

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Instituto de Ciências Básicas da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente

Detecção de Adenovirus, Enterovirus e coliformes termotolerantes em amostras de água das praias de Ipanema e do Lami – Porto Alegre –RS

Cristiane Piccinini Maurer
Farmacêutica-Bioquímica – UFRGS
Especialista em Microbiologia Clínica - FEEVALE

Junho, 2013

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Instituto de Ciências Básicas da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente

Detecção de Adenovirus, Enterovirus e coliformes termotolerantes em amostras de água das praias de Ipanema e do Lami – Porto Alegre – RS

Cristiane Piccinini Maurer
Farmacêutica-Bioquímica – UFRGS
Especialista em Microbiologia Clínica - FEEVALE

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente como um dos requisitos para a obtenção do grau de Mestre na área de Microbiologia Ambiental.

Orientador: Prof. Dr. Amauri Braga Simonetti
Co-Orientador: Prof. Dr. Fernando Rosado Spilki

Porto Alegre, RS, Brasil
Junho, 2013

CIP - Catalogação na Publicação

Maurer, Cristiane Piccinini
Detecção de Adenovirus, Enterovirus e coliformes termotolerantes em amostras de água das praias de Ipanema e do Lami - Porto Alegre -RS / Cristiane Piccinini Maurer. -- 2013.
46 f.

Orientador: Amauri Braga Simonetti.
Coorientador: Fernando Rosado Spilki.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Porto Alegre, BR-RS, 2013.

1. Adenovírus. 2. Enterovírus. 3. Análise virológica da água. 4. Água de recreação. I. Simonetti, Amauri Braga, orient. II. Spilki, Fernando Rosado, coorient. III. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Agradecimentos

Aos meus orientadores Dr. Amauri B. Simonetti e Dr. Fernando R. Spilki, pela ajuda, paciência e compreensão em todos os momentos.

Aos colegas do laboratório de Microbiologia Molecular da Universidade Feevale pela imensurável colaboração com este trabalho.

Ao laboratório Pró-Ambiente pela colaboração e compreensão nos meus momentos de ausência.

À minha família, em especial ao meu marido, pelo apoio e incentivo nesta jornada.

DETECÇÃO DE ADENOVIRUS, ENTEROVIRUS E COLIFORMES TERMOTOLERANTES EM AMOSTRAS DE ÁGUA DAS PRAIAS DE IPANEMA E DO LAMI – PORTO ALEGRE – RS

Autor: Cristiane Piccinini Maurer¹

Orientador: Prof. Dr. Amauri Braga Simonetti

Co-Orientador: Prof. Dr. Fernando Rosado Spilki

Resumo

Doenças infecciosas veiculadas pela água são causa comum de enfermidades em seres humanos no mundo inteiro. Dentre os patógenos causadores destas doenças, os vírus merecem destaque, pois possuem a capacidade de sobreviver em ambientes aquáticos e de permanecer infectantes por meses. A avaliação da balneabilidade das águas brasileiras é monitorada através da densidade de coliformes termotolerantes (CT), classificando as águas de recreação em próprias ou impróprias. Este trabalho tem como objetivo detectar e quantificar genomas de Adenovirus (AdV) e Enterovirus (EV) em amostras de água das praias de Ipanema e do Lami em Porto Alegre – RS e avaliar as condições de balneabilidade através da quantificação de CT. A metodologia utilizada foi reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR) para os vírus e o método de tubos múltiplos para quantificação de CT. Entre os meses de novembro de 2011 e abril de 2012, foram coletadas 36 amostras de água: 18 amostras de Ipanema e 18 da praia do Lami. Em 30 (83,3%) das 36 amostras coletadas foi detectada a presença de genomas virais. Genoma de AdV foi detectado em 28 (77,8%) amostras, enquanto de EV foi detectado apenas em 8 amostras (22,2%). Em contraste com as baixas concentrações de CT, a pesquisa de AdV e EV demonstrou alta positividade (83,3%), o que demonstra a baixa correlação entre os micro-organismos utilizados como marcadores fecais e a presença de genomas virais em amostras de água.

1. Dissertação de Mestrado pelo Programa de Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (46p.) Junho, 2013.

DETECTION OF ADENOVIRUS, ENTEROVIRUS AND THERMOTOLERANT COLIFORMS IN WATER SAMPLES OF IPANEMA AND LAMI BEACHES – PORTO ALEGRE – RS

Author: Cristiane Piccinini Maurer¹

Adviser: Prof. Dr. Amauri Braga Simonetti

Co-Adviser: Prof. Dr. Fernando Rosado Spilki

Abstract

Waterborne diseases are a common cause of illness in humans worldwide. Among the pathogens causing these diseases, the viruses are noteworthy because they have the ability to survive in aquatic environments and remain infective for months. In Brazil the evaluation of recreational waters is made by monitoring the density of fecal coliform (FC), classifying recreational waters in appropriate or inappropriate. This work aims to detect and quantify genomes of Adenovirus (AdV) and Enterovirus (EV) in water samples from Ipanema and Lami beaches in Porto Alegre - RS and assess the conditions of bathing by quantifying FC. The methodology used was real time polymerase chain reaction (qPCR) for virus and multiple tube technique for FC. Between the months of November 2011 and April 2012 were collected 36 water samples: 18 samples in Ipanema and 18 in Lami. In 30 (83.3%) of the 36 samples the presence of viral genomes was detected. AdV genome was detected in 28 (77.8%) samples, while the EV was only detected in 8 samples (22.2%). In contrast to the low concentrations of FC, research of EV and AdV showed a high positivity (83.3%), which demonstrates the low correlation between micro-organisms used as fecal markers and the presence of viral genomes in water samples.

