu querido cunhado, obrigada por vocês confiarem em mim, me apoiarem, sou grata ao suporte e companheirismo; ao meu irmão Mateus, meu “maninho”, pela alegria e até pela safadeza; Ao meu companheiro, amigo e amado Jamir, obrigada por todos os nossos momentos, por saber que posso contar contigo, obrigada por estar ao meu lado me ajudando e apoiando em minhas decisões.

**“Irmãos da vida”:** João Batista, Alexandre Tessman, Jane Peixoto, Jorge Petrolli, André Schinor (*in memoria*), Paulo Esteves, Edimara Peri, Daniela Pacheco, José Rodrigo, Mariana Nascimento, Annelise de Carvalho, Aline Viancelli, Gilian Fernando, Larissa Brustlin. Obrigada pelo companheirismo, carinho, conselhos ímpares (...) sei que vocês estão sempre aí e é só chama-los que me atendem, obrigada de coração, vocês ocupam lugar muito especial na minha vida.

**Família LVA (2011-2012):** Aline, Annelise, Ariadne, Caroline, Carlos, Clarissa, Dóris, Fabiana, Francieli, Izabela, Jadel, Lucas Garcia, Lucas Maróstica, Mariana Nascimento, Mariana Pilotto, Marina, Naira, Ricardo, Vanessa, Thiago e as professoras Claudia e Célia, para vocês dedico meu agradecimento especial. Primeiramente agradeço a todos pela receptividade, agradeço aos que me “deram aquela mão”, que estiveram muito perto de mim, da minha vida e do meu trabalho, que me aconselharam e me entenderam, aos que em mim confiaram seu tempo me ensinando muito, agradeço a todos vocês! Em especial, agradeço a Mariana Nascimento, pois trabalhando ao seu lado descobri uma pessoa maravilhosa, trabalhadora, justa, empenhada, que me ajudou e ajuda muito

(sem você certamente teria sido tudo mais difícil). Enfim, minha querida família LVA, serei eternamente grata aos ensinamentos, momentos e carinho. Tenham a certeza que de cada um de vocês eu levo algo para a vida inteira.

**Colegas de corredor:** Ninna, Maicon, Elisa, Patrícia e Débora pelas inúmeras conversas e trocas de ideias, risos, conselhos e principalmente pelo carinho.

**Meus pais e mães na ciência e na vida, meus professores e orientadores (ex e atuais),** dentre eles o Dr. Paulo A. Esteves, a Dra. Jane Peixoto, Dr. João Batista Ribeiro, Prof. MsC. Cláudia Moro e a Dra. Mônica Ledur (agora na posição de ex-orientadores), que me ensinaram a pensar e não só a executar, que me orientaram para a vida, agradeço vocês por confiaram em mim, por abrirem portas e principalmente por me acolher, respeitando dúvidas, angústias e dificuldades. Agradeço, especialmente a minha orientadora atual Dra. Célia Regina Monte Barardi, para você dedico minha gratidão, gratidão que está nos meus olhos e que cresce a cada dia que entro por esta porta principal do MIP (pois lembro do quanto desejei estar aqui), obrigada Célia pelas oportunidades ímpares, por tornar vivo o que era sonho, obrigada pela confiança, respeito, paciência, equilíbrio, conselhos, ideias e conversas, sou grata pelo seu jeito iluminado e pacificador, por meio do qual encontramos e buscamos a harmonia, sem desapegar dos desafios e novidades. Agradeço, claro e muito, a querida Caroline Rigotto Borges (Carol nossa da cada dia): obrigada por tudo, tudo mesmo... pela amizade, pelos conselhos, pelas dicas, pelas conversas, pela alegria... estarei sempre torcendo por ti e sei que o contrário é verdadeiro... Você sabe unir perfeitamente o carisma, o profissionalismo, a amizade e o equilíbrio e por isso é essa pessoa maravilhosa.

**“Gurias”:** agradeço vocês, Débora e Vanessa, por me acolherem em vossa casa, que agora é minha também, pela convivência tão próxima que me ensinou muito; Acredito fielmente que não é por acaso que os destinos são cruzados, conosco não podia ser diferente. Sou grata pelo convívio, risos, conversas, pelo “dorme bem” sem preço, pela confiança, preocupação e ajudas. Levo um pouco de cada uma de vocês comigo. Muitíssimo abrigada

Agradeço a **Eliana de Almeida:** obrigada pelos conselhos, apoio emocional, pelas conversas, pela ajuda (em tudo, inclusive

nas coletas) e principalmente pelo carinho em mim depositado. Sou muito grata por ter me acolhido.

**Laboratórios do MIP:** obrigada por abrirem suas portas sempre que solicitado (seja para empréstimos “simples” (materiais laboratoriais) até os mais “complexos” (café)).

Agradeço **as parcerias**, pois sem elas este trabalho não teria tomado esta dimensão. Foram parceiros deste trabalho: Laboratório de Ecologia de Águas Continentais desta universidade (coordenado pelo professor Maurício Mello Petrucio, a quem agradeço e muito pela colaboração, bem como agradeço aos seus alunos que ajudaram e muitas vezes realizaram as coletas na Lagoa do Peri); Ao LAPAD, especialmente aos colaboradores nas coletas na Lagoa do Peri. Aos funcionários da Secretaria de Saúde de Florianópolis (diretamente à Eliana Almeida) por facilitar, ajudar e disponibilizar o acesso nas coletas da SAC, bem como aos dados de tal; Embrapa Suínos e Aves, por ter sido parceira e por me receberem de braços abertos durante parte das análises aqui contempladas, especialmente ao Dr. Paulo Augusto Esteves, Dra. Alessandra d’ Ávila, Doutoranda Giseli Ritterbusch, Tânia Klein e ao Alexandre Tessmann, agradeço vocês por toda paciência, dedicação e receptividade.

**Suporte financeiro** da CAPES, CNPq, UFSC e ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociência.



## RESUMO

Dentre os patógenos humanos de veiculação hídrica, destacam-se os vírus de transmissão fecal-oral, como é o caso dos adenovírus (HAdV), rotavírus-A (RVA), vírus da hepatite A (HAV) e urino-oral como o poliomavírus (JCPyV). Estes vírus estão envolvidos, principalmente em episódios de gastroenterites, podendo causar ainda infecções respiratórias, conjuntivites, meningite asséptica, encefalites e sérias complicações em pacientes imunocomprometidos, além do que, possuem a característica de serem estáveis e permanecerem longos períodos no ambiente e por isso são apontados como potenciais indicadores ambientais de contaminação por efluentes humanos. Nesse contexto, a hipótese desse estudo foi que os vírus de transmissão fecal e urinária são prevalentes nas águas de consumo humano, não possuem correlação com perfis físico-químicos e de nutrientes, além de possuírem potencial infeccioso. Assim os principais objetivos desse trabalho foram: **1)** Estudar a incidência de HAdV, JCPyV, HAV e RVA em águas de mananciais superficiais utilizadas para consumo humano; **2)** Analisar a correlação viral com parâmetros físico-químicos e de nutrientes da água; **3)** Estudar a relação da sazonalidade com a presença de contaminação viral **4)** Avaliar a integridade, infecciosidade e realizar estudos filogenéticos de HAdV nas matrizes aquáticas estudadas. Três sítios de coletas, na cidade de Florianópolis-SC, foram selecionados: Sítio 1) Lagoa do Peri (em quatro Micro-ambientes (MA): i) MA1 centro ii), MA2 local preservado, iii) MA3 local degradado e iv) MA4 local de coleta de água para consumo humano e atividades recreacionais); Sítio 2) Fonte/Nascente natural de água, utilizada para consumo humano sem tratamento prévio e Sítio 3) Solução Alternativa de Abastecimento Coletivo (SAC), água utilizada para abastecimento humano, previamente clorada. Para as análises virais, dois litros de água foram coletados mensalmente, durante um ano e processadas (método de adsorção-eluição e reconcentração em dispositivo Centriprep®). Posteriormente, o material genético foi extraído e a presença e quantificação viral determinada por qPCR. As análises físico-químicas e de nutrientes das águas

contemplaram todos os Micro-ambientes da Lagoa do Peri (físico-químicas foram realizadas *in situ*, utilizando Sonda Multiparâmetros (YSI-85) e as de nutrientes determinadas em laboratório). Os HAdVs detectados nas amostras provenientes do Micro-ambiente 4 da Lagoa do Peri, Fonte/Nascente e da SAC foram avaliados quanto a sua integridade (por meio de tratamento com enzimático com DNase), infecciosidade (por meio do ensaio de placa de lise (EPL) e por cultura celular integrada ao RT-qPCR (ICC-et-RT-qPCR), bem como submetidos a estudos filogenéticos. Das amostras analisadas 93% (67/72) foram positivas para HAdV, 45,8% (33/72) para RVA, 13,8% (10/72) para JCPyV e 12,5% (9/72) para HAV. A distribuição sazonal viral foi determinada e o HAdV mostrou-se o mais prevalente em todas as estações. Os estudos físico-químicos e de nutrientes nos MAs da Lagoa do Peri não apresentaram diferenças espaciais significativas, concluindo que a lagoa é homogênea em sua coluna d'água. Quanto a correlação viral com parâmetros físico-químicos e de nutrientes, apenas JCPyV e nitrito correlacionaram-se positivamente no MA4. A integridade e infecciosidade de HAdV foi determinada, sendo que nas amostras do MA4 da Lagoa do Peri 83% (10/12) continham partículas íntegras, 66% (8/12) infecciosas por EPL e 75% (9/12) infecciosas por ICC-et-RT-qPCR; Na Fonte/Nascente 66% (8/12) continham partículas íntegras, 33% (4/12) infecciosas por EPL e 58% (7/12) infecciosas por ICC-et-RT-qPCR; Na SAC 58% (7/12) continham partículas de HAdV íntegras, 8% (1/12) infecciosas por EPL e 25% (3/12) infecciosas por ICC-et-RT-qPCR. Os estudos filogenéticos de HAdV demonstraram que o sorotipo circulante prevalente foi o 2 (HAdV-2 respiratório). Em conclusão, estes resultados demonstraram a fragilidade do sistema de segurança sanitária, principalmente em águas de mananciais superficiais utilizadas para abastecimento e consumo da população. Frente a ampla distribuição e persistência dos vírus de veiculação hídrica, há necessidade de implementar o monitoramento e remoção viral no processo de potabilização da água, o que traria reflexos positivos na manutenção da saúde humana e ambiental.

**Palavras-chave:** Vírus humano de veiculação hídrica; Água de manancial superficial; Integridade e infecciosidade de HAdV.



## ABSTRACT

Among the water-borne human pathogens, is highlighted virus of fecal-oral transmission, as adenovirus (HAdV), Rotavirus A (RVA), hepatitis A virus (HAV) and urino-oral, as polyomavirus (JCPyV). These viruses are involved especially with gastroenteritis episodes that can cause even respiratory infections, conjunctivitis, aseptic meningitis, encephalitis, and serious complications in immunocompromised patients. Also, they can remain stable for extended periods in environment and therefore are mentioned as potential indicators of environmental contamination by human sewage. In this context, the hypothesis of this study was that the virus of fecal and urinary transmission are prevalent in waters drinking, have no correlation with seasonality profiles and physicochemical, and also remain with infectious potential. The main objectives of this study were: 1) study the incidence of HAdV, JCPyV, RVA and HAV in surface water sources used for drinking; 2) analyze the correlation between virus, physico-chemical parameters and nutrients of water; 3) study the relationship of seasonality with the presence of viral contamination; 4) evaluate the integrity, infectivity and perform phylogenetic studies of HAdV in water matrices studied. Three sampling sites in the city of Florianópolis-SC were selected: Site 1) Peri Lagoon water (in four Micro-environments (ME): i) ME1 center of lagoon, ii) ME2 preserved site, iii) ME3 degraded site and iv) ME4 site of collection for drinking water and recreational activities); Site 2) Spring/Source water used for human consumption, without prior treatment and Site 3) Public Supply System (PSS) water chlorinated used for human supply. For viral analysis, two liters of water were collected monthly, during one year, and processed (method of adsorption-elution and reconcentration in Centriprep ® device). Subsequently, the genetic material was extracted and the viral presence and quantification was determined by qPCR. The analysis physico-chemical were performed in situ using Multiparameter probe (YSI-85) and the nutrients were performed in laboratory for all Micro-environments of Peri Lagoon. The HAdVs detected in samples from all sites were evaluated for their integrity (enzymatic treatment with DNase), infectivity (by plaque assay (PA) and integrated cell culture using transcribed RNA (ICC-et-RT-qPCR)) and subjected to phylogenetic studies.

Results showed that 93% (67/72) of samples were positive for HAdV, 45.8% (33/72) for RVA, 13.8% (10/72) for JCPyV, and 12.5% (9/72) for HAV. The seasonal distribution viral showed that HAdV was the most prevalent in all seasons. Studies physico-chemical and nutrient in Peri lagoon showed that the Micro-environmentals have no significant spatial differences, concluding that the lagoon is homogeneous in its own water column. Regarding the correlation among viral parameters, physico-chemical and nutrients, just JCPyV and nitrite were correlated positively in Micro-environment 4. The integrity and HAdV infectivity was determined. In samples from the Peri Lagoon (ME4) 83% (10/12) contained particles intact and 66% (8/12) infectious by PA and 75% (9/12) infectious by ICC-et-RT-qPCR; In samples from Spring/Source 66% (8/12) contained particles intact, 33% (4/12) infectious by PA and 58% (7/12) infectious by ICC-et-RT-qPCR; In PSS 58% (7/12) contained particles undamaged of HAdV, 8% (1/12) infectious by PA and 25% (3/12) infectious by ICC-et-RT-qPCR. The phylogenetic studies showed that serotype of HAdV circulating prevalent is 2 (HAdV-2 respiratory). These results demonstrate the fragility of the system of health security, particularly in supply waters. Facing wide distribution and persistence of waterborne viruses, is necessary to implement the monitoring and viral removal in water treatment, which would have a positive impact on maintenance of human and environmental health.

Key-words: Human waterborne viruses; Surface water; Integrity and infectivity of the HAdV.

## LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1:** ESTRUTURA GERAL DOS ADENOVÍRUS, REPRESENTADO ESQUEMATICAMENTE: A) O FORMATO ICOSAÉDRICO DO CAPSÍDEO VIRAL COM SEUS *HEXONS* E *PENTONS*, B) AS FIMBRIAS E O CONTEÚDO INTERNO DO CAPSÍDEO VIRAL (GENOMA E AS PROTEÍNAS DE ACOMPANHAMENTO). FONTE: ADAPTADO DE MARTÍN (2012)..... 33
- FIGURA 2:** ESTRUTURA ESQUEMÁTICA GERAL DO POLIOMAVÍRUS HUMANO (UTILIZANDO-SE COMO MODELO O SÍMIO SV40 E O HUMANO JC): A) ESTRUTURA DA SUPERFÍCIE VIRAL COMPOSTA POR 72 CAPSÔMEROS, B) MORFOLOGIA DOS CAPSÔMEROS EM PENTÂMEROS. FONTE: ADAPTADO DE LI ET AL., (2003)..... 36
- FIGURA 3:** REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DE UMA PARTÍCULA DE ROTAVÍRUS, CONTENDO SUAS PRINCIPAIS PROTEÍNAS DAS RESPECTIVAS CAMADAS VIRAIS: VP2 (INTERNA), VP4 (EXTERNA), VP6 (INTERMEDIÁRIA) E VP7 (EXTERNA) E O MATERIAL GENÉTICO DS RNA. FONTE: ADAPTADO DE LI ET AL., (2008)..... 38
- FIGURA 4:** REPRESENTAÇÃO DE UMA PARTÍCULA DE HAV, EVIDENCIANDO A SIMETRIA DO CAPSÍDEO, O CAPSÔMERO, AS PROTEÍNAS VIRAIS E O GENOMA DE RNA SENSO POSITIVO. FONTE: ADAPTADO DE [HTTP://:WWW.LABMED.COM.BR](http://www.labmed.com.br)..... 41
- FIGURA 5:** FLUXOGRAMA MOSTRANDO O DELINEAMENTO EXPERIMENTAL BÁSICO UTILIZADO PARA A REALIZAÇÃO DESTA TRABALHO..... 47
- FIGURA 6:** SÍTIO 1 DE COLETA, NA LAGOA DO PERI, ONDE 1, 2, 3 E 4 REPRESENTAM OS MICRO-AMBIENTES (MAS) 1, 2, 3 E 4, RESPECTIVAMENTE. FONTE: ADAPTADO DE HENNEMANN & PETRUCIO (2011)..... 50
- FIGURA 7:** SÍTIO 2 DE COLETA, NA NASCENTE/FONTE. (IMAGEM FOTOGRÁFICA: MARIANA DE ALMEIDA DO NASCIMENTO).....50

<b>FIGURA 8:</b> SÍTIO 3 DE COLETA, NA SAC, SENDO AS COLETAS REALIZADAS NESTES TANQUES RESERVATÓRIOS, MOSTRANDO AS PASTILHAS DE CLORO UTILIZADAS PARA TRATAMENTO DA ÁGUA. ....	51
<b>FIGURA 9:</b> SISTEMA A VÁCUO DE FILTRAÇÃO, COM CAPACIDADE PARA 5L DE ÁGUA, UTILIZADO PARA A CONCENTRAÇÃO VIRAL; NO CANTO DIREITO INFERIOR OBSERVA-SE A MEMBRANA CARREGADA ELETRONEGATIVAMENTE, RESPONSÁVEL PELA RETENÇÃO DAS PARTÍCULAS VIRAIS.....	53
<b>FIGURA 10:</b> FLUXOGRAMA MOSTRANDO O DELINEAMENTO EXPERIMENTAL BÁSICO UTILIZADO PARA A PADRONIZAÇÃO DO ENSAIO DE ICC-ET-RT-QPCR PARA DETECÇÃO DE HADV EM ÁGUAS DE MANANCIAIS SUPERFICIAIS. ....	61
<b>FIGURA 12:</b> TAXA DE RECUPERAÇÃO VIRAL OBTIDA APÓS CONCENTRAÇÃO DE HADV-2 EM AMOSTRAS DE ÁGUA DE MANANCIAL, MENSURADA PELAS TÉCNICAS DE EPL E ICC-ET-RT-QPCR.....	68
<b>FIGURA 13:</b> RESULTADOS DA QUANTIFICAÇÃO DOS VÍRUS (MÉDIA DE CG/L) NOS MICRO-AMBIENTES 1, 2, 3 E 4 DA LAGOA DO PERI, ONDE: A) QUANTIFICAÇÃO DE HADV; B) QUANTIFICAÇÃO DE JCPYV; C) QUANTIFICAÇÃO DE RVA E C) QUANTIFICAÇÃO DE HAV.....	70
<b>FIGURA 14:</b> RESULTADOS DA QUANTIFICAÇÃO DOS VÍRUS ESTUDADOS (MÉDIA DE CG/L), NA NASCENTE/FONTE (A) E SAC (B). ....	71
<b>FIGURA 15:</b> MÉDIA GLOBAL DE HADV, JCPYV, RVA E HAV EM TODOS OS SÍTIOS DE COLETA (LAGOA DO PERI: MICRO-AMBIENTES 1, 2, 3 E 4; NASCENTE FONTE E SAC).72	72
<b>FIGURA 16:</b> DISTRIBUIÇÃO SAZONAL DE HADV, JCPYV, HAV E RVA NOS SÍTIOS DE COLETA MONITORADOS, ONDE: A) NA LAGOA DO PERI; B) NA NASCENTE/FONTE E C) NA SAC.....	74
<b>FIGURA 17:</b> CORRELAÇÃO POSITIVA ENTRE NITRITO E JCPYV NO MICRO-AMBIENTE 4 DA LAGOA DO PERI. ....	75
<b>FIGURA 19:</b> MÉDIA GERAL DE CÓPIAS GENÔMICAS DE HADV TOTAIS, QUE CORRESPONDEM ÀS AMOSTRAS NÃO	

TRATADAS COM DNASE I (BARRA PRETA), ÍNTEGROS, QUE CORRESPONDEM ÀS AMOSTRAS TRATADAS COM DNASE I (BARRA CINZA) E A REDUÇÃO LOGARÍTMICA MÉDIA EM CG/L (LOG.) APÓS O TRATAMENTO ENZIMÁTICO (BARRA BRANCA) NOS SÍTIOS DE COLETA AVALIADOS (MA4, NASCENTE/FONTE E SAC)..... 77

**FIGURA 20:** MÉDIA DE HADV INFECCIOSOS PELA TÉCNICA DE EPL (EM UFP/L) DETECTADOS EM AMOSTRAS PROVENIENTES DOS SÍTIOS DE COLETA: A) NO MICRO-AMBIENTE 4 DA LAGOA DO PERI; B) NA NASCENTE/FONTE E C) NA SAC..... 80

**FIGURA 21:** CINÉTICA DA QUANTIFICAÇÃO DE HADV-2 EM CÉLULAS A549 PELA TÉCNICA DE ICC-ET-RT-QPCR. NO EIXO DIREITO A QUANTIDADE HADV INOCULADOS NAS CÉLULAS EM UFP/ML (LINHA) E NO EIXO ESQUERDO A RECUPERAÇÃO DE HADV EM CG/ML (BARRA CINZA), APÓS OS SEGUINTE TEMPOS DE INCUBAÇÃO: (A) 24 H, (B) 36 H E (C) 72 H..... 81

**FIGURA 22:** COMPARAÇÃO DA CINÉTICA DE QUANTIFICAÇÃO DE HADV EM CÉLULAS A549 PELA TÉCNICA DE ICC-ET-RT-QPCR APÓS 24H, 36H E 72H DE INOCULAÇÕES EM QUANTIDADES CONHECIDAS DE HADV EM UFP/ML EM ÁGUA DE MANANCIAL SUPERFICIAL..... 82

**FIGURA 23:** EQUIVALÊNCIA LOGARÍTMICA (LOG) DA QUANTIFICAÇÃO ENTRE UFP/ML E CG/ML, SENDO A MÉDIA GERAL DE 3,4 LOGS. PARA MAIS EM CG/ML E SENSIBILIDADE DO ENSAIO DE ICC-ET-RT-QPCR EM DETECTAR E QUANTIFICAR HADV INFECCIOSOS EM ÁGUA DE MANANCIAL SUPERFICIAL..... 83

**FIGURA 24:** MÉDIA DE HADV INFECCIOSOS PELA TÉCNICA DE ICC-ET-RT-QPCT (CG/L) DETECTADOS EM AMOSTRAS PROVENIENTES DOS SÍTIOS DE COLETA (A) MICRO-AMBIENTE 4 DA LAGOA DO PERI, (B) NASCENTE/FONTE E (C) NA SAC..... 85

**FIGURA 25:** DISTRIBUIÇÃO SAZONAL DE HADV INFECCIOSOS NOS SÍTIOS DE COLETA MONITORADOS (MA4 DA LAGOA DO PERI, NA NASCENTE/FONTE E NA SAC)..... 86

**FIGURA 26:** COMPARAÇÃO ENTRE HADV ÍNTEGROS (BARRA PRETA) E INFECCIOSOS POR ICC-ET-RT-QPCR (BARRA CINZA) E POR EPL (LINHA) NAS AMOSTRAS PROVENIENTES DOS SÍTIOS DE COLETA: MA4 DA LAGOA DO PERI (A), NASCENTE/FONTE (B) E SAC (C).....89

**FIGURA 27:** ÁRVORE FILOGENÉTICA DEDUZIDA POR MEIO DE ANÁLISES DE SEQUÊNCIAS DE NUCLEOTÍDEOS CORRESPONDENTE A REGIÃO DE HADV (GRIFADAS EM VERDE) OBTIDOS DE ÁGUAS DE MANANCIAS SUPERFICIAIS DA LAGOA DO PERI (MA4), NASCENTE/FONTE E ÁGUA DE SOLUÇÃO ALTERNATIVA DE ABASTECIMENTO COLETIVO (SAC), DE FLORIANÓPOLIS-SC. AS ANÁLISES FORAM REALIZADAS PELO MÉTODO DE MÁXIMA VEROSSIMILHANÇA (BASEADO NOS PARÂMETROS DE KIMURA 2 COM 500 REPETIÇÕES) NO PROGRAMA MEGA 5.0. AS SEQUÊNCIAS UTILIZADAS PARA COMPARAÇÃO FORAM ACESSADAS NO GENBANK NCBI (NÃO GRIFADAS), PRECEDIDAS POR “GB” E O SEU RESPECTIVO NÚMERO DE ACESSO.....90

**FIGURA 28:** COMPARAÇÃO DAS SEQUÊNCIAS DE AMINOÁCIDOS DA REGIÃO *HEXON* DE HADV (GRIFADO EM VERDE), OBTIDOS DE ÁGUAS DE MANANCIAS SUPERFICIAIS DA LAGOA DO PERI (MA4), NASCENTE/FONTE E ÁGUA DE SOLUÇÃO ALTERNATIVA DE ABASTECIMENTO COLETIVO (SAC), COM SEQUÊNCIAS ACESSADAS NO GENBANK NCBI (NÃO GRIFADAS E QUE APRESENTAM O SEU RESPECTIVO NÚMERO DE ACESSO PRECEDIDO PELA SIGLA “GB”).....93

**FIGURA 29:** PREDIÇÃO DA ESTRUTURA TRIDIMENSIONAL DA PROTEÍNA *HEXON* DE HADV, MODELADA A PARTIR DA ANÁLISE DE HOMOLOGIA COM A SEQUÊNCIA REFERÊNCIA DE HADV-52, USANDO O PROGRAMA PHYRE2. A: PROTEÍNA SEM ALTERAÇÕES AMINOACÍDICAS; B: PROTEÍNAS COM AS ALTERAÇÕES AMINOACÍDICAS.....95

## LISTA DE QUADROS E TABELAS

**QUADRO 1:** INICIADORES E SONDAS UTILIZADAS PARA QUANTIFICAÇÃO EM CÓPIAS GENÔMICAS DE HAdV, JCPyV, HAV E RVA.....54

**TABELA 1:** PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS E DE NUTRIENTES DA LAGOA DO PERI.....65

**TABELA2:** MÉDIA GEOMÉTRICA E INTERVALO DO NÚMERO DE CÓPIAS GENÔMICAS VIRAIS DETECTADOS NOS SÍTIOS DE COLETA.....72

**TABELA 3:** MÉDIA GEOMÉTRICA E INTERVALO DO NÚMERO DE CÓPIAS GENÔMICAS DE HAdV INFECCIOSOS QUANTIFICADOS PELO ENSAIO DE ICC-et-RT-qPCR NOS SÍTIOS DE MONITORAMENTO.....85

**TABELA 4:** COMPARAÇÃO ENTRE INTEGRIDADE E INFECCIOSIDADE DE HAdV NOS SÍTIOS DE COLETA.....87

**TABELA 5:** MATRIZ DE IDENTIDADE DAS SEQUÊNCIAS DE NUCLEOTÍDEOS (DADOS GRIFADOS EM AZUL CLARO) E DE AMINOÁCIDOS (DADOS GRIFADOS EM VERDE CLARO) DA REGIÃO *HEXON* DE HADV OBTIDOS DE ÁGUAS DE MANANCIAS SUPERFICIAIS DA LAGOA DO PERI (MA4), NASCENTE/FONTE E ÁGUA DE SOLUÇÃO ALTERNATIVA DE ABASTECIMENTO COLETIVO (SAC), COM SEQUÊNCIAS ACESSADAS NO GENBANK NCBI (NÚMERO DE ACESSO PRECEDIDO PELA SIGLA “GB”).....94



## LISTA DAS PRINCIPAIS ABREVIATURAS E SIGLAS

**A549** Células epiteliais de carcinoma de pulmão humano  
**ABES** Associação Brasileira de Engenharia Sanitária  
**AdV** Adenovírus  
**CCL** Lista de Candidatos a Contaminantes  
**cDNA** DNA complementar  
**CG** Cópias genômicas  
**CONAMA** Conselho Nacional do Meio Ambiente  
**DEPC** Dietilpirocarbonato  
**DMEM** Dulbecco's modified Eagle médium  
**DNA** Ácido desoxirribonucléico  
**dNTP** Desoxirribonucleotídeos (dATP, dTTP, dGTP)  
**EDTA** Ácido etilenodiamino tetra-acético  
**EPA** Agência Norte Americana de Proteção do Meio Ambiente  
**ETA** Estação de Tratamento de Água  
**ETE** Estação de Tratamento de Esgoto  
**HAdV** Adenovírus humano  
**HAV** Vírus da hepatite A  
**HCl** Ácido clorídrico  
**IBGE** Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística  
**ICC-et-RT-qPCR** Cultura Celular Integrada a Reação da Cadeia da Polimerase em Tempo Real precedida de tratamento enzimático e Transcrição Reversa  
**LVA** Laboratório de Virologia Aplicada  
**MA** Micro-ambiente  
**MEM** Meio Mínimo Essencial com sais de Eagle's  
**MS** Ministério da Saúde  
**NCBI** Centro Nacional de Informações Biotecnológicas  
**pb** Pares de Bases  
**PCR** Reação em Cadeia da Polimerase  
**pH** Potencial hidrogeniônico  
**PMISB** Plano Municipal de Saneamento Básico  
**PNI** Plano Nacional de Imunização  
**PNSB** Plano Nacional de Saneamento Básico  
**PyV** Poliomavírus humano  
**qPCR** Reação em cadeia da Polimerase em Tempo Real  
**RNA** Ácido Ribonucléico  
**RT** Transcriptase reversa  
**RV** Rotavírus

**SACs** Soluções Alternativas de Abastecimento Coletivo

**SFB** Soro fetal bovino

**UFP** Unidade Formadora de Placa

**UFSC** Universidade Federal de Santa Catarina

**UV** Radiação Ultravioleta

**VP** Proteína Viral

**WHO** Organização Mundial da Saúde

## SUMÁRIO

<b>1 CONTEXTUALIZAÇÃO</b> .....	<b>27</b>
<b>1.1 ÁGUAS DE MANANCIAS SUPERFICIAIS E O SANEAMENTO BÁSICO</b> .....	<b>27</b>
<b>1.2 VÍRUS HUMANOS DE VEICULAÇÃO HÍDRICA</b> .....	<b>30</b>
1.2.1 Adenovírus Humano (HAdV) .....	32
1.2.2 Poliomavírus – Cepa JC (JCPyV) .....	34
1.2.3 Rotavírus – A (RVA) .....	37
1.2.4 Vírus da Hepatite A (HAV) .....	40
<b>2 HIPÓTESES</b> .....	<b>43</b>
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	<b>45</b>
<b>3.1 OBJETIVO GERAL</b> .....	<b>45</b>
<b>3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b> .....	<b>45</b>
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>47</b>
<b>4.1 SÍTIOS/LOCAIS DE ESTUDOS E COLETAS</b> .....	<b>47</b>
<b>4.2 AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS E DE NUTRIENTES</b> .....	<b>51</b>
<b>4.3 CONCENTRAÇÃO DAS AMOSTRAS DE ÁGUAS</b> .....	<b>51</b>
<b>4.4 AVALIAÇÃO DA RECUPERAÇÃO VIRAL EM ÁGUAS DE MANANCIAS PELO MÉTODO DE ADSORÇÃO-ELUIÇÃO</b> .....	<b>53</b>
<b>4.5 EXTRAÇÃO DO MATERIAL GENÉTICO</b> .....	<b>54</b>
<b>4.6 REAÇÃO DE TRANSCRIÇÃO REVERSA</b> .....	<b>54</b>
<b>4.7 QUANTIFICAÇÕES DOS GENOMAS VIRAIS</b> .....	<b>54</b>
<b>4.8 ESTUDO DA INTEGRIDADE DE HAdV EM ÁGUAS DE MANANCIAS</b> .....	<b>56</b>
4.8.1 Ensaio Enzimático .....	56
<b>4.9 ESTUDO DA INFECIOSIDADE DE HAdV EM ÁGUAS DE MANANCIAS</b> .....	<b>57</b>
4.9.1 Linhagem Celular .....	57
4.9.2 Ensaio de citotoxicidade das amostras de água concentradas .....	58
4.9.3 Ensaio de Placa de Lise (EPL) .....	58
4.9.4 ICC-et-RT-qPCR .....	59
<b>4.10 SEQUENCIAMENTO GÊNICO E ESTUDOS FILOGENÉTICOS DE HAdV</b> .....	<b>62</b>
4.10.1 Modelagem da Proteína hexon de HAdV .....	63
<b>4.11 ANÁLISES ESTATÍSTICAS</b> .....	<b>64</b>
<b>5 RESULTADOS</b> .....	<b>65</b>

<b>5.1 AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS E DE NUTRIENTES</b> .....	65
<b>5.2 ENSAIOS DE RECUPERAÇÃO VIRAL</b> .....	68
<b>5.3 DETECÇÃO DOS GENOMAS VIRAIS</b> .....	68
<b>5.4 DISTRIBUIÇÃO SAZONAL DOS VÍRUS</b> .....	73
<b>5.5 CORRELAÇÃO DOS PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS E NUTRIENTES COM A PRESENÇA DE VÍRUS</b> .....	74
<b>5.6 AVALIAÇÃO DA INTEGRIDADE DE HAdV</b> .....	75
<b>5.7 AVALIAÇÃO DA INFECCIOSIDADE/VIABILIDADE DE HAdV EM AMOSTRAS DE ÁGUA DE CONSUMO</b> .....	77
5.7.1 Ensaio de Placa de Lise – EPL .....	78
5.7.2 Ensaio de Cultura Celular Integrada (ICC) ao RT-qPCR precedido por tratamento enzimático (et-RT-qPCR) – ICC-et-RT-qPCR .....	80
<b>5.8 DISTRIBUIÇÃO SAZONAL DE HAdV INFECCIOSOS</b> .....	86
<b>5.9 HAdV: COMPARAÇÃO ENTRE HAdV ÍNTEGROS E INFECCIOSOS POR EPL E ICC-ET-RT-QPCR</b> .....	87
<b>5.10 SEQUENCIAMENTO GÊNICO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE HAdV</b> .....	89
5.10.1 Análises de Similaridade .....	89
5.10.2 Modelagem da Proteína hexon do Capsídeo de HAdV .....	95
<b>6 DISCUSSÃO</b> .....	97
<b>7 SUMÁRIO DOS PRINCIPAIS RESULTADOS</b> .....	109
<b>8 CONCLUSÕES GERAIS</b> .....	113
<b>9 PERSPECTIVAS</b> .....	115
<b>10 REFERÊNCIAS</b> .....	117

# 1 CONTEXTUALIZAÇÃO

## 1.1 Águas de mananciais Superficiais e o Saneamento Básico

O Brasil conta com aproximadamente 8% dos recursos hídricos (água doce) disponíveis no globo terrestre (TUCCI et al., 2001), mas este recurso não se encontra distribuído de forma igual no território brasileiro e isso implica em políticas que visem planejamentos regionais a fim de garantir o acesso e a permanência ao abastecimento humano da água, bem como sua destinação nas atividades econômicas, garantindo assim a proteção e qualidade dos seus mananciais (MILARÉ, 2004).

