



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
NÚCLEO DE MEDICINA TROPICAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DOENÇAS TROPICAIS
MESTRADO EM DOENÇAS TROPICAIS**

**DETECÇÃO DE ADENOVÍRUS HUMANOS EM AMOSTRAS DE ÁGUA
SUPERFICIAL E ESGOTO NÃO TRATADO ORIUNDAS DE DIVERSOS
ECOSSISTEMAS AQUÁTICOS DA CIDADE DE BELÉM-PA.**

PAULA KATHARINE DE PONTES SPADA

**Belém – Pará
2012**

PAULA KATHARINE DE PONTES SPADA

**DETECÇÃO DE ADENOVÍRUS HUMANOS EM AMOSTRAS DE ÁGUA
SUPERFICIAL E ESGOTO NÃO TRATADO ORIUNDAS DE DIVERSOS
ECOSSISTEMAS AQUÁTICOS DA CIDADE DE BELÉM-PA.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Doenças Tropicais como requisito parcial para obtenção do grau de mestre em Patologia das Doenças Tropicais pelo Núcleo de Medicina Tropical da Universidade Federal do Pará.

Orientadora: Dra. Yvone Gabbay Mendes.

**Belém – Pará
2012**

PAULA KATHARINE DE PONTES SPADA

**DETECÇÃO DE ADENOVÍRUS HUMANOS EM AMOSTRAS DE ÁGUA
SUPERFICIAL E ESGOTO NÃO TRATADO ORIUNDAS DE DIVERSOS
ECOSSISTEMAS AQUÁTICOS DA CIDADE DE BELÉM-PA.**

Dissertação apresentada à aprovação como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Doenças Tropicais pelo Núcleo de Medicina Tropical da UFPA pela comissão formada pelos professores:

Banca examinadora:

Dra. Yvone Gabbay Mendes – Orientadora
Instituto Evandro Chagas /MS/SVS
Seção de Virologia

Dra. Karla Tereza Silva Ribeiro - Avaliadora
Universidade Federal do Pará
Instituto de Ciências Biológicas

Dra. Lena Lilian Canto de Sá - Avaliadora
Instituto Evandro Chagas/ MS/SVS
Seção de Meio Ambiente

Dra. Maísa Silva de Sousa - Avaliadora
Universidade Federal do Pará
Núcleo de Medicina Tropical

Dr. Túlio Machado Fumian- Suplente
Instituto Evandro Chagas /MS/SVS
Seção de Virologia

Aprovado em: 18/04/2012

**Belém – Pará
2012**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Biblioteca do Núcleo de Medicina Tropical/UFPA, Belém-PA.

Spada, Paula Katharine de Pontes.

Detecção de adenovírus humanos em amostras de água superficial e esgoto não tratado oriundas de diversos ecossistemas aquáticos da cidade de Belém-PA / Paula Katharine de Pontes Spada; orientadora, Yvone Gabbay Mendes. – 2012

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Pará. Núcleo de Medicina Tropical. Programa de Pós-Graduação em Doenças Tropicais. Belém, 91 p, 2012.

1. Adenovírus humano . 2. Águas – Belém - Análise. 2. Esgoto - Análise I. Mendes, Yvone Gabbay, orient. II. Título.

CDD: 22. ed. 614.58

Dedicado a Deus, ao meu
filho Marcos Saré, a minha
orientadora Dra. Yvone Gabbay
e a todos aqueles que estiveram e
estão ao meu lado sempre
acreditando em mim.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer a Deus, provedor da minha vida. Agradeço a toda minha família e ao meu filho Marcos Saré, meu maior motivador.

Não posso deixar de agradecer ao Thufi Saré pelo apoio e incentivo que sempre recebi. Apesar de estarmos seguindo caminhos diferentes, vamos sempre ter um objetivo em comum: amar, criar, incentivar e buscar dar sempre os melhores exemplos para o nosso filho. Também agradeço as suas irmãs (Iana, Sâmea, Kátia e Leila Saré) por sempre estarem ao meu lado nos momentos que mais precisei.

Agradeço a minha orientadora Dra. Yvone Gabbay Mendes por todo o apoio, aprendizado, confiança e dedicação que sempre recebi. E principalmente pela sua amizade, algo que vai muito além de uma simples orientação.

Ao Instituto Evandro Chagas, ao Dr. Linhares (Chefe da Seção de Virologia/IEC) e todos os pesquisadores, funcionários e técnicos da seção (principalmente a Sílvia Lucena e ao Ian Carlos).

Também gostaria de agradecer a equipe da Seção de Meio Ambiente (Seu Pio, Tereza, Denise, Ritângela, Rita Félix, Ane e seu Ednelson) e a Dra. Lena Sá por ter me recebido tão bem no projeto e por todo o apoio recebido.

Agradeço ao Núcleo de Medicina Tropical pela oportunidade de cursar o mestrado, a FAPESPA e ao CNPq pelo suporte financeiro.

Gostaria de agradecer a Dra. Maísa de Sousa pela contribuição no meu trabalho.

À Darleise pela identificação genética das minhas amostras. Também não posso deixar de agradecer ao Túlio Fumian, que apesar de ter chegado há pouco tempo me ajudou bastante na tentativa de genotipar mais amostras, mesmo com a tristeza que dava ao olhar as minhas “lindas” sequências. Obrigada pela amizade também!

Aos meus amigos e colegas de todos os laboratórios da seção pelos momentos de lazer e descontração. À Yasmin, Jane Kaiano, Jainara, Milla, Luana Soares, Dil Neri, Fernando e Igor Brasil . Também à Lorena, Carol e Jessylene pelas dicas fundamentais que recebi no começo do meu trabalho com os adenovírus.

A todos os meus amigos do Laboratório de Astrovírus: Thais Carvalho, Juliana Hernandez, Samya Picanço, Felipe, Maryelle Gonçalves e aos novos integrantes da equipe. Vocês moram no meu coração!

Um obrigada muito especial à minha amiga Dielle Teixeira por ter sido uma grande companheira dentro e fora do projeto, à Glicélia Aragão e ao Jones Siqueira, meu grande parceiro de todas as horas.

À Milene Silveira, uma grande amizade que fiz na turma do mestrado. E claro, não podia esquecer das minhas amigas, companheiras e parceiras de profissão: Luana Barbagelata, Danielle Calado, Renata Barbosa e Potira Fernandes por todos os momentos que passamos juntas e por todos que ainda vamos passar nesta nossa longa caminhada.

A todos que citei aqui e àqueles que de alguma maneira fazem ou fizeram parte da minha vida contribuindo para minha formação como pessoa e como profissional eu deixo um sincero: *Muito obrigada!!!*

“Adquire a sabedoria,
adquire a inteligência, e não te
esqueças nem te apartes das
palavras da minha boca”

Provérbios 4:5

Resumo

Os vírus entéricos são importantes agentes de doenças de veiculação hídrica. Entre esses, os adenovírus humanos (HAdV) assumiram importância por serem um dos principais causadores de gastroenterite em crianças menores de cinco anos e pela sua maior resistência a fatores físicos e químicos em detrimento a outros vírus no ambiente. Várias pesquisas têm demonstrado ausência de relação entre a presença de bactérias indicadoras e vírus. Diante disso, diversos autores têm sugerido a inclusão desses agentes como potenciais indicadores de contaminação viral e fecal da água. O objetivo desse trabalho foi detectar a presença de HAdV em amostras de água e esgoto não tratado oriundas de diversos ecossistemas aquáticos da cidade de Belém-PA. Foram selecionados seis pontos de amostragem, dentre eles um esgoto não tratado: Esgoto do UNA e cinco coleções hídricas: Porto do Açaí, Ver-o-Peso, Igarapé Tucunduba, Lago Bolonha e Lago Água Preta. Foi feita uma coleta mensal de dois litros de água em cada ponto durante 24 meses consecutivos, de nov/2008 a out/2010, totalizando 144 amostras. Foi utilizada água destilada autoclavada para controle negativo de cada ponto em todos os testes utilizados. As amostras foram concentradas pelo método de adsorção-eluição e posteriormente centrifugadas para a obtenção de dois mL. O DNA foi extraído pelo kit comercial Qiagen. Para a detecção molecular foram empregadas a Reação em Cadeia Mediada pela Polimerase (PCR convencional) e a PCR em tempo real, sendo utilizados iniciadores e sondas específicos que amplificam um gene do hexon de 301 e 96 pb, respectivamente. Visando-se melhorar o produto amplificado para sequenciamento genômico, algumas amostras positivas pela PCR convencional foram submetidas à Nested-PCR com a utilização de mais um par de iniciadores que amplificam uma região interna de 171 pb. Amostras de água e esgoto foram sequenciadas, analisadas e comparadas a outras obtidas no GeneBank. Os HAdV foram detectados em 59% (85/144) das amostras de água superficial e esgoto não tratado, sendo que a positividade obtida pela PCR convencional foi de 22,9% (33/144) e pela PCR em tempo real de 58,7% (84/143). A primeira detectou o agente apenas nas amostras do igarapé Tucunduba (62,5%) e do esgoto do UNA (75%) e a segunda em amostras provenientes dos seis pontos de coleta (com uma variação de 25 a 100%). O agente foi detectado em todos os 24 meses do estudo, estando presentes em pelo menos dois pontos, mensalmente. A PCR em tempo real se mostrou mais sensível nesse estudo, tendo encontrado o agente em 36,4% (52/143) das amostras não detectadas pela PCR convencional. Das oito amostras genotipadas todas pertencem à espécie F, sendo quatro referentes ao sorotipo 40 e quatro ao 41. Nossos resultados confirmam a alta circulação desse patógeno nas águas superficiais e esgoto da cidade, sugerindo a inclusão dos HAdV como bons indicadores de contaminação viral e fecal da água. A pesquisa desses vírus em ambientes aquáticos é pioneira em Belém e tais resultados são de relevante importância para as políticas de saúde pública e ambiental, servindo como base para estudos complementares nessa área.

Palavras-chave: Adenovírus humanos, gastroenterite, água, esgoto, PCR, PCR em tempo real, Belém.

Abstract

The enteric viruses are important agents of waterborne diseases. Among these, the human adenovirus (HAdV) assumed importance because they are a major cause of gastroenteritis in children under five years and by its high resistance to physical and chemical factors in the detriment of other viruses in the environment. Several studies have shown no relationship between the presence of indicator bacteria and viruses. Therefore, several authors have suggested the inclusion of these agents as potential indicators of viral and fecal water contamination. The aim of this study was to detect the presence of HAdV in water samples and untreated sewage originating from many aquatic ecosystems from Belém-PA. Six sampling points were selected, among them an untreated sewage: Esgoto do UNA and five catch basins: Porto do Açaí, Ver-o-Peso, Igarapé Tucunduba, Lago Bolonha and Lago Água Preta. A month collection of two liters of water was realized in each point for 24 consecutive months, from Nov/2008 to Oct/2010, in a total of 144 samples. Sterile distilled water was used as negative control for each point and in all tests. The samples were concentrated by adsorption-elution method and then centrifuged to obtain two ml. The DNA was extracted by the Qiagen commercial kit. Were employed the polymerase chain reaction (PCR) and real-time PCR for molecular detection, with specific primers and probes to amplify a specific hexon gene of 301 and 96 bp, respectively. In order to improve the amplified product for genomic sequencing, some samples positive by PCR were subjected to nested PCR using an additional pair of primers that amplify an internal region of 171 bp. Water and sewage samples were sequenced, analyzed and compared to other obtained from GenBank. The HAdV were detected in 59% (85/144) of samples of surface water and untreated sewage. The positivity obtained by PCR was 22,9% (33/144) and by real-time PCR 58.7% (84/143). The first technique detected the virus only in samples from the Igarapé Tucunduba (62,5%) and Esgoto do UNA (75%) and the second in samples from the six points of collection (variation of 25% to 100%). The agent was detected in all the 24 months of the study, being present in at least two points monthly. The real-time PCR was more sensitive in this study, having found the agent in 36,4% (52/143) of samples not detected by PCR. Of the eight samples genotyped all belong to the species F, four related to serotype 40 and four to 41. Our results confirm the high circulation of these pathogens in surface water and sewage of the city, suggesting the inclusion of HAdVs as good indicators fecal and viral contamination of the water. The study of these viruses in aquatic environments is pioneer in Belém and these results are of relevant importance for public health policies and environmental, serving as a basis for further studies in this area.

Keywords: human adenovirus, gastroenteritis, water, sewage, PCR, real-time PCR, Belém.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	12
LISTA DE FIGURAS.....	14
1- INTRODUÇÃO.....	15
2- JUSTIFICATIVA.....	17
3- REFERENCIAL TEÓRICO.....	19
3.1- A ÁGUA COMO VEÍCULO DE DOENÇAS.....	19
3.2- VÍRUS ENTÉRICOS.....	24
3.3- ADENOVÍRUS.....	26
3.3.1- Histórico.....	26
3.3.2- Classificação taxonômica.....	27
3.3.3- Estrutura e composição da partícula viral.....	28
3.3.4- Organização do genoma viral.....	32
3.3.5- Processo inicial de infecção pelo adenovírus.....	34
3.3.6- Epidemiologia.....	35
3.3.7- Estabilidade da partícula viral no ambiente.....	37
3.4- PESQUISA DE VÍRUS EM AMBIENTES AQUÁTICOS.....	38
3.4.1- Concentração das partículas virais.....	39
3.4.2- Detecção molecular.....	41
4- OBJETIVOS.....	44
4.1- OBJETIVO GERAL.....	44
4.2- OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	44
5- MATERIAL E MÉTODOS.....	45
5.1- DESCRIÇÃO DA ÁREA DE ESTUDO.....	45
5.1.1- Estação Elevatória de Esgoto do Canal do UNA (efluente de esgoto).....	46
5.1.2- Porto do Açaí.....	47
5.1.3- Ver-o-Peso	48
5.1.4- Igarapé Tucunduba.....	49
5.1.5- Mananciais do Utinga.....	50
5.1.5.1- Lago Bolonha.....	51
5.1.5.2- Lago Água Preta.....	52
5.2- RECURSOS FINANCEIROS.....	53
5.3- AMOSTRAGEM.....	53
5.4- COLETA.....	54
5.5- PESQUISA DE VÍRUS EM AMBIENTES AQUÁTICOS.....	54
5.5.1- Concentração das partículas virais.....	55
5.5.2- Detecção molecular de adenovírus humanos.....	57
5.5.2.1- Extração do DNA viral das amostras de água/esgoto.....	57
5.5.2.2- Reação em Cadeia mediada pela Polimerase (PCR).....	58
5.5.2.3- Nested-PCR.....	60
5.5.2.4- PCR em tempo real.....	61
5.5.3- Purificação do produto da PCR.....	62
5.5.4- Quantificação do DNA.....	63
5.5.5- Reação de sequenciamento nucleotídico.....	63
5.5.6- Purificação dos produtos da reação de sequenciamento.....	64
5.5.7- Eletroforese em sequenciador automático.....	64
5.5.8- Análise filogenética das sequências.....	64

5.5.9-	Análise Estatística.....	64
6-	RESULTADOS.....	66
7-	DISCUSSÃO.....	75
8-	CONCLUSÃO.....	81
	PERSPECTIVAS.....	82
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	83

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1-** Principais agentes encontrados nas fezes e as doenças ou sintomas causados por eles no organismo humano.....21
- Tabela 2-** Dose mínima infectante (DMI) para alguns patógenos e parasitas detectados em fezes.....22
- Tabela 3-** Classificação dos adenovírus humanos e as doenças associadas com as espécies e respectivos sorotipos.....28
- Tabela 4-** Localização e funções das proteínas estruturais presentes no capsídeo e no core da partícula de adenovírus.....31
- Tabela 5-** Pontos de coleta de água/esgoto com seus respectivos códigos de identificação.....53
- Tabela 6-** Iniciadores utilizados para a detecção do gene *hexon* de adenovírus humanos por PCR convencional e Nested-PCR em amostras de água/esgoto oriundas de diferentes ecossistemas aquáticos da cidade de Belém-PA, nov/2008 a out/2010.....59
- Tabela 7-** Reagentes e suas respectivas concentrações utilizadas para a amplificação por PCR convencional do gene *hexon* de adenovírus em amostras de água/esgoto oriundas de diferentes ecossistemas aquáticos da cidade de Belém-PA, nov/2008 a out/2010.....59
- Tabela 8-** Reagentes e suas respectivas concentrações utilizadas para a amplificação por Nested-PCR do gene *hexon* de adenovírus em amostras de água/esgoto oriundas de diferentes ecossistemas aquáticos da cidade de Belém-PA, nov/2008 a out/2010.....61
- Tabela 9-** Iniciadores e sondas utilizadas para a detecção do gene *hexon* de adenovírus humanos por PCR em tempo real em amostras de água/esgoto oriundas de diferentes ecossistemas aquáticos da cidade de Belém-PA, nov/2008 a out/2010.....62
- Tabela 10-** Reagentes e suas respectivas concentrações utilizadas para a amplificação e detecção por PCR em tempo real do gene *hexon* de adenovírus em amostras de água/esgoto oriundas de diferentes ecossistemas aquáticos da cidade de Belém-PA, nov/2008 a out/2010.....62
- Tabela 11-** Reagentes e volumes utilizados na reação de sequenciamento nucleotídico das cepas de adenovírus humanos detectadas em amostras de água/esgoto oriundas de diferentes ecossistemas aquáticos da cidade de Belém-PA, nov/2008 a out/2010.....63

Tabela 12- Detecção molecular de adenovírus nos seis pontos pesquisados da cidade de Belém-PA e comparação dos resultados com os achados em amostras de esgoto por PCR em tempo real, nov/2008 a out/2010.....70

Tabela 13- Distribuição mensal dos resultados obtidos pelos testes moleculares de acordo com os seis pontos pesquisados da cidade de Belém-PA, nov/2008 a out/2010.....71

Tabela 14- Comparação entre os resultados obtidos pela detecção de adenovírus por PCR convencional e PCR em tempo real em amostras de água e esgoto não tratado da cidade de Belém-PA, nov/2008 a out/2010.....72

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Rotas de transmissão dos vírus entéricos no ambiente.....	25
Figura 2- Imagem do adenovírus visualizada por microscopia eletrônica.....	29
Figura 3- Representação esquemática da localização das proteínas estruturais da partícula do adenovírus baseada em microscopia crio-eletrônica e cristalografia.....	30
Figura 4- Desenho esquemático da proteína fibra de adenovírus.....	32
Figura 5- Organização do genoma de adenovírus.....	34
Figura 6- Localização do município de Belém, Pará, Brasil e dos seis pontos de coleta utilizados no estudo.....	45
Figura 7- A) Estação Elevatória de Esgoto do Canal do UNA, Belém-Pa; B e C) Local e forma de coleta das amostras de esgoto.....	47
Figura 8- A) Porto do Açaí, Belém-Pa; B) Local e forma de coleta das amostras de água superficial do rio Guamá.....	48
Figura 9- A) Mercado do Ver-o-Peso, Belém-Pa; B) Local e forma de coleta das amostras de água superficial da baía do Guajará.....	49
Figura 10- A) Igarapé Tucunduba, Belém-Pa; B) Local e forma de coleta das amostras de água superficial.....	50
Figura 11- A) Lago Bolonha, Belém-Pa; B) Local e forma de coleta das amostras de água superficial.....	51
Figura 12- A) Lago Água Preta, Belém-Pa; B e C) Local e forma de coleta das amostras de água superficial.....	52
Figura 13- Representação esquemática da metodologia utilizada para a detecção de adenovírus humanos em amostras de água/esgoto oriundas de diferentes ecossistemas aquáticos da cidade de Belém-PA, nov/2008 a out/2010.....	55
Figura 14- Detecção de adenovírus em amostras de água e esgoto não tratado de seis pontos da cidade de Belém-PA, nov/2008 a out/2010.....	66
Figura 15- Visualização em gel de agarose (1,5%) de um gene do <i>hexon</i> (301 pb) de adenovírus amplificado pela Reação em Cadeia mediada pela Polimerase (PCR) em amostras de água e esgoto não tratado da cidade de Belém-PA, nov/2008 a out/2010.....	67

Figura 16- Amplificação e detecção de um gene do <i>hexon</i> de adenovírus pela PCR em Tempo Real em amostras de água e esgoto não tratado da cidade de Belém-PA, nov/2008 a out/2010.....	68
Figura 17- Percentuais de detecção de um gene do <i>hexon</i> de adenovírus pela PCR convencional e PCR em tempo real em amostras de água e esgoto não tratado da cidade de Belém-PA, nov/2008 a out/2010.....	69
Figura 18- Distribuição dos percentuais de positividade obtidos pelos testes moleculares para detecção de adenovírus em seis pontos estudados da cidade de Belém-PA, nov/2008 a out/2010.....	70
Figura 19- Visualização em gel de agarose (1,5%) de um fragmento do gene do <i>hexon</i> (171 pb) de adenovírus amplificado pela Nested-PCR em amostras de água e esgoto não tratado da cidade de Belém-PA, nov/2008 a out/2010.....	73
Figura 20- Análise filogenética baseada na sequência nucleotídica do gene do <i>hexon</i> envolvendo oito amostras de água de igarapé e esgoto não tratado da cidade de Belém-PA positivas para adenovírus.....	74

1-INTRODUÇÃO

A água é um componente essencial à vida. Atualmente, ela representa uma das principais preocupações mundiais devido a fatores relacionados à sua escassez em diversas regiões do planeta. Outra questão bastante preocupante advém da qualidade sanitária da água destinada ao consumo humano, sobretudo considerando a possibilidade de ocorrência de doenças que podem ser por ela veiculadas (LECLERC et al., 2002).

A falta de saneamento básico e higiene e as doenças de veiculação hídrica são responsáveis por 4% das mortes anuais no mundo (FUNASA, 2004). Apesar do aumento ocorrido no número de pessoas com acesso à água e esgoto entre 1990 e 2002 no mundo (WHO/UNICEF, 2004), atualmente ainda permanecem mais de 1,1 e 2,6 bilhões sem disponibilidade de água tratada e saneamento adequado, respectivamente.

A ausência ou a precária proteção dos recursos hídricos, em particular de excretas humanos e/ou de animais, pode introduzir nesse meio uma série de agentes patogênicos, tais como, vírus, bactérias, protozoários ou helmintos de origem intestinal, tornando a água um potencial veículo na transmissão de doenças (FEACHEM et al., 1983). Entre os diversos grupos que atuam como agentes etiológicos das doenças de veiculação hídrica destacam-se os vírus entéricos, principalmente os rotavírus (RVs), adenovírus entéricos (AdEs), norovírus (NoVs) e astrovírus (AstVs), considerados uma das principais causas de gastroenterite aguda, sobretudo em crianças menores de cinco anos de idade (FONG & LIPP, 2005; JIANG, 2006). Vários autores têm sugerido os adenovírus humanos (HAdV) como potenciais indicadores de contaminação viral e fecal da água por sua maior resistência a fatores físicos e químicos em detrimento a outros vírus (FONG & LIPP, 2005; JIANG, 2006).

Comparando-se o risco de infecção pela ingestão de água contaminada por vírus e por bactérias, o mesmo é 10 a 10.000 vezes maior para os primeiros (BOSCH, 1998; HAAS et al.,

1993). Vírus entéricos são altamente estáveis no ambiente, mantendo o seu potencial infeccioso mesmo após exposição a processos de tratamento (BOSCH, 1998).

As gastroenterites virais são transmitidas pela via fecal-oral, e as pessoas infectadas por esses agentes liberam nas fezes altas concentrações de partículas (10^5 - 10^{11} /g de fezes), que são lançadas nos esgotos e, como a maioria deles não são tratados adequadamente, esses patógenos podem vir a contaminar o ambiente e/ou atingir mananciais utilizados como fonte de abastecimento de água (BARRELLA et al., 2009; BOSCH, 1998).

No ano de 2008, quase 70% dos casos de morte ocorridos no mundo entre crianças menores de cinco anos de idade estiveram relacionados às doenças infecciosas. Dentre esses, 15% foram associados à diarreia, tornando-a a segunda maior causa de mortalidade infantil, com índices inferiores somente aos dos casos de pneumonia (BLACK et al., 2010).