1. Master of Science Dissertation in Agricultural and Environmental Microbiology, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (46p.) June, 2013.

Sumário

| | |
|---|------|
| Relação de Tabelas | VIII |
| Relação de Figuras | IX |
| Relação de Abreviaturas e Símbolos | X |
| 1. Introdução | 1 |
| 2. Revisão bibliográfica | 4 |
| 2.1 <i>Vírus entéricos e doenças de veiculação hídrica</i> | 4 |
| 2.1.1 <i>Enterovirus (EV)</i> | 6 |
| 2.1.2 <i>Adenovírus (AdV)</i> | 8 |
| 2.2 <i>Coliformes termotolerantes (CT)</i> | 9 |
| 2.3 <i>Coliformes termotolerantes (CT) como indicadores de balneabilidade</i> | 9 |
| 2.4 <i>Detecção de vírus em águas de recreação</i> | 10 |
| 2.5 <i>Região hidrográfica do Guaíba</i> | 12 |
| 3. Materiais e Métodos | 17 |
| 3.1 <i>Amostragem</i> | 17 |
| 3.2 <i>Concentração das amostras</i> | 18 |
| 3.3 <i>Extração e Detecção de Ácidos Nucléicos Virais</i> | 19 |
| 3.4 <i>Coliformes termotolerantes</i> | 21 |
| 3.5 <i>Dados meteorológicos</i> | 21 |
| 4. Resultados | 23 |
| 5. Discussão | 33 |
| 6. Conclusões | 39 |
| 7. Bibliografia | 40 |
| 8. Anexo I | 45 |

Relação de Tabelas

| | |
|--|----|
| Tabela 1: Coordenadas geográficas dos pontos onde foram coletadas as amostras..... | 18 |
| Tabela 2: Oligonucleotídeos Iniciadores e condições para amplificação dos fragmentos genômicos de AdV e EV por qPCR..... | 20 |
| Tabela 3: Quantificação de cópias genômicas/L de Adenovirus e Enterovirus e do NMP/100 mL de Coliformes Termotolerantes nas amostras de água da praia de Ipanema – Porto Alegre – RS..... | 23 |
| Tabela 4: Quantificação de cópias genômicas/L de Adenovirus e Enterovirus e do NMP/100 mL de Coliformes Termotolerantes nas amostras de água da praia de Lami – Porto Alegre – RS..... | 24 |
| Tabela 5: Dados meteorológicos da quinzena anterior às coletas, de novembro de 2011 a abril de 2012. Fonte: INMET – 8º Distrito de Meteorologia, Porto Alegre – RS..... | 27 |

Relação de Figuras

| | |
|---|----|
| Figura 1: Rotas de transmissão de vírus entéricos no meio ambiente..... | 4 |
| Figura 2: Localização da cidade de Porto Alegre – RS – Brasil..... | 13 |
| Figura 3: Região Hidrográfica do Guaíba e suas nove bacias..... | 14 |
| Figura 4: Bacia do Lago Guaíba. As setas indicam as praias de Ipanema e Lami..... | 16 |
| Figura 5: Localização dos pontos de coleta na praia de Ipanema em Porto Alegre – RS, Brasil..... | 17 |
| Figura 6: Localização dos pontos de coleta na praia do Lami em Porto Alegre – RS, Brasil..... | 18 |
| Figura 7: Resultados comparando cópias genômicas/L de Adenovirus e Enterovirus e do NMP/100 mL de Coliformes Termotolerantes com a precipitação pluviométrica nas amostras coletadas no ponto 1 da praia de Ipanema..... | 27 |
| Figura 8: Resultados comparando cópias genômicas/L de Adenovirus e Enterovirus e do NMP/100 mL de Coliformes Termotolerantes com a precipitação pluviométrica nas amostras coletadas no ponto 2 da praia de Ipanema..... | 28 |
| Figura 9: Resultados comparando cópias genômicas/L de Adenovirus e Enterovirus e do NMP/100 mL de Coliformes Termotolerantes com a precipitação pluviométrica nas amostras coletadas no ponto 3 da praia de Ipanema..... | 28 |
| Figura 10: Resultados comparando cópias genômicas/L de Adenovirus e Enterovirus e do NMP/100 mL de Coliformes Termotolerantes com a precipitação pluviométrica nas amostras coletadas no ponto 1 da praia do Lami..... | 29 |
| Figura 11: Resultados comparando cópias genômicas/L de Adenovirus e Enterovirus e do NMP/100 mL de Coliformes Termotolerantes com a precipitação pluviométrica nas amostras coletadas no ponto 2 da praia do Lami..... | 30 |
| Figura 12: Resultados comparando cópias genômicas/L de Adenovirus e Enterovirus e do NMP/100 mL de Coliformes Termotolerantes com a precipitação pluviométrica nas amostras coletadas no ponto 3 da praia do Lami..... | 30 |