Segundo a Lei Federal 9.433, de 8 de janeiro de 1997, da Agência Nacional das Águas (ANA), que instituiu a Política Nacional de Recursos Hídricos e criou o Sistema Nacional de Gerenciamento de Recursos Hídricos, entende-se por manancial todo o corpo de água interior subterrânea, superficial, fluente, emergente ou em depósito, efetiva ou potencialmente utilizável para o abastecimento público, sendo designada a água um bem de domínio público, recurso natural limitado, dotado de valor econômico e em situações de escassez, o uso prioritário é para o consumo humano e a dessedentação de animais. A gestão dos recursos hídricos deve sempre proporcionar o uso múltiplo das águas, ser descentralizada e contar com a participação do poder público, dos usuários e das comunidades.

Contudo, as águas de mananciais têm sido acometidas pelas ações humanas, influenciando na qualidade desses recursos hídricos, principalmente por meio de lançamento de cargas (dejetos humanos, animais e industriais), uso do solo rural e urbano (irrigações, fertilização, fossas sumidouros) e modificações no sistema fluvial pela ocupação desordenada (TUCCI et al., 2001).

Neste sentido, o saneamento básico figura como um dos setores imprescindíveis para regular e prevenir o lançamento de contaminantes no meio ambiente (IBGE, 2008). Entende-se por saneamento básico os serviços de abastecimento de água potável, drenagem urbana, a coleta de lixo e o esgotamento sanitário (coleta e tratamento de esgotos), sendo este último o mais precário destes serviços no Brasil (IBGE, 2010).

A Lei nº 11.445, de 05 de janeiro de 2007, estabelece as diretrizes nacionais para o saneamento básico, sendo que estes serviços são públicos e fundamentados nos seguintes princípios: a) universalização do acesso; b) integralidade, que é compreendida como o conjunto de todas as atividades e componentes de cada um dos diversos serviços de saneamento básico no que diz respeito ao abastecimento de água, esgotamento sanitário, limpeza urbana e manejo dos resíduos sólidos realizados de formas adequadas à saúde pública e à proteção do meio ambiente; c) disponibilidade destes serviços em todas as áreas urbanas, que visem a saúde pública e à segurança da vida e do patrimônio público e privado; d) adoção de métodos, técnicas e processos que considerem as peculiaridades locais e regionais; e) articulação com as políticas de desenvolvimento urbano e regional, de habitação, de combate à pobreza e de sua erradicação, de proteção ambiental, de promoção da saúde e outras de interesse social que implique em melhoria de qualidade de vida para as quais o saneamento básico seja fator determinante; f) eficiência e sustentabilidade econômica; g) utilização de tecnologias apropriadas; h) transparência das ações; i) segurança, qualidade e regularidade; j) integração das infra-estruturas e serviços com a gestão eficiente dos recursos hídricos.

No mundo todo, estima-se que 2,6 bilhões de pessoas não têm acesso ao saneamento básico e, dentre essas, 884 milhões de pessoas não têm acesso às fontes de água de qualidade para consumo (WHO & UNICEF, 2010). Como consequência, milhões de pessoas, especialmente crianças, morrem todo ano por doenças relacionadas à falta de água potável, saneamento inadequado e baixa higiene (WHO, 2009).

No Brasil, segundo o IBGE (2008), somente 55,16% dos municípios brasileiros têm serviços de esgotamento sanitário por rede coletora e no quesito serviço de tratamento de esgoto, apenas 28,5% dos municípios brasileiros e em Santa Catarina esse índice cai para 16%, retratando um cenário de descaso com o meio ambiente, o que implica em prejuízos à saúde pública (IBGE, 2008).

Atualmente a cidade de Florianópolis, capital do Estado de Santa Catarina, no que diz respeito ao sistema de captação e tratamento do esgotamento sanitário, abrange um total de 44% da população residente (PLANO MUNICIPAL INTEGRADO DE

SANEAMENTO BÁSICO – PMISB, 2008). Isso demonstra que mais da metade da população não tem acesso ao destino correto do esgoto que produz o que afeta enormemente os recursos hídricos, saúde e a qualidade de vida de todos os seres que vivem neste contexto geográfico e conseqüentemente, a prática econômica local, voltada para maricultura, malacocultura e pesca, bem como as áreas de recreação (banho e pesca esportiva).

Em um breve histórico, Florianópolis teve seu primeiro sistema de tratamento de esgoto inaugurado em 1916, deixando de operar em 1960, quando os resíduos sanitários voltaram a ser despejados diretamente nas águas das baías e praias locais. Somente em 1997, com o crescimento acelerado da cidade, valorização do turismo e necessidade de cumprir a legislação nacional de saneamento básico, foi inaugurada a primeira etapa do novo sistema com Estação de Tratamento de Esgoto (ETE) situada na Baía Sul da Ilha, gerenciada pela concessionária CASAN - Companhia Catarinense de Águas e Saneamento (CASAN, 2011).

A CASAN atende o município de Florianópolis no que diz respeito ao abastecimento de água potável, dispondo de três Estações de Tratamento de Água (ETA's) denominadas Sistema Norte, Costa Leste Sul e Integrado da Grande Florianópolis (PMISB, 2008). A água é captada em mananciais superficiais e subterrâneos, passando por ETA, onde ocorre o tratamento e distribuição da água captada para a população. O tratamento da água consiste 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. Outro serviço prestado pela CASAN é a coleta e tratamento de efluentes humanos, por meio de Estações de Tratamento de Esgoto (ETE's), sendo que nestas ETE's o esgoto é armazenado em Lagoas de Estabilização, Lodos Ativados (valos de oxidação, aeração prolongada) e Filtros Biológicos, onde ocorrerá o tratamento (CASAN, 2011).

Florianópolis também possui cerca de 50 Soluções Alternativas de Abastecimento Coletivo (SACs), operacionalizadas pela iniciativa privada ou por Associações de Moradores devidamente registradas (PMISB, 2008). Entende-se por SAC aquele sistema de abastecimento de água que não seja a oficial, e que abrange duas ou mais famílias, mantido o controle da qualidade da água, de acordo a Portaria do Ministério da

Saúde nº 2.914 de 2011. Essa Portaria prevê que todas as formas de abastecimento de água potável coletivo devem ser monitoradas, quanto à sua potabilidade pelos órgãos responsáveis pela Saúde Pública local, bem como que cada associação possua um responsável técnico.

O controle da qualidade de toda e qualquer água destinada ao consumo humano, no Brasil e em todo o Estado de Santa Catarina, contempla em seu quesito “padrões microbiológicos” análises de coliformes totais e termotolerantes (*E. coli*), que é o exigido pela Legislação Brasileira em sua Portaria/MS 2.914/2011. Este controle de qualidade não é suficiente para garantir a qualidade da água, uma vez que outros patógenos podem estar presentes (como protozoários e vírus), podendo permanecer na água após o tratamento convencional, por serem mais resistentes que às bactérias (FONG e LIPP, 2005). Neste sentido a Associação Brasileira de Engenharia Ambiental (ABES) elaborou sugestões para a inclusão de outros microorganismos na avaliação da qualidade de água, incluindo os vírus humanos de veiculação hídrica (ABES, 2010).

## **1.2 Vírus Humanos de Veiculação Hídrica**

A pesquisa de vírus em águas vem ganhando relevância, tendo em vista a necessidade da melhoria da qualidade dos recursos hídricos utilizados para consumo e atividades humanas (FONG & LIPP, 2005). A pesquisa investigativa de vírus na água iniciou após um surto de hepatite A em Nova Délhi na Índia, na década de 1950, causada pela água contaminada por esgoto não tratado (TAVARES et al., 2005).

Atualmente os vírus entéricos são considerados os principais agentes causais de doenças de veiculação hídrica, responsáveis por 30 a 90% das gastroenterites no mundo (BOSCH et al., 2008). São considerados vírus entéricos aqueles presentes no trato gastrointestinal humano e que podem ser eliminados nas fezes, e que, normalmente são introduzidos no meio ambiente por meio de atividades humanas, pelo uso de sistemas de fossas com sumidouro, pela presença de resíduos de atividades industriais e agrícolas e principalmente pelo despejo de dejetos não tratados, ou tratados ineficientemente, que acabam acometendo os corpos de água. (FONG & LIPP, 2005).

Os vírus entéricos encontram-se distribuídos em todas as partes do mundo, causando doenças como: gastroenterites, infecções respiratórias, conjuntivites, hepatite, encefalites e paralisias (KOCWA-HALUCH, 2001). De maneira geral eles contaminam a água de consumo humano e acabam por contaminar alimentos, tais como moluscos bivalves e vegetais, sendo também transmitidos por meio de águas de recreação poluídas (TAVARES et al., 2005).

Por serem vírus transmitidos principalmente por meio de água (direta ou indiretamente), são chamados de vírus de veiculação hídrica e destacam-se entre esses os: adenovírus humanos (HAdV), os rotavírus do grupo A (RVA), os vírus da hepatite A (HAV) e poliomavírus do tipo JC (JCPyV). Todos estes vírus são não envelopados sendo que os HAdV, RVA e HAV replicam-se no trato gastrointestinal e são excretados em altas concentrações nas fezes de humanos infectados ( $10^8$ - $10^{11}$  partículas/g de fezes) (BOSCH et al., 2008), e o JCPyV é excretado na urina (BOOTHUR & BRENNAN, 2010) e apesar de não ser considerado um vírus entérico, estudos apontam sua transmissão pela via urino-oral (BOFFIL-MAS et al., 2005).

Todos estes vírus mencionados são estudados pela sua elevada resistência às condições ambientais adversas, podendo permanecer viáveis por longos períodos na água e resistindo a condições ambientais desfavoráveis ou letais para outros microrganismos, tais como extremos de pH, temperaturas elevadas, salinidade, radiação ultra-violeta (U.V) pela luz solar e outros (LEY et al., 2002, GRIFFIN et al., 2008). Outra característica compartilhada entre tais vírus se refere à sua capacidade de adsorção rápida em partículas sólidas (biossólidos), dispersas no ambiente, favorecendo a proteção frente aos fatores inativantes ambientais e mudanças climáticas (HERNROTH et al., 2002).

Desta forma, os vírus entéricos apresentam vantagens em relação às bactérias como marcadores de eficiência do processo de descontaminação da água (por cloração e radiação U.V, por exemplo), sendo que a presença destes vírus não está relacionada com a presença de bactérias, bem como sua inativação por cloração (FONG & LIPP, 2005). Estas características justificam que já no ano de 1983 a Agência Norte-Americana de Proteção Ambiental afirmava que os vírus entéricos constituem um indicador mais significativo, confiável e eficiente a ser usado no

monitoramento ambiental em concordância com os parâmetros bacterianos vigentes (KARAGANIS et al., 1983).

Portanto, os vírus entéricos humanos são potenciais candidatos a biomarcadores de contaminação ambiental por efluentes humanos, principalmente em água utilizadas para consumo e atividades da população (FONG & LIPP, 2005). Assim, a pesquisa da presença e infecciosidade/viabilidade de vírus entéricos, em ambientes aquáticos, constitui uma relevante linha de investigação, tendo em vista a qualidade da saúde ambiental e humana (BOSCH et al., 2008).

### 1.2.1 Adenovírus Humano (HAdV)

Em 1953, na tentativa de se estabelecer linhagens de culturas de tecidos a partir de tecido adenóide removidos cirurgicamente de crianças, foi reconhecido que ali havia um agente transmissível, causador de degeneração celular, relatado como um agente viral, cultivável em células teciduais. (ROWE et al., 1953 *in* FIELDS; KNIPE; HOWLEY, 2007). Em 1954, pesquisas relataram agentes virais semelhantes isolados de militares com estado febril e com doenças respiratórias e logo se percebeu que havia sorotipos múltiplos desse agente e que este era causador de degeneração das adenóides, conjuntivites e doenças respiratórias e este agente infeccioso foi chamado de adenovírus (nome referido ao tecido adenóide de onde foi isolado) (HILLEMANN, 1954).

Os adenovírus, que receberam este nome oficial em 1999, pertencem à família Adenoviridae e são classificados nos gêneros *Mastadenovírus* (infectam humanos, símios, bovinos, equinos, caninos, suínos, ovinos e roedores), *Aviadenovírus* (infectam aves), *Atadenovírus* (infectam répteis, aves e marsupiais) e *Siadenovírus* (infectam répteis e aves) (FIELDS, KNIPE & HOWLEY, 2007).

Adenovírus (representados esquematicamente na Figura 1) são vírus não envelopados, de replicação nuclear, com material genético de natureza DNA fita dupla associado à proteínas, com a partícula viral medindo aproximadamente 90nm e com morfologia icosaédrica do capsídeo viral, que é composto de 252 capsômeros, sendo destes 240 *hexons* e 12 *pentons* (em cada *penton* existe a projeção de uma única fibra, que varia de tamanho de acordo com os sorotipos, sendo que os sorotipos

AdV-40 e 41 possuem duas fibras em cada *penton*) (FIELDS; KNIPE; HOWLEY, 2007).

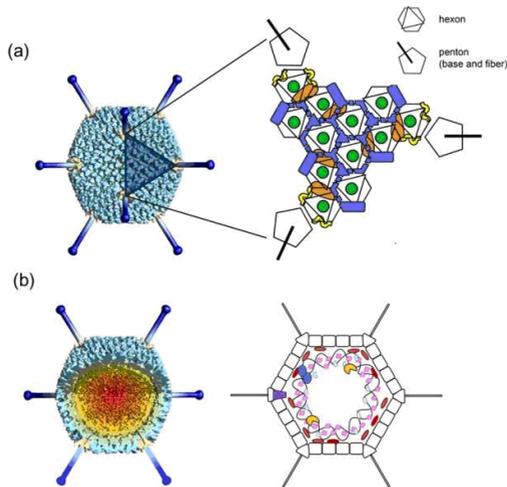


Figura 1: Estrutura geral dos adenovírus, representado esquematicamente: a) o formato icosaédrico do capsídeo viral com seus hexons e pentons, b) as fibras e o conteúdo interno do capsídeo viral (genoma e as proteínas de acompanhamento). Fonte: Adaptado de Martín (2012).

Os adenovírus que infectam humanos (HAdV) pertencem ao gênero *Mastadenovirus*, o qual contempla 52 sorotipos virais divididos em seis espécies, designadas de A até F (JONES et al., 2007).

Os HAdV são reconhecidos em todo o mundo como agentes causadores de múltiplas doenças, como as gastroenterites, uretrites, cervicites, faringites, doenças respiratórias agudas, conjuntivites e meningoencefalites (FONG & LIPP, 2005). Normalmente os quadros clínicos de infecção são moderados, mas existem casos fatais reportados na literatura (POND, 2005).

Dos 52 sorotipos de HAdV, se sabe que todos podem se replicar no trato gastrointestinal, mesmo em indivíduos assintomáticos e que portanto podem ser excretados em altas concentrações nas fezes ( $10^8$ - $10^{13}$  partículas/grama) (BÁNYAI et al., 2009). Desta forma os HAdV chegam ao meio ambiente (água, solo, alimentos), podendo contaminar o homem por meio

de inalação de aerossóis, no contato pessoa-pessoa e via fecal-oral (FORMIGA-CRUZ et al., 2002; RIGOTTO et al., 2010; VAN-HEERDEN et al., 2005).

Os HAdV são reconhecidos por sua estabilidade e resistência às diversas condições ambientais (pH, temperatura e radiação solar), sendo, por exemplo, cerca de 60 vezes mais resistentes à radiação U.V que os vírus entéricos de genoma RNA (FONG & LIPP, 2005; PINA et al, 1998). Além disso, os HAdV têm sido isolados em diversos ambientes, como na água do mar, água subterrânea, águas residuais, em rios e em água potável, apresentando resistência às condições adversas do meio ambiente e às formas de desinfecção normalmente empregadas no tratamento de água potável (cloração). Também se deve levar em consideração a capacidade deste vírus associar-se com partículas sólidas no ambiente, o que aumenta sua estabilidade (ENRIQUEZ, HURST & GERBA, 1995; FONG & LIPP, 2005).

Surtos de gastroenterites e de outras enfermidades características do HAdV estão sendo relatados mundialmente e estes relatos possuem em comum a veiculação viral por meio do ambiente aquático, seja ela por água de recreação, de reuso, rios e ainda em águas de mananciais utilizadas para consumo humano (tratada e não tratada) (LAMBERTINI et al., 2008; XAGORARAKI et al., 2007).

Em virtude de tais características a Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (EPA-EUA) incluiu o adenovírus na lista de candidatos a marcadores de contaminação ambiental (CCL), pois é considerado um contaminante presente em água de consumo humano entre outros ambientes aquáticos, sendo desta forma a avaliação da presença/ausência deste requerida para assegurar a qualidade da água destinada à população bem como para suas atividades (CROMEANS et al., 2008; USEPA, 2009).

Neste sentido é relevante a proposta de incluir os HAdV como indicadores de contaminação viral por dejetos humanos no ambiente, principalmente em águas utilizadas para consumo, uma vez que a distribuição deste vírus implica em qualidade de vida e saúde pública (PINA et al., 1998; VAN et al., 2003).

### **1.2.2 Poliomavírus – Cepa JC (JCPyV)**

Historicamente, a pesquisa de poliomavírus iniciou na década de 1950 em estudos sobre o vírus de leucemia murina

(MLV), por meio da qual se observou que havia um agente viral que se diferenciava do MLV e que era capaz de causar vários tipos de tumores quando inoculados em ratos recém-nascidos. A este agente se deu o nome de poliomavírus, que é derivado do grego, onde “poli” significa muitos e “oma” significa cancro ou tumor (FIELDS, KNIPE & HOWLEY, 2007).

Inicialmente, os poliomavírus foram classificados como pertencentes ao gênero da família Papovaviridae, mas em 2000 a Comissão Internacional de Taxonomia de Vírus formalmente classificou o gênero *Poliomavirus* na família Poliomaviridae (VAN et al., 2000).

Os poliomavírus, representados na Figura 2, são não envelopados, de replicação nuclear, simetria icosaédrica medindo 45nm e seu genoma é de natureza DNA circular fita dupla (FIELDS, KNIPE & HOWLEY, 2007).

O gênero *Poliomavirus* contempla 14 diferentes vírus que infectam até oito espécies distintas de mamíferos (NEU et al., 2009). A cepa símia SV40 foi descoberta acidentalmente numa cultura de células de rim de macaco Rhesus e é amplamente utilizada como modelo de poliomavírus humanos em estudos de inativação viral (BOOTHPUR & BRENNAN, 2010; NEU et al., 2009). Quanto às cepas humanas destacam-se a BK e a JC. Recentemente, outras três novas cepas de poliomavírus humanos, WUPyV, KIPyV e MCPyV, foram descritas (ALLANDER et al., 2007; GAYNOR et al., 2007; FENG et al., 2008).

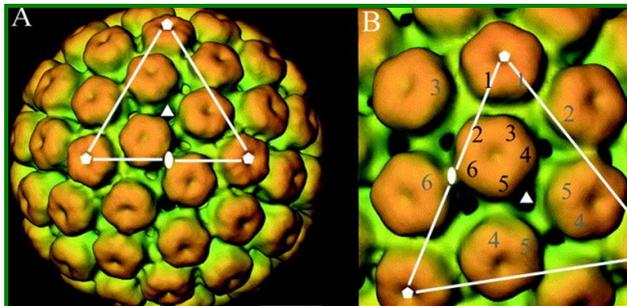


Figura 2: Estrutura esquemática geral do poliomavírus humano (utilizando-se como modelo o símio SV40 e o humano JC): a) estrutura da superfície viral composta por 72 capsômeros, b) morfologia dos capsômeros em pentâmeros. Fonte: Adaptado de Li et al., (2003).

As cepas humanas de poliomavírus mais estudadas são as JC e BK, que foram descobertas em 1971 em pacientes imunodeprimidos (GAYNOR et al., 2007). Estas cepas foram assim chamadas devido às iniciais dos nomes dos pacientes de onde foram isoladas (BOOTHPUR & BRENNAN, 2010). A cepa JC está associada à doença letal do sistema nervoso central (SNC), denominada Leucoencefalopatia Multifocal Progressiva (PML), em indivíduos imunodeprimidos. A cepa BK foi considerada a principal causa de Nefropatia e de Cistite Hemorrágica em pacientes imunodeprimidos (KITAMURA et al., 1994).

Em perspectiva filogenética, o JCV e o BKV são os mais relacionados, apresentando homologia de 75% em nível de genoma, sendo que permanecem muito próximos ao poliomavírus SV40 (símio) (PAL et al., 2006). Dados epidemiológicos, virológicos e filogenéticos sugerem que as cinco cepas humanas tenham co-evoluído com o seu hospedeiro natural, o que explica a elevada prevalência da infecção, a baixa taxa de letalidade, os longos períodos de latência e a reativação destes vírus na população mundial (HIRSCH & STEIGER, 2003).

Tanto poliomavírus humano – cepa JC (JCPyV) quanto a cepa BK (BKPyV) são excretados na urina, pois são responsáveis por infecções persistentes nos rins, o qual é o local de infecção primária, estimando-se que o JCPyV seja excretado por 30-80% da população mundial, que em sua maioria a infecção é

assintomática, podendo permanecer latente, sendo possível uma reativação quando o indivíduo infectado apresentar quadro de deficiência imunológica (BOOTHUR & BRENNAN, 2010). A transmissão de JCPyV não é bem esclarecida, existem três hipóteses de transmissão: por via gastrointestinal, via urinoral, por via respiratória, e de pais para filhos (por co-habitação prolongada) (FENG et al., 2008; BOOTHUR & BRENNAN, 2010).

Poucos são os estudos relatando a presença e persistência de JCPyV no meio ambiente, mas este vírus tem sido apontado como um indicador emergente de contaminação por dejetos humanos no mundo, pois tem sido encontrado em diferentes amostras de esgotos, águas residuárias e de recreação (MORESCO et al., 2011; HUNDESA et al., 2006; BOFILL-MAS et al., 2005). Recentemente no Brasil, Fumian et al. (2010), estabeleceram a prevalência de subtipos de JCPyV presentes na população do Rio de Janeiro por meio de caracterização molecular e as sequências nucleotídicas obtidas indicaram que as cepas de JCPyV detectadas eram correlacionadas com subtipos encontrados na África e na Europa (colonizadores e imigrantes nesta área geográfica).

Os poliomavírus humanos da cepa JC (JCPyV) são estáveis e prevalentes em matrizes ambientais, sugerindo que tenha este tipo viral potencial como indicador de contaminação por efluentes/dejetos humanos (BOFFIL-MAS et al., 2005; FUMIAN et al., 2010).

### **1.2.3 Rotavírus – A (RVA)**

Mesmo com a magnitude das diarreias infantis a busca pelo agente etiológico principal só foi realizada em meados de 1970, pois até aí nenhum vírus importante e causador de diarreias havia sido encontrado (MOFFETT, SEHULEN & BURKHOLDER, 1968). No entanto em 1973 um novo vírus humano, com aproximadamente 70nm foi associado com diarreias graves em recém-nascidos e em crianças e visualizado por microscopia eletrônica da mucosa duodenal, sendo que depois este novo vírus foi identificado diretamente de fezes humanas e por ter um formato arredondado, que lembrava uma roda e o nomeou de rotavírus (KAPIKIAN, 1974 *in* FIELDS; KNIPE; HOWLEY, 2007).

Embora os rotavírus humanos tenham sido descobertos somente em 1973, em 1963 haviam sido descritos rotavírus em ratos jovens com diarreia (cepa SA11) e em 1969 em fezes de bezerros com diarreia (MEBUS et al., 1969 *in* FIELDS; KNIPE; HOWLEY, 2007).

Os rotavírus (representado esquematicamente na Figura 3) pertencem ao gênero *Rotavirus* e família Reoviridae, morfológicamente os vírus maduros medem cerca de 100nm de diâmetro, não possuem envelope, possuem capsídeo icosaédrico composto por camada tripla proteica sendo que a camada mais interna é denominada nucleocapsídeo, que envolve o genoma viral e é formada pela proteína VP2; a camada intermediária é formada pelo capsídeo interno e composta pela proteína VP6 e a camada mais externa é formada pelo capsídeo externo e é constituída pelas proteínas VP4 e VP7. O genoma viral é de natureza RNA dupla-fita segmentado (contendo 11 segmentos), a replicação ocorre, por RNA-polimerase dependente de RNA e por outras enzimas, no citoplasma das células (KAPIKIAN & CHANOCK, 1996, FIELDS, KNIPE & HOWLEY, 2007).

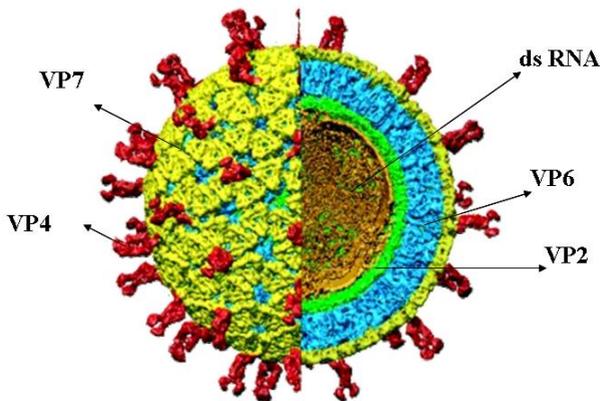


Figura 3: Representação esquemática de uma partícula de rotavírus, contendo suas principais proteínas das respectivas camadas virais: VP2 (interna), VP4 (externa), VP6 (intermediária) e VP7 (externa) e o material genético ds RNA. Fonte: Adaptado de Li et al., (2008).

Classicamente os rotavírus estão divididos em sete grupos (A, B, C, D, E, F e G), sendo os últimos quatro encontrados apenas em animais (ESTES, 2007). A identificação dos

sorotipos/genótipos dos rotavírus é determinada através da análise das proteínas estruturais VP7 e VP4 respectivamente. A classificação dos sorotipos é designada pela especificidade de anticorpos neutralizantes para ambas as proteínas. O sorotipo é denominado sorotipo G, pois a VP7 é uma glicoproteína, já o genótipo VP4 é denominado P, por esta ser uma proteína susceptível à clivagem por proteases intestinais que promovem sua adsorção às microvilosidades intestinais (no intestino delgado a proteína VP4 é clivada pela enzima tripsina em VP5 e VP8 e esta clivagem possibilita a adsorção e penetração viral na célula) (ESTES, 2007). Recentemente, para melhor classificar os RV, se propôs a pesquisa baseada na técnica molecular de RT-PCR e na tentativa de designar completamente todos os 11 segmentos (VP7-VP4-VP6-VP1-VP2-VP3-NSP1-NSP2-NSP3-NSP4-SP5/6 V) sendo denominados de: Gx-P[x]-Ix-Rx-Cx-Mx-Ax-Nx-Tx-Ex-Hx, representando o genótipo e sua função onde o “x” indica o número do genótipo (MATTHIJNSSENS et al., 2008).

Quanto ao tropismo geral dos RV, possuem tropismo específico pelos enterócitos, localizados nas extremidades das microvilosidades intestinais, causando gastroenterites agudas e sendo liberados em altas concentrações nas fezes (RAMIG, 2004). Os rotavírus do genótipo A (RVA) são os principais agentes etiológicos causadores de gastroenterites agudas, anualmente são responsáveis por mais de 100 milhões de episódios de diarreia, 25 milhões de visitas ambulatoriais, 2 milhões de hospitalizações e 600 mil mortes associadas à desnutrição de crianças entre zero e cinco anos de idade (principalmente na África, América Latina e Ásia) (PARASHAR et al 2006; CDC 2009).

A maioria dos estudos epidemiológicos têm demonstrado que amostras de RVA, de genótipos P[8]G1, P[4]G2, P[8]G3, P[8]G4, e, mais recentemente, o P[8]G9 são responsáveis pela maioria das infecções em humanos, sendo propícios a recombinações genéticas (SANTOS & HOSHINO 2005; LEITE et al 2008). No entanto o genótipo P[8]G1 é o mais prevalente mundialmente, sendo responsável por mais de 70% das infecções por RV-A na América do Norte, Europa e Austrália, mas apenas 30% das infecções por RV-A na América do Sul e Ásia, e 23% na África (TATE et al., 2010).

Neste contexto duas vacinas contra RVA encontram-se disponíveis em diversos países, inclusive no Brasil: a) RotaTeq®

(Merck, North Wales, PE, EUA); b) Rotarix® (GlaxoSmithKline [GSK], Rixensart, Bélgica). A Rotateq® é uma vacina oral, pentavalente (G1, G2, G3, G4 e P1A[8]) de vírus reestruturado (WC3 - bovino). A vacina Rotarix® é monovalente (G1P1A[8]), atenuada, e de origem humana (RUIZ-PALACIOS et al., 2006, VESIKARI et al., 2006). Desde 2006 o Brasil inseriu em seu PNI (Plano Nacional de Imunização) a Rotarix®. O impacto positivo da introdução destas vacinas já foi demonstrado em alguns países europeus, africanos e americanos (CHANDRAN et al., 2010; CARVALHO-COSTA et al., 2011). Contudo não se tem estudos ainda sobre o impacto negativo da vacinação, frente à problemática de recombinações e rearranjos do RV vacinal no ambiente, já que o RVA vacinal é também liberado nas fezes humanas (FONG & LIPP, 2005; FUMIAN et al., 2011).

A transmissão dos RV, especialmente os RVA, se dá principalmente pela ingestão de alimentos e água contaminados por meio de dejetos humanos que acometem o meio ambiente (SANTOS & HOSHINO, 2005). A veiculação de RVA pela água tem sido evidenciada durante todas as estações do ano, porém com uma maior frequência no inverno (MEHNERT et al., 1999; BORCHARDT et al., 2003). Quanto à estabilidade deste patógeno no ambiente, estudos demonstram sua persistência e infecciosidade, sendo que em águas de superfície, devido ao conteúdo de matéria orgânica, a estabilidade viral é mantida pela agregação em partículas sólidas (ESPINOSA et al., 2008).

#### **1.2.4 Vírus da Hepatite A (HAV)**

Entre os anos de 1950 e início de 1970, estudos se mostraram fundamentais na definição e caracterização do vírus da hepatite A, sendo que este vírus, durante as investigações iniciais, foi utilizado para infectar voluntários humanos adultos e por meio das fezes dos contaminados foi possível identificar o agente viral sendo liberado, sugerindo que a via de contaminação do HAV era fecal-oral (KRUGMAN, GILES & HAMMOND ,1969).