A pesquisa de vírus em diferentes ambientes aquáticos vem sendo realizada em diversos países (AW & GIN, 2010; CALGUA et al., 2011; CHEONG et al., 2009 ; FONG et al., 2010; GUERRERO-LATORRE et al., 2011; LA ROSA et al., 2010; MELEG et al., 2006; STEYER et al., 2011). No Brasil, esses estudos ainda são escassos (BARRELLA et al., 2009; MIAGOSTOVICH et al., 2008; RIGOTTO et al., 2010).

Em Manaus foi realizada uma pesquisa onde diversos vírus entéricos foram detectados em 56% das amostras de água superficial analisadas, sendo o RVs o mais frequente (44,2%), seguido pelos HAdV (30,8%), AstVs (15,4%) e NoVs (5,8%) (MIAGOSTOVICH et al., 2008). Em Goiânia, Silva et al. (2009) encontraram HAdV em 43% das amostras de água de lagos e rios. Recente estudo realizado em Florianópolis, envolvendo diferentes ecossistemas aquáticos, demonstrou a presença de HAdV, RVs e vírus da hepatite A (VHA) em 64,2%, 19% e 8,3% das amostras de água analisadas, respectivamente (RIGOTTO et al., 2010).

2- JUSTIFICATIVA

A água contaminada é responsável por cerca de 80% das doenças que ocorrem nos países em desenvolvimento. Sabe-se também que a cada ano 15 milhões de crianças menores de cinco anos morrem direta ou indiretamente pela falta ou deficiência dos sistemas de abastecimento de água e esgotos (ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DE SAÚDE, 2001). Em Belém, a taxa de mortalidade infantil no ano de 2000 foi de 27,2 para cada mil nascidos vivos, sendo que grande parte desses óbitos ocorreu por doença diarreica, principalmente entre os menores de um ano de idade (PARÁ, 2005).

A qualidade microbiológica da água de consumo é atualmente determinada pela concentração de bactérias do grupo dos coliformes. Contudo, numerosas investigações têm demonstrado que a presença de padrões mínimos de coliformes fecais não indica a ausência de contaminação viral (BOSCH, 1998; GIBSON et al., 2011).

Já foram encontrados 150 tipos de vírus entéricos humanos transmitidos por via fecal-oral. Os HAdV têm sido relacionados a infecções persistentes e surtos em água potável e de recreação (BARRELLA et al., 2009). Atualmente os AdEs são considerados a terceira causa de diarreia não bacteriana entre crianças (BARRELLA et al., 2009).

Diversos métodos de concentração de amostras de água já foram estabelecidos demonstrando a presença de vírus onde bactérias do grupo dos coliformes não estavam presentes. Esse fato levou vários pesquisadores a propor que esses agentes, principalmente os AdEs, juntamente com as bactérias fossem utilizados como indicadores microbiológicos para o controle de qualidade da água (KATAYAMA et al., 2002; MIAGOSTOVICH et al., 2008; SILVA et al., 2011).

O uso das técnicas de concentração, associado aos da biologia molecular, com destaque para a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e suas variantes, como a nested-PCR e a PCR em tempo real, têm sido empregadas para uma rápida, sensível e específica detecção

desses vírus (CHEONG et al., 2009; FONG et al., 2010; LA ROSA et al., 2010; RIGOTTO et al., 2010).

Recentemente, o Instituto Evandro Chagas (IEC), SVS, MS desenvolveu uma pesquisa relacionada à detecção de RVs, NoVs, AstVs e VHA em águas e esgoto de Belém, tendo obtido resultados que demonstram uma alta circulação desses agentes em tais ambientes (FLECK et al., 2009; GURJÃO et al., 2010; GURJÃO et al., 2011; MAESTRI et al., 2010; TEIXEIRA et al., 2009; TEIXEIRA et al., 2010; TEIXEIRA et al., 2011). Diante disso, estudos envolvendo a presença de AdEs nessas amostras tornaram-se necessários, haja vista sua importância nos quadros de gastroenterite viral (MÜLLER, 2011) e sua recomendação como indicador de contaminação microbiológica da água (SILVA et al., 2011).

Os resultados alcançados neste trabalho darão subsídios para se comprovar a possível participação da água como fonte de contaminação de vírus entéricos na cidade de Belém, bem como demonstrar a real necessidade de investimentos na área de saneamento ambiental. Ressalta-se o pioneirismo desta pesquisa em nosso estado e a sua importância para as políticas de saúde pública e ambiental, servindo como base para estudos complementares nesta área.

3- REFERENCIAL TEÓRICO

3.1- A ÁGUA COMO VEÍCULO DE DOENÇAS

A água representa insumo fundamental à vida. Para Borsoi e Torres (1997) ela é considerada um recurso ou bem econômico, pelo fato de ser finita, vulnerável e essencial para a conservação da vida e do meio ambiente, além de ser fundamental para o desenvolvimento de diversas regiões. Também é considerada como um recurso ambiental, haja vista que sua alteração pode contribuir para a degradação da qualidade ambiental afetando direta ou indiretamente a saúde, a segurança e o bem-estar da população, as atividades sociais e econômicas, a fauna e a flora, as condições estéticas e sanitárias do meio, além da qualidade dos recursos ambientais.

Sabe-se que 97,5% do volume total de água da Terra são salgadas, formando os oceanos, e apenas 2,5% são de água doce, sendo que 68,7% desse total estão armazenadas nas calotas polares e geleiras, e apenas 0,27% (0,007% do volume total do planeta) encontra-se disponível ao uso humano e animal, constituindo os lagos e os rios (SETTI et al., 2001).

Os elementos presentes na água variam de acordo com a natureza do solo de onde são originárias, das condições climáticas e do seu grau de poluição, sobretudo pelos despejos municipais e industriais. De um modo geral seria possível encontrar em uma água natural a presença de mais de cinquenta constituintes nela dissolvidos ou em suspensão. Dentre estes destacam-se sólidos dissolvidos ionizados, gases, compostos orgânicos, matéria em suspensão, incluindo microorganismos e material coloidal (SETTI et al., 2001).

Os recursos naturais, sobretudo os hídricos, passaram a ser explorados de forma predatória após o grande crescimento populacional e econômico observado no século XX. Com isso, a maioria dos rios que atravessam as cidades brasileiras encontra-se deteriorada, representando um dos maiores problemas ambientais brasileiros. Isso é reflexo da falta de coleta e tratamento de esgotos (efluentes domésticos, hospitalares e industriais) observada na

maioria das cidades, fazendo com que os mesmos sejam lançados *in natura* nos rios (TUCCI et al., 2001).

A maior parte do esgoto doméstico no Brasil é constituída por água e aproximadamente 0,1% corresponde a impurezas de natureza física, química e biológica. O contato com esses efluentes e a sua ingestão são responsáveis por cerca de 80% das doenças e 65% das internações hospitalares. Atualmente, apenas 10% do total de esgotos produzidos recebem algum tipo de tratamento; os outros 90% são despejados *in natura* nos solos, rios, córregos e nascentes, constituindo-se na maior fonte de degradação do meio ambiente e de proliferação de doenças (http://ambientes.ambientebrasil.com.br/saneamento/definicoes/saneamento_ambiental.html).

A qualidade da água exerce grande influência sobre a saúde humana. Se não for adequada, pode ocasionar surtos de doenças e causar grandes epidemias. Os riscos à saúde, associados à água, podem ser de curto prazo (quando resultam da poluição de água causada por elementos microbiológicos ou químicos) ou de médio e longo prazo (devido ao consumo regular e contínuo, durante meses ou anos, de água contaminada com produtos químicos, como certos metais ou pesticidas).

Segundo a Organização Pan-Americana de Saúde (2001b), a água microbiologicamente contaminada pode transmitir grande variedade de doenças infecciosas, de diferentes modos: pela ingestão de água contaminada com urina ou fezes, humanas ou de animais, contendo micro-organismos patogênicos (cólera, febre tifóide, amebíase, leptospirose, giardíase, hepatite infecciosa e diarreias agudas); por má higiene pessoal ou contato de água contaminada na pele ou nos olhos (como escabiose, pediculose, tracoma, conjuntivite bacteriana aguda, salmonelose, tricuriase, enterobíase, ancilostomíases e ascaridíase) e ocasionadas por parasitas encontrados em organismos que vivem na água ou

por insetos vetores com ciclo de vida aquático (como esquistossomose, dengue, malária, febre amarela, filarioses e oncocercoses) (FEACHEM et al., 1983).

As fezes podem armazenar uma ampla variedade de vírus, bactérias patogênicas, ovos de helmintos e cistos de protozoários (Tabela-1). Muitos desses micro-organismos transmitidos pela via fecal-oral são estáveis na água e em alimentos, sendo que diversas doenças infecciosas estão associadas aos excretas humanos (FEACHEM et al., 1983).

Tabela 1- Principais agentes encontrados nas fezes e as doenças ou sintomas causados pelos mesmos no organismo humano.

AGENTES	DOENÇAS OU SINTOMAS CAUSADOS NO ORGANISMO HUMANO
Vírus	
Poliovírus	Paralisia, meningite, febre
Coxsackievírus	Meningite, pneumonia, hepatite, febre
Echovírus	Meningite, paralisia, encefalite, febre
Vírus da Hepatite A	Hepatite
Vírus da Hepatite E	Hepatite
Reovírus humanos	Infecções no trato respiratório e gastroenterite
Rotavírus humanos	Gastroenterite aguda com diarreia grave
Adenovírus humanos	Conjuntivite, gastroenterite aguda, infecções no trato respiratório
Norovírus	Gastroenterites epidêmicas com diarreia grave
Astrovírus humanos	Gastroenterite
Parvovírus humanos	Gastroenterite
Coronavírus humanos	Gastroenterite e doenças do trato respiratório
Torovírus humanos	Gastroenterite
Bactérias	
<i>Campylobacter jejuni</i>	Gastroenterite
<i>Escherichia coli</i> enteropatogênica	Gastroenterite
<i>Salmonella</i> spp.	Febre tifóide e gastroenterite
<i>Shigella</i> spp.	Desintéria bacilar
<i>Vibrio cholerae</i>	Cólera
<i>Yersinia</i> spp.	Gastroenterite aguda
Protozoários	
<i>Balantidium coli</i>	Diarreia, desintéria
<i>Entamoeba histolytica</i>	Disentéria amébrica
<i>Cryptosporidium</i>	Gastroenterite, criptosporidiose
<i>Giardia intestinalis</i>	Giardíase
Helmintos	
<i>Ascaris lumbricoides</i>	Distúrbios digestivos e dores abdominais
<i>Ascaris suum</i>	Tosse, dores no tórax
<i>Hymenolepis nana</i>	Himenolepíase
<i>Necator americanus</i>	Ancilostomose
<i>Strongiloides stercoralis</i>	Estrongiloidíase
<i>Taeniorhynchus saginata</i>	Teníase
<i>Taenia solium</i>	Teníase, cisticercose
<i>Trichuris trichiura</i>	Dores abdominais, diarreias, anemia, perda de peso

Fonte: BITTON, 2005; BOSCH, 1998; BOSCH et al., 2008; GERBA & SMITH JR, 2005.

Apesar desta grande diversidade de micro-organismos patogênicos que podem estar presentes nas fezes e conseqüentemente em águas contaminadas, o processo infeccioso dependerá da entrada, multiplicação e estabelecimento destes agentes no interior do hospedeiro. O potencial de um agente biológico para causar infecção em um hospedeiro suscetível depende de vários fatores como o seu tipo, o reservatório e o modo de transmissão desses patógenos (BITTON, 2005).

A avaliação dos agentes infecciosos está baseada em sua virulência ou em seu potencial para causar doenças em seres humanos. A virulência está relacionada à dose do agente infeccioso necessária para infectar o hospedeiro e causar a doença, a qual também depende da estabilidade do patógeno no ambiente. A dose mínima infecciosa (DMI) varia muito com o tipo de patógeno ou parasita (Tabela-2). Para alguns vírus, apenas uma ou poucas partículas são suficientes para infectar pessoas, como por exemplo no caso dos rotavírus que requerem somente 10 partículas para estabelecer uma infecção (BITTON, 2005).

Tabela 2- Dose mínima infectante (DMI) para alguns micro-organismos detectados nas fezes.

MICRO-ORGANISMO	DOSE MÍNIMA INFECTANTE (DMI)
<i>Salmonella</i> spp.	10^4 - 10^7
<i>Shigella</i> spp.	10^1 - 10^2
<i>Escherichia coli</i>	10^6 - 10^8
<i>Escherichia coli</i> O157:H7	<100
<i>Vibrio cholerae</i>	10^3
<i>Campylobacter jejuni</i>	Cerca de 500
<i>Giardia lamblia</i>	10^1 - 10^2 cistos
<i>Cryptosporidium</i>	10^1 cistos
<i>Entamoeba coli</i>	10^1 cistos
<i>Ascaris</i>	1-10 ovos
Vírus da Hepatite A	1-10 UFP*
Rotavírus	1-10 UFP*

*Unidade formadora de placa.
Fonte: Traduzido de BITTON, 2005.

A liberação de patógenos nas fezes pode ocorrer a qualquer momento durante a infecção, inclusive antes do estabelecimento do quadro clínico, como é o caso do VHA, presente em uma concentração que pode chegar de 10^7 a 10^9 /g de fezes. A concentração de micro-organismos liberados nas fezes é bastante variável. O material fecal contém até 10^{12} bactérias por grama, sendo que esse conteúdo representa cerca de 9% do seu peso úmido. Para helmintos, a concentração é de 10^4 - 10^6 /g de fezes, para parasitas de 10^6 - 10^7 /g e para vírus entéricos como RVs e AdEs chega a 10^{10} e 10^{11} /g de fezes, respectivamente (BITTON, 2005).

Em muitos países, incluindo o Brasil, as bactérias do grupo dos coliformes são utilizadas para determinar a qualidade microbiológica da água, devido ao fato de as mesmas apresentarem as principais características requeridas para um bom indicador (FONG & LIPP, 2005; MIAGOSTOVICH et al., 2008; RIGOTTO et al., 2010; TAVARES et al., 2005; SILVA et al., 2011).

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (1995) um bom indicador é aquele que está presente na água de esgoto e em água contaminada quando os patógenos assim estiverem; quando existir risco de contaminação por patógeno; estar em maior número do que os patógenos e não deve multiplicar-se em condições ambientais em que eles não o possam fazer. Além disso, a população do indicador tem que estar correlacionada com o grau de contaminação fecal; seu tempo de sobrevivência sob condições ambientais desfavoráveis deve ser maior do que aquele apresentado pelos patógenos, devendo ser mais resistentes a desinfetantes e outras condições de estresse do que esses. Também é necessário que não representem risco à saúde, precisam ser identificáveis e quantificáveis por meio de métodos simples, além de apresentar características estáveis e reações constantes nestas análises.

É sabido que nenhum organismo apresenta todas estas características simultaneamente, entretanto, as legislações vigentes no Brasil que tratam da qualidade sanitária da água (Portaria 518/2004, Resolução CONAMA nº357/2005 e CONAMA

nº274/2000) referem-se aos coliformes, bactérias heterotróficas e enterococos fecais como indicadores de contaminação fecal.

Dentre os diversos patógenos responsáveis pelas doenças de veiculação hídrica, os vírus entéricos merecem destaque devido à sua alta resistência as intempéries ambientais e a alguns métodos de tratamento, além da sua baixa dose infectante (BOSCH, 1998; BOSCH et al., 2008; GIBSON et al., 2011).

3.2- VÍRUS ENTÉRICOS

O termo “vírus entérico” engloba todos os vírus que estão presentes no trato gastrointestinal humano e que apresentam capacidade de causar infecções ou enfermidades em indivíduos suscetíveis, após transmissão pela via fecal-oral (WYN-JONES & SELLWOOD, 2001; LECLERC et al., 2002; TAVARES et al., 2005).

A rota de transmissão desses vírus no ambiente tem início a partir da liberação das fezes humanas diretamente na terra, esgotos ou aterros sanitários. Por ação da infiltração da água da chuva ou da água diluente dos esgotos, os vírus, presentes nas fezes, são arrastados para rios, lagoas, lagos, lençóis freáticos, estuários e oceanos. Assim, o homem pode ser infectado por esses agentes a partir de diversas vias: ingestão de água retirada de rios, lagos e fontes subterrâneas; consumo de moluscos filtradores (ostras) e outros mariscos; recreação em oceanos, estuários, rios e lagos; além da dispersão dos vírus por meio da irrigação de plantios agrícolas (BITTON, 2005; BOSCH, 1998; BOSCH et al., 2008). A figura 1 ilustra as possíveis rotas de transmissão dos vírus entéricos no ambiente.

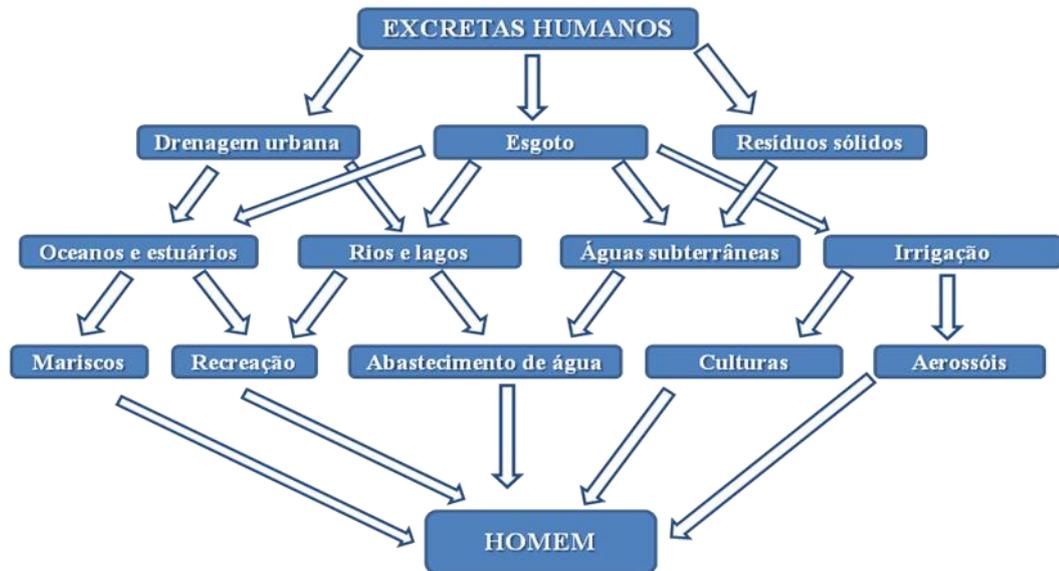


Figura 1- Rotas de transmissão dos vírus entéricos no ambiente.

Fonte: Adaptado de BOSCH, 1998.

Os vírus entéricos podem ser divididos em dois grupos de acordo com o crescimento em culturas celulares. Os enterovírus (poliovírus, coxsackievírus e echovírus) fazem parte do primeiro grupo, onde é possível se obter um bom crescimento e caracterização em células de primatas. Outros vírus que não causam doenças gastrintestinais também se encontram incluídos nesse grupo como alguns sorotipos de HAdV e reovírus. O segundo grupo abrange os RVs, AstVs, HAdV 40/41 (AdEs), VHA e vírus da hepatite E (VHE), agentes causais de gastroenterites ou hepatites que necessitam de condições especiais para sua multiplicação em células e os NoVs e sapovírus (SaVs), que não apresentam capacidade de se multiplicar em nenhuma linhagem celular (WYN-JONES & SELLWOOD, 2001).

Os vírus entéricos, além das infecções assintomáticas, podem estar associados a quadros de paralisia, doenças respiratórias, doenças cardíacas, meningites, encefalites, conjuntivites, hepatites, febre, exantema, gastroenterite e outras enfermidades (BOSCH, 1998; BOSCH et al., 2008; FONG & LIPP, 2005; WYN-JONES & SELLWOOD, 2001; LECLERC et al., 2002).

A gastroenterite destaca-se como um importante problema de saúde pública, sendo uma das principais causas de morbidade e mortalidade infantil nos países em desenvolvimento. Ela é responsável por 15% das mortes em crianças menores de cinco anos no mundo, sendo considerada a segunda ou terceira causa de consultas nos serviços de saúde. Pode estar relacionada com bactérias, parasitas e vírus entéricos, sendo que estes últimos são responsáveis por cerca de 80% dos casos, sobretudo os RVs, AdEs, AstVs e NoVs (DOMÍNGUEZ et al., 2009; BLACK et al., 2010).

Os HAdV são importantes patógenos responsáveis por doenças entéricas, respiratórias e infecções oculares. Recentemente, esses vírus foram encontrados predominantemente em rios, águas costeiras, de recreação e de abastecimento, além de terem sido detectados em altas concentrações nos esgotos domésticos em diferentes localidades do mundo (SILVA et al., 2011). Os HAdV, sobretudo os AdEs, têm se destacado por sobreviverem por mais tempo que as bactérias utilizadas como indicadoras de contaminação fecal da água e do esgoto, além de serem mais resistentes à luz ultravioleta, fato que deve estar associado às suas características moleculares distintas dos demais vírus entéricos (FONG & LIPP, 2005; JIANG, 2006; SILVA et al., 2011).

3.3- ADENOVÍRUS

3.3.1- Histórico

Em 1953, Rowe e colaboradores observaram a presença de um vírus desconhecido capaz de causar degeneração celular durante a manutenção de culturas primárias de adenóides e tonsilas removidas cirurgicamente de crianças. No ano seguinte, durante um estudo com recrutas americanos que apresentavam quadros de infecção respiratória, Hilleman e Werne isolaram um agente capaz de induzir efeito citopático em culturas de células humanas. Posteriormente esses patógenos foram relacionados a diferentes processos como degeneração da adenóide, infecção respiratória e febre faringo-conjuntiva ou da doença respiratória aguda.

Somente em 1956 esses agentes receberam o nome de adenovírus, em virtude do tecido onde foram inicialmente observados (WOLD & HORWITZ, 2007).

Em 1973, um tipo de AdV foi isolado em células de carcinoma de útero humano (HeLa), a partir de amostras fecais de uma criança com gastroenterite na Holanda (SANTOS & SOARES, 2008). Em 1975 os AdEs foram observados por microscopia eletrônica em amostras fecais provenientes de crianças envolvidas em um surto de gastroenterite (FLEWETT, 1976). Essas partículas virais não foram cultiváveis e, devido à sua característica de difícil replicação nos sistemas celulares convencionais, receberam o nome de adenovírus fastidiosos (BLACKLOW & GREENBERG, 1991).

3.3.2- Classificação taxonômica

Os adenovirus (AdVs) pertencem a família *Adenoviridae*, que pode ser filogeneticamente dividida em cinco gêneros: *Mastadenovirus*, que infectam seres humanos e outros mamíferos; *Aviadenovirus*, que infectam somente aves; *Atadenovirus*, que infectam mamíferos (marsupiais e cervos), répteis (cobras) e aves (patos); e *Siadenovirus*, que infectam anfíbios (rãs) e aves (perus). O quinto gênero dos AdVs, *Ichadenovirus*, com capacidade de infectar algumas espécies de esturjão, só foi incorporado pelo Comitê Internacional de Taxonomia Viral (ICTV- *International Committee on Taxonomy of Viruses*) no ano de 2009 (BENKO et al., 2002; CARSTENS, 2010).

O gênero *Mastadenovirus* é formado por mais de 90 sorotipos. Até o momento, 52 apresentaram capacidade de infectar seres humanos, sendo classificados em sete espécies, A-G, considerando principalmente as propriedades de hemaglutinação e análise filogenética (CARSTENS, 2010; HALL et al., 2010; JONES II, 2007).

A espécie G (HAdV-52) foi isolada de pacientes com gastroenterite na Califórnia (EUA) em 2007 e por possuir características distintas das espécies de A-F foi incorporada pelo ICTV no ano 2009 (CARSTENS, 2010; JONES II, 2007).

Os HAdV têm capacidade de infectar diversos tipos celulares, inclusive aqueles associados a tecidos altamente diferenciados. A classificação dos diferentes tipos de HAdV e as principais doenças associadas às espécies/sorotipos estão resumidas na tabela 3.

Tabela 3- Classificação dos adenovírus humanos e as doenças associadas com as espécies e respectivos sorotipos.