O vírus da hepatite A (HAV), representado esquematicamente na Figura 4, pertence à família Picornaviridae e ao gênero *Hepatovirus*, quanto à sua morfologia, é um vírus pequeno, não envelopado, com capsídeo icosaédrico, medindo aproximadamente 30nm, formado por várias cópias de três ou

quatro proteínas VP1, VP2, VP3 e VP4, sendo que esta última, apesar de exercer papel importante na formação da partícula viral, não se encontra presente em partículas virais maduras, seu material genético é de RNA simples-fita (polaridade positiva) e sua replicação é citoplasmática (FIELDS, KNIPE, & HOWLEY, 2007; HOLLINGER & EMERSON, 2007; PINTO et al., 2010). A replicação do vírus da hepatite A *in vivo* se dá na maioria das vezes em hepatócitos e em células epiteliais do trato gastrointestinal e o modo de liberação do vírus após a replicação não é necessariamente por lise celular, tendo evidências de que também possa ocorrer processo de necrose celular e liberação viral (CUTHBERT, 2001).

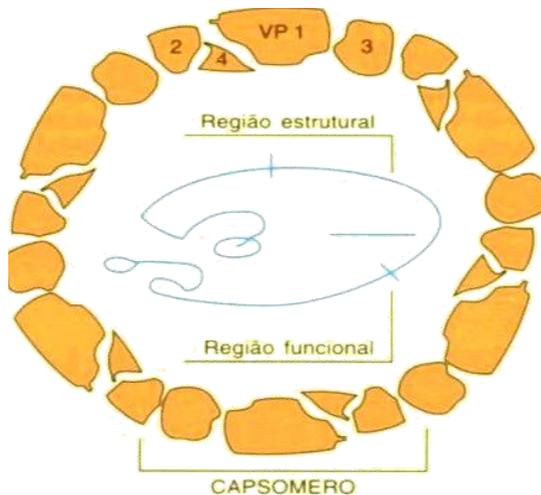


Figura 4: Representação de uma partícula de HAV, evidenciando a simetria do capsídeo, o capsômero, as proteínas virais e o genoma de RNA senso positivo. Fonte: Adaptado de <http://www.labmed.com.br>.

O HAV é o principal agente causador não parenteral de hepatites em países desenvolvidos e causador de infecções endêmicas em países em desenvolvimento veiculado pela água e alimentos (principalmente moluscos) contaminados, sendo a via de transmissão a fecal-oral (JOTHIKUMAR et al., 2005, MORGA, et al., 2009). Os sintomas da doença, em adultos, se caracterizam por febre, náuseas, desconforto abdominal e icterícia; Já em crianças, a infecção por HAV costuma ser

assintomática (PINTO et al., 2010). Surtos causados por HAV estão intimamente ligados com condições sanitárias precárias e com condições sócio-econômicas regionais (VILLAR et al., 2006).

O Brasil é considerado um país de alta endemicidade para HAV, sendo que dados epidemiológicos demonstram que 90% da população apresentam anticorpos anti-HAV (CARRILHO et al., 2005). Quanto à vacinação, desde a década de 90, encontra-se disponível no mercado a vacina inativada contra HAV, na qual a imunogenicidade se dá por meio de anticorpos específicos, sendo a eficiência da vacinação comprovada, uma vez que só existe um sorotipo de HAV circulante no mundo. No entanto esta vacina não está disponível no PNI brasileiro (PINTO et al., 2010).

Como estudos no mundo têm demonstrado que HAV é detectado em águas, sistemas de tratamento, rios e lagos e tendo em vista sua patogenicidade, sua investigação e monitoramento no ambiente é importante (BORCHARDT et al., 2003; CLEMENTE-CASARES et al., 2003), uma vez que possui características físico-químicas que garantem sua resistência, pois não é susceptível à degradação por detergentes, relativamente resistente a temperaturas de até 60°C, sendo inativado parcialmente quando incubado por um período de 10 a 12 horas nesta temperatura e ainda podem permanecer infecciosos por dias ou meses em águas contaminadas, como as de superfície (CUTHBERT, 2001; HOLLINGER & EMERSON, 2007).

## 2 HIPÓTESES

O presente trabalho de Dissertação foi desenvolvido baseado nas seguintes hipóteses:

- ❖ Vírus humanos de veiculação hídrica estão amplamente distribuídos em águas de mananciais superficiais;
- ❖ Parâmetros físico-químicos não estão correlacionados com a presença de vírus humanos de veiculação hídrica;
- ❖ Adenovírus humanos permanecem infecciosos em águas de mananciais.



### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo Geral

Avaliar e quantificar vírus humanos de veiculação hídrica, adenovírus (HAdV), poliomavírus-JC (JCPyV), vírus da hepatite A (HAV) e rotavírus-A (RVA), em águas de mananciais superficiais, bem como avaliar a integridade, infecciosidade/viabilidade e realizar estudos de caracterização molecular de HAdV nestas matrizes aquáticas.

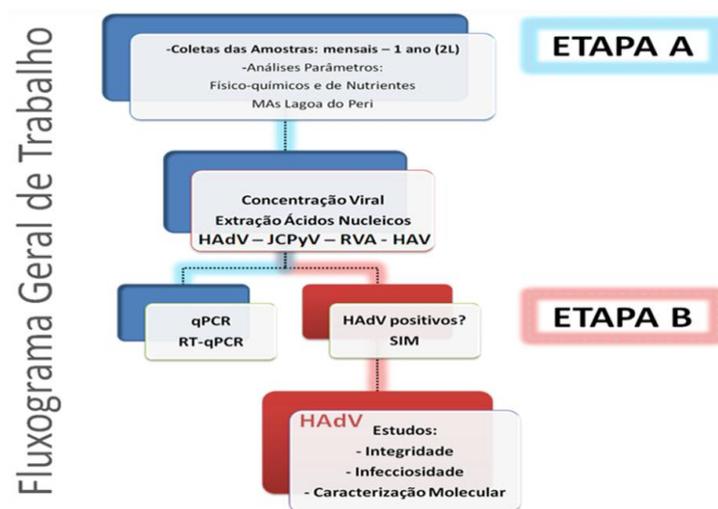
#### 3.2 Objetivos Específicos

- ❖ Monitorar águas de mananciais superficiais, em locais previamente selecionados, na cidade de Florianópolis, Santa Catarina, no que diz respeito aos parâmetros físico-químicos, de nutrientes e perfis virológicos;
- ❖ Quantificar os genomas dos seguintes vírus humanos de veiculação hídrica: adenovírus (HAdV), poliomavírus-JC (JCPyV), vírus da hepatite A (HAV) e Rotavírus-A (RVA);
- ❖ Avaliar a distribuição sazonal viral nas matrizes aquáticas;
- ❖ Avaliar a integridade de adenovírus humanos (HAdV) presentes em águas de mananciais superficiais usadas para consumo humano;
- ❖ Padronizar a técnica de ICC-et-RT-qPCR (Cultura Celular Integrada ao RT-qPCR – precedida de tratamento enzimático) na detecção de HAdV;
- ❖ Avaliar a infecciosidade/viabilidade de adenovírus humanos (HAdV) presentes em águas de mananciais superficiais;
- ❖ Realizar estudos de caracterização molecular de adenovírus humanos (HAdV) detectados nas amostras de águas de mananciais superficiais.



## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

O delineamento experimental geral utilizado para realizar este trabalho de dissertação constituiu-se basicamente em duas etapas: 1) monitoramento viral (HAdV, JCPyV, RVA e HAV), de parâmetros físico-químicos e de nutrientes em águas de mananciais utilizadas para consumo e atividades humanas; 2) avaliação da integridade, infecciosidade e caracterização molecular de HAdV presentes nestas águas. A Figura 5 apresenta resumidamente o fluxograma das atividades aplicadas no trabalho.



**Figura 5:** Fluxograma mostrando o delineamento experimental básico utilizado para a realização deste trabalho.

### 4.1 Sítios/Locais de Estudos e Coletas

Os objetos de estudo deste trabalho foram águas de mananciais superficiais (água de lagoa, água de nascente/fonte e água de sistema público de abastecimento coletivo) da cidade de Florianópolis Santa Catarina.

Dois litros (2L) de água foram coletados, mensalmente em cada um dos locais previamente selecionados:

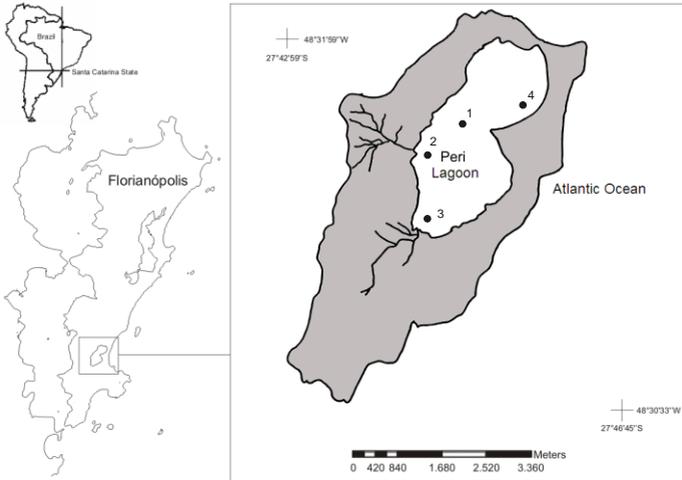
A: Lagoa do Peri (Sítio 1 de coleta) (Figura 6): A Lagoa do Peri está localizada em área protegida do Parque Municipal da Lagoa do Peri, no Sudeste da Ilha de Santa Catarina. Possui um espelho d'água de 5,7 km<sup>2</sup>, com uma profundidade média de 4,2 m. Sua distribuição, quanto a nutrientes, é homogênea (HENNEMANN & PETRUCIO, 2011). A Lagoa do Peri é alimentada principalmente pelos Rios Cachoeira Grande e Ribeirão Grande, sendo amplamente utilizada para atividades recreacionais (banho, pesca) e se destaca por participar da Estação de Tratamento de Água do Sistema Costa Leste-Sul, abastecendo cerca de 110.000 habitantes de Florianópolis nos distritos da Barra da Lagoa, Lagoa da Conceição, Campeche, Morro das Pedras, Armação e Ribeirão da Ilha. Por ser uma lagoa tão importante e extensa, foram previamente selecionados quatro pontos para coletas de água, designados neste trabalho como Micro-ambientes da lagoa (amostras de água superficial foram coletadas mensalmente de Junho de 2010 até Maio de 2011, sendo 12 amostras/coletas em cada Micro-ambiente, totalizando 48 amostras), sendo assim distribuídos (Figura 6): Micro-ambiente 1 (MA1): Parte central da lagoa; Micro-ambiente 2 (MA2) (ambiente preservado): próximo da entrada do Rio Cachoeira Grande. Este rio não passa por residências, nascendo em mata preservada, que rodeia a lagoa, sendo considerado este sítio um “micro-ambiente” muito preservado; Micro-ambiente 3 (MA3) (ambiente não preservado): próximo à entrada do Rio Ribeirão Grande. Este rio agrega em seu curso algumas residências e por isso pode ser um alimentador de poluição na lagoa, sendo considerado este sítio de coleta um “Micro-ambiente” não preservado; Micro-ambiente 4 (MA4) (ambiente onde ocorre coleta de água e atividades recreacionais): local de onde a água é captada para posterior tratamento e distribuição para consumo humano (isso é realizado pela Companhia Catarinense de Água e Esgoto (CASAN). Além de servir para abastecimento, este Micro-ambiente é amplamente utilizado para atividades recreacionais, tais como banho, pesca artesanal e rituais religiosos.

As coletas realizadas na Lagoa do Peri foram possíveis graças à parceria com o Laboratório de Ecologia de Águas Continentais desta universidade (Universidade Federal de Santa

Catarina), sob coordenação do Prof. Dr. Maurício Mello Petrucio.

B: Nascente/Fonte (Sítio 2 de coleta) (Figura 7): Localizada em um terreno privativo no Bairro Itacorubi em Florianópolis-SC, a água provém de uma Nascente/Fonte superficial de água. Esta água não recebe tratamento para possível descontaminação da água, entretanto é usada para consumo humano. A Nascente/Fonte é envolvida por mata, porém como é uma área urbanizada, há residências em sua proximidade. Neste sítio as amostras foram coletadas mensalmente, de Fevereiro de 2011 até Janeiro de 2012, totalizando 12 amostras.

C: Solução Alternativa de Abastecimento Coletivo (SAC) (Sítio 3 de coleta) (Figura 8): água potável, proveniente de um sistema de abastecimento coletivo, Solução Alternativa de Abastecimento Coletivo (SAC) do bairro Saco Grande. Entende-se por SAC a modalidade de abastecimento coletivo destinada ao fornecimento de água potável, com captação subterrânea ou superficial, que abrange duas ou mais famílias, na qual o controle da qualidade da água deverá ser realizada por responsável técnico e monitorada quanto à sua potabilidade pelos órgãos responsáveis pela saúde pública local / Prefeitura Municipal (Portaria Federal do MS Nº 2.914 de 12 de dezembro de 2011). As coletas foram realizadas a partir da SAC ACOLJOGOC (Associação Comunitária do Loteamento João Gonzaga da Costa), que capta água de nascente, armazena em tanques para realizar a cloração (com pastilhas de cloro) e distribui para aproximadamente 50 famílias. Neste sítio as amostras foram coletadas mensalmente, de Fevereiro de 2011 até Janeiro de 2012, totalizando 12 amostras.



**Figura 6:** Sítio 1 de coleta, na Lagoa do Peri, onde 1, 2, 3 e 4 representam os Micro-ambientes (MAs) 1, 2, 3 e 4, respectivamente. Fonte: Adaptado de Hennemann & Petrucio (2011).



**Figura 7:** Sítio 2 de coleta, na Nascente/Fonte. (Imagem fotográfica: Mariana de Almeida do Nascimento).



**Figura 8:** Sítio 3 de coleta, na SAC, sendo as coletas realizadas nestes tanques reservatórios, mostrando as pastilhas de cloro utilizadas para tratamento da água.

#### 4.2 Avaliação dos Parâmetros Físico-químicos e de Nutrientes

As avaliações dos parâmetros físico-químicos e de nutrientes foram realizadas nos quatro Micro-ambientes (MAs) da Lagoa do Peri. Para isto, em cada coleta, os seguintes parâmetros físico-químicos foram avaliadas *in situ*, por meio de Sonda Multiparâmetros (YSI-85): temperatura da água (TA), condutividade (Cond.), pH e oxigênio dissolvido (OD). Para as análises de nutrientes, amostras de água, de cada sítio de coleta, foram levadas ao laboratório para determinar a quantidade de nitrito (N.NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) (GOLTERMAN et al., 1978), nitrato (N.NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) (MACKERETH et al., 1978) e amônia (N.NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) (KOROLEFF, 1976) (Estas análises foram realizadas em parceria com o Laboratório de Ecologia de Águas Continentais, Departamento de Ecologia e Zoologia da Universidade Federal de Santa Catarina, sob coordenação do Prof. Dr. Maurício Mello Petrucio)

#### 4.3 Concentração das Amostras de Águas

A concentração das amostras de águas foi realizada por meio do método de adsorção-eluição descrito por Katayama, Shimasaki & Ohgaki (2002), seguida de reconcentração em dispositivo Centriprep<sup>®</sup> YM50 (Millipore).

As amostras de água foram filtradas em sistema de vácuo com membrana negativamente carregada (Nihon Millipore) com 90 mm de diâmetro e 0,45 µm de porosidade

(Figura 9), com um fluxo de 200 mL/min. Previamente à filtração, o pH foi ajustado para 7,5-8,0 sendo que 25 mL de  $MgCl_2$  [2M] foi adicionado às amostras para que as partículas virais, naturalmente carregadas negativamente, fossem positivamente carregadas pela ação dos íons  $Mg^{2+}$ , permitindo a retenção dessas partículas na membrana negativamente carregada durante o processo de filtração. A membrana ainda foi lavada com 350 mL de solução de  $H_2SO_4$  [0,5mM] pH 3,0 para assegurar a retenção das partículas virais na mesma e remover restos de biossólidos presentes. Em seguida, a membrana foi retirada do filtro e em vidraria estéril, ocorreu a eluição viral, que foi realizada por meio da adição de 11 mL de NaOH [1mM] pH 10,5, que ficou em contato com a membrana sob agitação por 10 min. O eluato foi neutralizado pela adição de 50  $\mu$ L de solução de  $H_2SO_4$  [50mM] e 50  $\mu$ L de tampão Tris-EDTA [100X] a 1mM pH 8,0.

A amostra final, em um volume de aproximadamente 10 mL, foi reconcentrada utilizando-se o dispositivo Centriprep<sup>®</sup> YM50 (Millipore), resultando em um volume final de cerca de 5 mL, por meio de centrifugação a 1.500×g por 10 min a 4°C. Em seguida as amostras concentradas foram aliquotadas (0,6 mL) em tubos do tipo *eppendorf* e armazenadas em temperatura -80°C para as análises posteriores.



**Figura 9:** Sistema a vácuo de filtração, com capacidade para 5L de água, utilizado para a concentração viral; No canto direito inferior observa-se a membrana carregada eletronegativamente, responsável pela retenção das partículas virais.

#### **4.4 Avaliação da Recuperação Viral em Águas de Mananciais pelo Método de Adsorção-Eluição**

Para determinar a eficiência da recuperação viral após a concentração das amostras, usando o método descrito por Katayama, Shimasaki & Ohgaki (2002), foi utilizado como modelo viral o HAdV. Amostras de água proveniente dos sítios de coletas foram inoculadas artificialmente com uma quantidade conhecida deste vírus ( $2 \times 10^6$  UFP/mL). As amostras foram concentradas como descrito no item 4.3 e a recuperação viral foi mensurada por meio do ensaio de placa de lise (EPL) e por ensaio de cultura celular integrada a uma reação de RT-qPCR, precedida por tratamento enzimático (ICC-et-RT-qPCR), de acordo com o descrito nos itens 4.9.3 e 4.9.4, respectivamente.

#### **4.5 Extração do Material Genético**

O material genético viral das amostras foi extraído através do kit comercial RTP DNA/RNA Virus<sup>®</sup> Mini Kit II (Invitex), de acordo com as instruções do fabricante. A partir de um volume de 200µL de amostra foi extraído o material genético viral (origem DNA ou RNA).

#### **4.6 Reação de Transcrição Reversa**

As reações de transcrição reversa (RT) foram realizadas utilizando iniciadores randômicos para a síntese do DNA complementar (cDNA). O material genético purificado foi previamente desnaturado a 97°C por 5min e resfriado por 2min em banho de gelo. Posteriormente o material genético foi adicionado a uma mistura de: iniciador randômico [20pmoles] (Promega), 0,6mM de dNTPs (deoxinucleotídeos dATP, dTTP, dCTP e dGTP), 1U da enzima transcriptase reversa (MMLV-Promega) e 0,5U de inibidor de RNase (RNasin-Promega), em condições salinas adequadas. A reação ocorreu em equipamento termociclador, em ciclos de 37°C por 60 min e 65°C por 10 min.

#### **4.7 Quantificações dos Genomas Virais**

A fim de quantificar as cópias genômicas de HAdV, JCPyV, HAV e RVA presentes nas amostras, realizou-se PCR em tempo real (qPCR), utilizando o Kit Taqman Universal PCR *Master Mix* (Applied Biosystems). Este kit contém a maioria dos reativos necessários para que a PCR ocorra (dNTPs, enzima Taq DNA Polimerase, co-fator enzimático, condições salinas adequadas), sendo adicionados sondas e iniciadores (amplificam regiões conservadas no genoma dos vírus investigados). A sequência específica das sondas e iniciadores encontram-se disponíveis no Quadro 1.

**Quadro 1:** Iniciadores e sondas utilizados para quantificação em cópias genômicas de HAdV, JCPyV, HAV e RVA.

Iniciadores Sondas	Sequências	Referência
HAdV F	C(AT)TACATGCACATC(GT)C(CG)GG	Hernroth
HAdV R	C(AG)CGGGC(GA)AA(CT)TGCACCAG	et al.,
HAdV Sonda	FAMCCGGGCTCAGGTA	(2002)
	TCCGAGGCGTCC	
	T-TAMRA	
JCPyV F	ATGTTTGCCAGTGATGATGAAA	Pal
JCPyV R	GGAAAGTCTTTAGGGTCTTCTACCTTT	et al.,
JCPyV Sonda	FAMGATCCCAACACTCTACCCACCTAA	(2006)
	AAAGA-TAMRA	
HAV F	GGTAGGCTACGGGTGAAAC	Jothikumar
HAV R	GCGGATATTGGTGAGTTGTT	et al. (2005)
HAV Sonda	FAMCTTAGGCTAATACTTTATGAAGAGA	
	TGC-TAMRA	
RVA F	ACCATCTWCACRTRACCCTATGAG	Zeng
RVA R	GGTCACATAACGCCCTATAGC	et al. (2008)
RVA Sonda	VIC-AGTTAAAAGCTAACACTGTCAAA-	
	MGB	

Para a quantificação viral, como padrão de reação, foram utilizados fragmentos de DNAs/cDNAs, previamente clonados em plasmídeos com as sequências-alvo para os respectivos iniciadores e sondas (apresentados no Quadro 1) para cada tipo viral.

Quando se buscou por genomas de origem RNA, o material genético foi submetido à reação de transcrição reversa (RT) para síntese de cDNA, previamente descrito no item 4.6, este foi o caso dos genomas de HAV e RVA.

Os ensaios de qPCR foram realizados em duplicatas em placas de 96 cavidades (MicroAmp Applied Biosystems), contendo também controles negativos e positivos. Um volume de 15µL da reação (mistura) de qPCR foi distribuída em cada cavidade da placa e 5µL dos ácidos nucleicos (DNA ou cDNA), previamente diluídos a 1:10 (a fim de diluir os possíveis inibidores naturais presentes nas matrizes ambientais), foram adicionados. Em seguida, a placa foi selada com filme óptico (Applied Biosystems) e inserida no aparelho StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems).

As condições de termociclagens (temperaturas utilizadas e ciclos) para que a reação ocorresse foram para HAdV e JCPyV: 1 ciclo com 2 min a 50 °C e 10 min a 95°C seguido por 40 ciclos de 95°C por 15seg., 60°C por 1min e para HAV e RVA: 1 ciclo com 2 min a 50°C e 10 min a 95°C, seguido por 40 ciclos de 95°C por 10seg. de 65°C por 1min.

Os resultados foram analisados para mensurar a quantidade de CG/L (cópias genômicas por litro) virais contidas nas amostras.

#### **4.8 Estudo da Integridade de HAdV em Águas de Mananciais**

Este estudo teve por objetivo identificar partículas íntegras de adenovírus (HAdV) por meio de ensaio enzimático, a fim de degradar possíveis genomas virais livres presentes na matriz amostral e comparar os genomas totais detectados com os genomas provenientes de partículas virais íntegras. O ensaio enzimático foi realizado conforme descrito no item 4.8.1.

Este estudo contemplou amostras de água previamente positivas para HAdV em qPCR, que são usadas diretamente para consumo humano, como é o caso do sítio 1 (Lagoa do Peri, especificamente no Micro-ambiente 4 (local utilizado para coleta e tratamento de água de consumo humano e atividades recreacionais), sítio 2 (Fonte/Nascente de água) e sítio 3 (Solução Alternativa de Abastecimento Coletivo (SAC).

##### **4.8.1 Ensaio Enzimático**

Amostras de água, concentradas (como descrito do item 4.3), foram submetidas ao ensaio enzimático, utilizando a enzima DNase I, segundo Viancelli et al.,(2011).

Para isso, uma mistura de reação contendo 180µL de água concentrada, tampão de enzima 1x e 1U de DNase I (Sigma) foi incubada por 15 min à temperatura ambiente (esta etapa tem por objetivo degradar o material genético livre). A enzima foi então inativada com 25mM de EDTA, seguido de incubação por 10 min a 65°C. As amostras foram submetidas à extração de ácidos nucleicos e a qPCR foi executada para detecção de genomas de HAdV, conforme descrito nos itens 4.5 e 4.7, respectivamente.

Com o objetivo de verificar os potenciais inibidores da atividade da enzima DNase I presentes na matriz amostral, uma quantidade conhecida de adenovírus humano-2 (HAdV-2) previamente inativado por 1h a 99°C seguido por 30min sob radiação U.V, foi adicionado em amostra concentrada de água (negativa para HAdV) e em água livre de nucleases, como controle da reação. Todas as reações enzimáticas foram

realizadas utilizando 1U de DNase I (o suficiente para degradar 100% do DNA adicionado), 1x tampão da enzima, 180µL de água livre de nuclease ou amostra concentrada e incubadas por 15min à temperatura ambiente. A enzima foi inativada com 25mM EDTA seguida de incubação por 10min a 65°C. Posteriormente os ácidos nucléicos foram extraídos e a qPCR foi executada, conforme descrito nos itens 4.5 e 4.7, respectivamente. (Este ensaio foi realizado durante o desenvolvimento do Trabalho de Conclusão de Curso (subprojeto da presente dissertação) da aluna Mariana de Almeida do Nascimento).

#### **4.9 Estudo da Infeciosidade de HAdV em Águas de Mananciais**

Este estudo teve por objetivo identificar partículas infecciosas/viáveis de HAdV por meio de ensaios em cultura celular e de cultura celular integrada a técnicas moleculares.

Duas técnicas foram utilizadas para acessar a infeciosidade viral: ensaio de formação de placa de lise (EPL) (técnica já estabelecida no Laboratório de Virologia Aplicada - UFSC) e Ensaio RT-qPCR - precedido por tratamento enzimático (et) integrado à cultura celular (ICC-et-RT-qPCR) (técnica estabelecida e padronizada neste trabalho de dissertação).

Este estudo contemplou amostras de água usadas diretamente para consumo e atividades humanas, como é o caso do sítio1 (Lagoa do Peri, especificamente no Micro-ambiente 4-local utilizado para coleta e tratamento de consumo humano e atividades recreacionais), sítio 2 (Fonte/Nascente de água, utilizada para consumo humano sem tratamento prévio) e sítio 3 (Solução Alternativa de Abastecimento Coletivo-SAC- utilizada para consumo humano).

##### **4.9.1 Linhagem Celular**

O crescimento e cultivo da linhagem celular A549 (células epiteliais derivadas de carcinoma de pulmão humano e permissivas à maioria dos adenovírus humanos) foi realizado em garrafas de cultura celular (75cm<sup>2</sup>), utilizando como meio de crescimento: meio mínimo essencial com Sais de Eagle (MEM), suplementado com 5% de soro fetal bovino [(SFB) Gibco], 1%

de antibióticos e antifúngico [(PSA Cultilab-penicilina G 100U/mL/sulfato de estreptomicina 100 g/mL/anfotericina B 0,25 g/mL)].

#### **4.9.2 Ensaio de citotoxicidade das amostras de água concentradas**

A fim de testar a citotoxicidade das amostras ambientais frente às células A549, foram realizados ensaios de citotoxicidade. Para isso, células A549 foram propagadas em placas de cultivo celular de 24 poços, na concentração de  $2,5 \times 10^5$  células por poço, conforme descrito no item 4.9.1, porém sem adição de SFB, 24h antes da realização dos ensaios.

As amostras ambientais, concentradas como descrito no item 4.3, foram previamente tratadas com 1% de antibiótico/antifúngico (penicilina G 100U/ml / estreptomicina 100µg/ml de anfotericina B 0,25µg/ml) e diluídas em MEM 1X, nas seguintes proporções: 1:2, 1:10 e 1:20. Um inóculo de 100µl de cada uma das diluições, em triplicata, foi colocado em contato com as células durante 1h, a 37°C em atmosfera CO<sub>2</sub> 5% e agitação uniforme a cada 15 min. Posteriormente, o inóculo foi removido e 1mL de MEM, contendo 1% de PSA, foi adicionado às células, três controles celulares foram mantidos e estes continham apenas células e meio de manutenção. As placas foram incubadas a 37°C, em atmosfera 5% de CO<sub>2</sub> e a monocamada celular foi monitorada durante sete dias.

Células que continham amostras testes inoculadas foram comparadas com os controles celulares em microscópio de luz. Sequencialmente, as células foram fixadas e coradas com 300µL da solução de Preto de Naftaleno (0,1% Preto de Naftaleno, 5% Ácido Acético, pH 2,3-2,4). O tapete celular corado foi analisado e a diluição não citotóxica, para cada uma das matrizes de água, foi estabelecida, a fim de ser utilizada nos ensaios de infecciosidade/viabilidade viral.

#### **4.9.3 Ensaio de Placa de Lise (EPL)**

O ensaio de placa de lise (EPL), adaptado de Cromeans et al. (2008) e Rigotto et al. (2011), foi realizado por ser capaz de quantificar partículas de HAdV infecciosas em amostra teste ou em fluido viral. Consiste resumidamente, em infectar células,

no mínimo em triplicatas, permissivas ao vírus (neste caso células A549) e encobrir a monocamada celular com uma camada ágar (Bacto Ágar) ou Carboximetilcelulose que, por aumentarem a densidade do meio, impedem que os vírus se espalhem rapidamente para outras células, o que favorece sua propagação apenas para as células vizinhas, obtendo-se desta forma, placas resultantes da lise celular. Estas placas são contabilizadas como unidades formadoras de placas de lise (UFP).

Para isso, células A549 foram cultivadas por 24h em placas de 6 cavidades, em meio Dulbecco modificado com sais de Eagle (DMEM-AG) – Alta Glicose, suplementado com 1mM de piruvato de sódio, 1% de antibióticos e antifúngico (PSA Cultilab-penicilina G 100U/mL/sulfato de estreptomicina 100 g/mL/anfotericina B 0,25 g/mL) a 37°C e atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>. Amostras de águas, em diluição não citotóxica (1:2) foram tratadas com 1% de antibióticos e antifúngico (PSA Cultilab-penicilina G 100U/mL/sulfato de estreptomicina 100 g/mL/anfotericina B 0,25 g/mL).

A monocamada celular foi lavada por três vezes com Tampão Fosfato Salina (PBS), posteriormente 250µL de cada amostra teste foi inoculado, às células. As placas foram incubadas por 1 h a 37°C sob rotação (movimentação uniforme) a cada 15 min. Em seguida, os inoculos foram removidos e adicionou-se em cada cavidade 2,5 mL de uma mistura contendo: 0.6 % de Bacto-ágar (previamente aquecido), 4% de soro bovino fetal (Gibico), 0.1mM de piruvato de sódio, 2% de antibióticos e antifúngico (PSA Cultilab-penicilina G 100U/mL/sulfato de estreptomicina 100 g/mL/anfotericina B 0,25 g/mL 10 U/mL penicillin) 25mM MgCl<sub>2</sub> e DMEM-AG. As placas foram incubadas a 37°C em atmosfera de CO<sub>2</sub>-5% por sete dias.

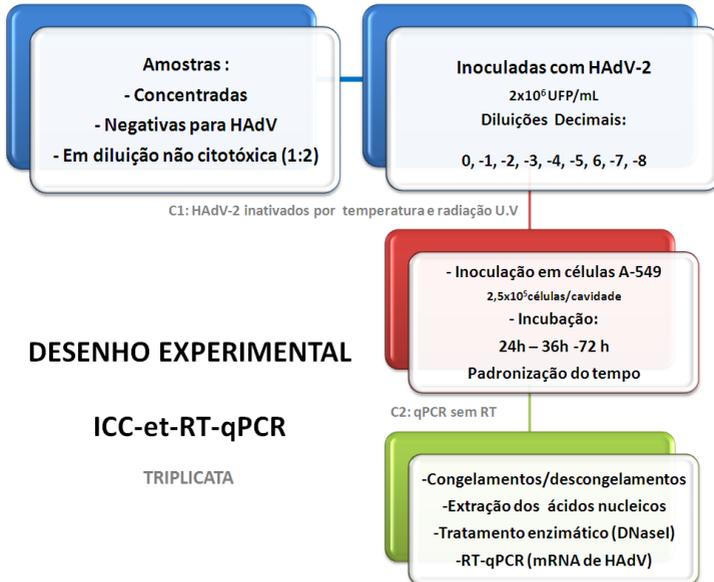
A monocamada celular foi monitorada diariamente e ao término dos sete dias de incubação o meio foi removido por aspiração, as células foram coradas utilizando solução de 20% do corante Cristal Violeta e as unidades formadoras de placa (UFP) foram contabilizadas.

#### **4.9.4 ICC-et-RT-qPCR**

O ensaio de ICC-et-RT-qPCR, adaptado de Ko et al. (2003) e Rigotto et al. (2010), consiste em quantificar o número de partículas virais infecciosas presentes em amostras teste ou em suspensões virais, por meio de cultura celular integrada a técnica molecular (RT-qPCR) precedida por ensaio enzimático com DNase I. Imediatamente após a extração dos ácidos nucleicos totais é realizado o tratamento enzimático (et), com DNase I, com o objetivo de degradar genomas de DNA na amostra, ficando somente o RNA viral transcrito durante a replicação do vírus. Uma reação de transcrição reversa (RT) é necessária para obtenção do cDNA seguido de qPCR para quantificação do número de cópias genômicas (CG) totais provenientes de vírus infecciosos.

#### **4.9.4.1 Padronização do Ensaio de ICC-et-RT-qPCR e Teste de Equivalência das Unidades “UFP” e “CG”**

Este ensaio teve por objetivo prever uma medida de equivalência no momento de quantificar os vírus por meio do EPL (em unidade formadora de placa de lise (UFP)) ou por ICC-et-RT-qPCR (em cópias genômicas (CG)), além de determinar a habilidade e sensibilidade do ICC-et-RT-qPCR em detectar partículas virais infecciosas em águas ambientais de mananciais, bem como padronizar as melhores condições experimentais para o ensaio. O fluxograma apresentado na Figura 10, resume a estratégia experimental aplicada.



**Figura 10:** Fluxograma mostrando o delineamento experimental básico utilizado para a padronização do ensaio de ICC-et-RT-qPCR para detecção de HAdV em águas de mananciais superficiais.

Células A549 (densidade celular  $2,5 \times 10^5$  células/cavidade) foram cultivadas em placas de 24 cavidades, como descrito no item 4.9.1, porém sem SFB, e as amostras testes (amostras de águas concentradas e sabidamente negativas para HAdV) foram contaminadas artificialmente com  $2 \times 10^6$  UFP/mL de HAdV, em presença de 1% de antibióticos e antifúngico (PSA Cultilab-penicilina G 100U/mL/sulfato de estreptomicina 100 g/mL/anfotericina B 0,25 g/mL). Em seguida foram realizadas diluições decimais seriadas das amostras ( $10^0$ ,  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$  e  $10^{-8}$ ) em matriz de água de manancial, também negativas para HAdV e um inóculo de 100µL de cada diluição foi adicionado, em triplicata, às células. As placas foram incubadas a 37°C em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>, durante 1 h, e agitadas uniformemente a cada 15min. Em seguida o inóculo foi aspirado e 1 mL de MEM 1X foi adicionado nas cavidades da placa, sendo esta re-incubada, nas mesmas condições, durante 24h, 36h (tempo estimado de 1 ciclo de replicação do HAdV-2) e 72h (tempo estimado de 2 ciclos de replicação do HAdV-2). Como controle

de qualidade e validação do teste, foi utilizada uma quantidade conhecida de adenovírus humano-2 (HAdV-2), previamente inativado por 1 h a 99°C e 30 min sob radiação U.V.

Após os períodos de incubação as células foram congeladas e descongeladas por 3 vezes, a fim de promover a lise celular e o material genético foi extraído (item 4.5) seguindo-se posteriormente a um tratamento enzimático (et) (item 4.8.1) , para a transcrição reversa (RT) (item 4.6) e a qPCR foi realizada (item 4.7).

Determinadas as condições ideais para realizar o ICC-et-RT-qPCR, as amostras de águas de consumo humano, positivas em qPCR para HAdV e em diluições não citotóxicas, foram submetidas a este mesmo ensaio.

#### **4.10 Sequenciamento Gênico e Estudos Filogenéticos de HAdV**

Para a amplificação gênica de fragmentos de HAdV foi utilizado o protocolo descrito por Allard et al. (1992), a fim de gerar um produto de PCR de 300pb.

Os iniciadores hexAA1885-5'GCCCCGAGTGGTCTTACATGCACATC 3' e hexAA1913-5'CAGCACGCCGCGGATGTCAAAGT3' foram utilizados para amplificar uma região do genoma de HAdV que codifica para a proteína *hexon* do capsídeo viral. Para a amplificação, 5µL de ácidos nucleicos, extraídos a partir das amostras de água de consumo humano, foram adicionados a uma mistura contendo: condições salinas adequadas, 20 pmoL de cada iniciador, 0,1mM de dATP, dCTP, dTTP e dGTP; 1,5mM de MgCl<sub>2</sub> , 1U/µL da enzima Taq DNA polimerase (Promega Corporation, Madison, USA), totalizando um volume de 25µL . A reação ocorreu em aparelho termociclador, nas seguintes temperaturas e ciclagens: 1 ciclo de 94°C por 5 min, seguindo-se de 40 ciclos de 94°C por 1 min, 56°C por 1 min e 72°C por 45 seg. e extensão final de 72°C por 10 min.

Os produtos amplificados (amplicons), foram submetidos a eletroforese em gel de agarose a 1%, observados e fotodocumentados por meio de transluminador/fotodocumentador acoplado em luz U.V (BioAmerica®).

Amostras de águas de consumo humano que continham partículas íntegras de HAdV foram selecionadas para realização do sequenciamento gênico e análises filogenéticas. Para isso, iniciadores descritos por Allard et al. (1992), dirigidos para a região do genoma viral que codifica para a proteína *hexon* do capsídeo (posição no genoma 1885-1913 pb), foram utilizados para realizar a PCR (de acordo com o descrito no item 4.10.1) gerando um produto amplificado de aproximadamente 300 pb.

Os amplicons foram purificados com ExoSAP-IT (GE Healthcare UK Ltda, Buckinghamshire, UK). O sequenciamento foi realizado utilizando a plataforma Genetic Analyzer 3130 (Applied Biosystems) e o reativo Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit v.3.1 (Applied Biosystems), segundo as recomendações do fabricante. Para cada amostra/produto de PCR foi realizado o sequenciamento quatro vezes em ambos os sentidos (direto e reverso).

A qualidade das sequências gênicas foi verificada e em seguida alinhadas (formação dos *contigs*) utilizando o pacote BioEdit 7.0.5 (HALL, 1999), e ContigExpress (InforMax, Inc.). Posteriormente, as sequências obtidas foram comparadas com as disponíveis no GenBank utilizando a ferramenta BLAST (ALTSCHUL et al., 1997).

O estudo filogenético foi realizado, utilizando sequências de nucleotídeos, por meio do software MEGA 5.0 (TAMURA et al., 2011) e a análise de homologia (história evolutiva) foi deduzida utilizando o método da máxima verossimilhança baseada nos parâmetros do modelo Kimura 2 (utilizando 500 repetições) (KIMURA, 1980).

#### **4.10.1 Modelagem da Proteína hexon de HAdV**

A partir das sequências de aminoácidos (obtidas por meio das análises dos produtos sequenciados) foi possível prever a estrutura secundária da proteína *hexon* do capsídeo HAdV, inferindo a modelagem proteica por homologia, também conhecido como modelagem comparativa, utilizando o programa Phyre2.

#### 4.11 Análises Estatísticas

Análises de variância não paramétrica (Kruskal-Wallis) foram utilizadas para avaliar a diferença espacial, quanto aos parâmetros físico-químicos e de nutrientes, entre os Micro-ambientes da Lagoa do Peri, considerando diferença significativa quando  $P < 0,05$ . Essas análises foram realizadas no programa Statistic 7.0.

Para as análises de correlações o Teste de Correlação de *Pearson* foi utilizado; para avaliar a influência da sazonalidade na distribuição viral utilizou-se o Teste ANOVA e quando necessário, o Teste *t Student* foi aplicado, com a finalidade de avaliar a significância dos resultados, considerando valores significativos quando  $P < 0,05$ . Estas análises foram realizadas no programa GraphPad (Prism 5.0, EUA).

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Avaliação dos Parâmetros Físico-químicos e de Nutrientes

Amostras provenientes da Lagoa do Peri foram avaliadas mensalmente, durante um ano, quanto aos seus parâmetros físico-químicos (temperatura da água- (TA), condutividade (Cond.), potencial de hidrogênio (pH) e oxigênio dissolvido (OD) e de nutrientes (nitrito ( $\text{N.NO}_2^-$ ), nitrato ( $\text{N.NO}_3^-$ ) e nitrogênio amoniacal ( $\text{N.NH}_4^+$ ). Os resultados das análises dos parâmetros físico-químicos e de nutrientes estão apresentados na Tabela 1.

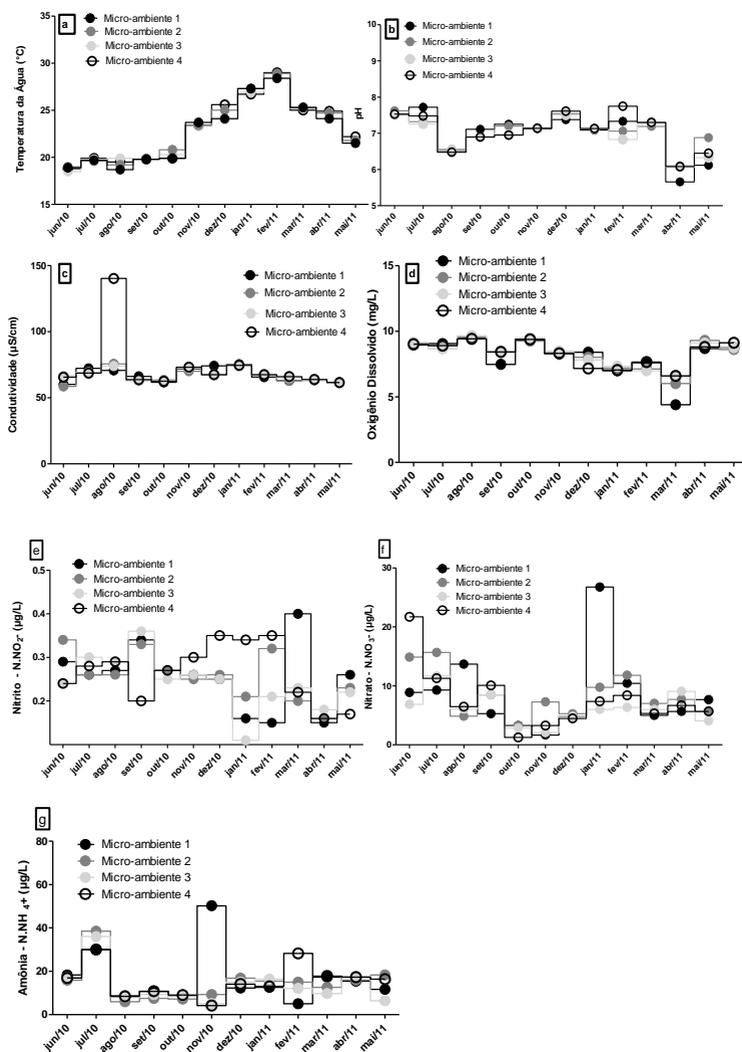
**Tabela 1:** Parâmetros físico-químicos e de nutrientes dos quatro Micro-ambientes da Lagoa do Peri ( $n=12$  por micro-ambiente).

Parâmetros	MA1	MA2	MA3	MA4
	Média±DP (min-max)	Média±DP (min-max)	Média±DP (min-max)	Média±DP (min-max)
TA (°C)	22,6±3,34 (18,7-28,4)	22,9±3,36 (19,0-28,9)	22,7±3,18 (18,5-28,4)	22,9±3,36 (18,8-29,0)
Cond. ( $\mu\text{s cm}^{-1}$ )	67,2±5,40 (60,2-75,4)	66,5±5,32 (58,6-75,7)	67,3±4,58 (61,2-74,9)	72,9±21,58 (61,5-140,3)
pH	7,0±0,60 (5,7-7,7)	7,0±0,42 (6,1-7,6)	7,0±0,45 (6,1-7,5)	7,1±0,52 (6,1-7,8)
OD ( $\text{mg L}^{-1}$ )	8,1±1,40 (4,4-9,45)	8,3±1,07 (6,0-9,6)	8,4±0,99 (6,6-9,6)	8,3±0,97 (6,6-9,4)
$\text{N.NO}_2^-$ ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	0,3±0,07 (0,1-0,4)	0,3±0,09 (0,1-0,4)	0,2±0,08 (0,1-0,4)	0,2±0,08 (0,1-0,3)
$\text{N.NO}_3^-$ ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	8,5±6,62 (1,7-26,7)	6,8±3,13 (1,3-12,5)	6,3±3,74 (1,7-13,3)	7,9±4,46 (3,3-18,1)
$\text{N.NH}_4^+$ ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	16,7±12,32 (5,0-50,2)	14,5±8,31 (4,5-36,7)	12,2±9,17 (4,5-37,0)	13,3±8,09 (1,8-31,5)

**MA:** Micro-ambiente; **DP:** desvio padrão; **min-max:** mínimo-máximo.

Durante os 12 meses de amostragem nos Micro-ambientes da Lagoa do Peri, todas as variáveis físico-químicas e de nutrientes monitoradas apresentaram variações temporais significativas, no entanto estes

parâmetros não tiveram variações espaciais significativas, como mostra a Figura 11 (a, b, c, d, e, f, g).

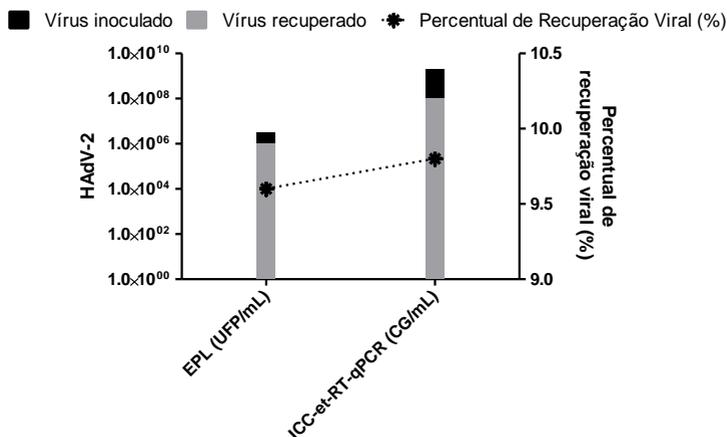


**Figura**

**11:** Resultados da quantificação mensal (Junho/2010 a Maio/2011) dos parâmetros físico-químicos (a, b, c, d) e de nutrientes (e, f e g) nos Micro-ambientes 1, 2, 3 e 4 da Lagoa do Peri.

## 5.2 Ensaios de Recuperação Viral

A taxa média de recuperação viral, pelo método de concentração adsorção-eluição em membrana eletronegativa, mensurada por EPL e por ICC-et-RT-qPCR, a partir de águas de mananciais utilizadas para consumo humano, foi de aproximadamente 10% nas duas técnicas, ou seja, no ensaio de EPL foram inoculados  $2 \times 10^6$  UFP/mL de HAdV-2 e recuperado  $1,5 \times 10^5$  UFP/mL; No ensaio de ICC-et-RT-qPCR foram inoculados  $3 \times 10^9$  CG/mL de HAdV-2 e recuperados  $1,2 \times 10^8$  CG/mL. Estes valores estão graficamente representados na Figura 12.



**Figura 12:** Taxa de recuperação viral obtida após concentração de HAdV-2 em amostras de água de manancial, mensurada pelas técnicas de EPL e ICC-et-RT-qPCR. Nas barras pretas e cinzas (eixo esquerdo) o valor de HAdV-2 inoculado e recuperado em UFP/mL e em CG/mL, respectivamente e na linha (eixo direito) o percentual de recuperação viral pelas técnicas de EPL e ICC-et-RT-qPCR.

## 5.3 Detecção dos Genomas Virais

Um total de 72 amostras foram analisadas quanto a presença e quantificação de genomas de HAdV, JCPyV, HAV e RVA, sendo as seguintes amostras avaliadas: 12 provenientes da SAC, 12 da Nascente/Fonte e 48 da Lagoa do Peri, sendo dessas últimas 12 provenientes do Micro-ambiente 1 (centro da lagoa), 12 do Micro-ambiente 2 (ambiente preservado), 12 do Micro-ambiente 3 (ambiente degradado) e 12 do Micro-ambiente 4 (ambiente utilizado para coleta de

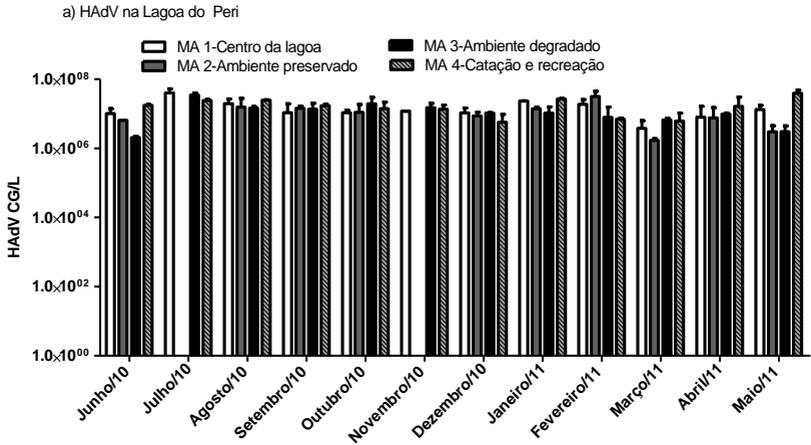
água para consumo humano e recreação). Dessas, globalmente, 93% (67/72) foram positivas para HAdV; 45,8% (33/72) foram positivas para RVA; 13,8% (10/72) foram positivas para JCPyV e 12,5% (9/72) positivas para HAV.

As Figuras 13 (a, b, c, e) e 14 (a,b) apresentam os perfis virais nos sítios de coleta, onde: Amostras do MA1 da Lagoa do Peri apresentaram 100% (12/12) de positividade para HAdV, 50% (6/12) para RVA e 16,6% (2/12) para JCPyV, não sendo detectadas cópias genômicas de HAV; Amostras provenientes do MA2 da Lagoa do Peri apresentaram 83,3% (10/12) de positividade para HAdV, 50% (6/12) para RVA, não sendo detectadas cópias genômicas de HAV nem de JCPyV; Amostras provenientes do MA3 da Lagoa do Peri apresentaram 100% (12/12) de positividade para HAdV, 75% (9/12) para RVA, 33,3% (4/12) para JCPyV e 16,6% (2/12) para HAV e amostras provenientes do MA 4 da Lagoa do Peri apresentaram 100% (12/12) de positividade para HAdV, 83,3% (10/12) para RVA, 33,3% (4/12) para JCPyV e 33,3% (4/12) para HAV. Amostras provenientes da SAC apresentaram 91% (11/12) de positividade para HAdV, 25% (3/12) para HAV, não sendo detectadas cópias genômicas de JCPyV nem de RVA e as amostras das Nascente/Fonte apresentaram 75% (9/12) de positividade para HAdV, 16,66% (2/12) para RVA, não sendo detectadas cópias genômicas de HAV nem de JCPyV.

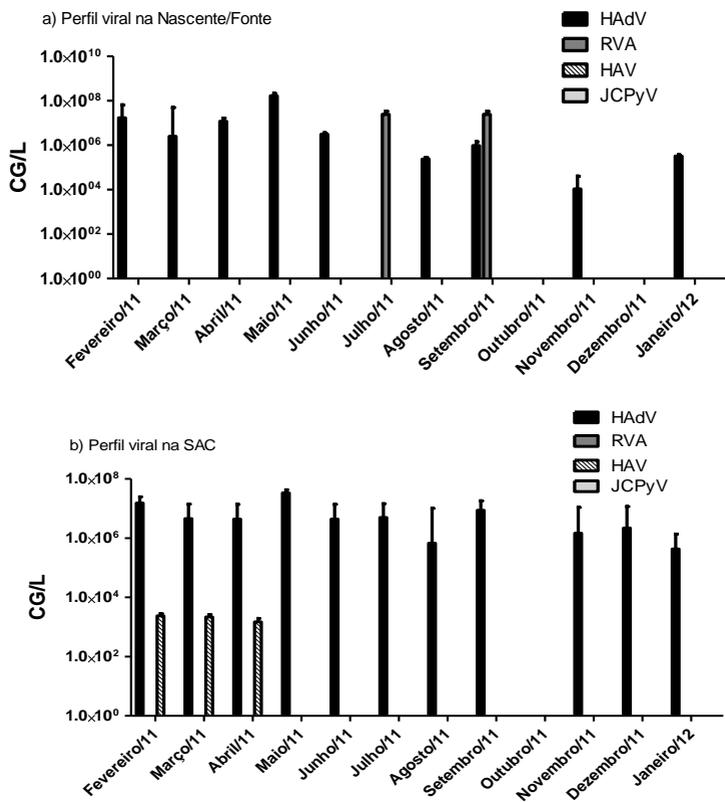
A Tabela 3 sumariza os resultados obtidos na quantificação dos vírus presentes nas amostras de água de manancial utilizadas para consumo humano, durante um ano de monitoramento. Os valores correspondem ao intervalo do número de cópias genômicas por litro de água (valores mínimos e máximos), bem como a média geral de CG virais em cada sítio de coleta.

Os locais de coleta que apresentaram todos os vírus analisados foram os Micro-ambientes 3 (ambiente não preservado) e 4 (coleta de água e recreação) da Lagoa do Peri. O HAdV foi o vírus mais prevalente em todos os pontos, seguido pelo RVA que apenas não foi encontrado na SAC.

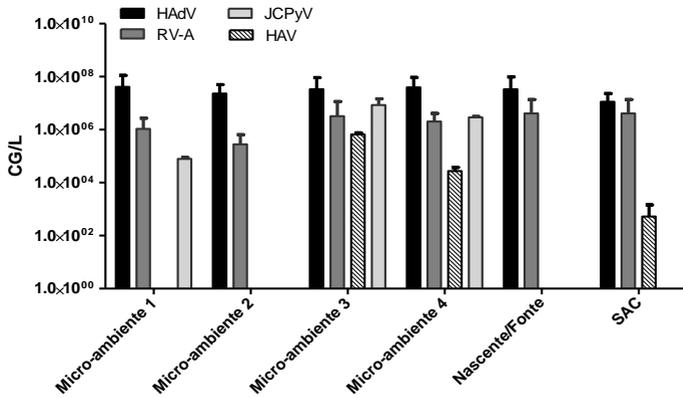
A Figura 15 apresenta a média geral de HAdV, JCPyV, RVA e HAV na Lagoa do Peri, na Nascente/Fonte e na e SAC.



**Figura 13:** Resultados da quantificação dos vírus (média de CG/L) nos Micro-ambientes 1, 2, 3 e 4 da Lagoa do Peri, onde: a) quantificação de HAdV; b) quantificação de JCPyV; c) quantificação de RVA e c) quantificação de HAV.



**Figura 14:** Resultados da quantificação dos vírus estudados (média de CG/L), na Nascente/Fonte (a) e SAC (b).



**Figura 15:** Média global de HAdV, JCPyV, RVA e HAV em todos os sítios de coleta (Lagoa do Peri: Micro-ambientes 1, 2, 3 e 4; Nascente Fonte e SAC).

**Tabela 2:** Média geral e intervalo (mínimo e máximo) do número de cópias genômicas virais detectadas nos sítios de coletas.

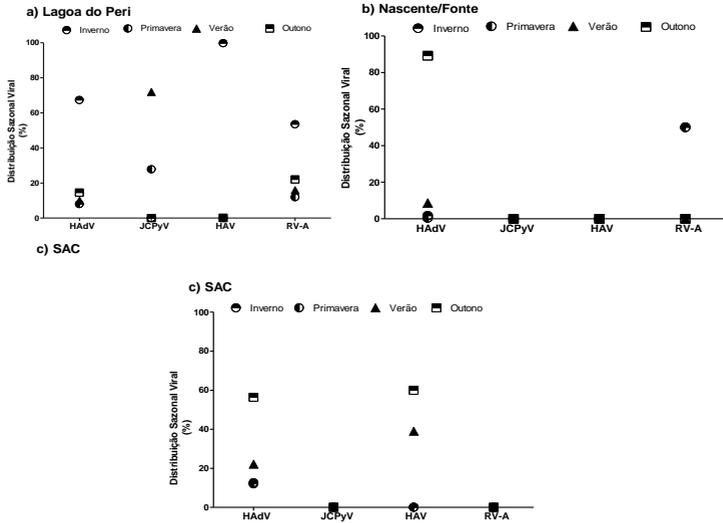
Origem Amostral	HadV CG/L	JCPyV CG/L	RVA CG/L	HAV CG/L
	Média min-max	Média min-max	Média min-max	Média min-max
SAC	6,7x10 <sup>6</sup> (11/12) 4,3x10 <sup>5</sup> - 3,3x10 <sup>7</sup>	ND	ND	5,0x10 <sup>2</sup> (3/12) 1,4x10 <sup>3</sup> - 2,3x10 <sup>3</sup>
Nascente/Fonte	1,6x10 <sup>7</sup> (9/12) 1,0x10 <sup>4</sup> - 1,6x10 <sup>8</sup>	ND	3,2x10 <sup>6</sup> (2/12) 1,2x10 <sup>7</sup> - 2,4x10 <sup>7</sup>	ND
Peri MA 1	4,1x10 <sup>7</sup> (12/12) 2,5x10 <sup>6</sup> - 2,4x10 <sup>8</sup>	7,9x10 <sup>3</sup> (2/12) 4,1x10 <sup>4</sup> - 5,4x10 <sup>4</sup>	5,4x10 <sup>5</sup> (6/12) 1,7x10 <sup>5</sup> - 9,4x10 <sup>5</sup>	ND
Peri MA 2	2,3x10 <sup>7</sup> (10/12) 1,7x10 <sup>6</sup> - 9,2x10 <sup>7</sup>	ND	2,7x10 <sup>5</sup> (6/12) 1,3x10 <sup>5</sup> - 1,0x10 <sup>6</sup>	ND
Peri MA 3	3,3x10 <sup>7</sup> (12/12) 4,0x10 <sup>6</sup> - 2,0x10 <sup>8</sup>	8,0x10 <sup>5</sup> (4/12) 1,8x10 <sup>5</sup> - 3,0x10 <sup>6</sup>	2,4x10 <sup>7</sup> (9/12) 1,2x10 <sup>5</sup> - 2,5x10 <sup>7</sup>	1,1x10 <sup>4</sup> (2/12) 7,8x10 <sup>1</sup> - 1,3x10 <sup>5</sup>
Peri MA 4	3,9x10 <sup>7</sup> (12/12) 2,0x10 <sup>6</sup> - 1,4x10 <sup>8</sup>	2,0x10 <sup>6</sup> (4/12) 5,8x10 <sup>6</sup> - 6,0x10 <sup>6</sup>	1,6x10 <sup>6</sup> (10/12) 2,1x10 <sup>5</sup> - 6,5x10 <sup>6</sup>	2,73x10 <sup>3</sup> (4/12) 1,5x10 <sup>2</sup> - 2,0x10 <sup>4</sup>

**min-max:** valor mínimo-máximo detectado - **ND:** Não detectado.

## 5.4 Distribuição Sazonal dos Vírus

A Figura 16 (a, b e c) apresenta graficamente a avaliação sazonal viral na Lagoa do Peri, na Nascente e na SAC. Na Lagoa do Peri como um todo (considerando os Micro-ambientes 1, 2, 3 e 4), os vírus tiveram a seguinte distribuição sazonal: HAdV: 67% no inverno; 8% na primavera, 10% no verão e 14% no outono; JCPyV: 28% na primavera e 72% no verão; RVA: 54% no inverno; 12% na primavera, 16% no verão e 22% no outono; HAV: 99% no inverno e 1% no outono (valor não significativo). Na Nascente/Fonte a distribuição sazonal dos vírus foi: HAdV: 2% no inverno, 7% no verão, 0,5% na primavera (valor não significativo) e 89% no outono; RVA: 50% no inverno e 50% na primavera; HAV e JCPyV não ocorreu neste sítio de coleta. Na SAC os vírus estiveram distribuídos da seguinte forma: HAdV: 12% no inverno, 12,6% na primavera, 22,1 no verão e 56,4% no outono; HAV: 60% no outono e 39% no verão; JCPyV e RVA não ocorreu neste sítio de coleta.

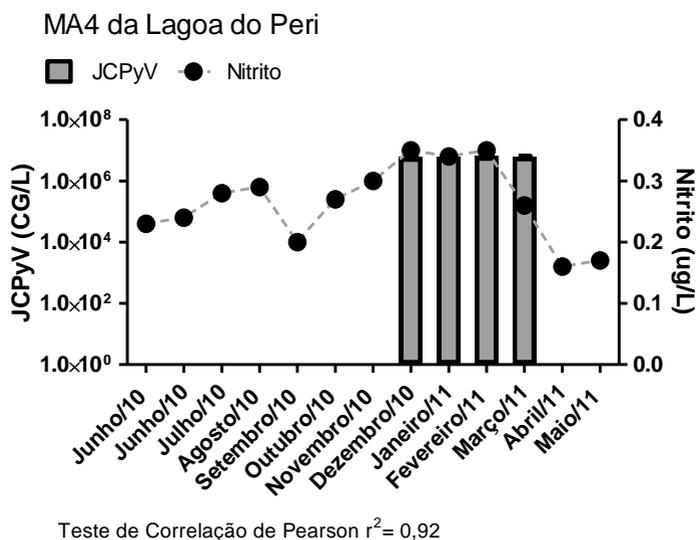
Quanto a correlação entre os vírus e as estações do ano, na Lagoa do Peri HAdV, RVA e HAV estiveram principalmente presentes no inverno, enquanto JCPyV foi restrito a primavera e verão. A presença de HAdV, RVA e HAV teve uma correlação positiva, estatisticamente comprovada, durante a estação de inverno, já o HAdV e o RVA foram correlacionados positivamente em todas as estações. Na SAC a presença de HAdV e HAV foram positivamente correlacionadas no outono, porém HAdV ocorreu durante todas as estações do ano, prevalentemente no outono e HAV apenas no verão e outono, porém prevalentemente no outono. Na Nascente/Fonte HAdV e RVA apresentaram correlação negativa no inverno e na primavera (a presença de RVA significou a diminuição de HAdV), exatamente o contrário do perfil apresentado na Lagoa do Peri, onde HAdV e RVA foram positivamente correlacionados.



**Figura 16:** Distribuição sazonal de HAdV, JCPyV, HAV e RVA nos sítios de coleta monitorados, onde: a) na Lagoa do Peri; b) na Nascente/Fonte e c) na SAC.

## 5.5 Correlação dos Parâmetros Físico-químicos e Nutrientes com a presença de Vírus

Dados físico-químicos (TA, pH, OD e Cond.) e de nutrientes (nitrito, nitrato e amônia), dos Micro-ambientes da Lagoa do Peri, foram submetidos ao teste de correlação com os vírus avaliados (HAdV, JCPyV, RVA e HAV) e foi determinada apenas uma correlação, sendo ela positiva, entre nitrito e JCPyV no Micro-ambiente 4, local utilizado para atividades recreacionais e coleta de água para tratamento e distribuição para consumo humano (Figura 17). Os demais parâmetros não apresentaram nenhum tipo de correlação com os vírus avaliados na Lagoa do Peri.



**Figura 17:** Correlação positiva entre Nitrito e JCPyV no Micro-ambiente 4 da Lagoa do Peri.

## 5.6 Avaliação da Integridade de HAdV

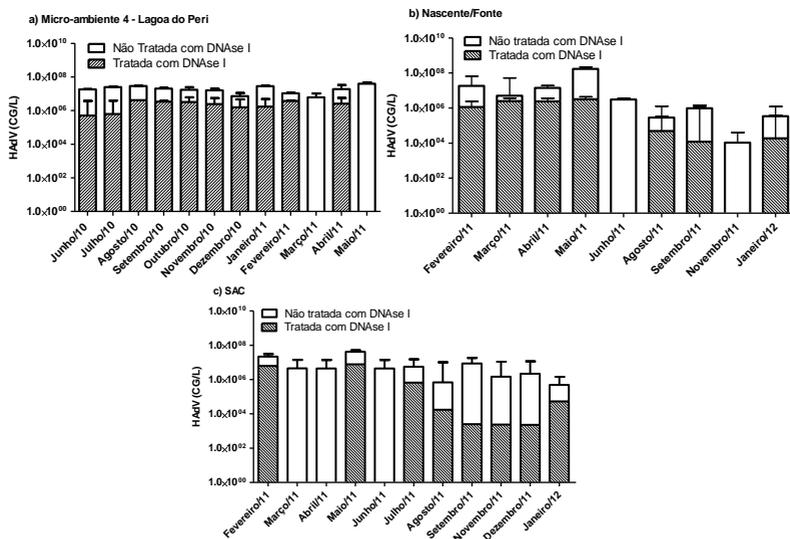
O HAdV foi o vírus mais prevalente em todas as amostras e em todos os sítios de coleta (considerando o genoma detectado em qPCR). Devido a essa alta prevalência aliada ao fato de estes vírus serem candidatos a marcadores virais de contaminação ambiental, principalmente em águas de consumo humano, avaliou-se, por meio de ensaio enzimático, a integridade das partículas virais detectadas nas amostras de água, o que possibilitou avaliar se os genomas quantificados em qPCR eram provenientes de partículas de HAdV íntegras ou de genomas virais livres.