ESPÉCIE	SOROTIPOS	DOENÇAS ASSOCIADAS
A	12, 18, 31	Gastroenterite
B	3, 7, 16, 21, 50 (B:1) 11, 14, 34, 35 (B:2)	Doenças no trato respiratório (B:1) e no trato urinário (B:2)
C	1, 2, 5, 6	Doenças respiratórias
D	8, 9, 10, 13, 15, 17, 19, 20, 22-30, 32, 33, 36-39, 42-49, 51	Ceratoconjuntivite
E	4	Doenças respiratórias/Conjuntivite
F	40, 41	Gastroenterite
G	52	Gastroenterite

Fonte: HALL et al., 2010.

3.3.3- Estrutura e composição da partícula viral

Os AdVs são vírus não envelopados que apresentam aproximadamente 90 nm de diâmetro e simetria icosaédrica (Figura 2). Seu genoma é constituído por DNA de fita dupla, linear e não segmentado com 30-38 Kb. A massa específica da partícula viral em gradiente de cloreto de céσιο (CsCl) varia de 1,33 a 1,34g/cm³ (HALL et al., 2010; BERK, 2007).

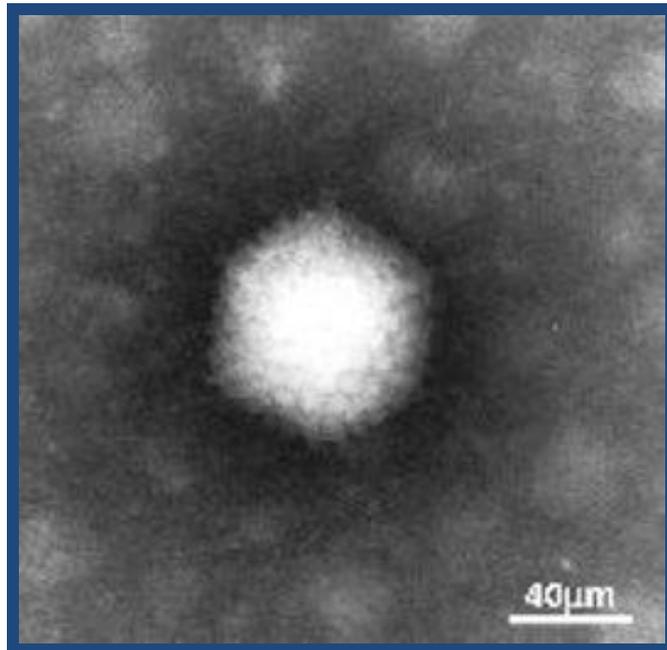


Figura 2- Imagem do adenovírus visualizada por microscopia eletrônica.

Fonte: Seção de microscopia eletrônica do Instituto Evandro Chagas.

O vírion é composto por 13 proteínas estruturais. Sete destas estão presentes no capsídeo, que é constituído por 252 capsômeros, dos quais 240 consistem em proteínas chamadas *hexons* (polipeptídeo II) formando as faces do icosaedro, e os 12 capsômeros restantes são compostos pelas proteínas denominadas *pentons* (polipeptídeo III), que incidem em duas estruturas distintas: a base, responsável por ancorar o *penton* ao capsídeo, e a fibra (polipeptídeo IV), que forma uma estrutura alongada que se estende a partir do vértice da partícula viral (Figura-3) (HALL et al., 2010; BERK, 2007). A tabela 4 demonstra a localização e as respectivas funções de cada uma das proteínas associadas ao capsídeo e ao core da partícula do vírus.

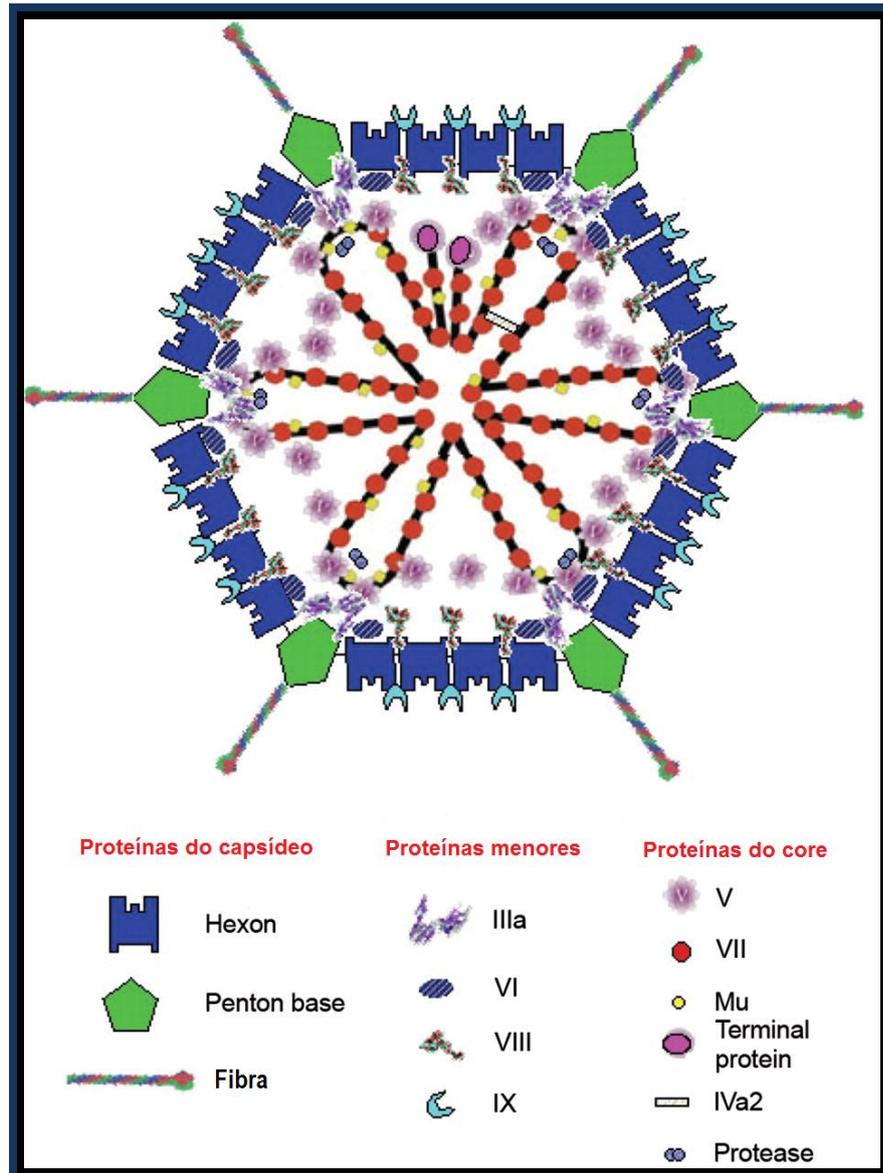


Figura 3- Representação esquemática da localização das proteínas estruturais da partícula do adenovírus baseada em microscopia crio eletrônica e cristalografia.

Fonte: Modificado de RUSSELL, 2009.

Tabela 4- Localização e funções das proteínas estruturais presentes no capsídeo e no core da partícula de adenovírus.

POLIPEPTÍDEO	LOCALIZAÇÃO	FUNÇÃO
II (<i>hexon</i>)	Faces do icosaedro	Principal componente estrutural; forma as faces do capsídeo.
III (<i>penton-base</i>)	Vértices do capsídeo	*Contém um motivo (sequência de aminoácidos) RGD, que facilita a interação com as integrinas celulares.
IIIa	Associada ao <i>penton-base</i>	Estabiliza os vértices.
IV (fibra)	Projeção a partir do <i>penton-base</i>	Medeia a ligação inicial às células hospedeiras.
V	Core	“Link” do core para o capsídeo; possivelmente ajuda na localização nuclear; empacotamento.
VI	Cavidade interna do <i>hexon</i>	Co-fator da protease; montagem do vírion; rompimento da membrana endossomal; importação nuclear do <i>hexon</i> .
VII	Core	Importação do genoma viral para o núcleo; condensação do DNA.
VIII	Entre os <i>hexons</i>	Estabilização das interações <i>hexon-hexon</i> .
IX	Face externa do capsídeo	Estabilização do vírion; ativador transcricional.
TP (proteína terminal)	5' terminal do genoma	Iniciador da replicação do DNA.
Mu	Core	Condensação do DNA.
IVa2	Core	Empacotamento do DNA; regulação da transcrição tardia.
Ad protease	Core	Clivagem de precursor de proteínas.

*Exceto para os HAdV-F (sorotipos 40/41).

Fonte: Modificado de HALL et al., 2010; RUSSELL, 2009.

Os HAdV-40 e HAdV-41 não apresentam o motivo (sequência de aminoácidos) RGD (Arg-Gly-Asp) no *penton-base*, importante para a entrada do vírus na célula. O HAdV-40 carrega o motivo RGAD (Arg-Gly-Ala-Asp) e o HAdV-41 o motivo IGDD (Ile-Gly-Asp) (ALBINSSON & KIDD, 1999). Estes vírus não utilizam integrinas durante a entrada na

célula e podem utilizar um mecanismo alternativo para facilitar a endocitose (SEIRADAKE & CUSACK, 2005).

Somente três proteínas estruturais estão expostas na partícula viral: o *hexon*, o *penton-base* e a fibra, as quais desempenham funções essenciais como na interface da partícula viral com o meio e interação com a célula hospedeira nas etapas de adsorção e penetração. Os determinantes antigênicos estão localizados no *hexon* e na fibra. Na superfície interna do *hexon* se encontra o determinante *alfa*, que é o antígeno gênero-específico comum a todos os AdVs do mesmo gênero. O *epsilon* do *hexon* e o *gama* da fibra caracterizam os sorotipos (RUSSELL, 2009).

A fibra é subdividida em três regiões: porção globular (Knob), haste e cauda (Figura-4). Os capsídeos da maioria dos sorotipos de AdVs apresentam apenas um tipo de fibra, enquanto que os das espécies F e G codificam proteínas para fibras curtas e longas (RUSSEL, 2009).

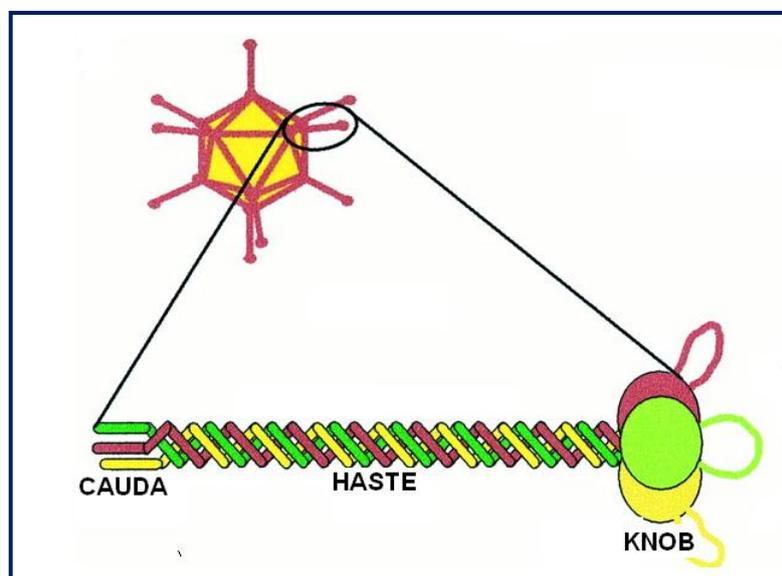


Figura 4- Desenho esquemático da proteína fibra de adenovírus.

Fonte: Adaptada de <http://cancerres.aacrjournals.org/content/60/24/6784/F2.large.jpg>

3.3.4- Organização do genoma viral

Os AdVs apresentam de 30-38 Kb e aproximadamente 40 proteínas (HALL et al., 2010; BERK, 2007). A análise dos genomas sequenciados dos sorotipos representativos de

todas as espécies desse vírus demonstraram que os mesmos apresentam uma organização genômica similar. Nas extremidades de cada molécula de DNA são encontradas as RTIs (repetições terminais invertidas), que variam de 36 pb (pares de base) para mais de 200 pb, dependendo do sorotipo, as quais são importantes durante a replicação do genoma. Cada terminal 5' do DNA do vírus é covalentemente ligado a uma TP (proteína terminal) que desempenha um papel fundamental na iniciação da replicação do DNA viral (HALL et al., 2010).

Seu genoma geralmente é dividido em regiões de genes de expressão precoce, E (E1A, E1B, E2A, E2B, E3 e E4); intermediária (IX e IVa2) e tardia, L (L1-L5) (Figura-5). Isso, além de outras unidades de transcrição menores que também estão presentes no genoma viral. Há também dois pequenos RNAs não traduzidos associados ao vírus (VA I e II), que funcionam na inibição da síntese de proteínas do hospedeiro nas células infectadas. A expressão dos genes de fase precoce, intermediária e tardia é sincronizada. A fase precoce, com início logo após a entrada do vírus nas células, antes da replicação do DNA viral, é caracterizada pela expressão de genes que modulam as funções celulares, facilitando a replicação do DNA e a transcrição dos genes tardios, durando aproximadamente 6 a 8 horas em células suscetíveis. Já a fase tardia, que ocorre após a replicação do DNA viral, é geralmente mais rápida, 4 a 6 horas, codificando todas as proteínas estruturais, com exceção da pIX (HALL et al., 2010; RUSSELL, 2000).

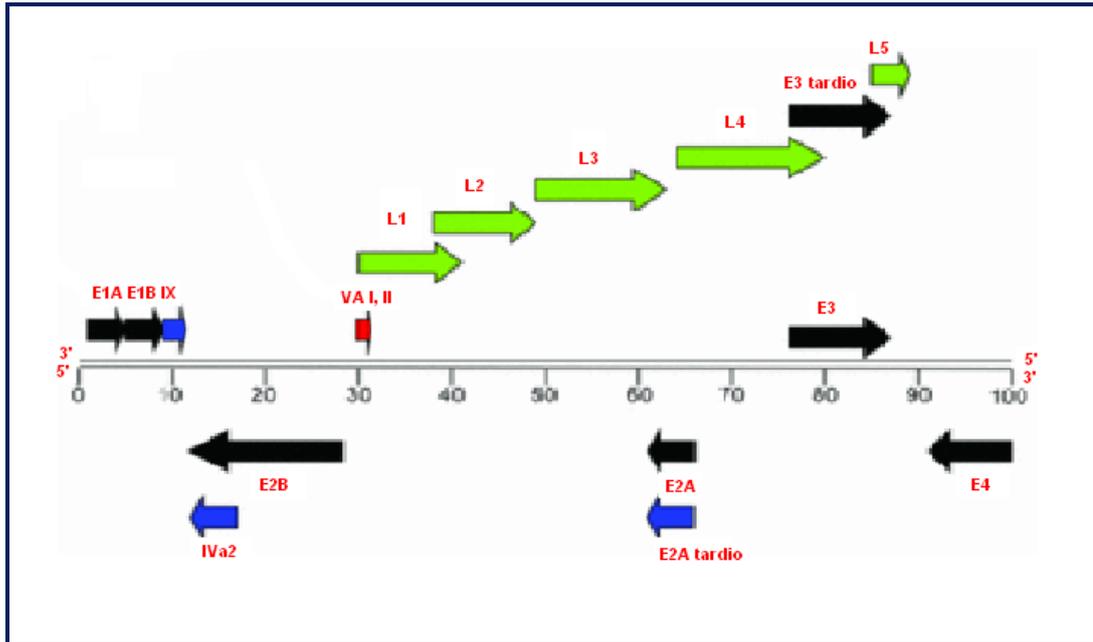


Figura 5- Organização do genoma de adenovírus. A leitura no sentido direito codifica o E1A, E1B, IX, as principais proteínas tardias, VA RNAs e unidades E3. A leitura para a esquerda denota o E4, E2A, E2B e genes IVa2. As setas pretas indicam as regiões de codificação de proteínas precoces, enquanto as azuis indicam as intermediárias e as verdes demonstram as unidades de transcrição tardias. Os RNAs VA-I e II são mostrados pela seta vermelha.

Fonte: HALL et al., 2010.

3.3.5- Processo inicial de infecção pelo adenovírus

A fibra é o primeiro componente do vírus a interagir com um determinado tecido. Estudos de infecção *in vitro* demonstraram que existem receptores em uma variedade de células. Na maioria dos AdVs o receptor é o CAR (receptor para AdV e coxsackievírus), o qual é expresso principalmente em linhagens epiteliais, sendo detectado no fígado, rim, pulmão, cérebro, coração, cólon, testículo, próstata e pâncreas, além de ser detectado em baixos níveis nas células hematopoiéticas (PHILIPSON & PETTERSSON, 2004). O CAR é membro da família das imunoglobulinas e está envolvido na formação de junções firmes (*tight junctions*). De uma maneira geral os HAdV das espécies A, C, D, E e F interagem com esse receptor, com maior ou menor afinidade, e a espécie B interage com outros receptores, como o CD46, CD80, CD86, ácido siálico e sulfato de heparana (RUSSEL, 2009).

Após o reconhecimento da porção globular da fibra pelo receptor primário, na maioria dos casos, o CAR, ocorre a interação do *penton*-base com as integrinas celulares (na presença

do domínio RGD). O que facilita a entrada do vírus por endocitose pela formação de vesículas revestidas por clatrina. Esta interação induz uma série de respostas celulares que levam a alterações no citoesqueleto visando a facilitar a internalização. As etapas subsequentes podem variar de acordo com o sítio de entrada e o sorotipo do vírus.

Alguns fatores indicam que o *penton*-base, associado com algumas proteínas, é o principal facilitador para a entrada do vírion na célula, como: a atuação do domínio RGD na liberação do vírion do endossomo e o desprendimento das fibras do *penton*-base após a interação com as integrinas. Entretanto, as vias de entrada podem variar de acordo com o tipo celular e com as espécies de AdVs, podendo nem haver a participação do *penton*-base na infecção (RUSSEL, 2009).

3.3.6- Epidemiologia

Os HAdV podem infectar e se multiplicar em várias partes do organismo, sobretudo no trato respiratório, trato gastrointestinal e olhos. Em menor escala, também podem infectar o fígado, bexiga urinária, pâncreas, miocárdio e sistema nervoso central. As infecções incluem faringite, conjuntivite, infecções respiratórias, bronquiolite e gastroenterite, além de cistite, miocardites e meningites (JIANG, 2006).

Apesar desta grande variabilidade tecidual, os HAdV apresentam certo grau de especificidade. Por exemplo, os sorotipos 2 e 5 (espécie C) são responsáveis por 5-10% das síndromes respiratórias em crianças, enquanto que os sorotipos 8, 9 e 37 (espécie D) estão comumente associados a ceratoconjuntivite epidêmica e os sorotipos 40 e 41 (espécie F) com gastroenterites (GONÇALVES & DE VRIES, 2006). Geralmente as infecções são autolimitantes, todavia, casos fatais têm sido relatados entre pacientes imunocomprometidos (GONÇALVES & DE VRIES, 2006).

As infecções por HAdV geralmente são persistentes, sendo caracterizadas pela excreção fecal prolongada e intermitente, principalmente no que diz respeito aos AdEs.

Apesar de suas características epidemiológicas variarem de acordo com os sorotipos, a transmissão é feita geralmente pelo contato direto ou pela via fecal-oral (CARTER, 2005). No entanto, a veiculação por águas de consumo, de recreação e na forma de aerossóis, além de alimentos contaminados e fômites têm se mostrado muito importante no ponto de vista epidemiológico (BITTON, 2005; FONG & LIPP, 2005; WOLD & HORWITZ, 2007; KIM et al., 2010).

Apesar de muitos tipos de HAdV terem a capacidade de se replicar no intestino e serem eliminados nas fezes, os HAdV-40 e HAdV-41 (espécie F) se destacam como os principais responsáveis pelos casos de gastroenterite em crianças, com duração de 5 a 12 dias, tendo como principais sintomas diarreia aquosa, vômitos, febre moderada a grave e desidratação leve. O novo sorotipo, HAdV-52, também está sendo associado com quadros de gastroenterite (JIANG, 2006; JONES II et al., 2007; KIM et al., 2010; WOLD & HORWITZ, 2007).

Os AdEs apresentam características estruturais distintas dos outros sorotipos, já mencionadas anteriormente, e algumas características físico-químicas que lhes conferem a habilidade de infectar o sistema gastrointestinal humano (SEIRADAKE & CUSACK, 2005). Tais particularidades também devem estar relacionadas à dificuldade de replicação destes sorotipos em sistemas celulares convencionais dentro de um tempo razoável, o que faz com que sejam denominados de adenovírus fastidiosos (KIM et al., 2010).

Outro dado epidemiológico relevante é o fato de aproximadamente 50% dos casos de intussuscepção intestinal pediátrica estarem associados à infecção por vírus, sobretudo pelos AdEs, com a ocorrência inicial de hipertrofia das placas de Peyer, o que atuaria como ponto de partida para a obstrução e, conseqüentemente, a intussuscepção (GINELLI et al., 2011).

Diversos surtos causados por HAdV têm sido descritos em creches, hospitais, quartéis militares e águas de recreação (JIANG, 2006). Durante um surto de gastroenterite ocorrido em

Maizuru (Japão), 8% dos episódios foram causados por HAdV, com a detecção dos sorotipos 1, 2, 3, 5 e 41, sendo este último responsável por 85,2% dos achados (SHIMIZU et al., 2007). Em um jardim de infância de uma cidade de Portugal, também foi descrito um surto de gastroenterite causado pelo HAdV-41 (GONÇALVES et al., 2010). Já em Los Angeles (EUA), em 2007, o novo sorotipo (HAdV-52), semelhante ao HAdV-41, foi isolado de cinco pacientes com gastroenterite (JONES II et al., 2007).

Estudo realizado em Goiânia (GO) nos anos de 1987-1990, com crianças de 0-5 anos hospitalizadas com e sem diarreia, demonstrou que os HAdV estiveram presentes em 2,1% dos casos, predominantemente na faixa etária de 1-3 anos (CARDOSO et al., 1992). E em Rondônia, o HAdV foi detectado em 6,4% das crianças menores de cinco anos hospitalizadas com diarreia aguda (MAGALHÃES et al., 2007).

Em Belém (PA), um estudo de vigilância hospitalar e ambulatorial realizado pelo IEC no período de março a setembro de 2003 detectou a presença de HAdV em 6,3% das amostras de fezes coletadas de crianças hospitalizadas, dentre estas, 58,3% correspondiam aos sorotipos 40 e 41 (MÜLLER et al., 2010).

3.3.7- Estabilidade da partícula viral no ambiente

De uma maneira geral, os vírus entéricos são altamente estáveis no ambiente e são sempre os patógenos mais diluídos, mantendo sua viabilidade mesmo após exposição a processos de tratamento, podendo sobreviver por um longo período na água (BOSCH, 1998; BOSCH et al., 2008). Mantêm-se em uma larga escala de pH (3-10) e por longos períodos a baixas temperaturas, podendo sobreviver e permanecer viáveis por até 130 dias em água do mar, 120 dias em água doce e de esgoto e até 100 dias em terra na temperatura de 20 a 30°C (FONG & LIPP, 2005; KOCWA-HALUCH, 2001).

Com relação aos HAdV, eles possuem alta estabilidade perante a ação de agentes físicos e químicos, sobrevivendo em variadas condições de pH (5,0 - 9,0) e de temperatura (4

– 36°C), o que possibilita uma permanência prolongada destes agentes no ambiente (JIANG, 2006).

Estes patógenos têm se mostrado até 60 vezes mais resistentes à radiação UV do que os vírus de RNA, tais como enterovírus e o VHA, devido ao fato de serem de dupla fita de DNA, o que lhes confere maior estabilidade, haja vista que o DNA desenvolve mecanismos de reparo realizados pela enzima DNA polimerase. Somado a isso, esses vírus possuem um alto peso molecular, o que também influencia positivamente nessa resistência (FONG & LIPP, 2005).

Diante disso, diversos estudos têm apontado o HAdV como um dos candidatos a indicador viral de contaminação fecal da água (FONG & LIPP, 2005; JIANG, 2006; PINA et al., 1998; SILVA et al., 2011; TONG & LU, 2011).

3.4- PESQUISA DE VÍRUS EM AMBIENTES AQUÁTICOS

Oficialmente, a virologia ambiental surgiu como área de interesse científico após um grande surto de hepatite E ocorrido na cidade de Nova Delhi, na Índia, em meados de 1956. A origem do surto foi a contaminação do rio Jumna por esgoto, o qual era utilizado como fonte de captação de água para tratamento prévio e consumo. Mais de 30.000 casos de hepatite ocorreram na população local, o que levou à formação de grupos especializados em pesquisas de vírus em amostras de água e efluentes. Vale mencionar que no início da década de 1940 foi realizada uma pesquisa para verificar possibilidade de transmissão do poliovírus por efluentes de esgoto (BOSCH, 1998).