Amostras de águas de mananciais provenientes de sítios destinados ao consumo e atividades humanas (Micro-ambiente 4 (MA4) da Lagoa do Peri, SAC e Nascente/Fonte) e que apresentaram positividade em qPCR para HAdV foram contempladas com tal análise. O MA4 apresentou CG de HAdV em todas as coletas, a Nascente/Fonte não apresentou CG de HAdV nas coletas de Julho, Outubro e Dezembro/2011 e a SAC só não apresentou CG de HAdV na coleta de Outubro, como apresentado anteriormente nas Figuras 13 e 14 (a,b),

respectivamente. Primeiramente, foi realizado o teste de inibição da atividade enzimática (DNase I) frente às amostras de águas de mananciais. O teste revelou que as amostras de águas concentradas não continham inibidores que pudessem interferir na atividade da DNase I, pois os resultados obtidos em amostras inoculadas com HAdV inativado/degradado e em água livre de nucleases foram idênticos.

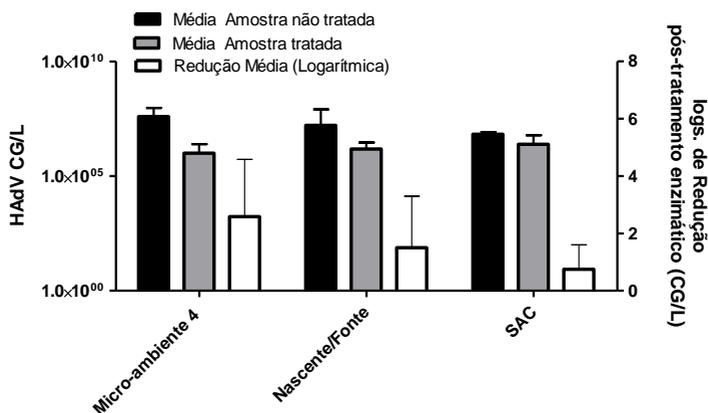
Quanto à integridade viral, 32 amostras foram avaliadas, sendo 12 provenientes do MA4 da Lagoa do Peri, 9 da Nascente/Fonte e 11 da SAC. Destas, 78% (25/32) apresentaram partículas virais íntegras, sendo que 83% (10/12) pertenciam ao MA4 da Lagoa do Peri, 77,7% (7/9) à Nascente/Fonte e 66,6% (8/11) à SAC.

Na Figura 18 (a, b, c) é possível comparar o número de CG totais com o número de CG provenientes de partículas de HAdV íntegras, em cada amostra analisada e em cada sítio de coleta. No MA4 da Lagoa do Peri: coletas dos meses de Março/11 e Maio/11; na Nascente/Fonte: coletas dos meses de Junho/11 e Novembro/11 e na SAC coletas dos meses de Março/11, Abril/11 e Junho/11 não apresentaram partículas de HAdV íntegras.



**Figura 18:** Comparação entre as cópias genômicas totais (amostras não tratadas com DNase I) e íntegras (amostras tratadas com DNase I) de HAdV nos sítios de coletas avaliados, onde: a) Micro-ambiente 4 da Lagoa do Peri; b) Nascente/Fonte e c) SAC.

A Figura 19 apresenta graficamente, a média de cópias genômicas totais e íntegras de HAdV, bem como mostra a redução logarítmica média de cópias genômicas de partículas de HAdV após o tratamento enzimático nos sítios de coleta avaliados (MA4, Nascente/Fonte e SAC). Amostras tratadas com DNase I no MA4 da Lagoa do Peri tiveram uma redução média de 2,5 logs., na Nascente/Fonte 1,8 logs. e na SAC de 0,85 logs. Estas reduções foram estatisticamente significativas ( $P < 0,05$ ).



**Figura 19:** Média geral de cópias genômicas de HAdV totais, que correspondem às amostras não tratadas com DNase I (barra preta), íntegros, que correspondem às amostras tratadas com DNase I (barra cinza) e a redução logarítmica média em CG/L (log.) após o tratamento enzimático (barra branca) nos sítios de coleta avaliados (MA4, Nascente/Fonte e SAC).

## 5.7 Avaliação da Infeciosidade/Viabilidade de HAdV em Amostras de água de consumo

Amostras submetidas ao teste de integridade de HAdV foram também submetidas a avaliação da infeciosidade/viabilidade deste vírus, totalizando 32 amostras avaliadas, dessas: 12 provenientes do MA4 da Lagoa do Peri, 9 da Nascente/Fonte e 11 da SAC.

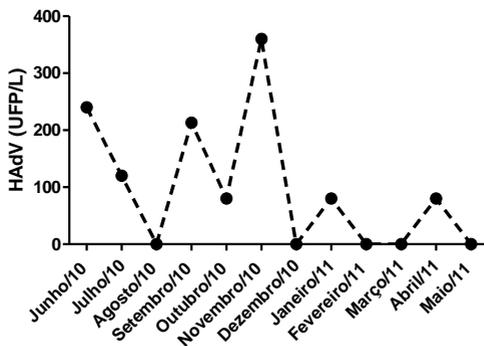
Inicialmente foi avaliado o potencial citotóxico das matrizes amostrais frente às células A549. Amostras diluídas 1:2 em MEM 1X não apresentaram efeito citotóxico, sendo esta a diluição adotada para os ensaios de infeciosidade de HAdV.

### 5.7.1 Ensaio de Placa de Lise – EPL

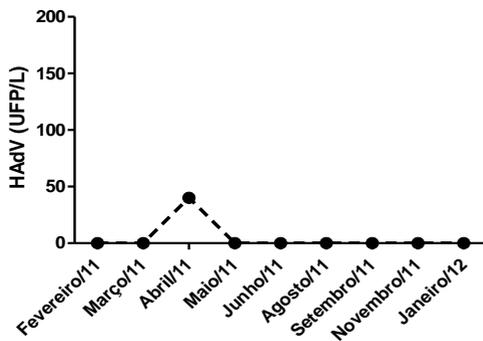
A avaliação de infecciosidade/viabilidade de HAdV por EPL revelou que 40,6% (13/32) das amostras continham partículas virais com capacidade infecciosa. Desse percentual, 8 amostras (66,6% ) provinham do MA4 da Lagoa do Peri, 1 amostra (11,1%) da Nascente/Fonte e 4 amostras (36,3%) da SAC. A quantificação de HAdV infecciosos se deu por unidade formadora de placa por litro de água de manancial (UFP/L).

A Figura 20 (a, b, c) apresenta a quantificação em UFP/L de HAdV nos sítios de coletas, sendo o menor número detectado 40 UFL/L de HAdV na Nascente/Fonte e o maior 360 UFP/L de HAdV no MA4 da Lagoa do Peri. Dos locais avaliados, o que apresentou maior prevalência de HAdV infecciosos foi o MA4, enquanto a Nascente/Fonte e SAC tiveram menos da metade das amostras analisadas contendo vírus infecciosos por esta técnica.

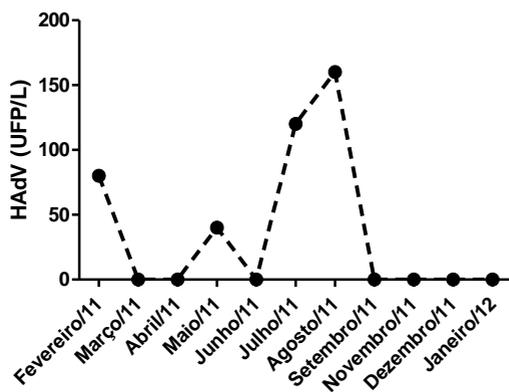
a) Micro-ambiente 4 (MA 4)



b) Nascente/Fonte



c) SAC



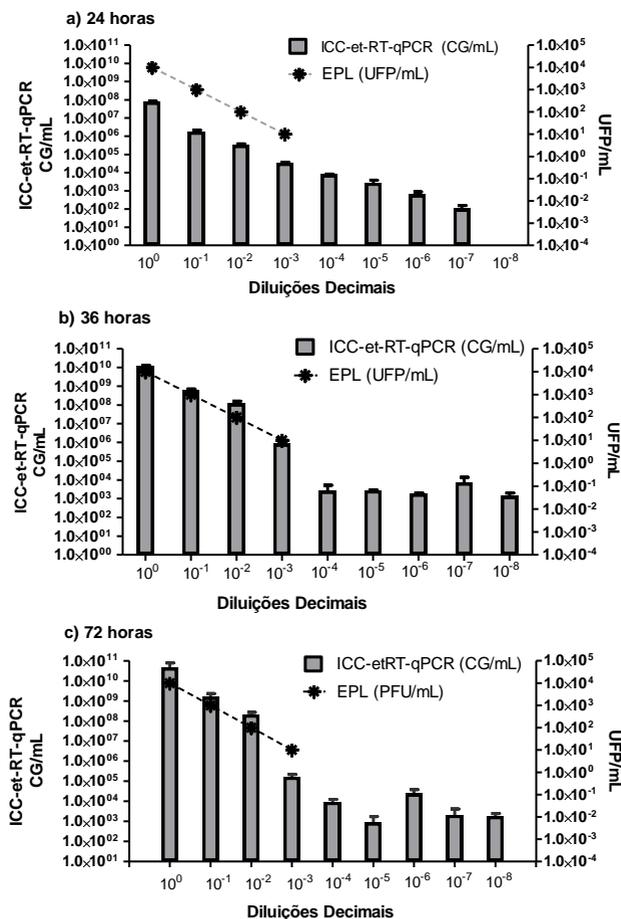
**Figura 20:** Média de HAdV infecciosos pela técnica de EPL (em UFP/L) detectados em amostras provenientes dos sítios de coleta: a) no Micro-ambiente 4 da Lagoa do Peri; b) na Nascente/Fonte e c) na SAC.

## **5.7.2 Ensaio de Cultura Celular Integrada (ICC) ao RT-qPCR precedido por tratamento enzimático (et-RT-qPCR) – ICC-et-RT-qPCR**

### **5.7.2.1 Padronização do ICC-et-RT-qPCR**

A eficiência do ensaio de ICC-et-RT-qPCR foi comprovada, uma vez que os resultados obtidos a partir dos controles de qualidade do teste (HAdV infecciosos e HAdV inativados por calor e radiação U.V) demonstraram que somente células inoculadas com HAdV infecciosos apresentaram no qPCR cópias genômicas de HAdV (isso porque estas continham mRNA de partículas virais em replicação, as quais foram reversamente transcritas a cDNA *in vitro* e quantificadas em qPCR). Também como teste de qualidade, amostras provenientes de células inoculadas com HAdV infecciosos foram submetidas apenas ao tratamento enzimático e qPCR (sem transcrição reversa) e o resultado final foi, como já esperado, negativo.

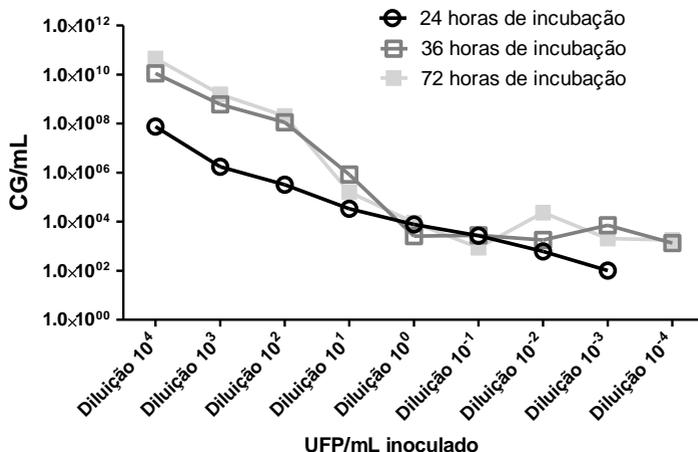
Estabelecida a eficiência do ensaio, foi necessário determinar também o melhor tempo de incubação para promover a replicação de HAdV nas células A549. Isso foi baseado na proporcionalidade da quantidade de vírus inoculados nas células (em UFP) e a recuperação ao final do teste por ICC-et-RT-qPCR (em CG), considerando a matriz de água (água de manancial superficial) e a respectiva diluição decimal viral em três tempos de incubação: 24h, 36h e 72h, como apresenta a Figura 21 (a, b e c, respectivamente).



**Figura 21:** Cinética da quantificação de HAdV-2 em células A549 pela técnica de ICC-et-RT-qPCR. No eixo direito a quantidade HAdV inoculadas nas células em UFP/mL (linha) e no eixo esquerdo a recuperação de HAdV em CG/mL (barra cinza), após os seguintes tempos de incubação: (a) 24 h, (b) 36 h e (c) 72 h.

A quantificação viral após 24 h de incubação foi a mais precisa, uma vez que houve proporcionalidade entre os valores de vírus inoculados e os recuperados, havendo comportamento linear em todas as diluições decimais e as quantificações em CG/mL, como apresenta a Figura 21 (a).

A Figura 22 compara todos os tempos de incubação de HAdV em células A549 para a padronização do ensaio de ICC-et-RT-qPCR nas respectivas quantidades em UFP/mL inoculados. Com isso, foi possível selecionar o tempo de 24 horas, pois foi o mais representativo para quantificar HAdV infecciosos contidos originalmente nas amostras testes.



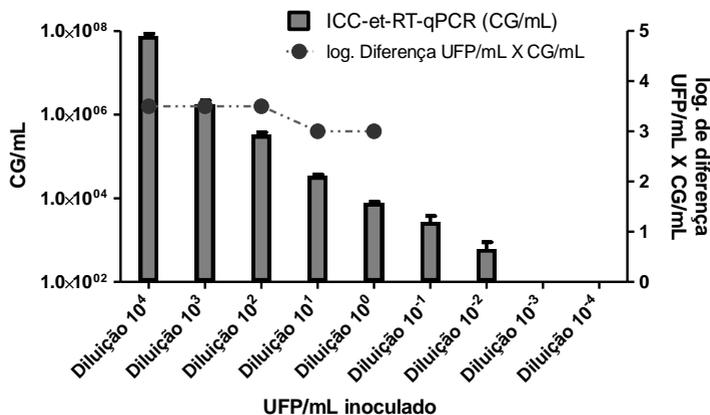
**Figura 22:** Comparação da cinética de quantificação de HAdV em células A549 pela técnica de ICC-et-RT-qPCR após 24h, 36h e 72h de inoculações em quantidades conhecidas de HAdV em UFP/mL em água de manancial superficial.

### 5.7.2.1.1 Sensibilidade do ICC-et-RT-qPCR e Equivalência das Unidades “UFP” e “CG” na quantificação de HAdV infecciosos

Durante a padronização do ICC-et-RT-qPCR, descrita anteriormente, foi possível determinar a sensibilidade desta técnica para detectar e quantificar HAdV infecciosos, bem como determinar a equivalência das unidades “UFP” e “CG” de HAdV, frente ao tempo de incubação de 24h, em células A549, em matriz de água de manancial e utilizando como modelo viral o HAdV-2.

A Figura 23 apresenta graficamente a equivalência logarítmica (log.) da quantificação entre UFP/mL e CG/mL. A média geral foi de 3,4 logs para mais em CG/mL, ou seja, quando foi inoculado 10<sup>2</sup> UFP/mL foi recuperado aproximadamente 10<sup>5</sup> CG/mL, sendo esta proporcionalidade confirmada estatisticamente.

A sensibilidade do ensaio de ICC-et-RT-qPCR, considerando 24h de incubação, foi determinada, sendo capaz de detectar até  $1 \times 10^2$  CG/mL, o que equivaleria  $1 \times 10^{-2}$  UFP/mL, quantidade que por meio do EPL não seria detectável (Figura 23).



**Figura 23:** Equivalência logarítmica (log) da quantificação entre UFP/mL e CG/mL, sendo a média geral de 3,4 logs. para mais em CG/mL e sensibilidade do ensaio de ICC-et-RT-qPCR em detectar e quantificar HAdV infecciosos em água de manancial superficial.

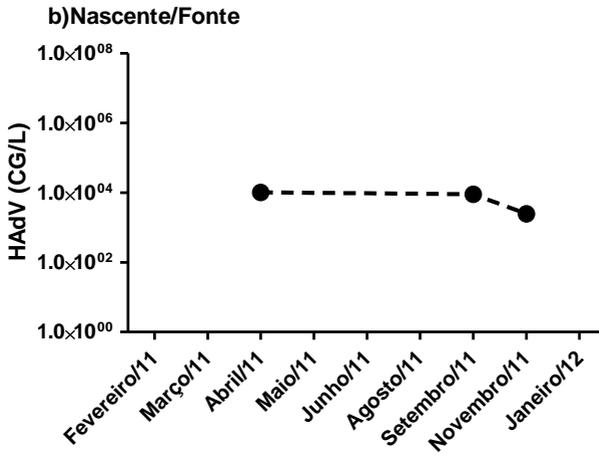
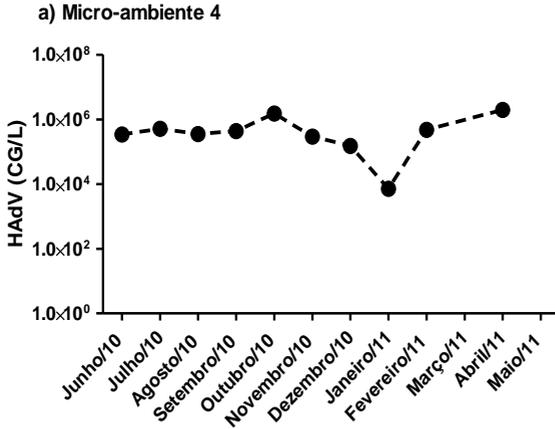
### 5.7.2.2 Avaliação da Infecciosidade de HAdV por ICC-et-RT-qPCR

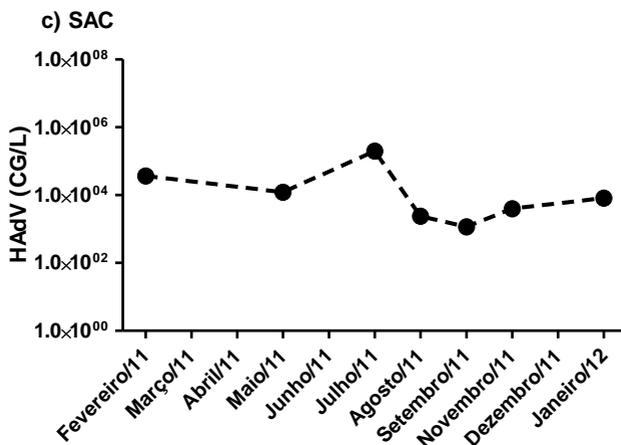
Após a padronização e validação do ensaio de ICC-et-RT-qPCR, avaliou-se a infecciosidade de HAdV em amostras provenientes dos sítios de coletas: MA4, Nascente/Fonte e SAC, totalizando 32 amostras avaliadas.

A avaliação de infecciosidade/viabilidade de HAdV por ICC-et-RT-qPCR revelou que 62,5% (20/32) das amostras avaliadas continham partículas virais com capacidade infecciosa. Desse percentual, 10 amostras provinham do MA4 da Lagoa do Peri, 3 da Nascente/Fonte e 7 da SAC. A quantificação de HAdV infecciosos se deu por unidade de cópias genômicas por litro de água de manancial (CG/L).

A Figura 24 (a,b) apresenta a quantificação em CG/L de HAdV infecciosos nos respectivos sítios de coletas. No MA4 da Lagoa do Peri 83,3% (10/12) das amostras avaliadas apresentaram HAdV infecciosos, na Nascente/Fonte 33,3% (3/9) e na SAC 63,3% (7/11). Assim como no

EPL, por meio do ICC-et-RT-qPCR, o MA 4 foi, dos locais avaliados, o que apresentou maior prevalência de HAdV infecciosos.





**Figura 24:** Média de HAdV infecciosos pela técnica de ICC-et-RT-qPCT (CG/L) detectados em amostras provenientes dos sítios de coleta (a) Micro-ambiente 4 da Lagoa do Peri, (b) Nascente/Fonte e (c) na SAC.

O valor mínimo de HAdV infecciosos contidos nas amostras avaliadas e detectados por ICC-et-RT-qPCR foi de  $1,1 \times 10^3$  CG/L e o máximo de  $2,0 \times 10^6$  CG/L. Dos três pontos avaliados, a média mais elevada de CG/L de HAdV infecciosos, ocorreu no MA4 ( $5,0 \times 10^5$ ) e a menor média ocorreu na SAC ( $2,3 \times 10^3$ ). O valor mínimo, máximo e média geral de CG/L detectados em cada sítio de coleta estão apresentados na Tabela 3.

**Tabela 3:** Média geométrica e intervalo (mínimo e máximo) do número de cópias genômicas de HAdV infecciosos quantificados pelo ensaio de ICC-et-RT-qPCR nos sítios de monitoramento.

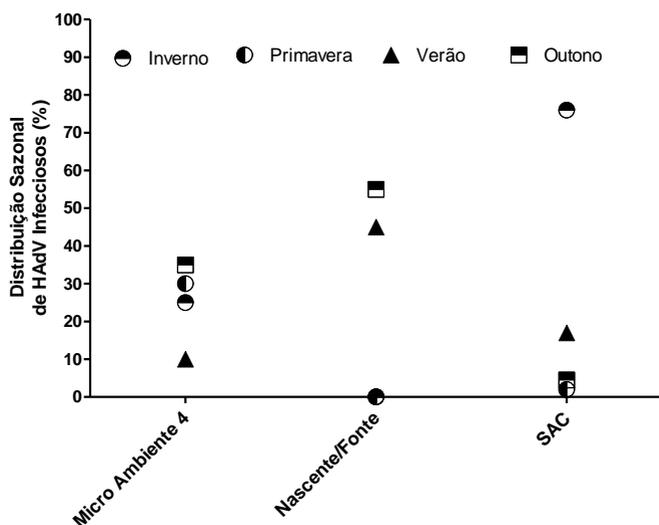
Micro-ambiente 4 (CG/L) Média (mín-máx)	Nascente/Fonte (CG/L) Média (mín-máx)	SAC (CG/L) Média (mín-máx)
$5,0 \times 10^5$ ( $7,0 \times 10^3$ - $2,0 \times 10^6$ )	$2,3 \times 10^4$ ( $1,1 \times 10^3$ - $2,0 \times 10^5$ )	$2,3 \times 10^3$ ( $2,4 \times 10^4$ - $1,0 \times 10^4$ )

**min/max:** valor mínimo e máximo detectado.

## 5.8 Distribuição Sazonal de HAdV Infecciosos

A fim de avaliar a distribuição sazonal de HAdV infecciosos em cada sítio de coleta, os resultados obtidos por meio do ensaio de ICC-et-RT-qPCR foram utilizados, já que essa técnica demonstrou maior sensibilidade na detecção e quantificação de HAdV infecciosos se comparados com os resultados de EPL.

A distribuição sazonal de HAdV infecciosos nos diferentes sítios de monitoramento está representada na Figura 25. No sítio MA4 da Lagoa do Peri 10% dos HAdV infecciosos foram detectados no verão, 25% no inverno, 30% na primavera e 35% no outono; Na Nascente/Fonte: 0% no verão, 0% no inverno, 45% na primavera e 55% no outono e na SAC: 17% no verão, 76% no inverno, 2% na primavera e 4,5% no outono.



**Figura 25:** Distribuição sazonal de HAdV infecciosos nos sítios de coleta monitorados (MA4 da Lagoa do Peri, na Nascente/Fonte e na SAC).

No MA4, HAdV infecciosos estiveram presentes durante todo o ano de monitoramento, menos prevalente no verão; Na Nascente/Fonte foi detectado HAdV infecciosos durante primavera e outono; Na SAC estiveram presentes durante todo ano, porém com maior prevalência no inverno.

## 5.9 HAdV: Comparação entre HAdV íntegros e infecciosos por EPL e ICC-et-RT-qPCR

Com finalidade de comparar a integridade e infecciosidade de HAdV, uma análise global foi realizada, compilando resultados obtidos por meio do teste de integridade (DNase I) e de infecciosidade (EPL e ICC-et-RT-qPCR).

A fim de comparar e traçar o perfil de HAdV nos sítios monitorados, considerou-se todas as coletas realizadas (12 coletas em cada sítio). No MA4 todas as amostras que continham partículas de HAdV íntegras (75%), apresentaram infecciosidade em pelo menos uma das técnicas (EPL ou ICC-et-RT-qPCR), sendo que pelo ICC-et-RT-qPCR 75% das amostras continham HAdV infecciosos, enquanto pelo EPL 66,6% continham HAdV infecciosos; Na Nascente/Fonte 58,3% das amostras continham HAdV íntegros e destes 25% eram infecciosos por ICC-et-RT-qPCR e 8,3 % por EPL; Na SAC, 66,6% das amostras continham partículas de HAdV íntegras e destas 58,3% eram infecciosas por ICC-et-RT-qPCR e 33% por EPL. A Tabela 4 mostra resumidamente estes dados.

**Tabela 4:** Comparação entre integridade e infecciosidade de HAdV nos sítios de coleta (média geral  $n=12$  por sítio).

Perfil de HAdV	Micro-ambiente 4	Nascente / Fonte	SAC
Íntegros*	75,0	58,3	66,6
Infecciosos*	75,0	25,0	58,3
Infecciosos em ICC-et-RT-qPCR*	75,0	25,0	58,3
Infecciosos em EPL*	66,6	8,30	33,3
Íntegros **	$1,65 \times 10^6$	$7,72 \times 10^5$	$1,24 \times 10^6$
Infecciosos por ICC-et-RT-qPCR **	$4,80 \times 10^5$	$3,69 \times 10^3$	$2,18 \times 10^4$
Infecciosos por EPL***	$1,07 \times 10^2$	$3,33 \times 10^0$	$3,33 \times 10^1$

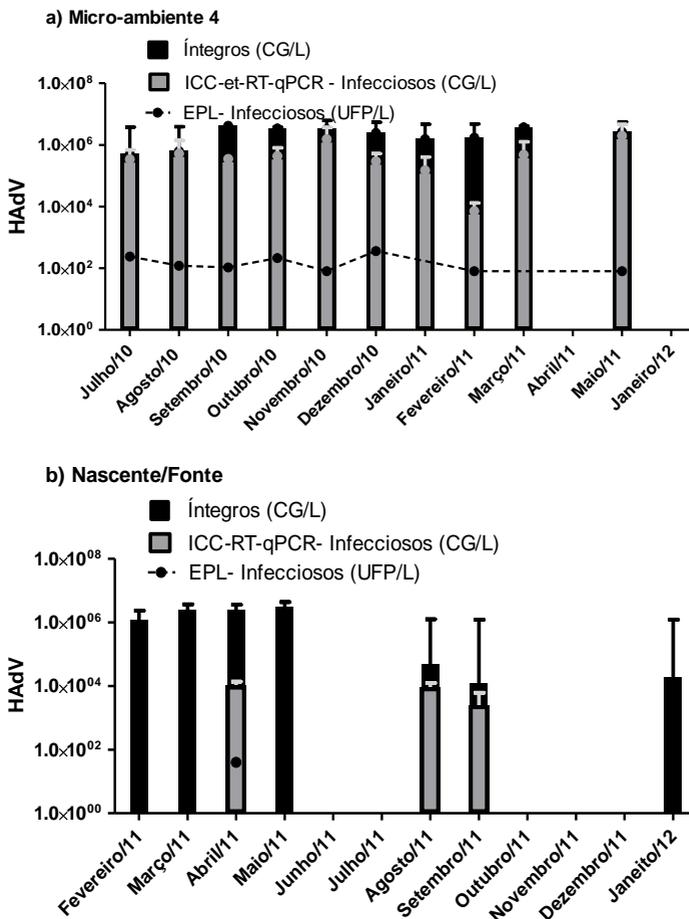
\* Média Percentual (%)

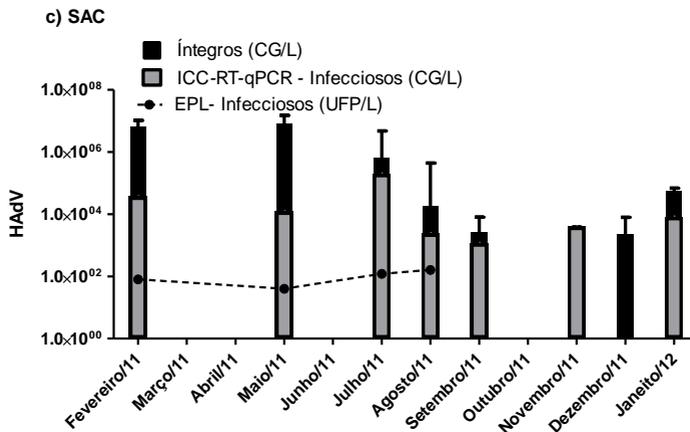
\*\* Média Geral (GC/L)

\*\*\* Média Geral (UFP/L)

Na Figura 26 (a,b e c) é possível observar o perfil de HAdV em cada amostra e sítio monitorado. Observa-se que amostras que continham partículas de HAdV infecciosas eram provenientes de vírus íntegros, mas o contrário não foi verdadeiro.

Quando foi avaliada a correlação entre partículas de HAdV íntegras e infecciosas, houve correlação positiva nos sítios de coleta MA4 da Lagoa do Peri e SAC, porém na Nascente/Fonte não foi observada nenhum tipo de correlação, uma vez que a presença de partículas íntegras neste sítio não significou a presença de HAdV infecciosos.





**Figura 26:** Comparação entre HAdV íntegros (barra preta) e infecciosos por ICC-et-RT-qPCR (barra cinza) e por EPL (linha) nas amostras provenientes dos sítios de coleta: MA4 da Lagoa do Peri (a), Nascente/Fonte (b) e SAC (c).

## 5.10 Sequenciamento Gênico e Caracterização Molecular de HAdV

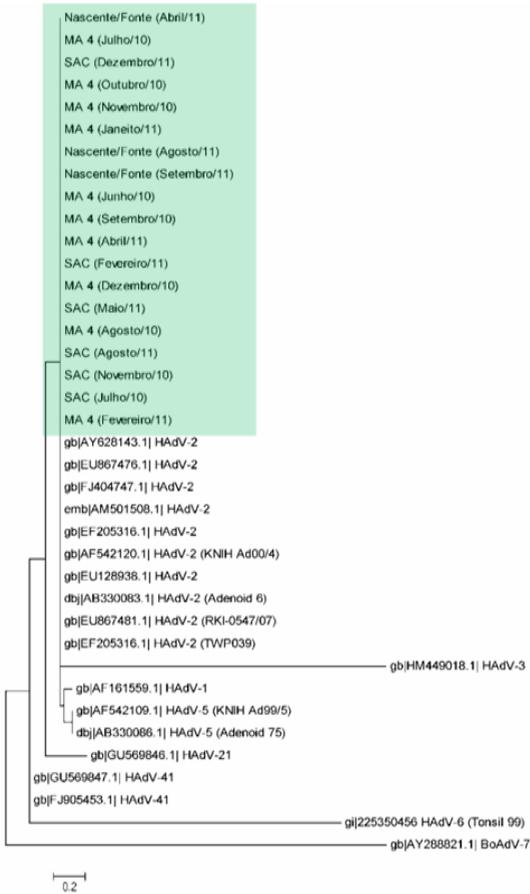
Foi possível sequenciar 19 amostras, sendo: 10 do MA4 da Lagoa do Peri, 3 da Nascente/Fonte e 6 da SAC. Essas amostras foram selecionadas tendo como critério a qualidade do produto amplificado por PCR e posteriormente a qualidade das sequências obtidas.

### 5.10.1 Análises de Similaridade

Para a realização dos estudos de similaridade AdV as sequências nucleotídicas e de aminoácidos, obtidas a partir do sequenciamento dos *amplicons* avaliados, foram comparadas quanto a sua homologia entre si e com sequências depositadas no GenBank-NCBI pertencentes aos HAdV sorotipos 1,2,3,5,6,21 e 41 e com BovAdV sorotipo 7 (adenovírus bovino, como grupo externo). O número de referência de acesso das sequências utilizadas para comparação estão disponíveis na Figura 27.

As análises comparativas possibilitaram caracterizar e prever quais os sorotipos de HAdV eram prevalentemente circulantes nas amostras coletadas. O sorotipo mais prevalente encontrado foi o 2 (HAdV-2), que pertence ao genogrupo C e é um HAdV respiratório, porém também transmitido pela via oral-fecal. Por meio das características moleculares e o grau de homologia entre as sequências

(tanto as obtidas como as comparadas) foi possível construir a *Árvore Filogenética* (Figura 27).



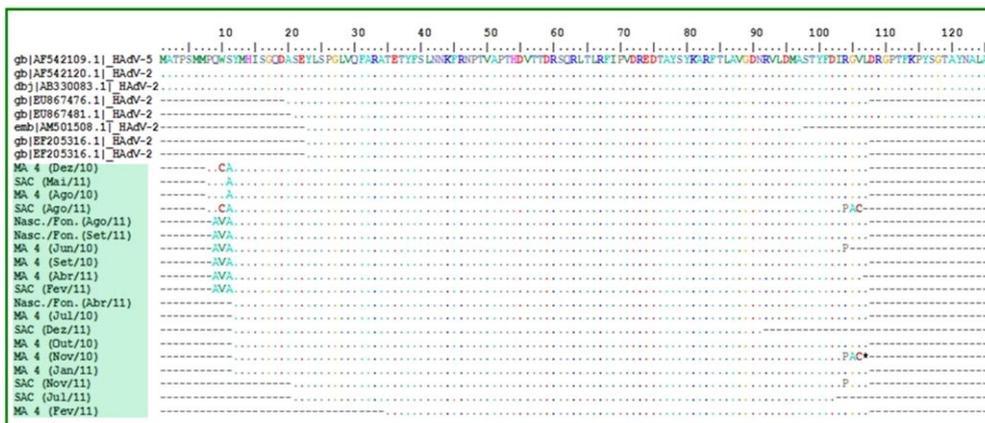
**Figura 27:** *Árvore Filogenética* deduzida por meio de análises de sequências de nucleotídeos correspondente a região de HAAdV (grifadas em verde) obtidos de águas de mananciais superficiais da Lagoa do Peri (MA4), Nascente/Fonte e água de solução alternativa de abastecimento coletivo (SAC), de Florianópolis-SC. As análises foram realizadas pelo método de máxima verossimilhança (baseado nos parâmetros de Kimura 2 com 500 repetições) no programa MEGA 5.0. As sequências utilizadas para comparação foram acessadas no GenBank NCBI (não grifadas), precedidas por “gb” e o seu respectivo número de acesso.

A Figura 28 apresenta o alinhamento das sequências aminoacídicas das amostras obtidas neste trabalho (grifadas em verde claro) bem como as sequências de referências utilizadas para comparação (não grifadas). Nesta comparação algumas modificações/substituições pontuais foram observadas, sendo elas: a) MA4: dezembro/10 (um triptofano (W) por uma cisteína (C) e uma serina (S) por uma alanina (A)), junho/10 (a trinca de glutamina, triptofano e serina (QWS) pela trinca alanina, valina e alanina (AVA) e a substituição de uma arginina (R) por uma prolina (P)), coletas dos meses de setembro/2010 e abril/2011 (a trinca glutamina, triptofano e alanina (QWA) pela trinca alanina, valina e alanina (AVA)) e a coleta do mês de novembro/2011 (a trinca arginina, guanina e valina (RGV) pela trinca prolina, alanina e cisteína (PAC)); 2) Nascente/Fonte: Amostras dos meses agosto e setembro/2011 (a trinca glutamina, triptofano e serina (QWS) pela trinca alanina, valina e alanina (AVA)) e 3) SAC: maio/2011 (uma serina (S) por uma alanina (A), dezembro/2011 (um triptofano (W) por uma cisteína (C), uma serina (S) por uma alanina (A) e a trinca arginina, guanina e valina (RGV) pela trinca prolina, alanina e cisteína (PAC)), fevereiro/2011 (a trinca glutamina, triptofano e serina (QWS) pela trinca alanina, valina e alanina (AVA)), assim como as amostras da Nascente/Fonte dos meses de agosto e setembro/11) e em novembro/11 (arginina (A) por uma prolina(P)). O efeito destas substituições frente a estrutura secundária e terciária proteica foi avaliado, no programa Phyre2, e não foram observadas alterações (descrito no item 5.8.2).

Na Tabela 5, a matriz de identidade das sequências é apresentada, sendo possível realizar a dedução do grau de homologia entre as sequências de nucleotídeos (dados grifados em azul claro) e de aminoácidos (dados grifados em verde claro) obtidas nas amostras sequenciadas neste trabalho com sequências já depositadas no NCBI (quanto mais próximo ao valor 1,0 mais homólogas/semelhantes são).

Nesta análise é possível inferir acerca da homologia entre as amostras pertencentes a diferentes sítios de coletas, ao longo do monitoramento de um ano realizado. Como é possível observar tanto na Figura 27 quanto na Tabela 5 todas as sequências de HAdV obtidas neste trabalho apresentaram entre si um alto grau de homologia, tanto as nucleotídicas quanto às de aminoácidos. Nos dados das sequências nucleotídicas (grifados em azul claro na Tabela 5), o grau de identidade variou entre 0,73 e 1,0, sendo que a sequência MA4 (Fevereiro/11) foi a mais distante/diferente de todas as outras. O mesmo ocorreu com os dados das sequências de aminoácidos (grifados em verde claro), todas as

sequências apresentaram alto grau de homologia entre si, variando de 0,69 a 1,0, sendo também a sequência MA4 (Fevereiro de/11) a mais distante/diferente das demais.



**Figura 28:** Comparação das seqüências de aminoácidos da região *hexon* de HAdV (grifado em verde), obtidos de águas de mananciais superficiais da Lagoa do Peri (MA4), Nascente/Fonte e água de solução alternativa de abastecimento coletivo (SAC), com seqüências acessadas no GenBank NCBI (não grifadas e que apresentam o seu respectivo número de acesso precedido pela sigla “gb”).

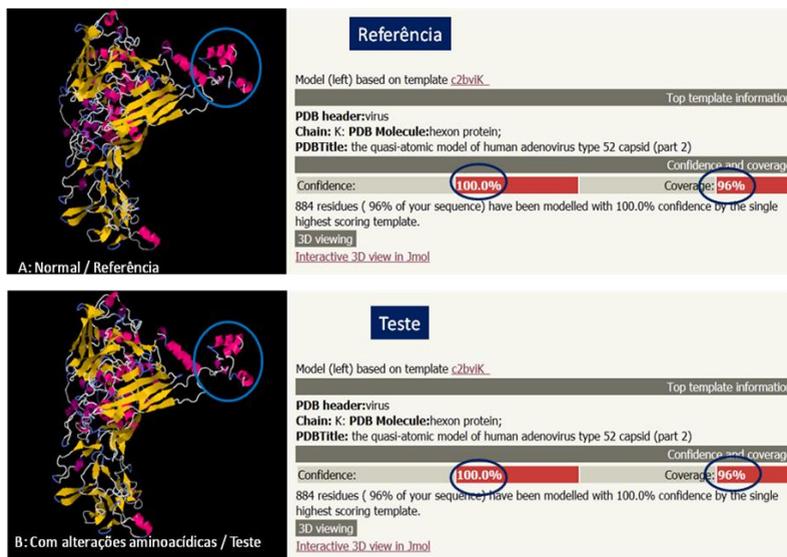
**Tabela 5:** Matriz de identidade das seqüências de nucleotídeos (dados grifados em azul claro) e de aminoácidos (dados grifados em verde claro) da região *hexon* de HAdV obtidos de águas de mananciais superficiais da Lagoa do Peri (MA4), Nascente/Fonte e água de solução alternativa de abastecimento coletivo (SAC), com seqüências acessadas no GenBank NCBI (número de acesso precedido pela sigla “gb”).

Amostras	Amostras																															
	Nasc.Fon.(Mar/11)	MA4 (Jul/10)	SAC (Dez/11)	MA4 (Out/10)	MA4 (Nov/10)	MA4 (Jan/11)	Nasc.Fon.(Ago/11)	Nasc.Fon.(Set/11)	MA4 (Jan/10)	MA4 (Set/10)	MA4 (Abr/11)	SAC (Fev/11)	MA4 (Dez/11)	SAC (Mai/11)	MA4 (Ago/10)	SAC (Ago/11)	MA4 (Nov/11)	SAC (Jul/11)	MA4 (Fev/11)	gb:GU569847.1_HAdV-41	gb:AY628143.1_HAdV-1	gb:AF161558.1_HAdV-1	gb:EU387476.1_HAdV-2	gb:FI404747.1_HAdV-2	emb:AM501508.1_HAdV-2	gb:EF20316.1_HAdV-2	gb:FF905453.1_HAdV-41	gb:GU569846.1_HAdV-21	gb:HM449018.1_HAdV-3	gb:AY288821.1_BcAdV-7		
Nasc.Fon.(Abr.11)	1,00	0,83	0,83	1,00	0,96	1,00	0,97	0,97	0,93	0,97	0,96	0,97	0,95	0,96	0,96	0,92	0,90	0,85	0,76	0,59	0,88	0,88	0,92	0,85	0,78	0,89	0,83	0,47	0,15	0,06		
MA4 (Jul.10)	0,83	1,00	0,96	1,00	0,97	0,97	0,93	0,97	0,96	0,97	0,95	0,96	0,96	0,92	0,90	0,85	0,76	0,59	0,88	0,88	0,92	0,85	0,78	0,89	0,83	0,47	0,15	0,06				
SAC (Dez.11)	0,83	0,83	0,83	0,84	0,83	0,81	0,81	0,83	0,81	0,82	0,81	0,79	0,80	0,80	0,81	0,74	0,78	0,76	0,43	0,86	0,86	0,75	0,71	0,80	0,72	0,80	0,31	0,15	0,06			
MA4 (Out.10)	1,00	1,00	0,83	1,00	0,96	1,00	0,97	0,97	0,93	0,97	0,96	0,97	0,95	0,96	0,96	0,92	0,90	0,85	0,76	0,59	0,88	0,88	0,92	0,85	0,78	0,89	0,83	0,47	0,15	0,06		
MA4 (Nov.10)	0,97	0,97	0,83	0,97	0,96	0,93	0,93	0,95	0,93	0,94	0,93	0,91	0,92	0,92	0,96	0,88	0,86	0,72	0,55	0,88	0,88	0,88	0,83	0,79	0,84	0,84	0,43	0,15	0,06			
MA4 (Jan.11)	1,00	1,00	0,83	1,00	0,97	1,00	0,97	0,97	0,93	0,97	0,96	0,97	0,95	0,96	0,96	0,92	0,90	0,85	0,76	0,59	0,88	0,88	0,92	0,85	0,78	0,89	0,83	0,47	0,15	0,06		
Nasc.Fon.(Ago.11)	0,97	0,97	0,81	0,97	0,94	0,97	1,00	0,96	1,00	0,99	1,00	0,96	0,97	0,97	0,93	0,87	0,83	0,74	0,58	0,85	0,85	0,89	0,83	0,76	0,86	0,81	0,45	0,15	0,06			
Nasc.Fon.(Set.11)	0,97	0,97	0,81	0,97	0,94	0,97	1,00	0,96	1,00	0,99	1,00	0,96	0,97	0,97	0,93	0,87	0,83	0,74	0,58	0,85	0,85	0,89	0,83	0,76	0,86	0,81	0,45	0,15	0,06			
MA4 (Jan.10)	0,93	0,93	0,83	0,93	0,94	0,93	0,96	0,96	0,96	0,97	0,96	0,92	0,93	0,93	0,95	0,85	0,85	0,70	0,54	0,88	0,88	0,85	0,81	0,78	0,82	0,83	0,41	0,15	0,06			
MA4 (Set.10)	0,97	0,97	0,81	0,97	0,94	0,97	1,00	0,96	0,99	1,00	0,96	0,97	0,97	0,93	0,87	0,83	0,74	0,58	0,85	0,85	0,89	0,83	0,76	0,86	0,81	0,45	0,15	0,06				
MA4 (Abr.11)	0,96	0,96	0,82	0,96	0,94	0,96	0,98	0,99	0,97	0,99	0,99	0,95	0,96	0,96	0,94	0,86	0,84	0,73	0,57	0,86	0,86	0,88	0,84	0,77	0,83	0,82	0,44	0,15	0,06			
SAC (Fev.11)	0,97	0,97	0,81	0,97	0,94	0,97	1,00	0,96	1,00	0,99	1,00	0,96	0,97	0,97	0,93	0,87	0,83	0,74	0,58	0,85	0,85	0,89	0,83	0,76	0,86	0,81	0,45	0,15	0,06			
MA4 (Dez.11)	0,96	0,96	0,80	0,96	0,92	0,96	0,97	0,97	0,93	0,97	0,96	0,97	0,98	0,98	0,95	0,85	0,81	0,72	0,56	0,83	0,83	0,87	0,81	0,74	0,84	0,79	0,45	0,15	0,06			
SAC (Mai.11)	0,96	0,96	0,80	0,96	0,88	0,96	0,97	0,97	0,94	0,97	0,96	0,97	0,99	1,00	0,95	0,86	0,82	0,73	0,57	0,84	0,84	0,88	0,82	0,75	0,85	0,80	0,45	0,15	0,06			
MA4 (Ago.10)	0,96	0,96	0,80	0,96	0,88	0,96	0,97	0,97	0,94	0,97	0,96	0,97	0,99	1,00	0,95	0,86	0,82	0,73	0,57	0,84	0,84	0,88	0,82	0,75	0,85	0,80	0,45	0,15	0,06			
SAC (Ago.11)	0,93	0,93	0,81	0,93	0,95	0,93	0,94	0,94	0,95	0,94	0,95	0,94	0,96	0,96	0,96	0,84	0,83	0,69	0,53	0,85	0,85	0,84	0,80	0,76	0,81	0,81	0,41	0,15	0,06			
MA4 (Nov.11)	0,90	0,90	0,74	0,90	0,88	0,90	0,88	0,88	0,85	0,88	0,87	0,88	0,86	0,86	0,87	0,84	0,83	0,64	0,46	0,86	0,86	0,96	0,86	0,86	0,86	0,83	0,51	0,13	0,07			
SAC (Jul.11)	0,85	0,85	0,78	0,85	0,85	0,85	0,83	0,83	0,85	0,83	0,84	0,83	0,82	0,82	0,82	0,83	0,84	0,78	0,60	0,91	0,91	0,93	0,91	0,61	0,92	0,67	0,46	0,13	0,07			
MA4 (Fev.11)	0,76	0,76	0,59	0,76	0,78	0,78	0,74	0,74	0,70	0,74	0,73	0,74	0,73	0,73	0,73	0,73	0,73	0,73	0,73	0,73	0,73	0,71	0,71	0,71	0,83	0,67	0,62	0,10	0,04			
gb:GU569847.1_HAdV-41	0,50	0,50	0,36	0,50	0,47	0,50	0,49	0,49	0,45	0,49	0,48	0,48	0,48	0,48	0,45	0,55	0,50	0,66	0,53	0,53	0,65	0,67	0,53	0,67	0,57	0,80	0,06	0,04				
gb:AY628143.1_HAdV-1	0,88	0,88	0,86	0,88	0,88	0,88	0,85	0,85	0,88	0,85	0,86	0,85	0,84	0,84	0,85	0,86	0,91	0,71	0,44	0,87	0,87	0,82	0,89	0,84	0,93	0,41	0,15	0,06				
gb:AF161558.1_HAdV-1	0,84	0,84	0,83	0,84	0,84	0,84	0,81	0,81	0,84	0,81	0,82	0,81	0,80	0,80	0,81	0,82	0,87	0,67	0,43	0,96	0,87	0,82	0,89	0,84	0,93	0,41	0,15	0,06				
gb:EU387476.1_HAdV-2	0,82	0,82	0,75	0,82	0,88	0,82	0,89	0,89	0,85	0,89	0,88	0,89	0,88	0,88	0,88	0,85	0,98	0,93	0,83	0,55	0,87	0,83	0,95	0,85	0,97	0,84	0,51	0,13	0,07			
gb:FI404747.1_HAdV-2	0,85	0,85	0,71	0,85	0,83	0,85	0,83	0,83	0,81	0,83	0,84	0,83	0,82	0,82	0,80	0,94	0,91	0,87	0,57	0,82	0,78	0,93	0,87	0,86	0,79	0,53	0,12	0,07				
emb:AM501508.1_HAdV-2	0,78	0,78	0,80	0,78	0,78	0,78	0,76	0,76	0,78	0,76	0,77	0,76	0,75	0,75	0,76	0,86	0,91	0,74	0,46	0,89	0,85	0,85	0,87	0,88	0,84	0,42	0,13	0,07				
gb:EF20316.1_HAdV-2	0,89	0,89	0,72	0,89	0,85	0,89	0,86	0,86	0,82	0,86	0,85	0,85	0,85	0,85	0,82	0,97	0,92	0,86	0,57	0,84	0,80	0,97	0,96	0,83	0,80	0,53	0,13	0,07				
gb:FF905453.1_HAdV-41	0,73	0,73	0,73	0,73	0,73	0,71	0,71	0,73	0,71	0,72	0,71	0,72	0,71	0,70	0,70	0,70	0,71	0,72	0,76	0,58	0,57	0,82	0,81	0,73	0,69	0,73	0,70	0,40	0,15	0,06		
gb:GU569846.1_HAdV-21	0,40	0,40	0,28	0,40	0,39	0,40	0,39	0,39	0,37	0,39	0,38	0,39	0,38	0,38	0,37	0,44	0,40	0,53	0,68	0,35	0,36	0,44	0,46	0,37	0,45	0,37	0,05	0,02				
gb:HM449018.1_HAdV-3	0,31	0,31	0,27	0,31	0,30	0,31	0,31	0,31	0,31	0,31	0,31	0,31	0,31	0,31	0,31	0,31	0,28	0,28	0,24	0,16	0,29	0,29	0,28	0,27	0,27	0,28	0,25	0,15	0,06			
gb:AY288821.1_BcAdV-7	0,20	0,20	0,17	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	0,19	0,20	0,20	0,20	0,19	0,19	0,19	0,21	0,20	0,18	0,15	0,20	0,20	0,21	0,20	0,19	0,20	0,20	0,14	0,16				

### 5.10.2 Modelagem da Proteína hexon do Capsídeo de HAdV

Por meio das sequência de aminoácidos foi realizada a predição da estrutura tridimensional da proteína *hexon* do capsídeo de HAdV, a qual foi modelada baseada na homologia encontrada com proteínas já elucidadas, utilizando o programa de modelagem Phyre2. As sequências de aminoácidos de HAdV obtidas neste trabalho tiveram 100% de confiança e 91% de cobertura com a sequência aminoacídica da proteína modelo de HAdV-52 (Figura 29 (A e B)).

Apesar das trocas aminoacídicas observadas, não houve modificação nas estruturas secundárias e terciárias da proteína *hexon* do capsídeo viras de HAdV, havendo 100% de similaridade entre as estruturas secundárias e terciárias da proteína normal/referência (Figura 29 A) com a alterada/teste (Figura 29 B).



**Figura 29:** Predição da estrutura tridimensional da proteína *hexon* de HAdV, modelada a partir da análise de homologia com a sequência referência de HAdV-52, usando o programa Phyre2. A: proteína sem alterações aminoacídicas; B: proteínas com as alterações aminoacídicas.



## 6 DISCUSSÃO

A água doce é um elemento natural e essencial para a vida, sendo seus reservatórios ambientes ecológicos e economicamente importantes (ESTEVES, 2008). A vasta escassez das águas de consumo humano e o agravamento da poluição destes recursos hídricos com aumento da população mundial implicam em planejamentos e manejos das massas inter-relacionadas de água doce, incluindo tanto às de superfície como subterrâneas, levando em consideração os aspectos de cada região (SILVA, 2006).

Muitos são os patógenos de veiculação hídrica, como bactérias, protozoários, helmintos e em destaque os vírus, que podem estar presentes nos mais diversos ambientes, desde água doce até áreas geotermiais (DJIKENG et al., 2009). Do total de doenças de veiculação hídrica destacam-se as gastroenterites virais, diretamente ligadas à falta de água potável, o não acesso e ao acesso inadequado de saneamento básico (WHO & UNICEF, 2009).

Contudo, os indicadores empregados para avaliar a qualidade das águas têm sido motivos de controvérsia há mais de 50 anos (ROSE et al., 2006). As bactérias (coliformes totais e *Escherichia coli*) geralmente são utilizadas como microrganismos de escolha no monitoramento microbiológico da água em todo o mundo (HSU et al., 2007), sendo que estudos relatam a não associação entre a presença de vírus encontrados no meio ambiente com indicadores bacterianos (GRABOW et al., 2001; HORMAN et al., 2004; ROSE et al. 2006) e que tratamentos convencionais de água podem não ser capazes de inviabilizar ou inativar vírus veiculados no meio hídrico, uma vez que são altamente estáveis no ambiente aquático e apresentam certa resistência aos agentes físicos e químicos de inativação, como a luz U.V e ao cloro (KOOPMANS et al., 2002; FONG & LIPP, 2005).

Dos agentes patogênicos presentes na água, o impacto causado pelos vírus tem sido menos estudado do que o impacto causado por bactérias e protozoários, devido, principalmente, ao elevado custo de equipamentos e materiais necessários à rotina laboratorial e a dificuldade em se detectar estes agentes em amostras ambientais por apresentarem-se normalmente em baixas concentrações (CALGUA et al., 2008; WYN-JONES & SELLWOOD, 2001; WYN-JONES et al., 2010).

Neste sentido se faz necessário o uso de métodos eficientes na concentração de vírus a partir de matrizes ambientais, possibilitando a pesquisa e detecção viral (BOSCH et al., 2008; CALGUA, 2008). A

concentração viral a partir de águas ambientais é a primeira etapa na realização da análise virológica, tendo como principal objetivo concentrar e recuperar o maior número possível de partículas virais (SOULE et al., 2000; CHEN et al., 2006; HAMAZA et al., 2009). Dentre os métodos de concentração de água, os mais utilizados são: ultracentrifugação (FORMIGA-CRUZ et al., 2005; ALBINANA-GIMENEZ et al. 2006; FUMIAN et al., 2011), adsorção-eluição em membranas polarizadas (KATAYAMA et al., 2002; RIGOTTO et al., 2009) e ultrafiltração (SOULE et al., 2000; RAJAL et al. 2007).

Neste trabalho o método utilizado e avaliado para concentração viral, a partir de águas de mananciais superficiais, foi o de adsorção-eluição em membrana eletronegativa, descrito por Katayama, Shimasaki & Ohgaki (2002), sendo o mais indicado pela *American Public Health Association* (APHA, 2005) para concentrar vírus a partir de água (CLESCERI et al., 2005). A taxa de recuperação viral neste trabalho, utilizando tal metodologia, foi de 10% de recuperação de HAdV. Katayama, Shimasaki & Ohgaki (2002) na padronização desta técnica recuperou 95% dos vírus semeados em água pura, Fumian et al. (2010) relatou média de recuperação de somente 3,5% , utilizando amostras de esgoto diluídas em água e Victoria et al. (2009) relatou taxa de 3% de recuperação viral a partir de água de consumo humano. Neste sentido, na investigação de vírus ambientais, a concentração viral é uma etapa crítica, trabalhosa e onerosa, sendo que a taxa de recuperação viral está intimamente ligada à origem e características da matriz amostral (TAVARES et al., 2005; FUMIAN et al., 2011).

As técnicas moleculares, como a PCR e PCR em tempo real (qPCR), são as mais utilizadas para a detecção de vírus em amostras de águas, por meio do genoma viral (ALBINANA-GIMENEZ et al., 2009; MIAGOSTOVICH, et al., 2008; RIGOTTO et al., 2010), porém tais técnicas, por si só, não são capazes de inferir sobre a infecciosidade dos vírus (GIRONES et al., 2010). A metodologia de detecção e quantificação de vírus humanos de veiculação hídrica circulantes em águas de consumo humano (HAdV, JCPyV, HAV e RVA), utilizada neste trabalho, foi o qPCR (*TaqMan*), pois atualmente é a técnica mais utilizada, aplicada no monitoramento de vírus ambientais por meio da detecção e quantificação de seus genomas (BOFILL-MAS et al., 2006; XAGORAKI et al., 2007; HARAMOTO et al., 2007). Neste trabalho a presença de HAdV, JCPyV, HAV e RVA foi detectada em amostras de águas de mananciais superficiais (Tabela 02 e Figuras 13, 14 e 15), corroborando com outros trabalhos (ALBINANA-GIMENEZ

et al., 2009; RIGOTTO et al., 2009; ABDELZAHER, et al., 2010; MORESCO et al., 2011; GARCIA et al., 2012).

Os resultados de detecção de vírus humanos de veiculação hídrica, nos diferentes sítios de coleta (Micro-ambientes da Lagoa do Peri, quanto na Nascente/Fonte e SAC), mostraram que o HAdV foi o mais prevalente, pois seu genoma detectado em 93% (67/72) das amostras analisadas. Estudos demonstram que os HAdV são, dos vírus humanos veiculados pela água, os mais frequentes (HARAMOTO et al., 2010; RIGOTTO et al., 2010), e mais amplamente distribuídos em todo o mundo sendo conhecidos por causarem doenças veiculadas por águas de consumo humano e recreação (FONG & LIPP, 2005; TAVARES et al., 2005). No Brasil alguns trabalhos investigaram e encontraram HAdV em diversas matrizes ambientais, como em água de mar (MORESCO et al., 2011), de consumo humano, de lagoa (RIGOTTO et al., 2010), de rios (MIAGOSTOVICH et al., 2008), em lodos de esgotos humanos e em águas residuais (SCHLINDWEIN, et al., 2010), em águas superficiais e subterrâneas (GARCIA et al., 2012).

Outro vírus avaliado, o segundo mais abundante nas amostras dos diferentes sítios de coletas de água, foi o RVA, que teve seu genoma presente em 45,8% (33/72) das amostras avaliadas, não sendo detectado em nenhuma amostra da SAC. Os RVA são excretados nas fezes humanas em uma concentração de até  $10^{10}$  partículas virais/g e estas partículas no ambiente perduram intactas e infecciosas por longos períodos (BOSH et al., 2008). Dentre os estudos mais recentes que contemplaram RVA em amostras ambientais, Rigotto et al. (2010) detectou em seu estudo RVA em tecido de ostras e Fumian et al. (2011) investigou e detectou RVA em 100% de amostras de esgotos humano.

Quanto ao resultado negativo de RVA no sítio de coleta SAC, sugere-se que se deva a esta água ser previamente clorada. A eficiência germicida do cloro é atribuída a sua capacidade e facilidade de penetração em membranas celulares e pela interação com as proteínas do capsídeo e ou ácido nucléico viral (CHEREMISINOFF, 2002). Por outro lado Guitierrez & Nguyen (2012) descreveram a alta capacidade de RVA agregarem-se em partículas sólidas suspensas em águas ambientais, se protegendo de agentes inativantes. Estudos demonstram que a persistência da partícula de rotavírus, seu genoma e de sua infecciosidade varia de acordo com o a matriz ambiental, por exemplo, a diferença entre águas de superfície (maior conteúdo de matéria orgânica permite maior agregação viral) e águas subterrâneas (menos matéria orgânica menor agregação viral) (ESPINOSA et al., 2008).

Quando se investigou a presença de JCPyV nos sítios de coletas, 13,8% (10/72) das amostras foram positivas para JCPyV, sendo que tal vírus foi encontrado somente nos Micro-ambientes 1 (centro da lagoa), 3 (considerado degradado) e 4 (área de coleta de água e recreação) da Lagoa do Peri. Tendo em vista que a Lagoa do Peri é amplamente utilizada para atividades recreacionais, principalmente frequentada por banhistas durante o veraneio (LAGO, 1996) e que o JCPyV é excretado na urina de humanos contaminados (HUNDESA et al., 2006; MCNEES et al., 2005), sugere-se que esses fatos sejam fatores importantes para justificar a presença de tal vírus na água da lagoa. Poucos são os trabalhos que reportam JCPyV em águas de consumo humano, no entanto ele é citado como um dos vírus de DNA mais prevalentes em amostras ambientais, como em água de rio, água do mar e esgotos humanos (BOFFIL-MAS et al., 2006; HUNDESA et al., 2006; FUMIAN et al., 2010). Bofill-Mas et al. (2001) sugere que o JCPyV tenha uma rota transmissão pela via urino-oral e cita este vírus como um novo potencial indicador de contaminação ambiental por efluentes humanos, tendo em vista que este vírus se demonstrou estável em valores de pH de 1, 3 e 5, sugerindo sua resistência a fatores de inativação ambiental, bem como a acidez do trato gastrointestinal.

Quando se investigou a prevalência de HAV nos sítios de coletas, 12,5% (9/72) das amostras apresentaram positividade. Este vírus só foi encontrado, e em baixa concentração (como mostra a Tabela 2), nos Micro-ambientes 3 e 4 da Lagoa do Peri e na SAC. Estudos voltados para a detecção de HAV por meio de PCR e suas variações são reportados, como os estudos conduzidos por Borchardt et al. (2003) que detectou HAV em águas de poços artesianos, por Rigotto et al. (2010) que avaliou e encontrou HAV em 16% das amostras de água de consumo analisadas e mais recentemente por Prado et al. (2012) que encontrou 58% das amostras de esgoto humano positivos para HAV. Quanto a estabilidade do HAV, Koopmans e Duizer (2004) reportaram a facilidade deste vírus adsorver-se em partículas sólidas suspensas no ambiente aquático, se protegendo de fatores inativantes ambientais; O HAV também é conhecido por ser o vírus de RNA mais resistente no meio ambiente aquático, se comparado com outros vírus de RNA fita simples, como o poliovírus (RZEZUTKA & COOK, 2004), apresentando estabilidade em valores de pH 1,0, temperaturas altas (56°C) e resistência a tratamentos convencionais de água (cloração) (CUTHBERT, 2001; IRVING, et al., 2012).

O estudo da distribuição sazonal dos vírus nos sítios de coletas, demonstrou que na Nascente/Fonte, HAV e JCPyV não foram

detectados em nenhuma estação do ano e HAdV e RVA apresentaram correlação negativa no inverno e na primavera (onde a presença de RVA significou a diminuição de HAdV), o que não foi ainda reportado na literatura; Na SAC, HAdV e HAV estiveram positivamente correlacionados durante o outono e JCPyV e RVA não foram encontrados em nenhuma estação do ano neste sítio. Na Lagoa do Peri, HAdV, RVA e HAV foram mais frequentes na estação do inverno, sendo correlacionados positivamente nesta estação, enquanto JCPyV foi restrito a primavera e verão. Estes resultados podem se dever a maior estabilidade dos vírus no inverno, isto porque a incidência de raios UV (que é um fator de degradação viral) diminui, sendo, portanto os vírus entéricos reportados durante esta estação nos ambientes aquáticos (LIPP et al., 2001; WETZ et al., 2004). Fong & Lipp (2005) mostraram que temperaturas ambientais mais elevadas podem danificar o capsídeo viral, o que poderia expor seu genoma a fatores degradantes. De maneira geral, os HAdV são reportados por estarem distribuídos amplamente em todas as estações do ano (LIN et al., 2004; CHIU et al., 2010), no entanto sua detecção pode estar diminuída nas estações mais quentes (primavera e verão), em função das altas temperaturas, que influenciam na estabilidade viral (FONG; GRIFFIN & LIPP, 2005), o que corrobora com os dados encontrados neste trabalho. Quanto ao RVA, detectou-se sua distribuição predominantemente no inverno, o que corrobora os resultados de Mehnert et al. (1999) e Borchardt et al. (2003), em que o RVA foi relatado por ocorrer o ano todo, porém com maior frequência no inverno.

A distribuição sazonal de JCPyV (vírus excretado na urina de humanos contaminados (BOOTHPUR & BRENNAN, 2010) na Lagoa do Peri foi limitada ao verão e primavera. Explica-se que estas estações correspondem às de veraneio e a Lagoa do Peri, especialmente neste período, é palco de atividades recreacionais, recebendo mais de 2 mil banhistas (LAGO, 1998), com isso sugere-se fortemente que a presença do JCPyV na Lagoa esteja intimamente relacionada a este cenário. Esta sugestão é reforçada, uma vez que a correlação entre parâmetros físico-químicos e de nutrientes com os vírus detectados na Lagoa do Peri demonstrou que JCPyV foi o único vírus que apresentou correlação, sendo esta positiva, com nitrito, especificamente no Micro-ambiente 4 (local utilizado para coleta de água e atividades recreacionais) (Figura 17). O nitrito é o estado intermediário do nitrogênio entre amônia e nitrato e sua presença em águas residuárias e em esgotos indicam atividade bacteriana (bactérias podem oxidar biologicamente uréia em amoníaco, e, em seguida, nitrito e nitrato) (METCALF & EDDY, 2003),

sendo a uréia excretada na urina de mamíferos (RANDALL, BURGGREN & FRENCH, 1997).