A partir daí, a pesquisa de vírus em ambientes aquáticos vem sendo desenvolvida em diversos países. Porém, no Brasil estes estudos ainda são restritos, sendo notória a predominância nas regiões sul e sudeste (AW & GIN, 2010; BARRELLA et al., 2009; CALGUA et al., 2011; CHEONG et al., 2009; FONG et al., 2010; GUERRERO-LATORRE et al., 2011; LA ROSA et al., 2010; MELEG et al., 2006; MIAGOSTOVICH et al., 2008;

RIGOTTO et al., 2010; SILVA et al., 2009; STEYER et al., 2011; TONG & LU, 2011; VILLAR et al., 2007; WYN-JONES & SELLWOOD, 2001).

Desde 2009, o IEC vem investindo em pesquisas nesta área, desenvolvendo projetos na região metropolitana de Belém, onde os resultados obtidos até o momento vêm demonstrando a presença de vírus entéricos como o rotavírus, norovírus e astrovírus, além do vírus da hepatite A, em amostras de água superficial e esgoto não tratado da cidade (FLECK et al., 2009; GURJÃO et al., 2010; MAESTRI et al., 2010; TEIXEIRA et al., 2009; TEIXEIRA et al., 2010). Ainda foi possível comprovar que a via hídrica estava relacionada à transmissão do VHA em um surto de hepatite A ocorrido no ano de 2010 no município de Cachoeira-do-Arari (PA) (Comunicação pessoal).

De uma forma sintética, a pesquisa de vírus em ambientes aquáticos está baseada em duas etapas: concentração e detecção viral (BOSCH, 1998; FONG & LIPP, 2005; SILVA et al., 2010). Diversos métodos de detecção podem ser empregados na pesquisa de vírus, como métodos sorológicos, cultura de células e métodos moleculares (FONG & LIPP, 2005). Todavia esses últimos têm sido mais utilizados devido às vantagens de alta sensibilidade, especificidade e rapidez diagnóstica, sendo empregados na maioria dos trabalhos realizados (SILVA et al., 2010).

3.4.1- Concentração das partículas virais

A concentração é uma etapa bastante crítica, devido ao fato de o vírus poder estar presente na água em uma concentração tão baixa que é necessário reduzir um grande volume da amostra a poucos mililitros. Um método eficaz de concentração deve cumprir alguns critérios, como ser tecnicamente simples e rápido, proporcionar elevada recuperação viral, ser adequado para uma ampla gama de vírus entéricos, fornecer um pequeno volume de concentrado e ser viável financeiramente (BOSCH, 1998; BOSCH et al., 2008; WYN-JONES & SELLWOOD, 2001).

A maioria dos métodos utilizados para a concentração de vírus presentes em ambientes aquáticos está baseada nas propriedades macromoleculares de suas proteínas virais. Algumas destas proteínas conferem aos vírus as características de um colóide hidrofílico com capacidade de se comportar ora como ácido, ora como base (anfotérica) com carga elétrica variável em função do pH e da força iônica do ambiente. Os vírus podem ser adsorvidos e depois desprendidos de diferentes substratos que estejam carregados positivamente ou negativamente, dependendo do pH (BOSCH et al., 2005).

Diferentes metodologias têm sido empregadas para a concentração, tais como ultrafiltração, separação imunomagnética, ultracentrifugação, adsorção viral com partículas de sílica aminofracionizadas, floculação orgânica e inorgânica, precipitação com polietilenoglicol e utilização de membranas de microfiltração simples ou em cartuchos, sendo polarizadas negativamente ou positivamente (FONG & LIPP, 2005; SILVA et al., 2010).

As membranas eletronegativas exigem que as amostras de água recebam um tratamento prévio para promover a interação entre a membrana e o vírus, o qual é carregado negativamente. Tais tratamentos envolvem a acidificação da água ou a adição de sais catiônicos como cloreto de magnésio (FONG & LIPP, 2005; SILVA et al., 2010). Os filtros carregados negativamente apresentam maior recuperação de vírus em águas marinhas e águas de maior turbidez (FONG & LIPP, 2005). Já as membranas carregadas positivamente não exigem tratamento prévio, porém, o pH deve ser rigidamente controlado, devendo permanecer entre 7,0 e 7,5, para não interferir na interação com o vírus (SILVA et al., 2010).

Os métodos baseados na adsorção de vírus em superfícies sólidas adequadas para posterior eluição em volumes de água muito menores são recomendados para estudos que envolvem grandes volumes de água (BOSCH et al., 2005).

3.4.2- Detecção molecular

As técnicas moleculares têm sido amplamente utilizadas para detectar vírus entéricos em amostras ambientais desde o início de 1990. Testes de detecção viral, como a PCR e a hibridização, geralmente são baseados na detecção de uma parte do genoma viral, que é altamente conservada com grande homologia dentro de um grupo específico de vírus. Os ensaios baseados na PCR oferecem várias vantagens sobre os ensaios de cultura celular para a detecção de patógenos virais em amostras ambientais, pelo fato de serem mais rápidos, altamente sensíveis e específicos, quando realizados adequadamente (FONG & LIPP, 2005).

Pina et al. (1998) sugeriram que a PCR tem levado a uma maior taxa de detecção de HAdV em amostras ambientais. Entretanto, os testes moleculares não têm a capacidade de discernir entre partículas infecciosas e não infecciosas, fato que poderá ser de relevância crítica nas pesquisas. Já o cultivo celular pode auxiliar na replicação do vírus antes da detecção molecular, aumentando o número de cópias do material genético alvo, e na comprovação da infectividade destas partículas (BOSCH, 1998). Porém, nem todos os vírus entéricos têm a capacidade de replicar-se em linhagens celulares. Em relação aos AdEs (fastidiosos), foco desta pesquisa, o cultivo é uma metodologia bastante onerosa devido a fatores intrínsecos da espécie F, não sendo comumente empregado nos estudos de rotina.

Recentemente, a PCR convencional foi aprimorada para melhorar a especificidade, sensibilidade e eficácia, assim como para quantificar o número de partículas virais presentes. Algumas variações da PCR convencional incluem a nested-PCR, multiplex PCR e PCR em tempo real. A semi-nested PCR e a nested-PCR aumentam a sensibilidade e a especificidade da PCR pela utilização de um ou dois iniciadores (“primers”) internos, respectivamente. No entanto, um aumento no risco de contaminação tem sido observado nestas técnicas durante a transferência do produto da primeira para a segunda reação de PCR (FONG & LIPP, 2005).

A PCR em tempo real é uma metodologia que combina amplificação e detecção simultaneamente. O teste utiliza os mesmos reagentes da PCR convencional acrescido de fluorocromos, intercalados em cadeias de DNA (metodologia *SybrGreen*) ou presentes em sondas de hibridização específicas (metodologia *TaqMan*) (PEREIRA & MACIEL, 2004). A fluorescência emitida é mensurada em tempo real à medida que os produtos são gerados no decorrer da reação. Neste caso, o monitoramento do ensaio ocorre durante todo o processo de produção de *amplicons* e a cada ciclo da PCR. Uma curva vai sendo gerada de acordo com a concentração do produto sintetizado e em função do número de ciclos (<http://www.centrodegenomas.com.br>).

Ao contrário dos outros métodos de PCR, a PCR em tempo real não requer a manipulação das amostras no período pós-reação, o que lhe confere maior proteção contra possíveis contaminações, maior rapidez e rendimento. É uma técnica extremamente sensível, sendo capaz de detectar quantidades mínimas de DNA (HEID et al., 1996).

A região do genoma dos AdVs que codifica o *hexon* é altamente conservada e foi a escolhida por Allard et al. (1992) para nortear o desenho dos iniciadores para a identificação dos sorotipos das espécies A-F. Essa mesma região foi utilizada posteriormente em inúmeros trabalhos de pesquisa.

Pesquisas desenvolvidas em diferentes localidades, inclusive no Brasil, relatam a detecção de HAdV em amostras ambientais, sobretudo em água e esgoto, por meio de técnicas moleculares, sendo que os percentuais de positividade obtidos variam de acordo com os tipos de amostra e das metodologias empregadas.

Jiang et al. (2001) detectaram os HAdV em 33% das amostras de águas costeiras do sul da Califórnia pelo método de nested-PCR. Uma positividade de 61% foi observada para os HAdV sorotipos 40/41 em águas do rio Tamagawa no Japão utilizando a PCR em tempo real (HARAMOTO et al., 2010). A nested-PCR foi empregada para detecção de HAdV em águas

residuais urbanas de Singapura (100% das amostras) e em águas subterrâneas destinadas à irrigação na Coreia do Sul (13.8%) (AW & GIN, 2010; CHEONG et al., 2009). Na Itália, Muscillo et al., (2008) verificaram a presença desses agentes em amostras de rios, estuários e mar (63%) e esgotos (100%). La Rosa et al. (2010), testando por PCR em tempo real amostras provenientes de afluentes e efluentes das estações de tratamento de águas residuais detectaram esse vírus em 96% e 76% das situações, respectivamente.

No Brasil, estudos conduzidos em Manaus demonstraram a presença deste agente em 30.8% das amostras de água superficial testadas pela nested-PCR (MIAGOSTOVICH et al., 2008). Pesquisas realizadas na cidade de Limeira (SP) detectaram HAdV em todas as amostras de esgoto doméstico testadas por PCR (BARRELLA et al., 2009). Um recente estudo realizado em Florianópolis em diferentes ambientes aquáticos encontrou pela nested-PCR esse patógeno em 64% das amostras investigadas (RIGOTTO et al., 2010).

4- OBJETIVOS

4.1- OBJETIVO GERAL

- Detectar a presença de adenovírus humanos em amostras de água e esgoto não tratado oriundas de diversos ecossistemas aquáticos da cidade de Belém-PA.

4.2- OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar a frequência de adenovírus humanos em amostras de água e esgoto;
- Comparar a sensibilidade dos métodos moleculares empregados;
- Identificar as espécies e sorotipos de adenovírus humanos encontrados nos casos onde haja quantidade suficiente de DNA.

5- MATERIAL E MÉTODOS

5.1- DESCRIÇÃO DA ÁREA DE ESTUDO

O estudo foi realizado na Região Metropolitana do Município de Belém-PA que possui de acordo com o IBGE (2011), 1.351.618 habitantes, estando dividida em oito Distritos Administrativos e 71 bairros. Possui um território de 50.582,30 hectares (ha), dividido em uma porção continental com 17.378,6 ha, equivalente a 34,4%, e outra insular, composta por 39 ilhas com 33.203,7 ha, correspondendo a 65,6% de todo o território (PREFEITURA MUNICIPAL DE BELÉM, 2011).

A cidade de Belém está situada a 1°30' de latitude sul e 48°30' de longitude oeste GWr, no vértice do estuário guajarino no ponto de encontro das influências marítimas da baía de Guajará e fluviais do Rio Guamá (RIBEIRO, 1992) (Figura-6). O estuário guajarino é um ambiente fluvial com influências marinhas, forma-se na confluência dos rios Pará, Acará e Guamá, este limitando a área sul, dando origem à baía de Guajará que, a norte, confunde-se com a baía de Marajó (SODRÉ, 2007).

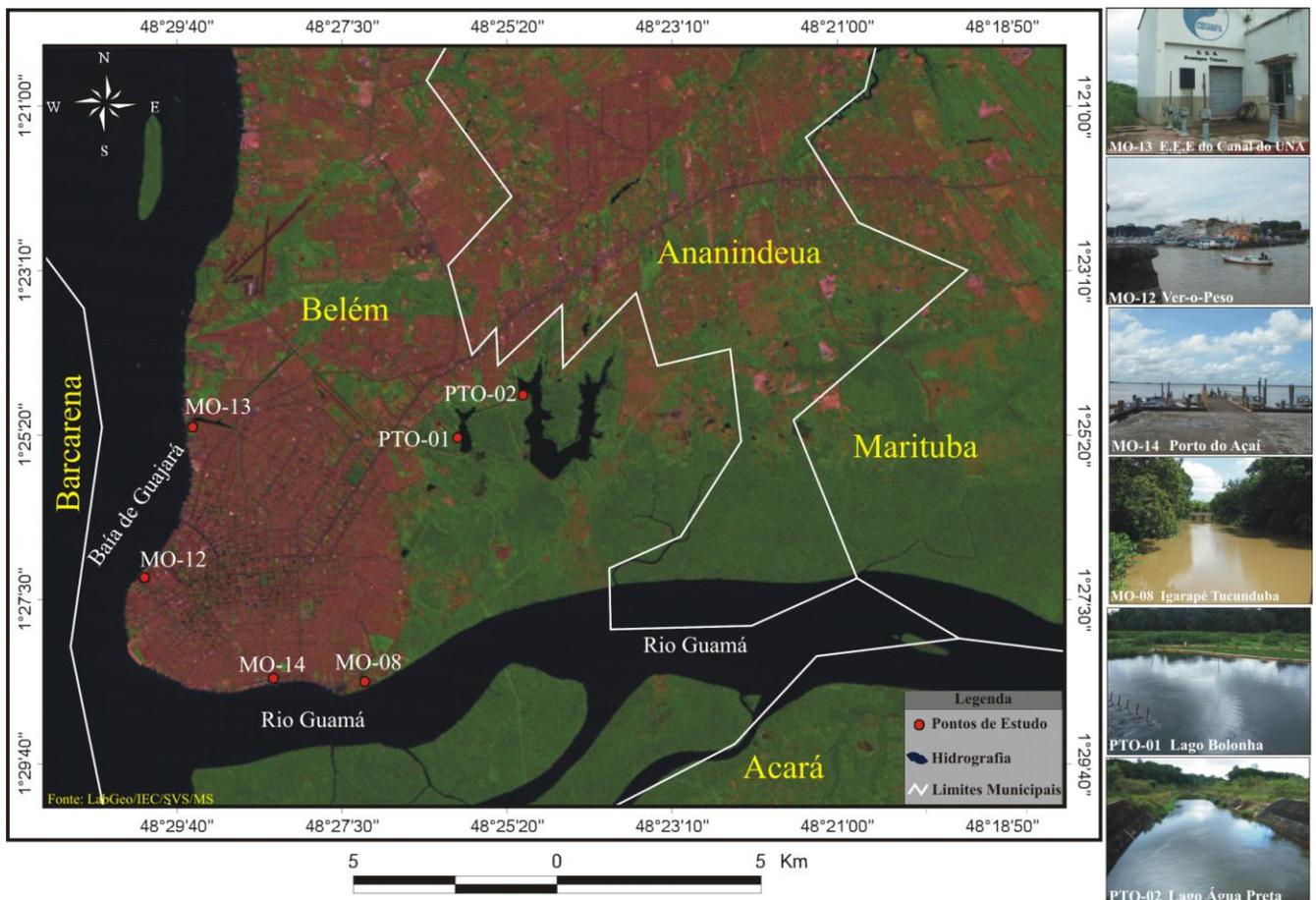


Figura 6- Localização do município de Belém, Pará, Brasil e dos seis pontos de coleta utilizados no estudo.

Fonte: LabGeo/IEC/SVS/MS.

Foram selecionados seis pontos de amostragem, estrategicamente localizados, os quais já apresentavam informações sobre a presença de coliformes fecais. Dentre eles, um esgoto não tratado: Estação Elevatória de Esgoto do Canal do UNA, cinco coleções hídricas: Porto do Açaí, Ver-o-Peso, igarapé Tucunduba, lago Bolonha e canal que liga o lago Água Preta ao lago Bolonha (Figura-6). Vale ressaltar que todos esses ambientes estão relacionados direta ou indiretamente com o cotidiano da população da cidade.

5.1.6- MO-13: Estação Elevatória de Esgoto do Canal do UNA (efluente de esgoto)

A Estação Elevatória de Esgoto do Canal do UNA (Figuras 6 e 7-A) está localizada a 335 metros do emissário na Baía do Guajará, no bairro do Telégrafo, e tem uma vazão média de $1800\text{m}^3/\text{h}$. Atualmente recebe cerca de $250\text{m}^3/\text{h}$, para uma rede de coleta com

aproximadamente 78,10 km e população de 127.210,00 habitantes. A veia principal da bacia do UNA (Canal do UNA) recebe os efluentes de 20 bairros de Belém, sendo que somente 8% dos mesmos recebem tratamento na Estação do UNA antes de serem lançados na baía do Guajará. Os 92% restantes são lançados *in natura*, o que contribui de forma bastante expressiva para a sua lenta e gradual degradação (SIMd, 2010). As amostras foram coletadas diretamente da caixa de esgoto (Figura 7- B e C).



Figura 7- A) Estação Elevatória de Esgoto do Canal do UNA, Belém-Pa; **B e C)** Local e forma de coleta das amostras de esgoto.

Fonte: Arquivo particular.

5.1.2- MO-14: Porto do Açaí

Localizado ao sul de Belém, à margem do Rio Guamá e no bairro do Jurunas, o Porto do Açaí (Figuras 6 e 8-A) é um dos portos públicos de maior movimento de Belém, onde atracam os barcos que trazem a produção dos ribeirinhos que moram nas ilhas de Barcarena, Acará e Marajó entre outras. Os produtos mais comercializados são o açaí, farinha, sementes de cacau e frutas regionais. Trata-se de um local aberto que funciona às 24 horas do dia sem nenhuma estrutura pública de limpeza, saneamento, higiene e água tratada. As colheitas das amostras de água do Rio Guamá foram realizadas na escadinha (Figura 8-B).



Figura 8- A) Porto do Açaí, Belém-Pa; B) Local e forma de coleta das amostras de água superficial do rio Guamá.

Fonte: Arquivo particular.

5.1.3- MO-12: Ver-o-Peso

O Ver-o-Peso (Figuras 6 e 9-A) é um mercado localizado no bairro da Cidade Velha diretamente às margens da Baía do Guarajá. A água do rio é utilizada para a lavagem de todo o pescado comercializado, além de ser utilizada *in natura* para o preparo de alimentos, lavagem de verduras, frutas e hortaliças comercializadas nesta feira. As amostras de água superficial da baía do Guajará foram coletadas atrás do mercado de peixe (Figura 9-B).

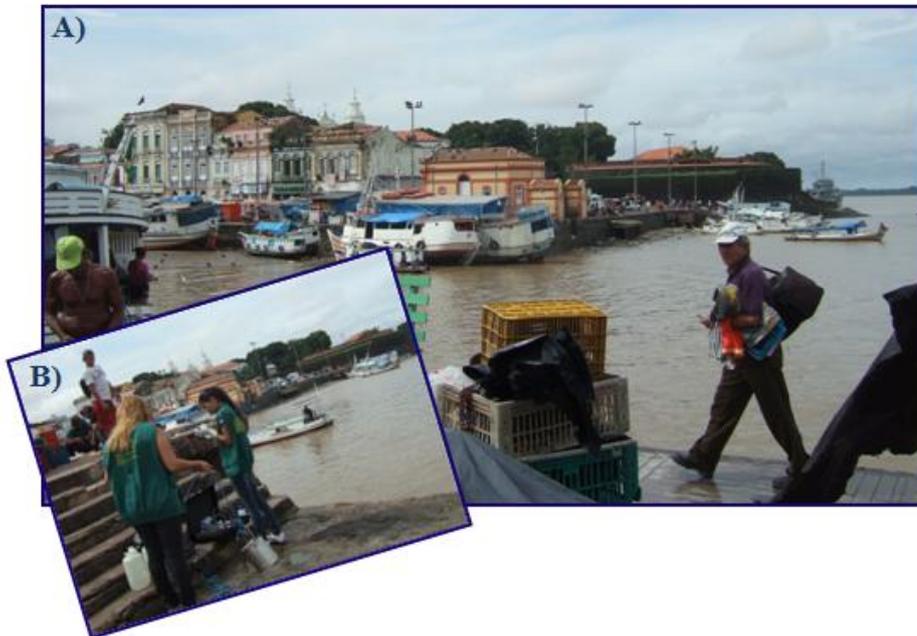


Figura 9- A) Mercado do Ver-o-Peso, Belém-Pa; B) Local e forma de coleta das amostras de água superficial da baía do Guajará.

Fonte: Arquivo particular.

5.1.4- MO-08: Igarapé Tucunduba

A bacia do Tucunduba, que inclui o igarapé Tucunduba (Figuras 6 e 10-A), é a segunda maior da Região Metropolitana de Belém, com uma área total de 10,5 Km² e área alagável de 5,7 Km² (54,50%). Ela abrange a totalidade dos bairros de Canudos e Terra Firme e se estende por parte dos bairros do Guamá, São Braz, Marco e Curió-Utinga. A espinha dorsal da bacia é o Canal do Tucunduba, com 3.900 metros de extensão, sendo 100% em estado natural, sofre grande influência das marés e suas margens e adjacências são habitadas por um contingente populacional significativo, cerca de 1400 domicílios. Embora o igarapé seja classificado como água superficial, ele recebe efluentes domésticos e hospitalares *in natura* de pelo menos cinco bairros da cidade. Como uma área de ocupação desordenada, ela é caracterizada por um alto grau de degradação ambiental, originada notadamente por lançamento de lixo e detritos urbanos no igarapé, desmatamento das margens e ausência de coleta de esgoto. Apesar destes fatores, a população das adjacências utiliza esta água para

recreação (principalmente as crianças), lavagem de louças, lavagem de roupas e banho (SILVA, 2003). As amostras foram coletadas sob a ponte do Campus Universitário no bairro do Guamá (Figura 10-B).



Figura 10- A) Igarapé Tucunduba, Belém-Pa; B) Local e forma de coleta das amostras de água superficial.

Fonte: Arquivo particular.

5.1.5- Mananciais do Utinga

A mata do Utinga abriga o Parque Ambiental de Belém, com cerca de 1.348 ha, e os mananciais hídricos que abastecem a cidade, lagos Bolonha e Água Preta. Os lagos Bolonha e Água Preta são abastecidos pelas águas drenadas de sua bacia hidrográfica (Rio Aurá a parte do Igarapé Tucunduba e Uriboquinha, sub-bacias do igarapé Mucutu e Água Preta), e por um sistema de bombeamento de água do Rio Guamá, implantado pela Companhia de Saneamento do Pará (COSANPA), que tem por objetivo suprir o “déficit” de água destinada ao abastecimento de Belém. Esses mananciais apresentam riscos de eutrofização, em decorrência

de sua localização em ambiente vulnerável à pressão da ocupação urbana e ao lançamento de efluentes domésticos e industriais (SODRÉ, 2007).

5.1.5.1- PTO-01: Lago Bolonha

Apresentando uma forma alongada, o lago Bolonha (Figuras 6 e 11-A), com aproximadamente $2.100.000 \text{ m}^3$ de água acumulada, 512.540 m^2 de lâmina d'água e profundidade máxima em torno de 7,64 m, é um dos mananciais que vem contribuindo ao longo do tempo, como fonte de água para o abastecimento da cidade de Belém (COSANPA, 1983). Com uma área total de $1.790.000 \text{ m}^2$, o lago Bolonha, encontra-se em grande parte ($1.664.130 \text{ m}^2$), nas terras do Utinga, as quais pertencem à COSANPA e o restante (133.870 m^2) em águas que pertencem a terceiros. As amostras foram coletadas diretamente do lago (Figura 11-B).



Figura 11- A) Lago Bolonha, Belém-Pa; B) Local e forma de coleta das amostras de água superficial.

Fonte: Arquivo particular.

5.1.5.2- PTO-02: Lago Água Preta

O lago Água Preta (Figuras 6 e 12-A) é formado pelas bacias hidrográficas dos igarapés Catu e Água Preta, do qual recebe o nome, sua área total é de 7.199.500 m², encontra-se em grande parte (6.331.850 m²) nas terras do Utinga, as quais pertencem a COSANPA, e em terras da EMBRAPA, o restante (867.650 m²) em áreas pertencentes a terceiros (COSANPA/ CENSA, 1983). Considerado como principal lago que serve como fonte de abastecimento da cidade de Belém, teve sua ampliação em 1973 para reservar uma quantidade de 10.550.000 m³ apresentando uma lâmina de água de 3.116.868 m² e 8,5 m aproximadamente de profundidade máxima. Existe no lago um sistema de comportas com função de controlar a saída de suas águas por gravidade até o lago Bolonha.



Figura 12- A) Lago Água Preta, Belém-Pa; B e C) Local e forma de coleta das amostras de água superficial.

Fonte: Arquivo particular.

Os lagos Bolonha e Água Preta mantêm seus níveis de água devido a adução por meio de quatro bombas instaladas às margens do Rio Guamá. O sistema de abastecimento tem início com captação de água do Rio Guamá, onde existe uma estação elevatória de eixo

vertical, cuja finalidade é captar água por meio de três adutoras, com diâmetros de 800 mm, 1.500 mm e 1.750 mm. Essa água é transportada ao lago Água Preta e este por sua vez é ligado com o lago Bolonha por meio de um canal de 1 km de distância (SODRÉ, 2007). As amostras foram coletadas neste canal (Figura 12-B e C).

5.2- RECURSOS FINANCEIROS

Esta pesquisa está inserida no projeto intitulado “Detecção de vírus causadores de gastroenterite em amostras de água oriundas de diferentes ecossistemas aquáticos na Região Metropolitana de Belém-Pa” desenvolvido no IEC/MS/SVS durante um período de dois anos (set/2008-out/2010), envolvendo as Seções de Virologia – SEVIR (Laboratório de Gastroenterites Virais) e Meio Ambiente - SAMAM (Laboratório de Microbiologia Ambiental). O projeto foi financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Pará (FAPESPA) e a maior parte dos recursos utilizados nessa pesquisa é proveniente deste subsídio e o restante foi disponibilizado pelo IEC.

5.3- AMOSTRAGEM

Quando a pesquisa de HAdV foi iniciada, os pontos de coleta já haviam sido estabelecidos e o processo já estava em andamento. Cada ponto de coleta recebeu um código (Tabela-5) para facilitar na identificação das amostras.

Tabela 5- Pontos de coleta de água/esgoto com seus respectivos códigos de identificação.

PONTO DE COLETA	CÓD. IDENTIFICAÇÃO
Esgoto UNA	MO-13
Porto do Açaí	MO-14
Ver-o-Peso	MO-12
Igarapé Tucunduba	MO-08
Lago Bolonha/Utinga	PTO-01
Lago Água Preta/Utinga	PTO-02

Foi feita uma coleta mensal de dois litros de água em cada ponto durante 24 meses consecutivos, nov/2008 a out/2010, totalizando 144 amostras. Foi utilizada água destilada como controle negativo.

As amostras referentes ao primeiro ano do estudo foram obtidas a partir de aliquotas do material (água/esgoto) que já havia sido processado para outros testes e se encontrava estocado à -70°C.

5.4- COLETA

Foram utilizados frascos de polipropileno esterilizados, com volume total de 4 litros. Todos os frascos foram armazenados em isopores contendo gelo, até sua chegada à SAMAM, onde ocorreu o processamento das amostras.

5.5- PESQUISA DE VÍRUS EM AMBIENTES AQUÁTICOS

A pesquisa de vírus em amostras de água/esgoto é baseada em duas etapas: Concentração e detecção viral. A figura 13 demonstra, de maneira esquemática, todos os procedimentos laboratoriais realizados neste trabalho.

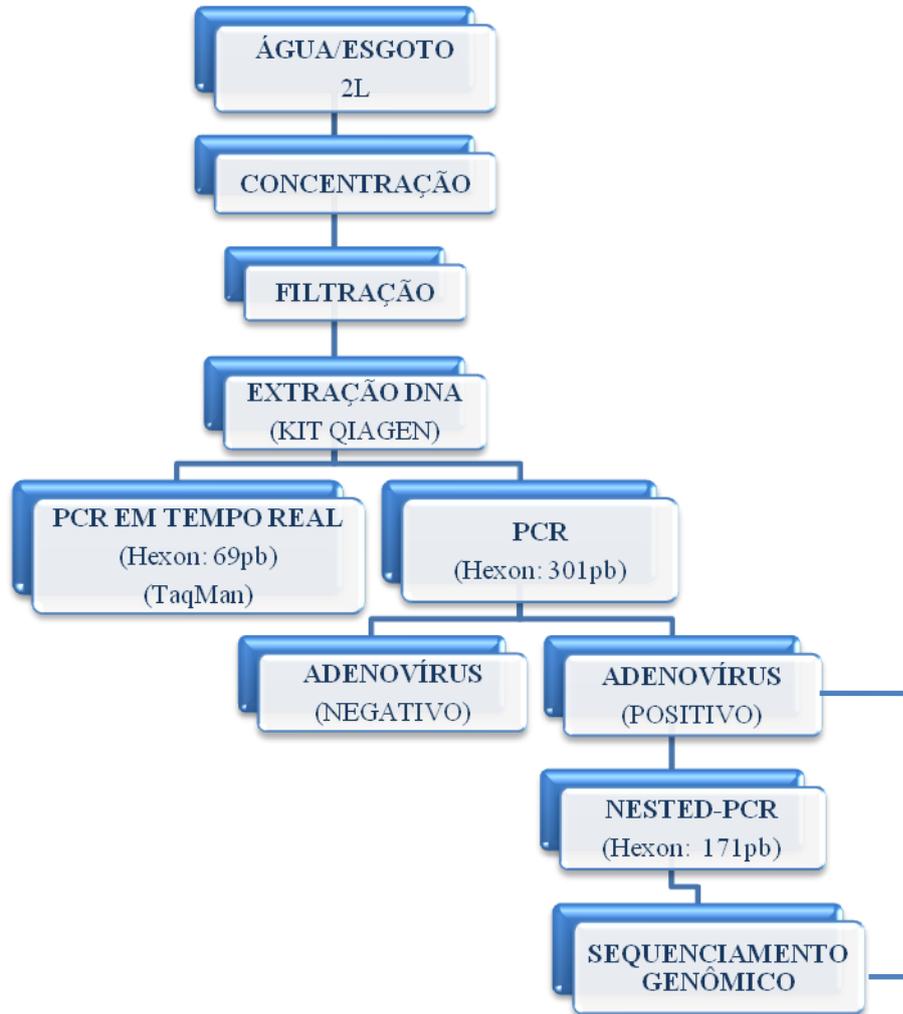


Figura 13- Representação esquemática da metodologia utilizada para a detecção de adenovírus humanos em amostras de água/esgoto oriundas de diferentes ecossistemas aquáticos da cidade de Belém-PA, nov/2008 a out/2010.

5.5.1- Concentração das partículas virais

As amostras de água e esgoto deste estudo foram concentradas seguindo o método de adsorção e eluição em membrana filtrante carregada negativamente adaptado de Katayama et al. (2002).

Em um Becker foram colocados 2L da amostra coletada. O volume foi levado ao agitador, adicionado 1200 mg (1,2 g) de cloreto de magnésio ($MgCl_2$) e homogeneizado por 10 minutos com o auxílio de uma barra magnética. Em seguida, o pH da água/esgoto foi ajustado para 5,0 com ácido clorídrico (HCl) 6N. Após esta etapa, o Becker foi retirado do agitador e a amostra despejada no interior de um vasilhame de pressão e filtrada em

membrana HAWP negativamente carregada com malha de 0,45 μm e 142 mm de diâmetro. Em seguida, a membrana foi transferida para uma placa de Petri de tamanho adequado. Em cabine de fluxo laminar, a membrana foi coberta com 30 mL de ácido sulfúrico (H_2SO_4) 0,5 mM, pH 3,0 durante 10 minutos para lavagem. Após este intervalo, todo o ácido foi descartado com o auxílio de um pipetador automático. Depois, a membrana foi eluída com 15 mL de hidróxido de sódio (NaOH) 1mM, pH 10,5, sendo deixada sob agitação constante por 10 minutos em placa agitadora. O conteúdo (aproximadamente 15 mL) foi transferido para um tubo Falcon estéril com o auxílio de um pipetador automático, onde foram adicionados 50 μl de H_2SO_4 50 mM e 50 μl de tampão TE 100X. Todo o eluato foi transferido para uma coluna Amicon Ultra-15 e centrifugado a 5.000 rpm por 5 min a 4°C. Ao final da centrifugação, o produto (aproximadamente 2 mL) foi agitado em vortex para o despreendimento das partículas concentradas na membrana e em seguida aliqotado e armazenado a -70°C / -20°C até extração de DNA.

As amostras coletadas de novembro de 2008 até novembro de 2009 passaram primeiramente por uma etapa de clarificação (pré-filtro AP-20). Porém, como nossos mananciais superficiais são extremamente ricos em sólidos totais dissolvidos e em suspensão, nos quais as partículas virais poderiam estar aderidas, a possibilidade de recuperação dos vírus estaria sendo comprometida, o que levou a eliminação desta etapa nas amostras posteriores.

Visando a otimização do protocolo, as amostras coletadas de abril a outubro de 2009, que estavam mantidas sob refrigeração (-70°C/-20°C) devido ao atraso na entrega dos dispositivos Amicon, foram centrifugadas de modo diferente, adotando-se colocar os tubos sempre em uma mesma posição de modo que as membranas ficassem voltadas para a parede interna da centrífuga. Outra modificação foi realizada após a centrifugação, na qual a parte

interna removível dos tubos passou a ser vigorosamente agitada para permitir a liberação de possíveis partículas virais aderidas na mesma.

5.5.2- Detecção molecular de adenovírus humanos

5.5.2.1- Extração do DNA viral das amostras de água/esgoto

A extração do DNA foi feita com a utilização do “QIamp® DNA Stool Mini Kit” fabricado pelo laboratório QIAGEN Inc (Valencia, USA). Os procedimentos descritos abaixo foram conduzidos conforme as instruções do fabricante:

1ª etapa- Suspensão fecal:

Esta etapa foi realizada somente para o processamento de amostras espécimes fecais positivos para HAdV testados previamente por Ensaio Imunoenzimático (EIE), os quais se encontravam estocados no banco de amostras do Laboratório de Gastreenterites Virais, sendo utilizados como controles positivos nos testes de detecção.

Foram pesados 180 a 220 mg da amostra de fezes em um tubo de 2 mL e adicionado 1,4 mL de tampão ASL. Agitou-se em vórtex por um minuto e incubou-se por 5 minutos a 70°C. Nova agitação foi realizada por 15 segundos e centrifugação por um minuto. Retirou-se 1,2 mL do sobrenadante, o qual foi colocado em um tubo novo de 2 mL. Adicionou-se um tablete de “inhibitex matrix” (componente do “kit” de extração para a absorção de inibidores de PCR em amostras de fezes) e agitou-se em vórtex por um minuto. Em seguida foi realizada uma incubação por um minuto à temperatura ambiente para permitir a absorção do “inhibitex matrix”. Após esta pausa, o material foi centrifugado por três minutos e o sobrenadante colocado em um novo tubo de 1,5 mL. Procedeu-se nova centrifugação por três minutos. O sobrenadante foi aliquoteado e armazenado a -20°C para ser utilizado como controle positivo dos testes de extração das amostras de água/esgoto a partir da próxima etapa.

2ª etapa: Extração do material genético

Todas as amostras de água/esgoto e controle positivo (suspensão fecal) foram submetidas a esta etapa.

Um volume de 20 µL de proteinase K foi pipetado em tubos de 1,5 µL sendo adicionados 200 µL das amostras de água/esgoto previamente concentrada (ou da suspensão fecal no caso do controle positivo) e 200µL de tampão AL. Efetuou-se uma incubação a 70°C por 10 minutos e posteriormente foram acrescentados 200 µL de etanol, sendo o tubo agitado em vórtex e rapidamente centrifugado para retirar as gotículas da tampa. Este produto foi transferido com o auxílio de uma pipeta para uma coluna (inclusa no “kit”) e centrifugado por um minuto. O material filtrado foi descartado e a coluna transferida para um novo tubo coletor (incluso no “kit”). Foram adicionados 500 µL do tampão AW1 na coluna e centrifugado por um minuto, sendo o filtrado novamente descartado e a coluna transferida para outro tubo coletor. Após a adição de 500 µL do tampão AW2 e centrifugação por três minutos, a coluna (sem resíduos de tampão sob a membrana filtrante) foi transferida para um tubo de 1,5 µL, onde foram acrescentados 100 µL do tampão AE. O material foi incubado por um minuto a temperatura ambiente para a hidratação do DNA e em seguida centrifugado pelo mesmo tempo. A coluna foi descartada e o filtrado (DNA) armazenado a -20°C.

5.5.2.2- Reação em Cadeia mediada pela Polimerase (PCR)

Para a detecção de HAdV (A-F) foi utilizado o par de iniciadores (Hex1deg/Hex2deg) descrito por Allard et al. (2001) (Tabela-6). O volume final de cada reação de PCR foi de 25µL, sendo que os reagentes e suas respectivas concentrações estão apresentadas na tabela 7. Foram utilizados 5 µL do DNA extraído, sendo que as amostras dos pontos MO-08 e MO-13 também foram testadas em uma diluição de 10⁻¹, visando a diminuição de possíveis inibidores. O DNA foi incubado a 94C° por cinco minutos e

resfriado em banho de gelo durante dois minutos para uma desnaturação prévia. Em seguida foram adicionados 20 µL da mistura de reação de PCR.

Para determinação do gene *hexon*, a amplificação foi realizada em termociclador automático da marca Biocycler® em um ciclo de 94°C por 15 minutos, seguido de 40 ciclos de 91°C por 40 segundos, 40°C por 30 segundos e 72°C por 40 segundos, finalizando com um ciclo de extensão de 72°C por sete minutos.

Tabela 6- Iniciadores utilizados para a detecção do gene *hexon* de adenovírus humanos por PCR e Nested-PCR em amostras de água/esgoto oriundas de diferentes ecossistemas aquáticos da cidade de Belém-PA, nov/2008 a out/2010.

INICIADOR	SEQUÊNCIA	GENE ALVO	AMPLICON
Hex1deg	5'-GCC SCA RTG GKC WTA CAT GCA CAT C-3'	<i>Hexon</i>	301 pb*
Hex2deg	5'-CAG CAC SCC ICG RAT GTC AAA-3'		
Nehex3deg	5'-GCC CGY GCM ACI GAI ACS TAC TTC-3'		171 pb*
Nehex4deg	5'-CCY ACR GCC AGI GTR WAI CGM RCY TTG TA-3'		

*Pares de base

Fonte: ALLARD et al., 2001.

Tabela 7- Reagentes e suas respectivas concentrações utilizadas para a amplificação por PCR do gene *hexon* de adenovírus em amostras de água/esgoto oriundas de diferentes ecossistemas aquáticos da cidade de Belém-PA, nov/2008 a out/2010.

REAGENTES	CONCENTRAÇÃO	VOLUME/REAÇÃO (Total: 20 µL)
Água ultrapura (GIBCON, Invitrogen® Corporation)	-	12,6 µL
DNTP (dATP + dTTP + dGTP + dCTP) (Invitrogen®)	200µM	2,0 µL
Tampão10X (Biotools®)	-	2,5 µL
MgCl ₂ (Biotools®)	50mM	0,75 µL
Hex1deg (Invitrogen®)	20pMol/µL	1,0 µL
Hex2deg (Invitrogen®)	20pMol/µL	1,0 µL
Taq DNA polimerase (Biotools®)	5U/µL	0,15 µL

Para a visualização dos *amplicons*, 10 µL dos produtos da PCR foram corados com Blue/Orange Loading Dye 6X (Promega®) e aplicados, juntamente com um marcador de peso molecular - DNA Ladder (Invitrogen®) de 123 pb, em gel de agarose a 1,5%- UltraPure™ Agarose (Invitrogen®) e corados com SYBR Safe® DNA gel stain (Invitrogen®). Foi realizada eletroforese horizontal durante 35 minutos (120 volts) em tampão TBE 1X e os fragmentos amplificados foram visualizados utilizando-se o aparelho de foto-documentação Gel Doc 1000 (Vilber Lourmat, France) em sistema de captura de imagem “Biocapt”. Amostras que apresentaram bandas com 301 pb foram consideradas positivas.

5.5.2.3- Nested-PCR

A nested-PCR foi utilizada na tentativa de otimizar o produto gerado pela PCR para a realização do sequenciamento genômico, haja vista a dificuldade que foi encontrada na obtenção de sequências com qualidade para análise. A metodologia foi aplicada somente nas amostras que se apresentaram positivas após a realização da PCR nas condições citadas no item anterior, servindo também para a confirmação dos resultados de detecção nessas amostras.

Foram utilizados os pares de iniciadores (Hex1deg/Hex2deg e Nehex3deg/Nehex4deg) descritos por Allard et al. (2001) (Tabela-6). O volume final de cada reação de PCR foi de 25µL, sendo que os reagentes e suas respectivas concentrações estão apresentadas na tabela 8. Para a primeira reação de amplificação foram utilizados 5 µL do DNA extraído (diluído a 10^{-1}) e para a segunda, 2,5 µL do produto da primeira somados a 2,5 µL de água ultrapura (GIBCON, Invitrogen® Corporation).

Ambas as reações de amplificação foram realizadas em termociclador automático da marca Biocycler® em um ciclo de 94°C por 5 minutos, seguido de 35 ciclos de 94°C por 30 segundos, 55°C por 30 segundos e 72°C por 1 minuto, finalizando com um ciclo de extensão de 72°C por cinco minutos (ALLARD et al., 2001).

Tabela 8- Reagentes e suas respectivas concentrações utilizadas para a amplificação por Nested-PCR do gene *hexon* de adenovírus em amostras de água/esgoto oriundas de diferentes ecossistemas aquáticos da cidade de Belém-PA, nov/2008 a out/2010.

REAGENTES	CONCENTRAÇÃO	VOLUME/REAÇÃO (Total: 20 µL)
Água ultrapura (GIBCON, Invitrogen® Corporation)	-	12,2 µL
DNTP (dATP + dTTP + dGTP + dCTP) (Invitrogen®)	200µM	2,0 µL
Tampão10X (Biotools®)	-	2,5 µL
MgCl ₂ (Biotools®)	50mM	1,0 µL
Hex1deg/Nehex3deg (Invitrogen®)	20pMol/µL	1,0 µL
Hex2deg/Nehex4deg (Invitrogen®)	20pMol/µL	1,0 µL
Taq DNA polimerase (Biotools®)	5U/µL	0,3 µL

Para visualização dos *amplicons* foi realizado o mesmo procedimento descrito no item anterior, sendo que neste caso as amostras que apresentaram bandas com 171 pb foram consideradas positivas.

5.5.2.4- PCR em tempo real

Para a detecção dos HAdV (A-F) foram utilizados os iniciadores e as sondas descritas por Hernroth et al. (2002) com algumas modificações (MUSCILLO et al., 2008) (Tabela-9).

O volume final de cada reação foi de 15µL, sendo que os reagentes e suas respectivas concentrações estão apresentados na tabela 10. Foram usados 6 µL do DNA extraído. As mostras de DNA dos pontos MO-08 e MO-13 também foram submetidas à diluição (10^{-1}).

A amplificação e a detecção do gene *hexon* foram realizadas em equipamento 7500 Real-Time PCR (Applied Biosystems®) empregando-se o 7500 Software v 2.0.5 com um ciclo de 50°C por dois minutos e outro de 95°C por 10 minutos seguidos de 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por um minuto. Foram consideradas como amostras positivas aquelas

com Ct (*Cycle Threshold*) até o valor máximo de 39.

Tabela 9- Iniciadores e sondas utilizadas para a detecção do gene *hexon* de adenovírus humanos por PCR em tempo real em amostras de água/esgoto oriundas de diferentes ecossistemas aquáticos da cidade de Belém-PA, nov/2008 a out/2010.

INICIADOR/SONDA	GENE ALVO	AMPLICON
5'-CWT ACA TGC ACA TCK CSG G-3'	Hexon	69 pb*
5'- CRC GGG CRA AYT GCA CCA G-3'		
5'-FAM- CCG GGC TCA GGT ACT CCG AGG CGT CCT-TAMRA-3'		

*Pares de base.

Fonte: HERNROTH et al., 2002; MUSCILLO et al., 2008.

Tabela 10- Reagentes e suas respectivas concentrações utilizadas para a amplificação e detecção por PCR em tempo real do gene *hexon* de adenovírus em amostras de água/esgoto oriundas de diferentes ecossistemas aquáticos da cidade de Belém-PA, nov/2008 a out/2010.

REAGENTE	CONCENTRAÇÃO/REAÇÃO	VOLUME (TOTAL: 9µL)
Água ultrapura (GIBCON, Invitrogen® Corporation)	-	0,6 µL
TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems®)	2x	7,5 µL
Primer F (Applied Biosystems®)	900 nM	0,3 µL
Primer R (Applied Biosystems®)	900 nM	0,3 µL
Sonda (Applied Biosystems®)	225 nM	0,3 µL

5.5.3- Purificação do produto da PCR

Os *amplicons* obtidos pela PCR e pela Nested-PCR foram purificados utilizando os kit's comerciais "QIAquick® Gel Extraction" (QIAGEN™, Valencia, CA, USA) ou "QIAquick® PCR purification" (QIAGEN™, Valencia, CA, USA) dependendo da presença ou não de *amplicons* inespecíficos durante as reações, seguindo as recomendações do fabricante.

5.5.4- Quantificação do DNA

Após a purificação, os produtos foram aplicados em gel de agarose a 2% corados com SYBR Safe® DNA gel stain (Invitrogen®). Foram utilizados tampão TBE 1X e peso molecular “Low DNA Mass Ladder” (Invitrogen®). Após a eletroforese, as bandas de interesse foram comparadas com o peso molecular. De acordo com a intensidade da banda, a concentração do DNA foi expressa em nanogramas (ng) para servir de parâmetro no preparo da reação de sequenciamento.

5.5.5- Reação de sequenciamento nucleotídico

Foi utilizado para identificar as espécies e respectivos sorotipos de HAdV detectados nas amostras pesquisadas. Porém, só pode ser realizado nas amostras positivas que apresentaram a quantidade/qualidade de DNA requerida pelo teste.

Para o sequenciamento direto dos produtos amplificados e purificados foi utilizado o kit comercial “Big Dye Terminator® v1.3 Cycle Sequencing Kit” (Applied Biosystems, CA, USA) de acordo com as instruções do fabricante. Os iniciadores empregados foram os mesmos da reação de amplificação genômica (PCR/Nested-PCR). As reações foram realizadas em termociclador Eppendorf® em 25 ciclos de 96C° - 30 segundos, 50C° - 15 segundos e 60C° - 4 minutos. A tabela 11 demonstra os reagentes e volumes aplicados na reação.

Tabela 11- Reagentes e volumes utilizados na reação de sequenciamento nucleotídico das cepas de adenovírus humanos detectadas em amostras de água/esgoto oriundas de diferentes ecossistemas aquáticos da cidade de Belém-PA, nov/2008 a out/2010.

REAGENTES	VOLUME
Iniciador (Hex1deg, Hex2deg, Nehex3deg ou Nehex4deg)	2 µL
Tampão (5X)	1 µL
Big Dye Terminator	2 µL
DNA	≤ 5 µL (Depende da concentração em ng)
H ₂ O	q.s.p. 10 µL

5.5.6- Purificação dos produtos da reação de sequenciamento

Inicialmente foram adicionados 40 µL de isopropanol a 65% e após agitação e incubação por 15 minutos a temperatura ambiente a placa (com 96 orifícios) foi centrifugada a 14.000 rpm durante 45 minutos. Após descartar o sobrenadante, solução de etanol na concentração de 70% (200 µL) foi adicionada e, após agitação, centrifugada por 20 minutos a 14.000 rpm. O sobrenadante foi descartado e a placa submetida à secagem em termociclador (Eppendorf®) a 60C° durante 5 minutos. Os produtos foram armazenados a -20C° (protegidos de qualquer luminosidade) para posterior eletroforese.

5.5.7- Eletroforese em sequenciador automático

Os produtos purificados foram ressuspensos em 10 µL de formamida e submetidos à desnaturação em termociclador por cinco minutos a 96C° e banho de gelo por três minutos. Em seguida a placa foi colocada em sequenciador automático ABI PRISM 3130 xl (Applied Biosystems®) para a realização da eletroforese.

5.5.8- Análise filogenética das sequências

O programa “BioEdit Sequence Alignment Editor” (v. 6.05) foi utilizado no alinhamento e na edição das sequências obtidas, as quais foram comparadas com outras já existentes no banco de dados (GenBank), incluindo as sequências protótipos.