O presente trabalho abordou a avaliação da integridade (pelo ensaio enzimático com DNase I) e infecciosidade (pelo EPL e ICC-et-RT-qPCR) de HAdV presentes em amostras de águas provenientes dos sítios de coletas destinados ao uso humano direto, como era o caso do Micro-ambiente 4 (MA 4) da Lagoa do Peri, Nascente/Fonte e SAC.

É relatada a importância de utilizar técnicas que detectem não só o genoma do vírus mas também sua integridade, no que se refere ao estado de conservação das partículas virais, sendo consideradas íntegras aquelas em que o material genético esteja protegido pelo capsídeo do vírus (GIRONES et al., 2010) e infecciosidade, que se refere à capacidade dos vírus adsorverem aos receptores de superfície celular, adentrarem nas células e se replicarem (HERZOG et al., 2008).

Quando comparadas às cópias genômicas totais com aquelas provenientes de partículas virais íntegras, no Micro-ambiente 4 da Lagoa do Peri houve uma redução média de 2,5 logs., na Nascente/Fonte de 1,8 logs. e na SAC de 0,85 logs. Essa redução se deve a degradação dos genomas livres circulantes nas matrizes de água pela ação da enzima DNase I, sendo a maior média de genomas livres registrado no MA 4 da Lagoa do Peri, seguido pela Nascente/Fonte, sugerindo que a degradação do capsídeo viral tenha se dado por meio da radiação U.V, já que nesses dois sítios a água fica exposta ao sol, enquanto na SAC há um reservatório de água que fica protegido dos raios solares. Essa suposição é suportada pelos estudos que relatam a degradação das proteínas do capsídeo viral por meio da radiação U.V emitida pelo sol (GERBA, GRAMOS & NWACHUKU, 2002; NUANUALSUWAN & CLIVER, 2002; THURSTON-ENRIQUEZ et al., 2003). No entanto os HAdV possuem capacidade de agregarem-se em partículas presentes na água, permanecendo protegidos de fatores inativantes (BOSCH, 1998).

A comprovação que as partículas virais estejam íntegras não garante que as mesmas estejam também infecciosas, pois fatores como temperatura, pH e radiação U.V são conhecidos por provocarem modificações conformacionais moderadas no capsídeo viral, resultando em perda da capacidade infecciosa (THURSTON-ENRIQUEZ et al., 2003; FONG & LIPP, 2005). Por isso, a capacidade infecciosa de HAdV, presentes nas amostras de água de consumo e atividades humanas, foi avaliada por meio de duas técnicas envolvendo a passagem por uma cultura celular *in vitro*: EFP e ICC-et-RT-qPCR. A aplicabilidade e sensibilidade do ensaio de ICC-et-RT-qPCR foi

comprovada, tendo em vista sua capacidade de detectar até  $1 \times 10^2$  GC/mL em 24 horas, quantidade viral que não seria detectável pela técnica de EPL, pois equivaleria a  $1 \times 10^{-1}$ UFP/ml de HAdV. Outro aspecto muito importante é que o ICC-et-RT-qPCR quantifica o mRNA viral que está sendo transcrito durante a replicação viral no núcleo da célula hospedeira, o que evita resultados falsos negativos ou positivos (KO et al., 2003). Por ser o PCR quantitativo (qPCR) uma técnica rápida, sensível e usual na detecção de patógenos em amostras ambientais, esta técnica combinada com os métodos de cultura celular podem quantificar vírus infecciosos com segurança e rapidez (KO et al. 2005; LAMBERTINI et al., 2010).

Quando se avaliou a infecciosidade de HAdV contidos em amostras de águas de mananciais, todas as que apresentaram partículas infecciosas por meio do EPL apresentaram estas infecciosas pelo ICC-et-RT-qPCR, mas o inverso não foi verdadeiro, comprovando mais uma vez a habilidade e sensibilidade da técnica de ICC-et-RT-qPCR, frente a detecção de HAdV infecciosos.

O EPL tem sido utilizado principalmente em estudos de inativação, resistência e titulação viral, sendo também uma ferramenta útil na detecção de vírus ambientais (CROMEANS et al., 2008; KAHLERR et al., 2012; RIGOTTO et al., 2011; GARCIA et al., 2011). Lee & Jeong (2004) enfatizam a importância de usar a cultura celular integrada ao RT-qPCR quando se deseja mensurar patógenos infecciosos, justificando que esta técnica é segura e precisa. No entanto, a maioria dos trabalhos que utilizam ICC-RT-qPCR, procuram estimar a infecciosidade viral em amostras semeadas com o patógeno estudado, mas raramente empregam tal técnica para avaliar vírus a partir de amostras ambientais (GALLAGHER & MARGOLIN, 2007; LAMBERTINI et al., 2010; LI et al., 2010). O uso do ensaio de ICC-RT-qPCR foi reportado como sensível rápido e acurado na detecção de vírus no monitoramento de amostras ambientais (HONG-XIA et al., 2011).

No estudo de distribuição sazonal de HAdV infecciosos nos sítios de coleta, observou-se que eles estiveram amplamente presentes em todas as estações do ano, porém menos prevalentes no verão no MA4 e Nascente/Fonte, sugerindo que este resultado se deu devido a incidência do sol (raios UV) que podem danificar o capsídeo viral promovendo a perda da infecciosidade, fato esse já relatado por Wetz et al. (2004) e Fong & Lipp (2005).

A integridade de HAdV esteve correlacionada positivamente com sua infecciosidade, por ICC-et-RT-qPCR, exceto no sítio de coleta

Nascente/Fonte. Neste sentido, como os estudos que avaliam a infecciosidade viral geralmente se referem às metodologias laboriosas por envolverem cultura celular e, que alguns vírus não são adaptados a culturas *in vitro*, metodologias como os ensaios enzimáticos servem como alternativas para fazer inferências sobre a capacidade infecciosa viral (RODRÍGUEZ; PEPPER & YERBA, 2009).

Nuanualsuwan & Cliver (2002) trataram amostras ambientais, contendo vírus de RNA, com enzima RNase, a fim de acessar a integridade viral após testes de inativação com luz ultravioleta, e comprovaram a aplicabilidade do ensaio enzimático; Em 2006, Bofill-Mas et al. trataram amostras de esgoto com a enzima DNase, e não observaram diferenças notáveis nos níveis de HAdV e JCPyV em relação às amostras não tratadas, concluindo desta forma que todos os genomas detectados provinham de partículas virais íntegras; Mais recentemente, Viancelli et al. (2011) aplicou a metodologia do ensaio enzimático (DNase I) em amostras provenientes de sistemas de tratamento de dejetos suínos e também confirmou a aplicabilidade desta técnica, assim como Kovac et al. (2012) que utilizou o ensaio enzimático seguido de qPCR para avaliar a inativação de HAdV-2 em água de consumo humano e selecionou apenas partículas virais íntegras.

Considerando a importância dos HAdV, bem como sua presença, integridade e infecciosidade nas amostras de águas de mananciais superficiais monitoradas nesse trabalho, foi realizado também sua caracterização molecular e estudos filogenéticos (utilizando somente amostras que apresentaram HAdV íntegros dos sítios de coletas do MA 4 da Lagoa do Peri, da Nascente/Fonte e SAC), o que possibilitou determinar os sorotipos virais prevalentemente circulantes. Muitos trabalhos abordam a caracterização de HAdV por métodos de imunohistoquímica, tais como neutralização de soro e hemaglutinação (ECHAVARRIA, 2009; WALSH et al., 2010), no entanto a utilização de métodos moleculares e estudos de bioinformática têm demonstrado maior eficiência na caracterização de HAdV, bem como na descoberta de novos tipos virais (LIU et al., 2011, ISHIKO & AOKI, 2009).

No presente estudo a região gênica amplificada e sequenciada corresponde a um fragmento que codifica para a proteína *hexon* do capsídeo viral. A proteína estrutural *hexon* é componente principal do capsídeo de AdV, altamente imunogênica e conservada, além do que, confere aos AdV a sua conformação icosaédrica (FIELDS, KNIPE & HOWLEY, 2007). A caracterização de HAdV por meio da região do *hexon* viral já foi reportado, mais recentemente, por Barrero et al. (2012), Lee et al. (2012), Liu et al. (2011) e Moresco et al. (2011).

As análises de similaridade realizadas revelaram que o sorotipo prevalente de HAdV circulante nas matrizes analisadas correspondia ao HAdV-2 (respiratório - subgrupo C). HAdV-2 são comumente encontrados em todo o mundo, sendo reportados por causar doenças que afetam o trato respiratório superior e inferior, particularmente em crianças (FOY et al., 1997; VIDELA et al., 1998), além do que HAdV do subgrupo C (C1,-C2,-C5,-C6, e C7) são os agentes virais conhecidos por causarem infecções respiratórias (WOLD & HORWITZ, 2007).

Os resultados de caracterização molecular de HAdV relatados neste trabalho corroboram os demais estudos que demonstram a prevalência de HAdV-2 no ambiente aquático, uma vez que um dos sorotipos mais excretados pelo homem (MENA & GERBA, 2008), sugerindo que este tipo viral seja excretado intermitentemente nas fezes da maioria dos indivíduos, mesmo que assintomáticos (WYN-JONES et al., 2010). Os sorotipos respiratórios de HAdV circulantes variam temporalmente e geograficamente (TOHMA et al., 2012). Recentemente, Lee et al. (2011) encontrou HAdV-2 em 11% das amostras de fezes de crianças Coreanas com diarreia; Barrero et al. (2011) analisando fezes de crianças com diarreias, na Argentina, detectou que 40,5% dos HAdV pertenciam ao subgrupo C e Moresco et al. (2011) detectou em todas as amostras de água de mar analisadas a presença de HAdV-2.

Quando as sequências aminoacídicas obtidas neste trabalho, quando comparadas, foi possível observar algumas substituições/modificações pontuais. Tohma et al. (2012) e Kaneko et al., (2009) também compararam sequências de aminoácidos de HAdV respiratórios isolados diretamente de pacientes e observaram algumas substituições, sugerindo que isso ocorre devido ao tropismo viral nos tecidos respiratórios.

A água seja ela destinada a atividades recreacionais ou para consumo humano, quando contaminada se torna veículo de patógenos, principalmente microorganismos entéricos, incluindo bactérias, vírus e protozoários (AW & ROSE, 2012). Segundo a Organização Mundial da Saúde o elevado número de patógenos contidos nos recursos hídricos representa o maior desafio para garantir a segurança das águas ambientais e potáveis (WHO, 2010).

Especificamente nas águas dos sítios de coletas monitorados neste trabalho, sugerimos que as possíveis vias de contaminação viral sejam pelo lançamento de resíduos humanos no ambiente, que chegam aos mananciais superficiais, uma vez que a cidade de Florianópolis possui somente 44% de cobertura de coleta e tratamento de esgoto

sanitário e que ainda durante o veraneio a população da cidade aumenta resultando também no aumento da descarga de esgotos no meio ambiente (PMISB, 2008). Outra via de contaminação pode se dar pelo amplo uso de fossas com sumidouros nas proximidades de rios e córregos, ainda uma prática muito frequente nos moradores da cidade de Florianópolis, que drenam os contaminantes até as reservas de água (LAPOLLI, 1990, Rede Nacional de Capacitação e Extensão Tecnológica em Saneamento Ambiental – ReCESA, 2008), uma vez que rios, riachos, sua bacia de drenagem, assim como a porção territorial, estão intimamente relacionados entre si, onde um ambiente tem influência direta sobre o outro, e ambos se complementam (TEIVE, LISBOA & PETRUCIO, 2008). São reportadas, também como importantes vias de contaminação de mananciais, as inundações, que promovem a disseminação de patógenos e contaminantes provenientes de esgoto sanitário, valas e fossas (ReCESA, 2008).

Na Lagoa do Peri, em estudos prévios realizados, Silva (2000) e Simonassi (2001) e mais recentemente Hennemann & Petrucio (2011) classificaram-na como homogênea em toda sua extensão, principalmente devido à ação do vento e homogênea também em sua coluna d'água. Considerando este fato, os parâmetros físico-químicos e de nutrientes avaliados neste trabalho, não apresentaram diferença significativa entre os Micro-ambientes monitorados, consideramos que a contaminação viral também seja homogeneizada, devido à ação do vento e da movimentação da água que carrega a contaminação de um Micro-ambiente para outro. Sugere-se que a contaminação viral da Lagoa do Peri seja alimentada, tanto pelos visitantes em épocas de veraneio, quanto pelo Rio Ribeirão Grande (Micro-ambiente 3), pois em suas margens são praticadas atividades agrícolas de subsistência bem como existem propriedades localizadas às margens de tal, o que pode comprometer a qualidade da água (LAPOLLI et al., 1990; LAGO; 1996; CARDOSO et al., 2008).

Frente aos resultados obtidos neste trabalho, é reforçada a necessidade de tomadas de medidas efetivas de desinfecção de água, no que se refere aos vírus entéricos (GERBA, GRAMOS & WACHUKU, 2002; KO, CROMEANS & SOBSEY, 2005), especialmente no Brasil, que a legislação, quanto à avaliação microbiológica no monitoramento da qualidade das águas balneárias, limita-se à presença de bactérias coliformes fecais, *Escherichia coli* ou enterococos (CONAMA, 2000) e para água para consumo humano (Portaria MS 2.914/2011) apenas se prevê o monitoramento de coliformes totais e *Escherichia coli* ou coliformes termotolerantes, no entanto relatos datados desde 1995

indicam a maior labilidade das bactérias quando comparadas aos vírus, tanto no que diz respeito à interferência dos fatores ambientais, como a radiação U.V e aos processos convencionais de tratamento de água (como a cloração amplamente utilizada) (HURST & GERBA, 1995; CALGUA et al., 2008; ENRIQUEZ, GIRONES et al., 2010).

Em geral, o lançamento de esgoto humano no ambiente reflete o descaso com a segurança sanitária, principalmente em águas de mananciais superficiais utilizadas para abastecimento e consumo da população. Frente à ampla distribuição e persistência dos vírus de veiculação hídrica, há a necessidade e apelo da implementação do monitoramento e remoção viral no processo de potabilização da água, bem como no tratamento de dejetos, o que implica positivamente na saúde humana.



## 7 SUMÁRIO DOS PRINCIPAIS RESULTADOS

Os principais resultados obtidos durante o desenvolvimento desta Dissertação de Mestrado foram:

- ❖ Monitoramento de parâmetros físico-químicos e de nutrientes nos Micro-ambientes 1, 2, 3 e 4 da Lagoa do Peri: Foi registrada variação temporal mas não espacial entre os Micro-ambientes da Lagoa do Peri ao longo do monitoramento, demonstrando sua homogeneidade.
- ❖ Recuperação viral pelo método de adsorção-eluição a partir de água de manancial superficial: A taxa de recuperação viral (avaliada por EPL e por ICC-et-RT-qPCR) foi de 10%.
- ❖ Deteccção de genomas de HAdV, JCPyC, HAV e RVA: O genoma de HAdV foi detectado em 93% (67/72) das amostras avaliadas, de JCPyV em 13,8% (10/72), de HAV em 12,5% (9/72) e de RVA em 45,8% (33/72).
- ❖ Distribuição sazonal viral: Os sítios de coletas (Lagoa do Peri, Nascente/Fonte e SAC) apresentaram distribuição sazonal viral variada. Na Lagoa do Peri: HAdV esteve presente em todas as estações do ano, prevalentemente no inverno; JCPyV exclusivamente no verão e primavera; HAV exclusivamente no inverno e RVA em todas as estações do ano, prevalentemente no inverno. Na Nascente/Fonte: HAdV ocorreu no verão e prevalentemente no outono; RVA na primavera e inverno e a presença de JCPyV e HAV não foi registrada. Na SAC: HAdV ocorreu em todas as estações do ano, mais prevalentemente no outono; HAV no verão e outono e JCPyV e RVA não ocorreu.
- ❖ Correlação dos parâmetros físico-químicos e de nutrientes com a deteção viral na Lagoa do Peri: A única correlação observada foi a de nitrito com JCPyV (correlação positiva no Micro-ambiente 4 da Lagoa do Peri).
- ❖ Avaliação da Integridade de HAdV nos sítios de coletas MA4 da Lagoa do Peri, Nascente/Fonte e SAC: Um total de 32 amostras foram avaliadas, dessas 78% (25/32) apresentaram partículas de HAdV íntegras, sendo: 83% (10/12) no MA4,

77% (7/9) na Nascente/Fonte e 66.6% (8/11) na SAC. A média logarítmica de redução de CG pós tratamento enzimático foi: 2,5 logs. no MA4, 1,8 logs. Na Nascente/Fonte e 0,85 log, na SAC.

- ❖ Avaliação da infecciosidade/viabilidade de HAdV nos sítios de coletas MA4 da Lagoa do Peri, Nascente/Fonte e SAC: Um total de 32 amostras foram avaliadas quanto à presença de HAdV infecciosos, por meio de duas técnicas: EPL e ICC-et-RT-qPCR. Em EPL 40,6% (13/32) das amostras apresentaram partículas infecciosas de HAdV, sendo: 66,6% (8/12) no MA4, 11,1% (1/9) na Nascente/Fonte e 36,3% (4/11) na SAC. Em ICC-et-RT-qPCR 62,5% (20/32) das amostras apresentaram partículas virais infecciosas de HAdV, sendo: 83,3% (10/12) no MA4, 33,3% (3/9) na Nascente/Fonte e na 3,3% (7/11) na SAC.
- ❖ Padronização do ensaio de ICC-et-RT-qPCR e teste de equivalência das unidades UFP e CG: O melhor tempo de incubação (adsorção e replicação de HAdV em células A549) foi 24h. O ICC-et-RT-qPCR, em 24h, na matriz de água de manancial e usando como modelo o HAdV-2 e células A549, foi sensível a ponto de detectar até  $1 \times 10^2$  CG/mL de HAdV. A equivalência das unidades “UFP” e “CG”, nas mesmas condições descritas, foram determinadas em 3,4 Logs. a mais em CG (isso é  $10^2$  UFP equivale a aproximadamente  $10^5$  CG).
- ❖ Distribuição sazonal de HAdV Infecciosos em ICC-et-RT-qPCR: No MA4 da Lagoa do Peri os HAdV estiveram distribuídos 10% no verão, 25% no inverno, 30% primavera e 35% no outono; Na Nascente/Fonte 45% na primavera e 55% no outono e na SAC 17% no verão, 76% no inverno, 4,5 % no outono e 2% na primavera.
- ❖ Comparação e correlação entre integridade e infecciosidade de HAdV: Foi observada na maioria das amostras correlação positiva entre HAdV íntegro e infecciosos.
- ❖ Caracterização Molecular de HAdV: Um total de 19 amostras foram sequenciadas (amplicons de da região *hexon* de HAdV). Todas as amostras (utilizando sequências nucleotídicas) demonstraram maior prevalência do sorotipo 2, que pertence ao

- ❖ subgênero C e é um HAdV respiratório. Foram observadas modificações/substituições entre as sequências aminoacídicas que não implicaram em mudanças conformacionais das estruturas secundárias e terciárias da proteína *hexon* do capsídeo de HAdV.



## 8 CONCLUSÕES GERAIS

- ❖ A detecção de material genético de vírus humanos veiculados pela água, nos sítios de coletas, comprova que as águas de mananciais superficiais utilizadas para consumo da população estão sendo acometidas por dejetos de origem humana;
- ❖ A presença de HAdV infecciosos nas águas de mananciais superficiais apontam a persistência e resistência deste vírus no ambiente, bem como enfatiza risco para a saúde humana;
- ❖ O ensaio de integridade de HAdV por tratamento enzimático é um método menos laborioso que os de cultura celular e se mostrou capaz de detectar partículas virais com potencial infeccioso;
- ❖ Os parâmetros físico-químicos e de nutrientes, em sua maioria, não estão correlacionados com a presença de vírus em águas de mananciais superficiais (com exceção da correlação entre nitrito e JCPyV).
- ❖ O ensaio de ICC-et-RT-qPCR se demonstrou mais sensível e rápido na detecção de HAdV infecciosos, se comparado com EPL.



## **9 PERSPECTIVAS**

Tendo em vista os resultados obtidos neste trabalho, as perspectivas de continuidade estão voltadas principalmente para estudos de estabilidade e desinfecção de vírus de veiculação hídrica em matrizes ambientais, por meio de tratamentos alternativos, como escala de pH, escala de temperatura, radiação U.V, biodigestão anaeróbia e cloração, sendo estes tratamentos aplicados isolada e/ou concomitantemente.



## 10 REFERÊNCIAS

ABDELZAHER, A.M., WRIGHT, M.E., ORTEGA, C., SOLO-GABRIELE, H.M., MILLER, G., ELMIR, S., NEWMAN, X., SHIH, P., BONILLA, A., BONILLA, T.D., PALMER, C.J., SCOTT, T., LUKASIK, J., HARWOOD, V.J., MCQUAIG, S., SINIGALLIANO, C., GIDLEY, M., PLANO, L.R.W., ZHU, X., WANG, J.D., FLEMING, L.E. Presence of pathogens and indicator microbes at a non-point source subtropical recreational marine beach. **Applied and Environmental Microbiology**, v.76, p.724-732, 2010.

ABES – ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE ENGENHARIA SANITÁRIA – SEÇÃO SÃO PAULO. **Subsídios para legislação nacional de água para consumo humano**. Ano I, v.1, (nº1), 2010.

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

ALBINANA-GIMENEZ, N., MIAGOSTOVICH, M. P., CALGUA, B., HUGUET, J. M., MATIA, L., GIRONES, R. Analysis of adenoviruses and polyomaviruses quantified by qPCR as indicators of water quality in source and drinking-water treatment plants. **Water Research**, v. 43, p. 2011–2019, 2009.

ALLANDER, T., ANDREASSON, K., GUPTA, S., BJERKNER, A., BOGDANOVIC, G., PERSSON, M.A. Identification of a third human polyomavirus. **Journal Virology**, v.81, n. 8, p. 4130–4136, 2007.

ALLARD, A., ALBINSSON, B., WADELL, G. Detection of adenoviruses in stools from healthy persons and patients with diarrhea by two-step polymerase chain reaction. **Journal of Medical Virology**, v.37, p.149-157, 1992.

ALTSCHUL, S.F., MADDEN, T.L., SCHAFER, A.A., ZHANG, J., ZHANG, Z., MILLER, W., LIPMAN, D.J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, v. 25, p. 3389–3402, 1997.

APHA: Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 21st edition, American Public Health Association/American Water Works Association/Water Environment Federation, Washington, DC, USA 2005.

AW, T.G., ROSE, J.B., Detection of pathogens in water: from phylochips to qPCR to pyrosequencing. **Current Opinion in Biotechnology**, v.23 (3), p. 422-430, 2011.

BÁNYAI, K., MARTELLA, V., MELG, E.; KISFALI, P., PÉTERFI, Z., BENKŐ, M., MELEGH, B.; SZUCS, G. Searching for HAdV-52, the putative gastroenteritis-associated human adenovirus serotype in Southern Hungary. **New Microbiologic**, v.32, p.185-188, 2009.

BARRERO, P.R., VALINOTTO, L.E., TITTARELLI, E., MISTCHENKO, A.S. Molecular typing of adenoviruses in pediatric respiratory infections in Buenos Aires, Argentina (1999–2010). **Journal of Clinical Virology**, v. 53, p. 145–150, 2012.

BOFILL-MAS, S., ALBINANA-GIMENEZ, N., CLEMENTE-CASARES, P., HUNDESA, A., RODRIGUEZ-MANZANO, J., ALLARD, A., CALVO, M., GIRONES, R. Quantification and Stability of Human Adenoviruses and Polyomavirus JCPyV in Wastewater Matrices. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, n. 12, p. 7894–7896, 2006.

BOFILL-MAS, S., CLEMENTE-CASARES, P., ALBINANA GIMÉNEZ, N., DE MOTES, C.M., HUNDESA, A., GIRONES, R. Effects on health of water and food contamination by emergent human viruses. **Revista Española de Salud Pública**, v. 79, n. 2, p.253-269, 2005.

BOFILL-MAS, S., CLEMENTE-CASARES, P., MAJOR, E.O., CURFMAN, B. Y., GIRONES, R. Analysis of the excreted JC

virus strains and their potential oral transmission. **Journal Neurovirology**, v. 9, n. 4, p. 498-507, 2003.

BOOTHPUR, R., BRENNAN, D.C. Human polyoma viruses and disease with emphasis on clinical BK and JC. **Journal of Clinical Virology**, v.47, p.306-312, 2010.

BORCHARDT, M.A., BERTZ, P.D., SPENCER, S.K., BATTIGELLI, D.A. Incidence of enteric viruses in groundwater from household wells in Wisconsin. **Applied Environmental Microbiology**, v. 69, p. 1172-1180, 2003.

BOSCH, A., GUIX, S., SANO, D., 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.

BOSH, A. Human enteric viruses in the water environment: a minireview. **International Microbiology**, v.1, p191–196, 1998.

BRASIL: Política Nacional de Recursos Hídricos LEI Nº 9.433, de 8 de Janeiro de 1997. <http://www.ana.gov.br/Institucional/Legislacao/leis/lei9433.pdf>. Acesso em: 18 de Julho 2012.

BRASIL: Diretrizes Nacionais para o Saneamento Básico. LEI Nº 11.445 de 05 de Janeiro de 2007. [http://4ccr.pgr.mpf.gov.br/institucional/grupos-de-trabalho/gt-aguas/docs\\_legislacao/Lei%2011445%20-%202007.pdf](http://4ccr.pgr.mpf.gov.br/institucional/grupos-de-trabalho/gt-aguas/docs_legislacao/Lei%2011445%20-%202007.pdf). Acesso em: 19 de Julho de 2012.

CALGUA, B.M., A.; GRÜNERT, A.; BOFILL-MAR, S.; CLEMENTE-CASARES, P.; HUNDESA, A.; WYN-JONES, A. P.; LÓPEZ-PILA, J. M.; GIRONES, R. Development and application of a one-step low cost procedure to concentrate viruses from seawater samples. **Journal of Virological Methods**, v.153, p.79-83, 2008.

CARDOSO, F. S., PEREIRA, G., AGUDO-PADRÓN, A. I., NASCIMENTO, C., ABDALLA, A. Análise do uso e ocupação da

terra na bacia da Lagoa do Peri, Florianópolis, SC. **Caminhos de Geografia**, v. 9, n. 27, p. 201 – 213, 2008.

CARRILHO, F.J., MENDES, C.C., SILVA, L.C. Epidemiology of hepatitis A and E virus infection in Brazil. **Gastroenterology Hematology**, v.28, n.3, p.118-25. 2005.

CARVALHO-COSTA, F.A.M.D.P., VOLOTAO, E.D.M.P., DE ASSIS, R.M.S.B, FIALHO, A.M.B, DE ANDRADE, J.D.S.R.B, Rotavirus: Surveillance During the Introduction of a Vaccination Program, Brazil, 2005-2009. **Pediatric Infectious Disease Journal**, v. 30p. 35-41.

CASAN – COMPANHIA CATARINENSE DE ÁGUAS E SANEAMENTO. História do Saneamento Básico de Florianópolis: Águas – Esgotos – Lixo. Disponível em: <http://www.casan.com.br/index.php?sys=241>. Acesso em: 17 de agosto de 2012.

CDC - CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Update on vaccine-derived polioviruses - worldwide, January 2008-June 2009. **MMWR - Morbidity and mortality weekly report**, v.58, p. 1002- 1006, 2009.

CHANDRAN, A., FITZWATER, S., ZHEN, A., SANTOSHAM, M. Prevention of rotavirus gastroenteritis in infants and children: rotavirus vaccine safety, efficacy, and potential impact of vaccines. **Biologics**, v. 4, p. 213-229, 2010.

CHEN, Z., HSU, F.C., BATTIGELLI, D., CHANG, H.C. Capture and release of viruses using amino-functionalized silica particles. **Analytica Chimica Acta**, v.569, p.76-82, 2006.

CHEREMISINOFF, N.P. Handbook of Water and Wasterwater Treatment Technologies. Ed. **Butterworth Heinemann, Woburn, MA, USA**, 2002.

CHIU, S.S., CHAN, K.H., CHEN, H. Virologically confirmed population-based burden of hospitalization caused by respiratory syncytial virus, adenovirus, and parainfluenza viruses in children in

Hong Kong. **Pediatric Infectivity Disease Journal**, v.29, p.1088–1092, 2010.

CLEMENTE-CASARES, P., PINA, S., BUTI, M., JARDI, R., MARTIN, M., BOFILL-MAS, S., GIRONES, R. Hepatitis E virus epidemiology in industrialized countries. **Emergence Infectivity Disease**, v. 9, p.448-454, 2003.

CLESCERI, S.L., GREENBERG, A.E., EATON, A.D. **Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater** (APHA). 21 ed. Washington: American Public Health Association, 2005.

CONAMA – CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE. **A Resolução Nº 274 de 29 de Novembro de 2000**. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/port/conama/res/res00/res27400.html>>. Acesso em: 18 de maio de 2010.

CROMEANS, T.L., LU, X., ERDMAN, D.D., HUMPHREY, C.D., HILL, V.R. Development of a plaque assay for adenoviruses 40 and 41. *Journal of Virological Methods*, v.151, p.140-145, 2008.

CUTHBERT, J.A. Hepatitis A: old and new. **Clinical Microbiology Reviews**, v.14, p.38-58, 2001.

DJIKENG, A., KUZMICKAS, R., ANDERSON, N.G., SPIRO, D.J. Metagenomic analysis of RNA viruses in a fresh water lake. **PLoS ONE**, v.4, n. 9, p. e7264. 2009.

ECHAVARRIA, M (2009) Adenoviruses. In: Zuckerman AJ, Banatvala JE, Pattison JR, eds. *Principles and Practice of Clinical Virology*. Sixth Edition ed. Chichester: John Wiley & Sons. pp 463–488.

ENRIQUEZ, C.E., HURST, C.J., GERBA, C.P. Survival of the enteric adenoviruses 40 and 41 in tap, sea and wastewater. **Water Research**, v. 29, p. 2548-2553, 1995.

ESPINOSA, A.C., MAZARI-HIRIART, M., ESPINOSA, R., MARURI-AVIDAL, L., MÉNDEZ, E., ARIAS, C.F. Infectivity and genome persistence of rotavirus and astrovirus in groundwater

and surface water. **Water Research**, v. 42, n. 10-11, p.2618-2628, 2008.

ESTES, M.K., KAPIKIAN, A.Z. Rotaviruses. In: *Fields Virology*, ed. DM Knipe, PM Howley, DE Griffin, MA Martin, RA Lamb, et al, pp. 1917-1974. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins, 2007.

ESTEVEZ, F.A., CALIMAN, A., SANTANGELO, J.M., GUARIENTO, R.D., FARJALLA, V.F., & BOZELLI, R.L. Neotropical coastal lagoons: an appraisal of their biodiversity, functionings, threats and conservation management. **Brazilian Journal of Biology**, v. 68 (n° 4), p. 967–981, 2008.

FENG, H., SHUDA, M., CHANG, Y., MOORE, P.S. Clonal integration of a polyomavirus in human Merkel cell carcinoma. **Science**, v. 319, n. 5866, p. 1096–1100, 2008.

FIELDS, B.N., KNIPE, D.M., HOWLEY, P.M. **Fields Virology**, Philadelphia: Lippincott-Williams & Wilkins, 5 ed, v.1, p. 3177, 2007.

FONG, T.T., GRIFFIN, D.W., LIPP, E.K. Molecular assays for targeting human and bovine enteric viruses in coastal waters and their application for library-independent source tracking. **Applied and Environmental Microbiology**, v.71, p.2070-2078, 2005.

FONG, T.T., LIPP, E.K. Enteric viruses of human and animals in aquatic environments: health risks, detection, and potential water quality assessment tools. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 69, p. 357-371, 2005.

FORMIGA-CRUZ, M., TOFINO-QUESADA, G., BOFILL-MAS, S., LEES, D.N., HENSHILWOOD, K., ALLARD, A.K., CONDÉN-HANSSON, A.C., HERNROTH, B.E., VANTARAKIS, A., TSIBOUXI, A., PAPAPETROPOULOU, M., FURONES, M.D., GIRONES, R. Distribution of human virus contamination in shellfish from different growing areas in Greece, Spain, Sweden, and the United Kingdom. **Applied and Environmental Microbiology**, v.68, p.5990-5998, 2002.

FOY, H.M. Adenovirus. In: *Viral infections of humans: epidemiology and control*; Evans, A.S., Kaslow, R.A. Eds.; **Plenum Medical Book Company: New York** 4th ed., p119-138, 1997.

FUMIAN, T. M., LEITE, J. P. G., CASTELLO, A. A., GAGGERO, A., CAILLOU, M. S. L., MIAGOSTOVICH, M. P. Detection of rotavirus A in sewage samples using multiplex qPCR and an evaluation of the ultracentrifugation and adsorption-elution methods for virus concentration. **Journal of Virological Methods**, v.170, p.42-46, 2010.

FUMIAN, T.M., GUIMARÃES, F.R., PEREIRA, B.J., DA SILVA, M.T., MUYLAERT, F.F., BOFILL-MAS, S., GIRONÉS, R., LEITE, J.P., MIAGOSTOVICH, M.P. Molecular detection, quantification and characterization of human polyomavirus JC from waste water in Rio de Janeiro, Brazil. **Journal Water Health**, v. 8, n.3, p.438-445, 2010.

FUMIAN, T.M., LEITE, J.P.G., ROSE, T.L., PRADO, T., MIAGOSTOVICH, M.P. One year environmental surveillance of rotavirus specie A (RVA) genotypes circulation after the introduction of the Rotarix. **Water Research**, v. 45, p. 5755–5763, 2011.

GARCIA, L.A., VIANCELLI, A., RIGOTTO, C., PILOTTO, M.R., ESTEVES, P.A., KUNZ, A., BARARDI, C.R. Surveillance of human and swine adenovirus, human norovirus and swine circovirus in water samples in Santa Catarina, Brazil. **Journal Water and Health**, v. 10 (nº3), p.445-52, 2012.

GAYNOR, A.M., NISSEN, M.D., WHILEY, D.M., MACKAY, I.M., LAMBERT, S.B., WU, G. Identification of a novel polyomavirus from patients with acute respiratory tract infections. **PLoS Pathogens**, v. 3, n. 5, p. 64, 2007.

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

GIRONES, R., FERRÚS, M.A., ALONSO, J.L., RODRIGUEZ-MANZANO, J., CALGUA, B., CORRÊA, A.A., HUNDESA, A., CARRATALÁ, A., BOFILL-MAS, S. Molecular detection of pathogens in water - the pros and cons of molecular techniques. **Water Research**, v.44, p.4325-4339, 2010.

GOLTERMAN, H.L., CLYMO, R.S., OHNSTAD, M.A.M. Methods for physical and chemical analysis of freshwater. **Oxford: Blackwell Science Publisher**, 1978.

GRABOW, W.O., TAYLOR, M.B., DE VILLIERS, J.C. New methods for the detection of viruses: call for review of drinking water quality guidelines. **Water Science and Technology**, v. 43, p. 1-8, 2001.

GRIFFIN, J.S., PLUMMER, J.D., LONG, S.C. Torque teno virus: an improved indicator for viral pathogens in drinking waters. **Journal Virology**, v. 5, p. 112, 2008.

GUTIERREZ, L., NGUYEN, T.H. Interactions between Rotavirus and Suwannee River Organic Matter: Aggregation, Deposition, and Adhesion Force Measurement. **Environmental Science and Technology**, v.46 (16), p. 8705-8713, 2012.

HALL, T.A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Oxford Journal: Nucleic Acids Symposium**. Ser. 41, 1999.

HAMAZA, I.A., JURZIK, L., STANG, L., SURE, K., ÜBERLA, K., WILHELM, M. Detection of human viruses in rivers of a densely populated area in Germany using a virus adsorption elution method optimized for PCR analyses. **Water Research**, v.43, p.2657-2668, 2009.

HARAMOTO, E., KATAYAMA, H., OGUMA, K., OHGAKI, S. Quantitative analysis of human enteric adenoviruses in aquatic environments. **Journal of Applied Microbiology**, v.103, p.2153-2159, 2007.

HENNEMANN, M.C., PETRUCIO, M.M. Spatial and temporal dynamic of trophic relevant parameters in a subtropical coastal lagoon in Brazil. **Environmental Monitoring Assess**, v. 181, p. 347-361, 2011.

HERNROTH, B.E., CONDEN-HANSSON, A.C., REHNSTAM-HOLM, A.S., GIRONES, R., ALLARD, A.K. Environmental factors influencing human viral pathogens and their potential indicator organisms in the blue mussel, *Mytilus edulis*: the first Scandinavian report. **Applied and Environmental Microbiology**, v.68, p.4523-4533, 2002.

HERZOG, P., DROSTEN, C., MULLER, M. A. Plaque assay for human coronavirus NL63 using human colon carcinoma cells. **Virology Journal**, v.5, p.138, 2008.

HILLEMANN, M.R., WERNER, J.H. Recovery of new agents from patients with acute respiratory illness. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, 1954. In: *Fields Virology*, Philadelphia: Lippincott-Williams&Wilkins, 5 ed, v.1, p. 3177, 2007.

HIRSCH, H.H., STEIGER, J. Polyomavirus BK. **The Lancet Infectious Diseases**, v.3, p. 611-623, 2003.

HOLLINGER, F. B., EMERSON, S. U. Hepatitis A virus. In: **B. N. Fields, D. N. Knipe, & P. M. Howley (Eds.), Virology** (pp. 799–840). Philadelphia, PA: Lippincott Williams and Wilkins, 2001.

HONG-XIA, M., LIN, Z., YUAN, Z. Rapid quantification of infectious enterovirus from surface water in Bohai Bay, China using an integrated cell culture-qPCR assay. **Marine Pollution Bulletin**, v. 62 , p. 2047–2054, 2011.

HSU, B.M., CHEN, C.H., KUNG, C.M., WAN, M.T., SHEN, S.M. Evaluation of enterovirus recovery in surface water by different adsorption and elution procedures. **Chemosphere**, v. 66: p. 964-969, 2007.

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

IBGE – INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Pesquisa Nacional de esgotamento sanitário 2008. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/27032002pnsb.shtm>. Acesso em: 10 de agosto de 2012.

IBGE – INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Pesquisa Nacional de esgotamento sanitário 2010. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/27032002pnsb.shtm>. Acesso em: 17 de junho de 2012.

IRVING, G.J., HOLDEN, J., YANG, R., POPE, D. Hepatitis A immunization in persons not previously exposed to hepatitis A. **Cochrane Database System Review**, v.7, p. 09-51, 2012.

ISHIKO, H., AOKI, K. Spread of epidemic keratoconjunctivitis due to a novel serotype of human adenovirus in Japan. **Journal of Clinic Microbiology**, v. 47, p.2678–2679, 2009.

JIANG, V., JIANG, B., TATE, J., PARASHAR, U. D., PATEL, M. M. Performance of rotavirus vaccines in developed and developing countries. **Human Vaccines**, v.6, p.532–542 , 2010.

JONES II, M. S., HARRACH, B., GANAC, R. D., GOZUM, M. M. A., DELA CRUZ, W. P., RIEDEL, B.; PAN, C., DELWART, E. L., SCHNURR, D. P. New Adenovirus Species Found in a Patient Presenting with Gastroenteritis. **Journal of Virology**, v. 81, n. 11, p. 5978-5984. 2007.

JOTHIKUMAR, N., CROMEANS, T.L., SOBSEY, M.D., ROBERTSON, H. Development and evaluation of a broadly reactive TaqMan assay for rapid detection of hepatitis A virus.

Applied and Environmental Microbiology, v.71, p.3359-3363, 2005.

KAHLER, A.M., CROMEANS, T.L., ROBERTS, J.M., HILL, V.R. Source water quality effects on monochloramine inactivation of adenovirus, coxsackievirus, echovirus, and murine norovirus. **Water Research**. v. 45, p. 1745 -1751, 2011.

KANEKO, H., IIDA, T., ISHIKO, H. Analysis of the complete genome sequence of epidemic keratoconjunctivitis related human adenovirus type 8, 19, 37 and a novel serotype. *Journal Genetic Virology*, v.90, p.1471–1476, 2009.

KAPIKIAN, A.Z. Acute viral gastroenteritis. **Preventive Medical**, 1974; In: *Fields Virology*, Philadelphia: Lippincott-Williams&Wilkins, 5 ed, v.1, p. 3177, 2007.

KAPIKIAN, A.Z.; CHANOCK, R.M. Rotaviruses. In: **Virology**, p. 1657-1708. Fields BN, Knipe DM, Howley PM, Chanock RM, Melnick JL, Monath TP, Roizman B, Straus SE (eds). Vol.2. Lippincott-Raven, 3rd ed., Philadelphia, USA, 1996.

KARAGANIS, J. V.; LARKIN E. P.; MELNICK J. L.; SCARPINO P. V.; SCHAUB S. A.; SORBER C. A.; SULLIVAN R.; WELLINGS F. M. Research priorities for monitoring viruses in the environment. **EPA-600/9-83-010. U.S. Environmental Protection Agency, Office of Research and Development, Environmental Monitoring and Support Laboratory, Cincinnati**. 1983.

KATAYAMA, H., SHIMASAKI, A., 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, p.1033-1039, 2002.

KIMURA, M. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. **Journal of Molecular Evolution**, v. 16, p. 111-120, 1980.

KITAMURA, T., SATOH, K., TOMINAGA, T., TAGUCHI, F., TAJIMA, A., SUZUKI, K. Alteration in the JC polyomavirus genome is enhanced in immunosuppressed renal transplant patients. **Virology**, v. 198, p. 341-345, 1994.

KO, G., CROMEANS, T. L., SOBSEY, M. D. UV inactivation of adenovirus type 41 measured by cell culture mRNA RT-PCR. **Water Research**, v.39, p.3643-3649, 2005.

KO, G., CROMEANS, T.L., SOBSEY, M.D. Detection of Infectious Adenovirus in Cell Culture by mRNA Reverse Transcription-PCR. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, p. 7377–7384, 2003.

KOCWA-HALUCH, R. Waterborne enteroviruses as a hazard for human health. **Polish Journal of Environmental Studies**, v. 10, p. 484-487, 2001.

KOOPMANS, M., BONDDORFF, C.H., VINJE, J., MEDICI, D., MONROE, S. Foodborne viruses. **Federation of European Microbiological Societies: Microbiology Review**, v. 26, p. 87-205, 2002.

KOOPMANS, M., DUIZER, E., Foodborne viruses: An emerging problem. **Int. J. Food Microbiolody**, v. 90, n. 1, p. 23–41, 2004.

KOROLEFF, F. (). Determination of nutrients. In: Grasshoff, K. **Methods of Sea Water Analysis**. Weinhein: Verlag. Chemie, p. 117–181, 1976.

KOVAC, K., BOUWKNEGT, M., DIEZ-VALCARCE, M., RASPOR, P., HERNÁNDEZ, M., RODRÍGUEZ-LÁZARO, D. Evaluation of high hydrostatic pressure effect on human adenovirus using molecular methods and cell culture. **International Journal of Food Microbiology**, v. 157, p. 368–374, 2012.

KRUGMAN, S., GILES, J.P., HAMMOND, J. Infectious hepatitis: evidence for two distinctive clinical epidemiological and immunological types of infection. In: **B. N. Fields, D. N. Knipe, &**

**P. M. Howley (Eds.), Virology** (pp. 799– 840). Philadelphia, PA: Lippincott Williams and Wilkins, 2001.

LAGO, P. F. Florianópolis: a polêmica urbana. Florianópolis, **Fundação Franklin Cascaes**, 312p., 1996.

LAMBERTINI, E., SPENCER, S.K., BERTZ, P.D., LOGE, F., BORCHARDT, M.A. New mathematical approaches to quantify human infectious viruses from environmental media using integrated cell culture-qPCR. **Journal Virology Methods**, v.163, p.244–252, 2010.

LAMBERTINI, E., SPENCER, S.K., BERTZ, P.D., LOGE, F.J., KIEKE, B.A., BORCHARDT, M.A. Concentration of enteroviruses, adenoviruses and noroviruses from drinking water by use of glass wool filters. **Applied and Environmental Microbiology**, v.74, p.2990-2996, 2008.

LAPOLLI, E. M.; MOREIRA, J. C.; ZARDO, S. M.; VIEIRA, V. F. Carta dos elementos do meio ambiente – **Parque da Lagoa do Peri, Florianópolis, SC: LARS/SC, Memorial descritivo**, p. 24p., 1990.

LEE, H.K., JEONG, Y.S. Comparison of total cultivable virus assay and multiplex integrated cell culture-PCR for reliability of waterborne virus detection. **Applied Environmental Microbiology**, v.70, p.3632–3636, 2004.

LEE, I.J, LEE, G.C., CHUNG, J.Y., HAN, T.H., LEE, Y.K., KIM, M.S, LEE, C.H. Detection and molecular characterization of adenoviruses in Korean children hospitalized with acute gastroenteritis. **Microbiology and Immunology**, v. 56, p. 523–528, 2012.

LEITE, J.P.G., CARVALHO-COSTA, F.A., LINHARES, A.C. Group A rotavirus genotypes and the ongoing Brazilian experience: a review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 103, p. 745-753, 2008.

LEY, V., HIGGINS, J., FAYER, R. Bovine Enteroviruses as Indicators of Fecal Contamination. **Applied Environmental Microbiology**, v.68, p.3455-3461, 2002.

LI, D., APRIL, Z., GU, W.Y., HE, M., HU, X.H., SHI, H.C. An integrated cell culture and reverse transcription quantitative PCR assay for detection of infectious rotaviruses in environmental waters. **Journal Microbiology Methods**, v.82, p.59–63, 2010.

LI, R., LÍLYESTROM, W., GAI, R., ZHANG, R., CAPRIO, J.A., FANNIGN, E., JOCHIMIYAK, A., SZAKONYI, G., CHEN, X.S. Structure of the replicative helicase of the oncoprotein SV40 large tumour antigen. **Nature**, v. 423, p. 512-518, 2003.

LI, Z., BAKER, M. L., JIANG, W., ESTES, M.K., PRASARD, B.V. Rotavirus architecture at sub nanometer resolution . **Journal Virology**, v. 83, p. 1754-1766, 2009.

LIN, T.Y., HUANG, Y.C., NING, H.C. Surveillance of respiratory viral infections among pediatric outpatients in northern Taiwan. **Journal of Clinic Virology**, v.30, p.81–85, 2004.

LIPP, E. K., KURZ, R., VINCENT, R., RODRIGUEZ-PALACIOS, C., FARRAH, S. R., ROSE, J. B. The effects of seasonal variability and weather on microbial fecal pollution and enteric pathogens in a subtropical estuary. **Estuaries**, v. 24 (n° 2), p.266–276, 2011.

LIU, E.B., FERREYRA, L., FISCHER, S.L., PAVAN, J.V., NATES., S.V., HUDSON, N.R., TIRADO, D., DYER, D.W., CHODOSH, J., SETO, D., JONES, M.S. Genetic Analysis of a Novel Human Adenovirus with a Serologically Unique Hexon and a Recombinant Fiber Gene. **PLoS ONE**, v. 6 (n° 9) p.24491, 2011.

MACKERETH, F.J.H., HERON, J., TALLING, J.F. Water Analysis:some revised methods for limnologists. **Freshwater Biological Association, Scientific Publication**, p.36, 1978.

MARTÍN, C.S. Latest Insights on Adenovirus Structure and Assembly. **Viruses**, v. 4, p. 847-877, 2012.

MATTHIJNSSENS, J.; CIARLET, M.; RAHMAN, M.; ATTOUI, H.; BÁNYAI, K.; ESTES, M. K.; GENTSCH, J. R.; ITURRIZA GÓMARA, M.; KIRKWOOD, C. D.; MARTELLA, V.; MERTENS, P. P. C.; NAKAGOMI, O.; PATTON, J. T.; RUGGERI, F. M.; SAIF, L. J.; SANTOS, N. M.; STEYER, A.; TANIGUCHI, K.; DESSELBERGER, U.; VAN RANST, M. Recommendations for the classification of group A rotaviruses using all 11 genomic RNA segments. **Archives of Virology**, v.153, p.1621-1629, 2008.

MCNEES, A.L., WHITE, Z.S., ZANWAR, P., VILCHEZ, R.A., BUTEL, J.S. Specific and quantitative detection of human polyomaviruses BKV, JCV, and SV40 by real time PCR. **Journal of Clinical Virology**, v.34, p.52-62, 2005.

MEBUS, C., UNDERDAHL, N., RHODES, M. Calf diarrhea (scours): reproduced with a virus from a field outbreak. **Journal Universit Nebraska**, 1969. In: Fields Virology, Philadelphia: Lippincott-Williams&Wilkins, 5 ed, v.1, p. 3177, 2007.

MEHNERT, D.U., QUEIROZ, A.P.S., SANTOS, F.M., CANDEIAS, J.M.G. & HÁRSI, C.M. Occurrence of human enteric viruses in sewage and surface waters in the city of São Paulo. **Virus Reviews & Research**, v.4, p. 27, 1999.

MENA, K.D., GERBA, C.P. Waterborne Adenovirus. **Reviews of Environmental Contamination and Toxicology**, v.198, p.133-167, 2008.

MIAGOSTOVICH, M.P., FERREIRA, F.F.M., GUIMARÃES, F.R., FUMIAN, T.M., DINIZ-MENDES, L., LUZ, S.L.B., SILVA, L.A., LEITE, J.P.G. Molecular detection and characterization of gastroenteritis viruses occurring naturally in the stream waters of Manaus, Central Amazônia, Brazil. **Applied and Environmental Microbiology**, v.74, p.375-382, 2008.

MILARÉ, E. *Direito do Ambiente: doutrina, jurisprudência, glossário*. São Paulo: RT, 2004.

MOFFETT, H.L., SEHULEN, BERGER H.K., BURKHOLDER, E.R. Epidemiology and etiology of severe infantile diarrhea. **Journal Pediatric**, v. 72, p. 1-14, 1968.

MORESCO, V., VIANCELLI, A., NASCIMENTO, M. A., SOUZA, D. M. S., RAMOS, A. P. D., GARCIA, L. A. T., SIMÕES, C. M. O., BARARDI, C. R. M. Microbiological and physicochemical analysis of the coastal waters of southern Brazil. **Marine Pollution Bulletin**, v. 64, p. 40-48, 2012.

MORGA, J.H., LEON-FELIX, J., PERAZA-GARAY, F., GIL-SALAS, B.G., CHAIDEZ, C. Detection and characterization of hepatitis A virus and norovirus in estuarine water samples using ultrafiltration-RT-PCR integrated methods. **Journal of Applied Microbiology**, v.106, p.1579-1590, 2009.

MS 2914/2011-Portaria MS Nº 2.914 12 de Dezembro de 2011; <http://www.agenciapcj.org.br/novo/images/stories/portaria-ms-2914.pdf>. Acesso em: 10 de Agosto de 2012.

NEU, U., STEHLE, T., ATWOOD, W.J. The Polyomaviridae: Contributions of virus structure to our understanding of virus receptors and infectious entry. **Virology**, v.384, p.389-399, 2009.

NUANUALSUWAN, S., CLIVER, D.O. Pretreatment to avoid positive RT-PCR results with inactivated viruses. **Journal of Virological Methods**, v. 104, p. 217-225, 2002b.

PAL, A., SITORA, L., MAUDRU, T., PEDEN, K., LEWIS JR, A.M. Real-time, quantitative PCR assays for the detection of virus-specific DNA in samples with mixed populations of polyomaviruses. **Journal of Virological Methods**, v.135, p.32-42, 2006.

PARASHAR UD, GIBSON CJ, BRESEE JS, GLASS RI. Rotavirus and Severe Childhood Diarrhea. **Emergence Infectivity Disease**, v. 12, p. 304-306, 2006.

PINA, S., PUIG, N., LUCENA, F., JOFRE, J., GIRONES, R. Viral pollution in the environment and in shellfish: human adenovirus

detection by PCR as an index of human viruses. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, p. 3376-3382, 1998.

PINTO, R.M., COSTAFREDA, M.I., PÉREZ-RODRIGUEZ, F.J., D'ANDREA, L., BOSCH, A. Hepatitis A Virus: State of the Art. **Food Environmental Virology**, v. 2, p.127–135, 2010.

PMISB - PLANO MUNICIPAL INTEGRADO DE SANEAMENTO BÁSICO. Produto 4: Diagnóstico do setor de abastecimento de água. RELATÓRIO N° RL-0309-800-942-MPB-004. Abril de 2009. Disponível em: [http://portal.pmf.sc.gov.br/arquivos/arquivos/pdf/19\\_07\\_2010\\_17\\_53.14.8a01bc3f9c234ec98970a56f2a0812ef.pdf](http://portal.pmf.sc.gov.br/arquivos/arquivos/pdf/19_07_2010_17_53.14.8a01bc3f9c234ec98970a56f2a0812ef.pdf). Acesso em: 04 de agosto de 2012.

POND, K. Plausibility of Associated Infections Acute Effects, Sequelae and Mortality . **Water Recreation and Disease – WHO**, 2005.

PRADO, T., FUMIAN, T.M., MIAGOSTOVICH, M.P., GASPAR, A.M.C. Monitoring the hepatitis A virus in urban wastewater from Rio de Janeiro, Brazil. **Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v.106,p. 104-109, 2012.

RAJAL, V.B., MCSWAIN, B.S., THOMPSON, D.E., LEUTENEGGER, C.M., WUERTZ, S. Molecular quantitative analysis of human viruses in California storm water. **Water Research**, v.41, p.4287-4298, 2007.

RAMIG, R.F. Pathogenesis of intestinal and systemic rotavirus infection. **Journal of Virology**, v. 78, n.19, p. 10213-10220, 2004.

RANDALL, D.; BURGGREN, W.; FRENCH, K .Eckert animal physiology. Mechanisms and adaptations. In: W.H. Freeman and Co., 4a. ed. New York, 1997. 723 p.

REDE NACIONAL DE CAPACITAÇÃO E EXTENSÃO TECNOLÓGICA EM SANEAMENTO AMBIENTAL – ReCESA. Esgotamento sanitário: qualidade da água e controle da poluição: guia do profissional em treinamento: nível 2 / **Secretaria Nacional de Saneamento Ambiental**, p. 87, 2008.

RIGOTTO, C., HANLEY, K., ROCHELLE, P.A., DE LEON, R., BARARDI, C.R.M., YATES M.V. Survival of Adenovirus Types 2 and 41 in Surface and Ground Waters Measured by a Plaque Assay. **Environmental Science and Technology**, v. 45, p. 4145 – 4150, 2011.

RIGOTTO, C., VICTORIA, M., MORESCO, V., KOLESNIKOVAS, C.K.M., CORREA, A.A., SOUZA, D.S.M., MIAGOSTOVICH, M., SIMÕES, C.M.; BARARDI, C.R. Assessment of adenovirus, hepatitis A virus and rotavirus presence in environmental samples in Florianópolis, South Brazil. **Journal of Applied Microbiology**, v.109, p.1979-1987, 2010.

RODRÍGUEZ, R.A., PEPPER, I.L., YERBA, C.P. Application of PCR-based methods to assess the infectivity of enteric viruses in environmental samples. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, p. 297–307, 2009

ROSE, M.A., DHAR, A.K., BROOKS, H. A., ZECCHINI, F. & GERS-BERG, R.M. Quantitation of hepatitis A virus and enterovirus levels in the lagoon canals and Lido beach of Venice, Italy, using real-time RT-PCR. **Water Research**, v. 40, p. 2387-2396, 2006.

ROWE, W.P., HUEBNER, R.J., GILLMORE, L.K. Isolation of a cytopathic agent from human adenoids undergoing spontaneous degeneration in tissue culture. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, 1953. In: Fields Virology, Philadelphia: Lippicort-Williams&Wilkins, 5 ed, v.1, p. 3177, 2007.

RUIZ-PALACIOS, G.M., PÉREZ-SCHAEL, I., VELÁZQUEZ, F.R., ABATE, H., BREUER, T., CLEMENS, S.C., CHEUVART, B., ESPINOZA, F., GILLARD, P., INNIS, B.L., CERVANTES, Y., LINHARES, A.C., LÓPEZ, P., MACÍAS-PARRA, M., ORTEGA-BARRÍA, E., RICHARDSON, V., RIVERA-MEDINA, D.M., RIVERA, L., SALINAS, B., PAVÍA-RUZ, N., SALMERÓN, J., RÜTTIMANN, R., TINOCO, J.C., RUBIO, P., NUÑEZ, E., GUERRERO, M.L., YARZÁBAL,

J.P., DAMASO, S., TORNIEPORTH, N., SÁEZ-LLORENS, X., VERGARA, R.F., VESIKARI, T., BOUCKENOOGHE, A., CLEMENS, R., DE VOS B., O'RYAN, M. Safety and efficacy of an attenuated vaccine against severe rotavirus gastroenteritis. **New England Journal of Medicine**, v. 354, p. 11-22, 2006.

RZEZUTKA, A., COOK, N. Survival of human enteric viruses in the environmental and food. **Federation of European Microbiological Societies: Microbiology Review**, v. 28, 441-45, 2004.

SANTOS, N.; HOSHINO, Y. Global distribution of rotavirus serotypes/genotypes and its implication for the development and implementation of an effective rotavirus vaccine. **Journal of Medical Virology**, v. 15, p. 29-56, 2005.

SCHLINDWEIN, A.D., RIGOTTO, C., SIMÕES, C.M., BARARDI, C.R. Detection of enteric viruses in sewage sludge and treated wastewater effluent. **Water Science Technology**, v.61, p.537-544, 2010.

SILVA, A.Á.S da. **Parque Municipal da Lagoa do Peri subsídios para o gerenciamento ambiental**. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Brasil, 120 p., 2000.

SILVA, AGENOR V. da. **Grandes enchentes no rio Amazonas**. Monografia do Curso de Especialização em Planejamento e Gerenciamento de Águas – CEPGA. NIEMA/UFAM/CT-HIDRO, 2006.

SIMONASSI, J. C. **Caracterização da lagoa do Peri, através da análise de parâmetros físico-químicos e biológicos, como subsidio ao gerenciamento dos recursos hídricos da Ilha de Santa Catarina, SC, Brasil**. Dissertação de Mestrado, UFSC, Florianópolis, 74 p. 2001.

SOULE, H., GENOULZ, O., GRATACAP-CAVALLIER, B., CHEVAL-LIER, P., LIU, J.X. Ultrafiltration and reverse transcription-polymerase chain reaction: an efficient process for

poliovirus, rotavirus and hepatitis A virus detection in water. **Water Research**, v.34, p.1063-1067, 2000.

TAMURA K, PETERSON D, PETERSON N, STECHER G, NEI M, KUMAR S. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. **Molecular Biology Evaluative**. v. 28, p. 2731-2739, 2011.

TATE, J.E., PATEL, M.M., STEELE, A.D., GENTSCH, J.R., PAYNE, D.C. Global impact of rotavirus vaccines. **Expert Review of Vaccines**, v. 9, p. 395-407, 2010.

TAVARES, M.T., CARDOSO, D.D.P., DE-BRITO, W.M.E.D. Vírus entéricos veiculados por água: aspectos microbiológicos de controle de qualidade da água. **Revista de Patologia Tropical**, v.34, p.85-104, 2005.

TEIVE, L.F, LISBOA, L.K, PETRUCIO, M.M. Uma revisão da disponibilidade de dados ecológicos visando o direcionamento de novas pesquisas na Lagoa do Peri. **Biotemas**, v. 21 (nº2), p. 133-143, 2008.

THURSTON-ENRIQUEZ, J. A., HAAS, C. N., JACANGELO, J., RILEY, K., 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.

TOHMA, K., BAYASGALAN, N., SUZUKI, A., DARMA, B., OSHITANI, H., NYMADAWA, P. Detection and Serotyping of Human Adenoviruses from Patients with Influenza-Like Illness in Mongolia. **Japan Journal Infectivity Disease.**, v. 65, p.289-294, 2012.

TUCCI, C. E. M. Plano Diretor de Drenagem Urbana de Porto Alegre. **IPH-UFRGS**, 2001. Disponível em: <http://www.iph.ufrgs.br/gerenciarede/servicos/producao/ListaPublicacoes.asp>. Acesso em 03 de setembro de 2012.

USEPA – UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. Contaminant Candidate List 3 2009 – CCL. Disponível em:

<http://water.epa.gov/scitech/drinkingwater/dws/ccl/cc13.cfm#microbial>. Acesso em: 31 de julho de 2012.

VAN, R.M., FAUQUET, C, BISHOP D. Virus Taxonomy. **Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses**. New York: Academic Press; 2000.

VAN-HEERDEN, J., EHLERS, M.M., HEIN, A., 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, p.234-242, 2005.

VESIKARI, T., MATSON, D.O., DENNEHY, P., VANDAMME, P., SANTOSHAM, M., Safety and Efficacy of a Pentavalent Human-Bovine (WC3) Reassortant Rotavirus Vaccine. **New England Journal of Medicine**, v. 354, p. 23-33, 2006.

VIANCELLI, A., GARCIA, L. A. T., KUNZ, A., STEINMETZ, R., ESTEVES, P. A., BARARDI, C. R. M. Detection of circoviruses and porcine adenoviruses in water samples collected from swine manure treatment systems. **Research in Veterinary Science**, v. 93, p. 538–543, 2011.

VICTORIA, M., GUIMARÃES, F., FUMIAN, T., FERREIRA, F., VIEIRA, C., LEITE, J. P., MIAGOSTOVICH, M. Evaluation of an adsorption–elution method for detection of astrovirus and norovirus in environmental waters. **Journal of Virological Methods**, v. 156, p. 73-76, 2009.

VIDELA, C., CARBALLAL, G., MISIRLIAN, A., AGUILA, M. Acute lower respiratory infections due to respiratory syncytial virus and adenovirus among hospitalized children from Argentina. **Journal of Clinic Virology**, v.10, p.17–23, 1998.

VILLAR, L.M., MORAIS, L.M., ALOISE, R., MELO, M.M., CALADO, I.A., LAMPE, E., GASPARGASPAR, A.M. Co-circulation of genotypes IA and IB of hepatitis A virus in Northeast Brazil.

**Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.39, p.873-881, 2006.

WALSH, M.P., SETO, J., JONES, M.S., CHODOSH, J., XU, W. Computational analysis identifies human adenovirus type 55 as a re-emergent acute respiratory disease pathogen. **Journal of Clinic Microbiology**, v. 48, p.991–993, 2010.

Wastewater Engineering: Treatment and Reuse, 4th edition, Metcalf and Eddy, New York, USA, 2003.

WETZ, J. J., LIPP, E. K., GRIFfIN, D. W., LUKASIK, J., WAIT, D., SOBSEY, M. D., SCOTT, T. M., ROSE, J. B. Presence, infectivity, and stability of enteric viruses in seawater: relationship to marine water quality in the Florida Keys. **Marine Pollution Bulletin**, v.48, p.698–704, 2004.

WOLD, W.S.M., HORWITZ, M.S. Adenoviruses. In: Knipe, D.M. and Howley, P.M., **Fields Virology**. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, p.2395–2436 (2007).

WORLD HEALTH ORGANIZATION; UNICEF. Diarrhoea: Why children are still dying and what can be done, 2009.

WORLD HEALTH ORGANIZATION; UNICEF. Progress on sanitation and Drinking-water: 2010 Update, 2010.

WYN-JONES, A.P., CARDUCCI, A., COOK, N., D'AGOSTINO, M., DIVIZIA, M., FLEISCHER, J., GANTZER, C., GAWLER, A., GIRONES, R., HOLLER, C., HUSMAN, A.M., KAY, D., KOZYRA, I., LÓPEZ-PILA, J., MUSCILLO, M., NASCIMENTO, M.S., PAPAGEORGIOU, G., RUTJES, S., SZEWZYK, R., WYER, M. Surveillance of adenoviruses and noroviruses in European recreational waters. **Water Research**, v.45, p.1025-1038, 2010.

WYN-JONES, A.P., SELLWOOD, J. Enteric viruses in the aquatic environment. **Journal of Applied Microbiology**, v.91, p. 945-962, 2001.

XAGORARAKI, I., KUO, D.H.-W., WONG, K., WONG, M., ROSE, J.B. Occurrence of human adenoviruses at two recreational beaches of the Great Lakes. **Applied and Environmental Microbiology**, v.73, p.7874-7881, 2007.

ZENG, S.Q., HALKOSALO, A., SALMINEN, M., SZAKAL, E.D., PUUSTINEN, L., VESIKARI, T. One-step quantitative RT-PCR for the detection of rotavirus in acute gastroenteritis. **Journal Virology Methods**, v. 153, p. 238-240, 2008.