A análise filogenética das sequências foi realizada pelo uso o programa MEGA 5.0 v. 5.0.1.102 (TAMURA et al., 2011) e a distância genética calculada pelo modelo Kimura 2-parâmetros, a partir do método “neighbor-joining” com “bootstrap” de 2500 réplicas.

5.5.9- Análise Estatística

Para armazenamento de dados, elaboração de planilhas e gráficos foram utilizados os aplicativos do Office 2007/Excel e do Harvard Graphics 98. A sensibilidade e a especificidade dos testes moleculares empregados para a detecção foram verificadas pelo *Screening Test*.

O teste Exato de Fisher foi empregado para comparar os padrões de contaminação por HAdV entre as cinco amostras de água superficial com os achados em esgoto pela técnica de PCR em tempo real, adotando-se o valor de *p bilateral*. A discordância entre os resultados obtidos pela PCR convencional e PCR em tempo real foi avaliada pelo teste não paramétrico de McNemar, adotando-se o nível de decisão: $\alpha=0.01$ para ambos os testes a partir da execução do programa BioEstat 5.0 (AYRES et al., 2007).

6-RESULTADOS

Os adenovírus foram detectados pela PCR e PCR em tempo real em 59% (85/144) das amostras de água superficial e esgoto analisadas no período de nov/2008 a out/2010, sendo que no primeiro ano de estudo a prevalência observada foi de 72,2% (52/72) e no segundo de 45,8% (33/72) (Figura-14). Uma amostra coletada em mar/2009 no Igarapé Tucunduba foi testada somente pela PCR convencional devido a falta de material biológico para a realização da PCR em tempo real.

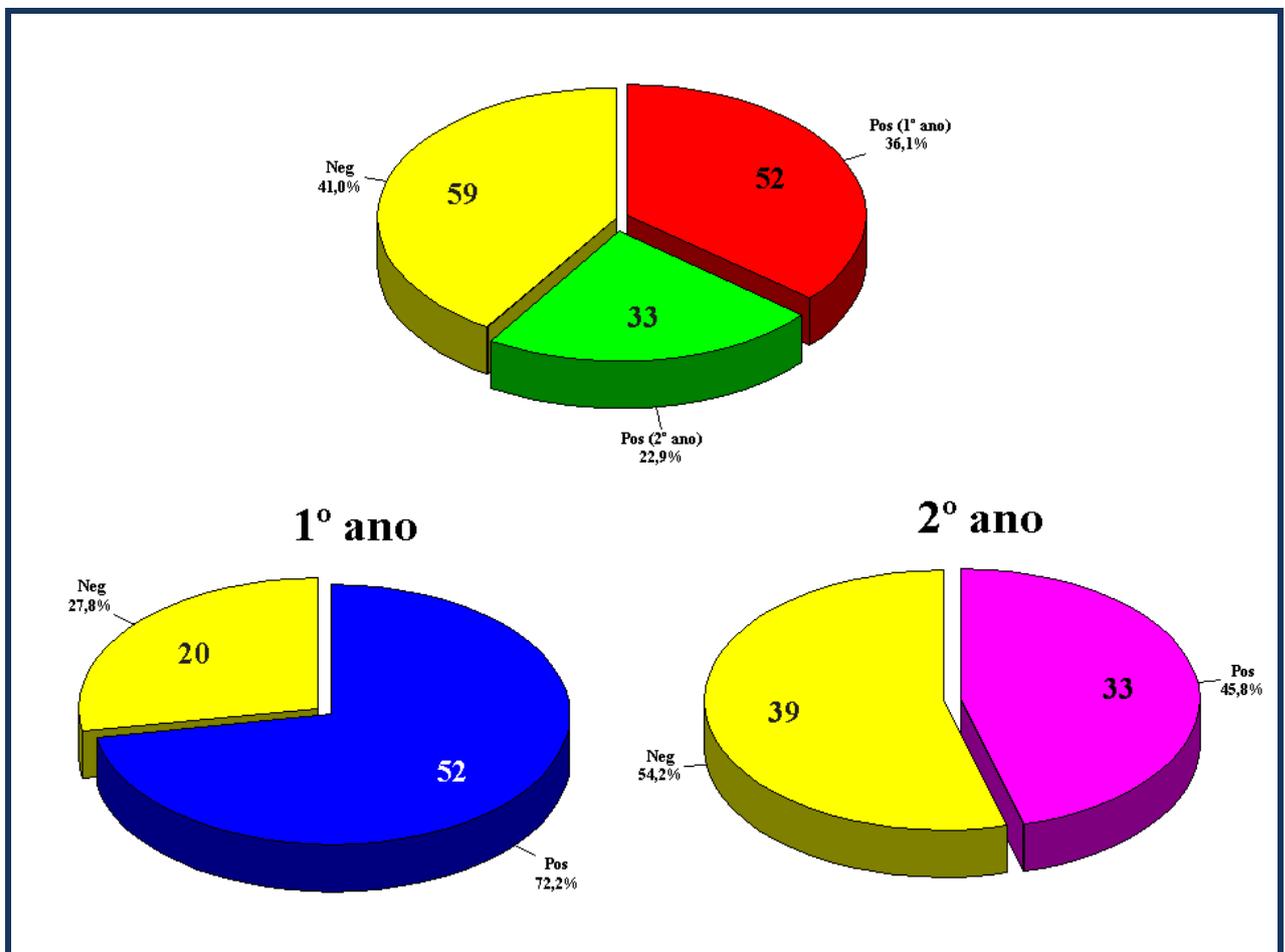


Figura 14- Detecção de adenovírus em amostras de água e esgoto não tratado de seis pontos da cidade de Belém-PA, nov/2008 a out/2010.

Quando da realização da PCR convencional, 23 amostras coletadas no primeiro ano apresentaram resultados inconclusivos devido à presença de uma série de bandas inespecíficas

e a não reprodutibilidade em testes subsequentes, sendo consideradas desta forma, como negativas. Assim, o teste (Figura-15) detectou os HAdV em 13,9% (10/72) e 31,9% (23/72) das amostras do primeiro e segundo ano, respectivamente. Já a PCR em tempo real (Figura-16) observou a presença do genoma do adenovírus em 71,8% (51/71) das amostras oriundas do primeiro ano e 49, 8% (33/72) do segundo ano da pesquisa. Deste modo, a taxa de detecção nesses dois anos pela técnica de PCR foi de 22,9% (33/144) e pelo PCR em tempo real de 58,7% (84/143) (Figura-17).

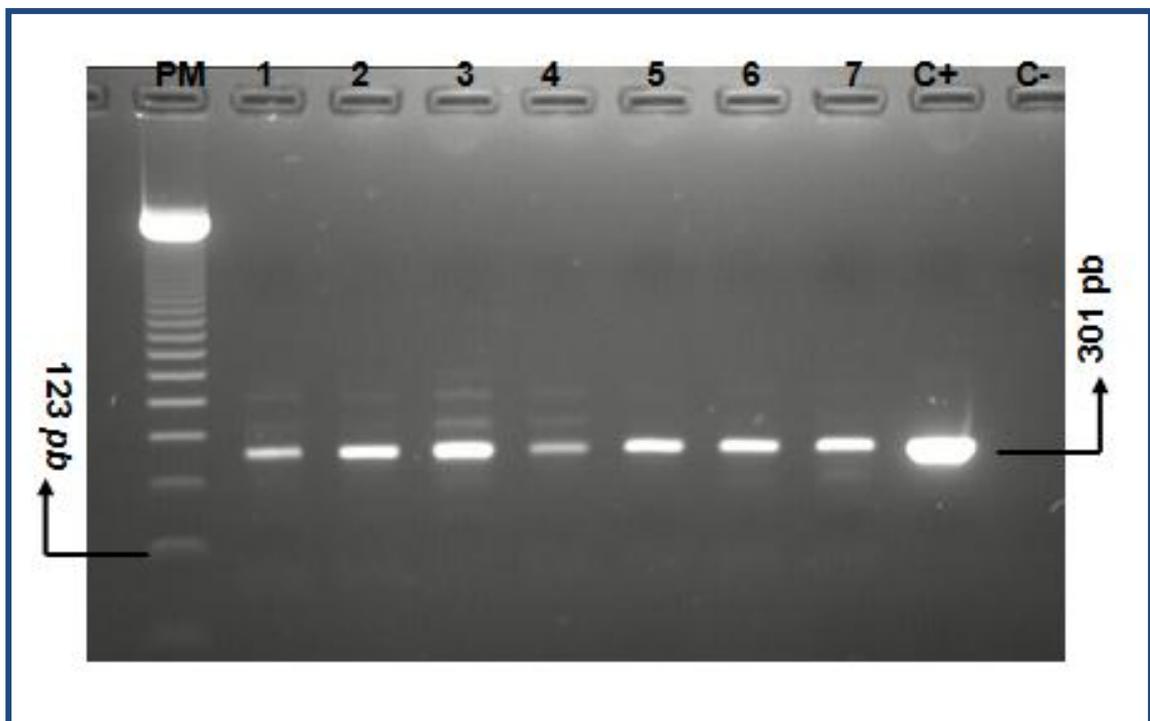


Figura 15- Visualização em gel de agarose (1,5%) de um gene do *hexon* (301 pb) de adenovírus amplificado pela Reação em Cadeia mediada pela Polimerase (PCR) em amostras de água e esgoto não tratado da cidade de Belém-PA, nov/2008 a out/2010. PM: Peso Molecular (123 pb), 1-7: Amostras de água/esgoto, C+: Controle positivo e C-: Controle negativo.

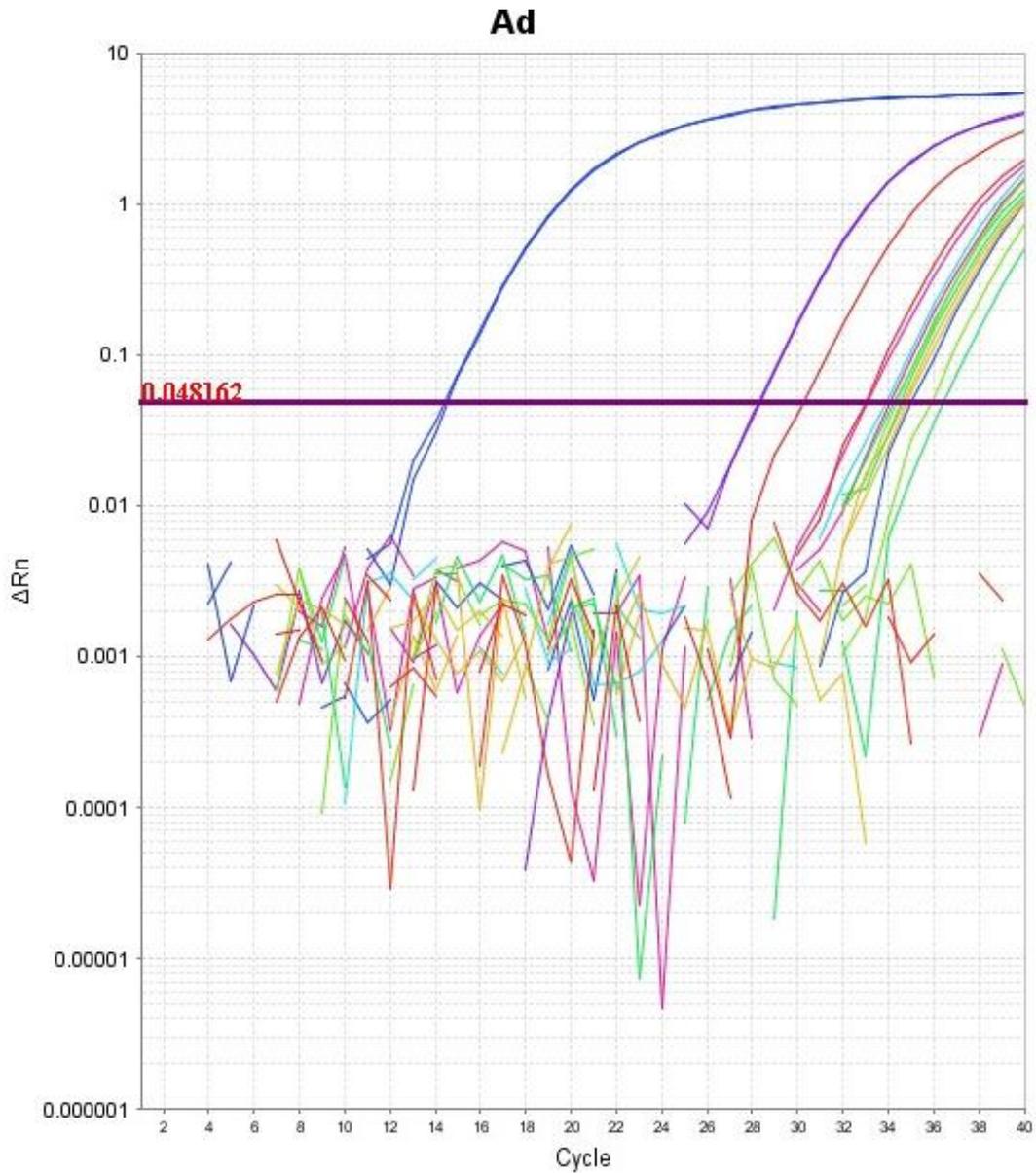


Figura 16- Amplificação e detecção de um gene do *hexon* de adenovírus pela PCR em Tempo Real em amostras de água e esgoto não tratado da cidade de Belém-PA, nov/2008 a out/2010. As amostras (duplicatas) estão representadas pelas cores distintas.

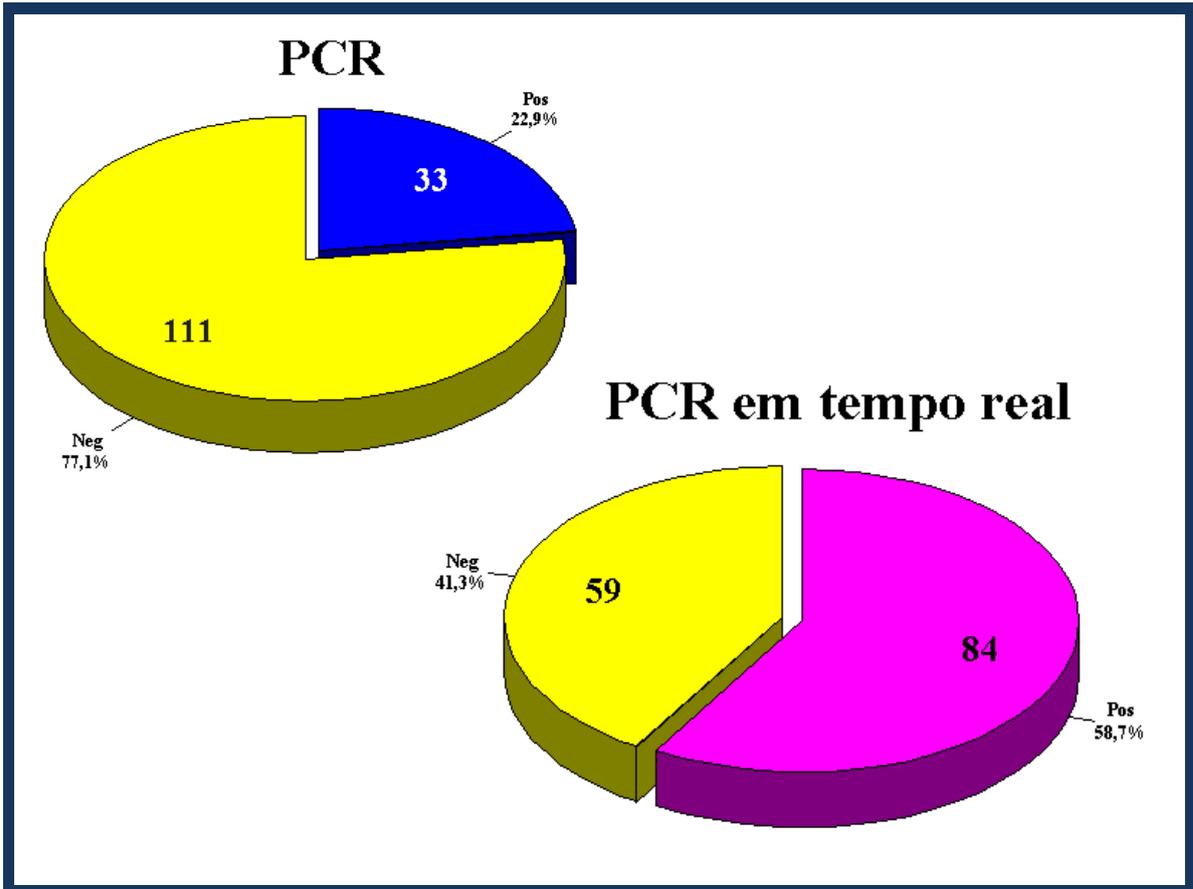


Figura 17- Percentuais de detecção de um gene do *hexon* de adenovírus pela PCR e PCR em tempo real em amostras de água e esgoto não tratado da cidade de Belém-PA, nov/2008 a out/2010.

A tabela 12 e a figura 18 demonstram a distribuição dos resultados obtidos de acordo com os seis pontos de coleta. É possível observar que os pontos de maior detecção do agente foram o Esgoto do UNA e o Igarapé Tucunduba com uma variação de 62,5% a 100%, por ambas as técnicas empregadas. O Teste Exato de Fisher demonstrou que os achados entre as amostras de esgoto e água de Igarapé não diferiram significativamente ($p_{bilateral}=0.2340$), demonstrando assim, os mesmos padrões de contaminação pelo agente.

Foi possível observar a circulação de adenovírus nas amostras ambientais durante todos os meses estudados dessa pesquisa. A tabela 13 demonstra a presença do agente em pelo menos dois dos ambientes analisados durante os 24 meses de pesquisa, sendo que no esgoto do UNA a detecção ocorreu em todo o período, ininterruptamente.

Tabela 12- Detecção molecular de adenovírus nos seis pontos pesquisados da cidade de Belém-PA e comparação dos resultados com os achados em amostras de esgoto por PCR em tempo real, nov/2008 a out/2010.

LOCAL	Adenovírus		EXATO DE FISHER
	PCR	PCR em tempo real	Nível de decisão: alfa bilateral=0.01 Comparação com detecção em esgoto PCR em tempo real
Esgoto do UNA	75% (18/24)	100% (24/24)	-----
Igarapé Tucuduba	62,5% (15/24)*	91,3% (21/23)**	$p=0.2340^{***}$
Ver-o-Peso	0% (0/24)	50% (12/24)	$p=0.0001$
Porto do Açaí	0% (0/24)	41,7% (10/24)	$p=0.0000$
Lago Bolonha	0% (0/24)	45,8% (11/24)	$p=0.0000$
Lago Água Preta	0% (0/24)	25% (6/24)	$p=0.0000$
TOTAL	22,9% (33/144)	58,74% (84/143)	

*Uma amostra do Igarapé Tucunduba apresentou resultado positivo por PCR e negativo no PCR em tempo real.

**Uma amostra do Igarapé Tucunduba não foi testada pela PCR em tempo real por falta de material biológico.

***Valor de p bilateral > 0.01 .

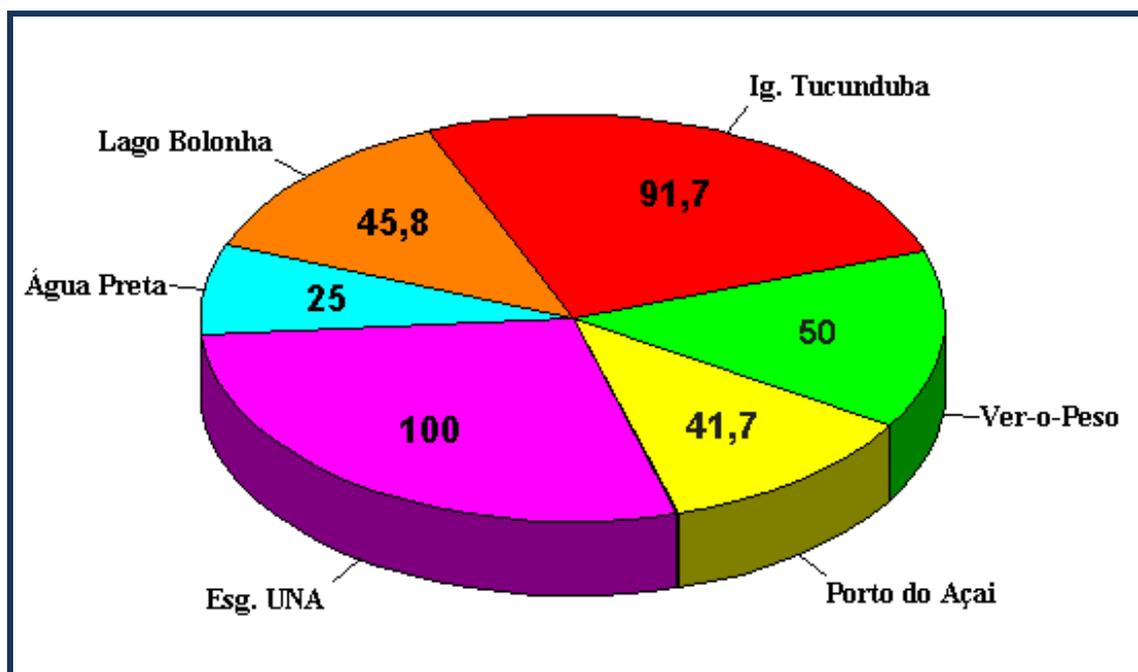


Figura 18- Distribuição dos percentuais de positividade obtidos pelos testes moleculares para detecção de adenovírus em seis pontos estudados da cidade de Belém-PA, nov/2008 a out/2010.

Tabela 13- Distribuição mensal dos resultados obtidos pela PCR e PCR em tempo real de acordo com os seis pontos pesquisados da cidade de Belém-PA, nov/2008 a out/2010.

Local	MO-08		MO-12		MO-13		MO-14		PTO-01		PTO-02	
Período	●	■	●	■	●	■	●	■	●	■	●	■
Nov-08	+	-	-	-	+	+	-	-	RI	+	-	-
Dez-08	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-
Jan-09	+	+	-	+	+	+	-	+	-	+	-	+
Fev-09	RI	+	RI	-	RI	+	RI	-	RI	+	RI	-
Mar-09	RI	NT	RI	+	RI	+	RI	+	RI	+	RI	+
Abr-09	RI	+	RI	+	RI	+	RI	-	RI	+	RI	+
Mai-09	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-	+
Jun-09	-	+	-	+	RI	+	-	+	-	+	-	+
Jul-09	RI	+	-	+	RI	+	-	+	-	-	-	-
Ago-09	RI	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-
Set-09	RI	+	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-
Out-09	+	+	-	+	+	+	-	+	-	+	-	+
Nov-09	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-
Dez-09	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-
Jan-10	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-
Fev-10	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-
Mar-10	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-
Abr-10	-	+	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-
Mai-10	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-
Jun-10	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-
Jul-10	+	+	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-
Ago-10	+	+	-	+	+	+	-	+	-	+	-	-
Set-10	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-
Out-10	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-

MO-08: Igarapé Tucunduba, MO-12: Ver-o-Peso, MO-13: Esgoto do UNA, MO-14:

Porto do Açaí, PTO-01: Lago Bolonha, PTO-02: Lago Água Preta, NT: Não testada, RI: Resultado

inconclusivo, ●: PCR e ■: PCR em tempo real. As regiões em azul claro e escuro representam o 1º e 2º ano de estudo, respectivamente.

A comparação dos resultados obtidos nas 143 amostras testadas por ambas as metodologias demonstrou que 22,4% (32/143) foram positivas quanto à presença de HAdV em ambos os testes, porém, 36,4% (52/143) tiveram o agente detectado apenas pela PCR em tempo real. Uma única amostra foi positiva somente pela PCR convencional (Tabela-14).

Tabela 14- Comparação entre os resultados obtidos pela detecção de adenovírus por PCR e PCR em tempo real em amostras de água e esgoto não tratado da cidade de Belém-PA, nov/2008 a out/2010.

PCR	PCR em tempo real		Total
	<i>Pos</i>	<i>Neg</i>	
<i>Pos</i>	32	1	33
<i>Neg</i>	52	58	110
Total	84	59	143

McNemar: Qui-quadrado= 47.17; $p < 0.0001$.

As discordâncias obtidas nos resultados das duas metodologias empregadas mostraram-se altamente significativas pelo teste de McNemar, sugerindo a PCR em tempo real como metodologia mais adequada para detecção deste agente em amostras ambientais (Tabela-14).

Considerando-se a metodologia de PCR em tempo real como padrão-ouro para esse tipo de estudo, a PCR convencional apresentou sensibilidade de 38,1% e especificidade de 98,3% pelo “Screening Test”.

Todas as 33 amostras positivas pela PCR tiveram seu produto aumentado para a utilização no sequenciamento genômico, porém, apenas seis apresentaram uma sequência nucleotídica com qualidade para análise. Visando a identificação gênica de um maior número de amostras foi padronizada e empregada a técnica de nested-PCR, onde 17 amostras desse total foram submetidas e confirmadas após a segunda amplificação, apresentando uma banda de 171 pb correspondendo a uma região interna do gene amplificado na primeira metodologia

(Figura-19). A partir dessa segunda metodologia e após a reação de sequenciamento mais duas amostras apresentaram sequências analisáveis.

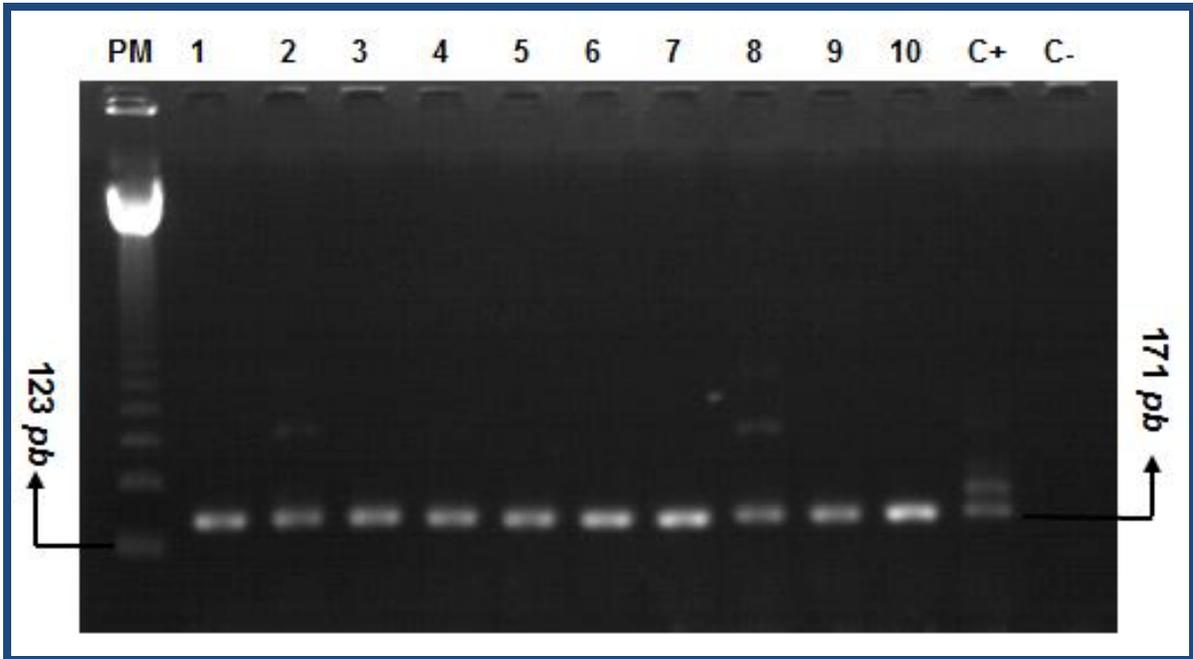


Figura 19- Visualização em gel de agarose (1,5%) de um fragmento do gene do *hexon* (171 pb) de adenovírus amplificado pela Nested-PCR em amostras de água e esgoto não tratado da cidade de Belém-PA, nov/2008 a out/2010. PM: Peso Molecular (123 pb), 1-10: Amostras de água/esgoto, C+: Controle positivo e C-: Controle negativo.

A análise nucleotídica das sequências obtidas por ambas as metodologias demonstrou que as oito amostras pertenciam a espécie dos AdEs (Espécie F), sendo quatro referentes ao sorotipo 40 e quatro ao 41 (Figura- 20).

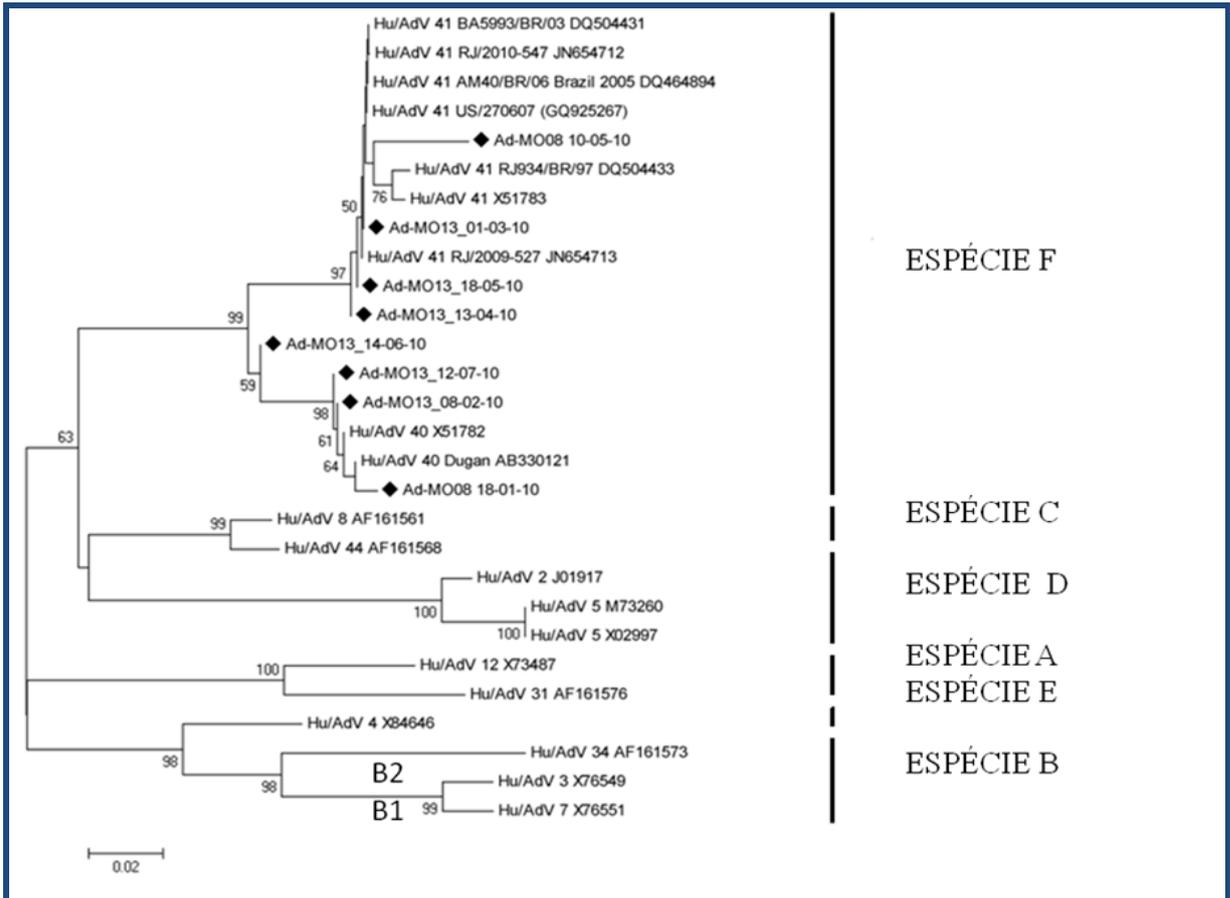


Figura 20- Análise filogenética baseada na sequência nucleotídica do gene do hexon envolvendo oito amostras de água de igarapé e esgoto não tratado da cidade de Belém-PA positivas para adenovírus. Os valores de *bootstrap* (2.500 pseudoréplicas) estão indicados nos nós da árvore.

7- DISCUSSÃO

A pesquisa de vírus em ambientes aquáticos vem tomando força a partir do reconhecimento da água como veículo transmissor de patógenos virais e da ausência de correlação entre a presença de bactérias indicadoras da qualidade microbiológica e a desses agentes (BOSCH, 1998; GIBSON et al., 2011; TAVARES et al., 2005; WYN-JONES & SELLWOOD, 2001).

Uma característica comum dos vírus entéricos é a inexistência de envelope viral e a sua alta resistência em relação ao calor, desinfetantes e mudanças de pH, o que lhes conferem grande vantagem para sua viabilidade e persistência no ambiente. A estabilidade viral nesses meios, as altas concentrações liberadas nas fezes e a baixa dose infectante são os três fatores principais que estão relacionados com a alta probabilidade de infecções por alimentos, água e superfícies contaminadas (BOSCH, 1998; STEYER et al., 2011).

A importância da água como um veículo para a transmissão de vírus entéricos foi reconhecida em 1960 e desde então muitas melhorias nos métodos de detecção destes agentes foram implementadas (STEYER et al., 2011). Os métodos de detecção molecular representam um passo significativo em termos de diagnóstico, quando comparados aos métodos convencionais inicialmente usados no estudo da virologia aquática (TAVARES et al., 2005).

O presente estudo está inserido em um projeto que visou detectar por diversos métodos moleculares (PCR, nested-PCR, semi-nested PCR e PCR em tempo real) vírus causadores de gastroenterite, como RVs, NoVs e HAdV e também o VHA em diversos ecossistemas aquáticos da cidade de Belém-PA. Trata-se de uma pesquisa pioneira, a qual exigiu uma fase de aprimoramento e estabelecimento de técnicas, tanto de concentração quanto de detecção molecular, visando alcançar níveis satisfatórios de acordo com a natureza do vírus e do tipo de amostra analisada. Vários ajustes metodológicos são necessários no

sentido de se obter uma boa recuperação viral e tais alterações podem levar a uma grande variabilidade de resultados. Isso pode ser verificado em uma metanálise realizada por Silva et al. (2010), que demonstrou que o método de escolha para detecção de vírus em meio ambiente é o molecular. Além disso, que o método de concentração deve estar estritamente relacionado ao tipo de vírus, soluções de eluição, tipo de amostra e volume utilizado. A partir da análise de diversos estudos utilizando PCR, nested-PCR e PCR quantitativa, associados a diferentes métodos de concentração, realizados em amostras de água superficial e esgoto não tratado foi possível observar uma variação de detecção de AdVs de 0-100%.

Os HAdV estiveram presentes em 59% das amostras analisadas durante os dois anos de estudo propostos neste trabalho. Uma alta prevalência já era esperada, haja vista a maior estabilidade destes agentes no ambiente em detrimento aos outros vírus entéricos. Rigotto et al. (2010) desenvolveram em Florianópolis uma pesquisa de vírus entéricos no qual detectaram o HAdV em 64,2% das amostras de água: superficial, de recreação, potável não tratada e potável submetida a cloração. Um achado importante foi que entre as 12 amostras de água potável clorada testadas para HAdV, oito foram positivas (66,6%). Em um estudo realizado na Europa o HAdV foi detectado em 36,4% (513/1410) das amostras de água superficial destinadas a recreação (WYN-JONES et al., 2011).

Nesta pesquisa a PCR detectou 22,9% (33/144) de positividade entre as amostras testadas, enquanto que a PCR em tempo real, 58,7% (84/143). Ao analisarmos os resultados obtidos das amostras que apresentaram resultados para ambas as metodologias (143/144) podemos observar que a primeira demonstrou uma sensibilidade relativamente baixa em relação à segunda. O valor de $p < 0.0001$ obtido pelo teste estatístico empregado apontou a PCR em tempo real como metodologia de escolha para esse estudo, tendo detectado o agente em 36,4% (52/143) das amostras que se apresentaram negativas pela PCR convencional. Houve um único caso onde a PCR detectou o agente em uma amostra que se apresentou

negativa na PCR em tempo real. Tratou-se de uma amostra do Igarapé Tucunduba, sendo que tal fato pode ser explicado pela possível presença de inibidores, detectáveis pela alta sensibilidade do teste, presentes nessas águas, haja vista se tratar de um ambiente bastante eutrofizado que recebe efluentes domésticos e até hospitalar de diversos bairros de Belém. É provável que se pudesse obter a positividade após um maior número de diluições dessa amostra. De uma maneira geral, uma alta positividade nesse ambiente já era esperada, diante de suas características biológicas. Padrão similar foi descrito no estudo de Silva et al. (2010).

A PCR só detectou os HAdV nas amostras do Igarapé Tucunduba (62,5% - 15/24) e do Esgoto do UNA (75% - 18/24), os quais correspondem aos pontos que, por sua natureza, apresentam uma maior concentração de agentes biológicos. Nas amostras de água da Baía do Guajará (Ver-o-Peso), do Rio Guamá (Porto do açaí) e dos Lagos Bolonha e Água Preta, essa metodologia não detectou o agente. Esse fato deve estar relacionado à baixa concentração devido a uma maior diluição das partículas virais nesses tipos de ambientes, o que limita sua detecção pela PCR convencional.

Similarmente ao percentual de positividade obtido nessa pesquisa nas amostras de esgoto (75%), Barrella et al. (2009) detectaram pela PCR o genoma do HAdV em 84% das amostras analisadas em Limeira (SP), sendo essa taxa aumentada para 100% pela Nested-PCR. Resultados de 100% também foram descritos utilizando-se a nested-PCR em Roma (MUSCILLO et al., 2008). Essa metodologia também foi citada por outros autores como de maior sensibilidade para detecção de AdVs em amostras ambientais (PUIG et al., 1994; SILVA et al., 2010).

Já a PCR em tempo real amplificou o genoma viral em amostras provenientes de todos os pontos de coleta, inclusive dos mananciais que abastecem a cidade, utilizadas nesse estudo. O teste detectou os HAdV em 50,4% (60/119) das amostras de água superficial (dois rios, dois lagos e um igarapé) e em 100% (24/24) das amostras de esgoto. Tais resultados

demonstram que fatores como a menor concentração viral, a exposição à luz ultravioleta e outros intempéries ambientais não impediram a detecção desse patógeno por tal metodologia. La Rosa et al. (2010), utilizando os mesmos iniciadores e sondas desse estudo, detectaram o agente em 96% e 76% de amostras de água superficial e residual na Itália, respectivamente. Enquanto que Albinana-Gimenez et al. (2006) também obtiveram positividade de 100% nas amostras de esgoto analisadas em Barcelona.

A frequência verificada no esgoto da cidade de Belém (100%) revela a alta circulação desses agentes na população. Fator que pode estar associado a quadros de gastroenterite viral na região, sobretudo entre crianças menores de cinco anos. Isso pode ser observado em um estudo realizado com crianças diarreicas na cidade de Belém nos anos de 2003 e 2009 que demonstrou uma positividade para HAdV de 7,2% (84/1160) (MÜLLER, 2011).

Outro resultado importante a ser observado nesse estudo está relacionado ao fato de o Igarapé Tucunduba, apesar de se tratar de um ponto de água superficial, ter apresentado os mesmos padrões de contaminação viral que as amostras do Esgoto do UNA. Vale ressaltar que as águas desse ambiente são utilizadas para diversos fins pelos moradores das adjacências, inclusive para recreação de crianças.

Os lagos analisados nessa pesquisa estão relacionados ao abastecimento de água da cidade de Belém-Pa, porém os percentuais detectados no lago Bolonha (45,8%) e Água Preta (25%) foram maiores que os observados por Xagorarakis et al. (2007) em amostras de lagos de recreação (24,1%) em Michigan (EUA).

Diversos estudos têm demonstrado a alta sensibilidade da PCR em tempo real, assim como a alta estabilidade dos AdVs em amostras ambientais. Pesquisas realizadas na África do Sul (água tratada para consumo) e no oeste da África (água potável) detectaram esses agentes em 4,4% e 12,9% das amostras, respectivamente (VAN HEERDEN et al., 2005; VERHEYEN et al., 2009).

Embora a PCR em tempo real apresente uma maior sensibilidade, a técnica não permite que seu produto amplificado seja submetido ao sequenciamento genômico, devido ao pequeno tamanho do fragmento obtido, no caso desse estudo 69 pb. Tal limitação inviabiliza a identificação genética das partículas detectadas. Desta forma a utilização da PCR e da nested-PCR (em casos onde o fragmento apresenta um tamanho mínimo indicado para o sequenciamento) é necessária quando se objetiva analisar a sequencia nucleotídica do produto amplificado. No caso de simples genotipagem é possível utilizar a PCR em tempo real com a utilização de primers e sondas específicas para as diferentes espécies e sorotipos (XAGORARAKI et al., 2007).

Outro fator importante a ser discutido está relacionado com a viabilidade das partículas detectadas em amostras ambientais, principalmente quando se trata de água destinada para o consumo. Apesar da alta estabilidade dos AdVs, eles apresentam um período de sobrevivência e uma faixa de tolerância as variações físico-químicas do ambiente. As técnicas de detecção utilizadas nesse estudo não têm a capacidade de identificar se o agente ainda se encontra infectante, sendo desta forma, passível de causar doenças. Para tal, a cultura celular seria indicada. Porém, no caso dos AdVs, sobretudo os AdEs, a técnica se torna bastante onerosa pela dificuldade e/ou impossibilidade de crescimento em células convencionais. Aliado a isso, o fato de se tratar de amostras ambientais torna o processo ainda mais dispendioso, devido à necessidade da padronização de uma metodologia de acordo com a natureza dessas amostras e da realização de ensaios de toxicidade.

No que se diz respeito à identificação genética dos tipos de HAdV detectados nesse estudo, todas as amostras genotipadas (n=8) pertencem a espécie F, sorotipos 40 (n=4) e 41 (n=4), causadoras de gastroenterite. Resultado similar foi encontrado em um estudo realizado em amostras de água superficial de Manaus, onde das cinco amostras analisadas, três foram classificadas como HAdV-41 e duas como HAdV-40 (MIAGOSTOVICH et al., 2008). Uma

pesquisa desenvolvida em Singapura com amostras de esgoto também demonstrou a predominância dessa espécie, sendo as 10 amostras sequenciadas referentes ao sorotipo 41 (AW & GIN, 2010). Os AdEs também foram encontrados em maior proporção (49%) em amostras de águas destinadas a recreação impactadas por esgoto na Europa (WYN-JONES et al., 2011). A baixa quantidade de material genético e a natureza das amostras dificultam consideravelmente a etapa de sequenciamento genômico, tal motivo torna os resultados de identificação genética escassos na literatura. Geralmente é possível observar baixo número de amostras genotipadas entre as detectadas.

Vale ressaltar que os AdEs apresentam grande importância epidemiológica devido ao fato de serem os agentes virais mais relacionados aos casos de intussuscepção intestinal pediátrica (GINELLI et al., 2011).

Nossos resultados revelam uma alta circulação de HAdV nos diferentes ambientes aquáticos estudados de Belém e, conseqüentemente, apontam a necessidade de um monitoramento permanente nesses locais, haja vista o fato de todos estarem associados direta ou indiretamente com o cotidiano da população. Estudos envolvendo a pesquisa de vírus em água potável, lagos, rios e esgotos são muito importantes no contexto da saúde pública, especialmente nos países em desenvolvimento, onde há uma relativa falta de informação sobre a vigilância microbiológica, avaliações de risco e estudos epidemiológicos (RIGOTTO et al., 2010).

8- CONCLUSÃO

- ✓ Os adenovírus foram detectados em 59% (85/144) das amostras de água superficial e esgoto não tratado da cidade de Belém-PA, sendo 72,2% (52/72) e 45,8% (33/72) no primeiro e segundo ano do estudo, respectivamente;
- ✓ A PCR detectou os HAdV em 22,9% (33/144) das amostras, enquanto que a PCR em tempo real em 58,7% (84/143), sendo que somente as amostras provenientes do igarapé Tucunduba e do esgoto do UNA foram positivas pela primeira;
- ✓ A PCR em tempo real detectou o patógeno nas amostras provenientes de todos os pontos de coleta e os maiores percentuais de detecção de ambos os testes moleculares empregados foram observados no igarapé Tucunduba e no esgoto do UNA;
- ✓ Os HAdV foram detectados ininterruptamente nos 24 meses do estudo, estando presentes em pelo menos dois pontos em cada mês;
- ✓ A PCR convencional apresentou baixa sensibilidade na detecção dos HAdV nas amostras ambientais, apontando a PCR em tempo real como metodologia de escolha para esse tipo de estudo;
- ✓ Todas as amostras genotipadas pertenceram à espécie F, sendo referentes aos sorotipos 40 e 41 em igual proporção;
- ✓ Os resultados observados nesse estudo confirmam a alta circulação desse patógeno nas águas superficiais e esgoto da cidade, sugerindo a inclusão dos HAdV como bons indicadores de contaminação viral e fecal da água, demonstrando a necessidade de um monitoramento nesses ambientes;
- ✓ Estudos da viabilidade viral tornam-se necessários no sentido de avaliar o risco de contaminação por esses agentes no ambiente.

PERSPECTIVAS

Esse foi um estudo preliminar, o qual se propôs a estabelecer metodologias, tanto de concentração como de detecção, dos HAdV em amostras de água e esgoto, as quais geraram subsídios para futuras pesquisas. Deste modo pretende-se:

- Implementar um protocolo de cultura celular de HAdV (entéricos e não entéricos) nesses tipos de amostras, visando a distinção entre as partículas infectantes e não infectantes;
- Estabelecimento da curva padrão de HAdV para padronização da qPCR em tempo real;
- Utilização da nested-PCR em detrimento da PCR para a detecção desses vírus nas amostras ambientais, visando seu sequenciamento;
- Introduzir um monitoramento em águas obtidas na saída da Estação de Tratamento de Água Bolonha (ETA-Bolonha), assim como manter a coleta nos lagos de abastecimento (Bolonha e Água Preta).
- Pesquisar esse vírus em águas de recreação (praias).

REFERÊNCIAS

- ALBINANA- GIMENEZ, N.; CLEMENTE - CASARES, P.; BOFILL-MAS, S.; HUNDESA, A.; RIBAS, F.; GIRONES, R. Distribution of human polyomaviruses, adenoviruses, and hepatitis E virus in the environment and in a drinking-water treatment plant. **Environ Sci Technol.** 40: 7416-7422, 2006.
- ALBINSSON, B. & KIDD, A.H. Adenovirus type 41 lacks an RGD alpha (v) - integrin binding motif on the penton base and undergoes delayed uptake in A549 cells. **Virus Res.** 64:125-36, 1999.
- ALLARD, A.; ALBINSSON, B.; WADELL, G. Detection of adenoviruses in stools from healthy persons and patients with diarrhea by two-step polymerase chain reaction. **J Med Virol.** 37(2):149-57, 1992.
- ALLARD, A.; BO, A.; GÖRAN, W. Rapid typing of human adenoviruses by a general PCR combined with restriction endonuclease analysis. **J Clin Microbiol.** 39: 498–505, 2001.
- AYRES, M; AYRES, M.J; AYRES, D.L & SANTOS, A.S. **BioEstat 5.0** - Aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas. Sociedade Civil Mamirauá MCT – CNPq. 2007.
- AW, T.G. & GIN, K.Y.-H. Environmental surveillance and molecular characterization of human enteric viruses in tropical urban wastewaters. **J Appl Microbiol.** 109: 716-730, 2010.
- BARRELLA, K.M.; GARRAFA, P.; MONEZI, T.A.; HÁRSI, C.M.; SALVI, C.; VIOLANTE, P.A.B..C.; MEHNERT, D.U. Longitudinal study on occurrence of adenoviruses and hepatitis A virus in raw domestic sewage in the city of Limeira, São Paulo. **Brazilian J Microbiol.** 40:102-107, 2009.
- BENKO, M.; ELO, P.; URSU, K; AHNE, W.; LAPATRA, S.E.; THOMSON, D.; HARRACH, B. First molecular evidence for the existence of distinct fish and snake adenoviruses. **J Virol.** 76(19): 10056-10059, 2002.
- BERK, A.J. *Adenoviridae: The viruses and their replication.* In: FIELDS, B.N.; KNIPE, D.M.; HOWLEY, P.M.; GRIFFIN, D.E.; LAMB, R.A.; MARTIN, M.A.; ROIZMAN, B; STRAUS, S.E. **Virology.** 5^a ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins Publishers. 2007. P.2355-2394.
- BITTON, G. Pathogens and Parasites in Domestic Wastewater. In: **Wastewater Microbiology.** 3^a ed., New York: Willey Liss Inc. 2005.763p.
- BLACK, E.R.; COUSENS, S.; JOHNSON, H.L.; LAWN, J.E.; RUDAN, I.; BASSANI, D.G.; PRABHAT, J.; CAMPBELL, H.; WALKER, R.C.; EISELE, T.; LIU, L.; MATHERS, C. Global, regional, and national causes of child mortality in 2008: a systematic analysis. **Lancet.** 375: 1969–87, 2010.

- BLACKLOW, N.R. & GREENBERG, H.B. Viral gastroenteritis. **N Engl J Med.** 325: 252-264, 1991.
- BORSOI, Z.M.F. & TORRES, S.D.A. A política de recursos hídricos no Brasil. **Revista do BNDES.** Rio de Janeiro, v. 4, n. 8, p. 143-166, 1997
- BOSCH, A. Human enteric viruses in the water environment: a minireview. **Int Microbiol** 1:191-196, 1998.
- BOSCH, A.; ABAD, F.X.; PINTÓ, R.M. Human pathogenic viruses in the marine environment. In: BELKIN, S. & COWELL, R.R. **Oceans and Health: Pathogens in the Marine Environment.** Springer, New York, NY, pp 109-131, 2005.
- BOSCH, A.; GUIX, S.; SANO, D.; PINTÓ, R.M. New tools for the study and direct surveillance of viral pathogens in water. **Current Opinion in Biotechnology.** 19:295-301, 2008.
- CALGUA, B.; BARARDI, C.R.M.; BOFILL-MAS, S.; RODRIGUEZ-MANZANO, J.; GIRONES, R. Detection and quantitation of infectious human adenoviruses and JC polyomaviruses in water by immunofluorescence assay. **J Virol Meth.** 171: 1-7, 2011.
- CARDOSO, D.D.P.; MARTINS, R.M.B.; KITAJIMA, E. W.; BARBOSA, A.J.; CAMAROTA, S.C.T.; AZEVEDO, M. S. P. Rotavirus and adenovirus in 0- to 5-year-old children hospitalized with or without gastroenteritis in Goiania, GO, Brazil. **Rev Inst Med Trop São Paulo.** 34(5):433-9, 1992.
- CARSTENS, E. B. Ratification vote on taxonomic proposals to the International Committee on Taxonomy of Viruses (2009). **Arch Virol.** Virology Division News. 155:133–146, 2010.
- CARTER, M.J. A Review: Enterically infection viruses: pathogenicity, transmission and significance for food and waterborne infection. **J Appl Microbiol.** 98:1354-80, 2005.
- CHEONG, S.; LEE, C.; SONG, S.W.; CHOI, W.C.; LEE, C.H.; KIM, S-J. Enteric viruses in raw vegetables and groundwater used for irrigation in South Korea. **Appl Environ Microbiol.** 75: 7745-7751, 2009.
- COSANPA/CENSA. **Diagnóstico do estudo urbanístico de proteção sanitária dos lagos Bolonha e Água Preta. II. Estudo da qualidade de proteção das águas.** Belém. Companhia de Saneamento do Estado do Pará. 1983.
- COSANPA. **Diagnóstico do estudo urbanístico de proteção sanitária dos lagos Bolonha e Água Preta- Estudo da qualidade de proteção das águas.** Belém. Companhia de Saneamento do Pará. 1983.
- DOMÍNGUEZ, A.; GODOY, P.; TORNER, N.; CARDEÑOSA, N.; MARTÍNEZ, A. Las gastroenteritis víricas: Un problema de salud pública. **Rev Esp Salud Pública.** 83: 679-687, 2009.
- FEACHEM, R.G.; BRADLEY, D. J.; GARELICK, H ; MARA, D. D. **Sanitation and Disease: Health aspects of excreta and wastewater management.** Washington (USA): John Wiley & Sons,1983. 501p.

FLECK, E. ; GABBAY, Y. B. ; MEDEIROS, R. L. F. ; TEIXEIRA, D. M. ; DE PAULA, V. S. ; VALLE, E. R. ; CARNEIRO, B. S. ; SIQUEIRA, J. A. M. ; SÁ, L. L. C. . **Molecular detection of Hepatitis A Virus (HAV) in different aquatic ecosystems of the metropolitan region of Belém-PA.** In: XX Encontro Nacional de Virologia, 2009, BRASÍLIA-DF. *Virus: Reviews and Research/Sociedade Brasileira de Virologia.* v. 14. p. 186-187, 2009.

FLEWETT, T.H. Diagnosis of enteritis virus. **Proc R Soc Med.** 69 (9): 693-6, 1976.

FONG, T.T. & LIPP, E.K. Enteric viruses of humans and animals in aquatic environments: health risks, detection, and potential water quality assessment tools. **Microbiol Mol Biol Rev.** 69: 357-371, 2005.

FONG, T.T.; PHANIKUMAR, M.S.; XAGORASAKI, I.; ROSE, J.B. Quantitative detection of human adenoviruses in wastewater and combined sewer overflows influencing a Michigan River. **Appl Environ Microbiol.** 76: 715-723, 2010.

FUNASA. Fundação Nacional da Saúde. Esgotamento sanitário. **In: Manual de Saneamento.** Brasília. 2004. Cap. 3.

GERBA, C.P. & SMITH, J.E. JR. Sources of pathogenic microorganisms and their fate during land application of wastes. **J Environ Qual.** 34(1):42-8, 2005.

GIBSON, K.E; OPRYSZKO, M.C.; SCHISLER, J.T.; GUO, Y.; SCHWAB, K.J. Evaluation of Human Enteric Viruses in Surface Water and Drinking Water Resources in Southern Ghana. **Am J Trop Med Hyg.** 84(1): 20–29, 2011.

GINELLI, A. et al. **Intussuscepção.** Disponível em: <<http://www.ctscan.com.br/casosclinicos/clinicamedica/intussuscepcao/index.php>>. Acesso em 20 de abril de 2011.

GONÇALVES, M.A.F.V. & DE VRIES, A.A.F. Adenovirus: from foe to friend. **Rev Med Virol.** 16(3): 167-186, 2006.

GONÇALVES, G.; GOUVEIA, E.; MESQUITA, JR, ALMEIDA, A., RIBEIRO, A.; ROCHA-PEREIRA, J.; SÃO JOSÉ NASCIMENTO, M. Outbreak of acute gastroenteritis caused by adenovirus type 41 in a kindergarten. **Epidemiol Infect.** 15:1-4, 2010.

GUERRERO-LATORRE, L.; CARRATALA, A.; RODRIGUEZ-MANZANO, I.; CALGUA, B.; HUNDESA, A.; GIRONES, R. Occurrence of water-borne enteric viruses in two settlements based in Eastern Chad: analysis of hepatitis E virus, hepatitis A virus and human adenovirus in water sources. **J Water Health.** 9(3):515-24, 2011.

GURJAO, T.C.M.; DE PAULA, V. S.; TEIXEIRA, D.M.; SOARES, L.S.; MASCARENHAS, J.D.P.; GABBAY, Y.B.; SÁ, L.L.C. **Detection and phylogenetic analysis of Hepatitis A Virus in superficial waters and sewage from Belém, Pará, Brazil.** In: I Latin America Symposium of Environmental Virology, 2010, Rio de Janeiro. I Latin America Symposium of Environmental Virology, 2010.

GURJÃO, T.C.M., GARZA, D., TEIXEIRA, D.M., SPADA, P. K. P., MASCARENHAS, J.D.P., GABBAY, Y.B., PAULA, V. S., SÁ, L.L.C. **Molecular detection of hepatitis A virus (HAV) in main wellspring of water supply of the city of Belém, Pará, Brazil.** In: XXII Encontro Nacional de Virologia, 2011, Atibaia, SP. VI Encontro de Virologia do Mercosul, 2011.

HAAS, C. N., ROSE, J. B., GERBA, C. P.; REGLI, R. Risk assessment of viruses in drinking water. **Risk Anal.** 13:545–552, 1993.

HALL, K.; BLAIR ZAJDEL, M.E.; BLAIR, G.E. Unity and diversity in the human adenoviruses: exploiting alternative entry pathways for gene therapy. Review. **Biochem J.** 431(3):321-36, 2010.

HARAMOTO, E.; KITAJIMA, M.; KATAYAMA, H.; OHGAKI, S. Real-time PCR detection of adenoviruses, polyomaviruses, and torque teno viruses in river water in Japan. **Water Res.** 44(6):1747-52, 2010.

HEID, C. A.; STEVENS, J.; LIVAK, K.J.; WILLIAMS, P.M. Real time quantitative PCR. **Genome Res.** 6: 986-994, 1996.

HERNROTH, B. E.; CONDÉN-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. **Appl Environ Microbiol.** 68:4523–4533, 2002.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia Estatística. **Senso 2010.** Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br>>. Acesso em 23 de fevereiro de 2011.

JIANG, S.; NOBLE, R.; CHU, W. Human adenoviruses and coliphages in urban runoff-impacted coastal waters of Southern California. **Appl Environ Microbiol.** 67(1):179-84, 2001.

JIANG, S.C. Human adenoviruses in water: Occurrence and health implications: A critical review. **Environ Sci Technol.** 40:7132-40, 2006.

JONES II, M.S.; HARRACH, B.; GANAC R.D.; GOZUM M.M.; DELA CRUZ W.P.; RIEDEL, B.; PAN, C.; DELWART, E.L.; SCHNURR, D.P. New adenovirus species found in a patient presenting with gastroenteritis. **J Virol.** 81. 5978-5984, 2007.

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. **Appl Environ Microbiol.** 68:1033–1039, 2002.

KIM, M.; LIM, M.Y.; KO, G. Enhancement of enteric adenovirus cultivation by viral transactivator proteins. **Appl Environ Microbiol.** 76(8):2509-16, 2010.

KOCWA-HALUCH, R. Waterborne enteroviruses as a hazard for human health. **Polish J Environ Studies.** 10:485–487, 2001.

LA ROSA, G.; POURSHABAN, M.; IACONELLI, M. ; MUSCILLO, M. Quantitative real-time PCR of enteric viruses in influent and effluent samples from wastewater treatment plants in Italy. **Environ Issues of Health Concern**. 46 (3): 266-273, 2010.

LECLERC, H.; SCHWARTZBROD, L., DEI-CAS, E. Microbial agents associated with waterborne diseases. **Crit Rev Microbiol**. 28:371-409, 2002.

MAESTRI, R.P.; NERI, D.L.; TEIXEIRA, D.M.; GURJAO, T.C.M.; SÁ, L.L.C.; GABBAY, Y.B.; MASCARENHAS, J.D.P. **Detection of Rotavirus in Water and Untreated sewage samples collected in the city of Belém, Pará, Brazil**. In: I Latin America Symposium of Environmental Virology, 2010, Rio De Janeiro. I Latin America Symposium of Environmental Virology, 2010.

MAGALHÃES, G.F.; NOGUEIRA, P.A.; GRAVA, A.F.; PENATI, M.; SILVA, L. H. P.; ORLANDI, P. P. Rotavirus and adenovirus in Rondônia. **Mem Inst Oswaldo Cruz**. 102(5):555-557, 2007.

MELEG, E.; JAKAB, F.; KOCSIS, B.; BÁNYAI, K.; MELEGH, B.; SZUCS, G. Human astroviruses in raw sewage samples in Hungary. **J Appl Microbiol**. 101: 1123-1129, 2006.

Metodologia PCR real time. Carta molecular nº2. Disponível em: <<http://www.centrodegenomas.com.br>>. Acesso em 07/10/2011.

MIAGOSTOVICH, M.P.; FERREIRA, F.F.M.; GUIMARÃES, F.R.; FUMIAN, T.M.; DINIZ-MENDES, L.; LUZ, 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 Amazonia, Brazil. **Appl Environ Microbiol**. 74(2): 375-82, 2008.

MÜLLER, E.C.A.; MORAIS, M.A.A.; GABBAY, Y.B.; LINHARES, A.C. Ocorrência de adenovirus em crianças com gastroenterite aguda grave na Cidade de Belém, Pará, Brasil. **Rev Pan-Amaz Saude**. 1(3): 49-55, 2010.

MÜLLER, E.C.A. **Prevalência de adenovírus em crianças com gastroenterite aguda grave na cidade de Belém, Pará**. 2011. 97f. Dissertação (Mestrado em Doenças Tropicais). Universidade Federal do Pará. Belém. Pará.

MUSCILLO, M.; POURSHABAN, M.; IACONELLI, M.; FONTANA, S.; DI GRAZIA, A.; MANZARA, S.; FADDA, G.; SANTANGELO, R.; LA ROSA, G. Detection and quantification of human adenoviruses in surface waters by nested PCR, taqman real-time PCR and cell culture assays. **Water Air Soil Pollut**. 191:83-93, 2008.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. **Guías para la calidad del agua potable**. **Genebra**: OMS, 1995.

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE. **Informe regional sobre avaliação 2000 na região da Américas: água potável e saneamento, estado atual e perspectivas.** Washington. 2001.

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE. **Água e Saúde.** Brasil. 2001b.

PEREIRA, F & MACIEL, L. PCR quantitativo em tempo real. **Publicações Weinmann.** 2004. Disponível em: <<http://www.publicacoesweinmann.com.br>>. Acesso em 07/10/2011.

PHILIPSON, L. & PETTERSSON, R.F. The coxsackie-adenovirus receptor--a new receptor in the immunoglobulin family involved in cell adhesion. **Curr Top Microbiol Immunol.** 273:87-111, 2004.

PINA, S.; PUIG, M.; 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. **Appl Environ Microbiol.** 64(9): 3376-3382, 1998.

Portaria FUNASA nº 518 de 25 de março de 2004. Publicada no DOU de 26 de março de 2004, Seção 1, p266. Disponível em: http://www.funasa.gov.br/web%20Funasa/Legis/pdfs/portarias_m/pm_518_2004.pdf. Acesso em 10 de fevereiro de 2012.

PREFEITURA MUNICIPAL DE BELÉM. **Revisão do Plano Diretor do Município de Belém.** Disponível em: <<http://www.belem.pa.gov.br/>>. Acesso em 23 de fevereiro de 2011.

PUIG, M.; JOFRE, J.; LUCENA, F.; ALLARD, A.; WADELL, G.; GIRONES, E. R. Detection of adenoviruses and enteroviruses in polluted waters by nested PCR amplification. **Appl Environ Microbiol.** 60(8): 2963–2970, 1994.

Resolução CONAMA nº 274 de 29 de novembro de 2000. Publicada no DOU nº 18, de 25 de janeiro de 2001, Seção 1, páginas 70-71. Disponível em: <http://www.mma.gov.br/port/conama/legiabre.cfm?codlegi=272> Acesso em 10 de fevereiro de 2012.

Resolução CONAMA nº 357 de 17 de março de 2005. Publicada no DOU nº 53, de 18 de março de 2005, Seção 1, páginas 58-63. Disponível em: <http://www.mma.gov.br/port/conama/legiabre.cfm?codlegi=459> Acesso em 10 de fevereiro de 2012.

RIBEIRO, H.M.C. **Avaliação atual da qualidade das águas superficiais dos lagos Bolonha e Água Preta situados na área fisiográfica do Utinga (Belém-Pa).** 1992. 205 f. Dissertação (Mestrado em Geoquímica e Petrologia) – Universidade Federal do Pará, Instituto de Geociências, Belém.

RIGOTTO, C.; VICTÓRIA, M.; MORESCO, V.; KOLESNICOVAS, C.K.; CORRÊA, A.A.; SOUZA, D.S.M; MIAGOSTOVICH, M.P.; SIMÕES, C.M.O.; BARARDI, C.R.M. Assessment of adenovirus, hepatitis A virus and rotavirus presence in environmental samples in Florianopolis, South Brazil. **J Appl Microbiol.** 109: 1979-19 87, 2010.

RUSSELL, W.C. Update on adenovirus and its vectors. Review. **J Gen Virol.** V.81, p.2573-2604, 2000.

RUSSELL, W.C. Adenoviruses: update on structure and function. Review. **J Gen Virol.** 90:1-20, 2009.

Saneamento Ambiental. Disponível em: http://ambientes.ambientebrasil.com.br/saneamento/definicoes/saneamento_ambiental.html. Acesso em: 10/02/2012.

SANTOS, N.S.O.; & SOARES, C.C. Víruses Entéricas. In: SANTOS, N.S.O.; ROMANOS, M.T.V. et al. **Introdução à Virologia Humana**, Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 2008. p.59-74.

SEIRADAKE, E. & CUSACK, S. Crystal structure of enteric adenovirus serotype 41 short fiber head. **J Virol.**, 79 (22):14088-14094, 2005.

PARÁ. Secretaria Municipal de Saúde. **Senso 2000**. Belém, 2005.

SETTI, A.A.; LIMA, J.E.F.W.; CHAVES, A.G.M.; PEREIRA, I.C. **Introdução ao gerenciamento de recursos hídricos**. 2ª ed. – Brasília: Agência Nacional de Energia Elétrica, Superintendência de Estudos e Informações Hidrológicas, 2001. 207 p.

SHIMIZU, H.; PHAN, T.G.; NISHIMURA, S.; OKITSU, S.; MANEEKARN, N.; USHIJIMA H. An outbreak of adenovirus serotype 41 infection in infants and children with acute gastroenteritis in Maizuru City, Japan. **Infect Genet Evol.** 7(2):279-84, 2007.

SILVA, A.M. **Gestão de conflitos pelo uso da água em bacias hidrográficas urbanas**. 2003. 151f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Civil). Universidade Federal do Pará. Belém. Pará.

SILVA, H.D. ; WOSNJUK, L. A. C.; SANTOS; S. F. O.; VILANOVA-COSTA, C. A. S. T.; PEREIRA, F. C.; SILVEIRA-LACERDA, E. P.; GARCÍA-ZAPATA, M. T. A.; ANUNCIACÃO, C. E. Molecular detection of adenoviruses in lakes and rivers of Goiânia, Goiás, Brazil. **Food Environ Virol.** 2(1):35-40, 2009.

SILVA, H.D.; MELO, M. R.; ANUNCIACAO, C. E.; GARCÍA-ZAPATA, M. T. A. Avaliação de métodos de concentração e detecção molecular de adenovírus em águas não tratadas - uma metanálise. **Rev Soc Ven Microbiol.** 30(1):65-71, 2010.

SILVA, H.D.; GARCÍA-ZAPATA, M. T. A.; ANUNCIACAO, C. E. Communication: Why the Use of Adenoviruses as Water Quality Virologic Marker? **Food Environ Virol.** 3:138–140, 2011.

SIMd. **Sistema Informatizado da Macrodrenagem.** Disponível em: <<http://www.logicalservices.net/servicos/informatica/cosanpa>>. Acesso em 10 jun. 2010.

SODRÉ, S.C.V. **Hidroquímica dos Lagos Bolonha e Água Preta, mananciais de Belém-Pará.** 2007. 115f. Dissertação (Mestrado em Ciências Ambientais). Universidade Federal do Pará. Belém. Pará.

STEYER, A.; TORKAR, K.G; GUTIÉRREZ-AGUIRRE, I.; POLJSAK-PRIJATELT, M. High prevalence of enteric viruses in untreated individual drinking water sources and surface water in Slovenia. **Int J Hyg Environ Health.** 214: 392-398, 2011.

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. **Mol Biol Evol.** 28: 2731-2739, 2011.

TAVARES, T.M.; CARDOSO, D.D.P.; BRITO, W.M.E.D. Vírus entéricos veiculados por água: Aspectos microbiológicos e de controle de qualidade da água. **Rev Patol Trop.** 34:85-104, 2005.

TEIXEIRA, D. M.; SÁ, L. L. C.; FLECK, E.; DE PAULA, V. S. ; ARAGÃO, G. C.; SIQUEIRA, J. A. M.; OLIVEIRA, D. S.; SOARES, L. S.; MEDEIROS, R. L. F.; CARNEIRO, B. S.; MASCARENHAS, J. D. P.; GABBAY, Y. B. **Detection of norovirus and astrovirus in different aquatic ecosystems in the metropolitan region of Belém, Pará, Brazil.** In: XX Encontro Nacional de Virologia, 2009, Brasília-DF. *Virus: Reviews and Research/Sociedade Brasileira de Virologia.* v. 14. p. 180-180, 2009.

TEIXEIRA, D.M.; FLECK, E.; OLIVEIRA, D.S.; MASCARENHAS, J.D.P.; SÁ, L.L. C.; GABBAY, Y.B. . **Detecção de calicivírus e astrovírus em diferentes ecossistemas aquáticos da região metropolitana de Belém-Pa.** In: 62^a Reunião Anual da SBPC, 2010, Natal. 62^a Reunião Anual da SBPC, 2010.

TEIXEIRA, D.M., LIMA, I.C.G., LUCENA, S.S., SPADA, P. K. P., SIQUEIRA, J.A.M., GURJÃO, T.C.M., GARZA, D., HERNANDEZ, J.M., ARAGÃO, G.C., CARVALHO, T.C.N., SOUSA, M. S., MASCARENHAS, J.D.P., GABBAY, Y.B. **Detection of human norovirus in surface water and untreated sewage samples by semi-nested RT-PCR and real time PCR methods, in Belém city, Northern Brazil.** In: XXII Encontro Nacional de Virologia, 2011, Atibaia, SP. VI Encontro de Virologia do Mercosul, 2011.

TONG, H-I & LU, Y. Effective detection of human adenovirus in hawaiian waters using enhanced pcr methods. **Virol J.** 8: 57, 2011.

TUCCI, C.E.M.; HESPANHOL, I.; NETTO, O.M.C. **Gestão da água no Brasil.** Brasília: UNESCO, 2001.156p.

VAN HEERDEN, J.; EHLERS, M.M.; VIVIER, J.C.; GRABOW, W.O.K. Risk assessment of adenoviruses detected in treated drinking water and recreational water. **J Appl Microbiol.** 99: 926–933, 2005.

VERHEYEN, J.; TIMMEN-WEGO, M.; LAUDIEN, R.; BOUSSAAD, I.; SEN, S.; KOC, A.; UESBECK, A.; MAZOU, F.; PFISTER, H. Detection of adenoviruses and rotaviruses in drinking water sources used in rural areas of Benin, West Africa. **Appl Environ Microbiol.** 75(9): 2798–2801, 2009.

VILLAR, L.M.; DE PAULA, V.S.; DINIZ-MENDES, L.; GUIMARÃES, F.R.; FERREIRA, F.F.; SHUBO, T.C.; MIAGOSTOVICH, M.P.; LAMPE, E.; GASPAR, A.M. Molecular detection of hepatitis A virus in urban sewage in Rio de Janeiro, Brazil. **Lett Appl Microbiol.** 45 (2):168-73, 2007.

WHO/UNICEF. World Health Organization. **Meeting the MDG Drinking Water and Sanitation Target: A Mid-Term Assessment of Progress.** 2004. Geneva.

WOLD, W.S.M. & HORWITZ, M.S. Adenoviruses. In: FIELDS, B.N.; KNIPE, D.M.; HOWLEY, P.M.; GRIFFIN, D.E.; LAMB, R.A.; MARTIN, M.A.; ROIZMAN, B.; STRAUS, S.E. **Virology.** 5^a ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins Publishers. 2007. P.2395-2436.

WYN-JONES, A.P. & SELLWOOD, J. Enteric viruses in the aquatic environment. **J Appl Microbiol.** 91:945-962, 2001.

WYN-JONES, A.P.; CARDUCCI, A.; COOK, N.; D'AGOSTINO, M.; DIVIZIA, M.; FLEISCHER, J.; GANTZER, C.; GAWLER, A.; GIRONES, R.; HÖLLER, C.; HUSMAN, A. M. R.; KAY, D.; KOZYRA, I.; LÓPEZ-PILA, J.; MUSCILLO, M.; NASCIMENTO, M. S. J.; PAPAGEORGIOU, G.; RUTJES, S.; SELLWOOD, J.; SZEWZYK, R.; WYER, M. Surveillance of adenoviruses and noroviruses in European recreational waters. **Water Res.** 45: 1025-1038, 2011.

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. **Appl Environ Microbiol.** 73 (24): 7874–7881, 2007.