Relação de Abreviaturas e Símbolos

ADV: Adenovirus

°C: graus Celsius

cm: centímetro

CT: coliformes termotolerantes

DNA: ácido desoxiribonucleico

EV: Enterovirus

g: gramas

h: horas

HCl: ácido clorídrico

H₂SO₄: ácido sulfúrico

KCl: cloreto de potássio

MgCl₂: cloreto de magnésio

mL: mililitro

mm: milímetro

NaOH: hidróxido de sódio

ND: não detectado

NMP: número mais provável

qPCR: reação em cadeia da polimerase em tempo real

RNA: ácido ribonucleico

UFC: unidades formadoras de colônias

UV: ultravioleta

µm: micrômetro

1. Introdução

Doenças infecciosas veiculadas pela água são causa comum de enfermidades em seres humanos no mundo inteiro, com um impacto potencialmente mais amplo nos países em desenvolvimento. O lançamento de esgotos sem tratamento em corpos de água doce e no ambiente marinho é a principal causa de contaminação das águas, que, por fim, serão utilizadas para recreação ou mesmo para abastecimento da população.

No Brasil, as gastroenterites infecciosas e suas complicações são a principal causa de internação entre menores de 20 anos, possuindo alta representatividade no perfil de morbidade da população, sobretudo nas faixas etárias inferiores a cinco anos. A gastroenterite aguda é a doença mais comum transmitida pelas águas contaminadas. Os sintomas dessa doença vão desde algumas horas de desconforto intestinal até a morte.

Bactérias, vírus e protozoários excretados pelas fezes e veiculados pela água possuem capacidade infectante, dependendo da sua resistência ou capacidade de multiplicar-se no ambiente e da dose infectante. Devido à grande variedade de agentes infecciosos, alguns com diversos reservatórios naturais e a ocorrência da excreção por indivíduos assintomáticos, é muito difícil erradicar doenças de veiculação hídrica; deste modo torna-se necessário seu controle através do monitoramento desses organismos no meio ambiente.

Dentre os patógenos causadores de doenças transmitidas através da água os vírus merecem destaque, pois são altamente resistentes aos fatores ambientais, como temperatura, e aos métodos usualmente empregados para descontaminação da água, além de possuírem baixa dose infectante.

Tradicionalmente, a qualidade da água é monitorada através da presença de bactérias do grupo dos coliformes termotolerantes, os quais são aceitos como um indicativo da contaminação microbiológica da água (CONAMA, Resolução nº274, 2000). Sabe-se que esta avaliação possui deficiências, pois protozoários e vírus podem estar presentes na água sem que bactérias do grupo coliforme sejam detectadas.

A avaliação da balneabilidade das águas brasileiras é regulada pelo Conselho Nacional de Meio Ambiente (CONAMA) através da Resolução nº 274, de 29 de novembro de 2000, que exige o monitoramento da densidade bacteriológica de *Escherichia coli*, representante do grupo dos CT, como indicador do grau de contaminação das águas, classificando-as em próprias ou impróprias para uso de contato primário. Por esta resolução são aceitáveis para banho águas com até 2500 coliformes termotolerantes ou 2000 *Escherichia coli* por 100 mL de amostra de água coletada. Ressalte-se que ao comparar esta legislação com aquela para potabilidade da água (ANVISA 2914/2011), a água apresentada na primeira como própria para banho seria imprópria para consumo na segunda. Mais que isso, nenhuma das duas normativas traz como exigência no âmbito de monitoramento e prevenção, a busca e quantificação de agentes virais na água.

Este trabalho tem como objetivo detectar e quantificar Adenovirus e Enterovirus em amostras de água das praias do Lami e de Ipanema em Porto Alegre – RS e comparar os resultados com a avaliação da balneabilidade realizada segundo critérios estabelecidos pela Resolução nº274 do CONAMA. Para isso será realizada a reação em cadeia da polimerase em tempo real

(qPCR) para detecção dos genomas virais e a quantificação de CT será executada pelo método de tubos múltiplos.

2. Revisão bibliográfica

2.1 Vírus entéricos e doenças de veiculação hídrica

Vírus entéricos estão presentes naturalmente no ambiente aquático. Os seres humanos são expostos a estes micro-organismos de diversas formas, como através do cultivo de vegetais com água contaminada, águas de recreação e, até mesmo, através da água potável contaminada (Metcalf *et al.*, 1995). A Figura 1 mostra as possíveis rotas de transmissão dos vírus entéricos.

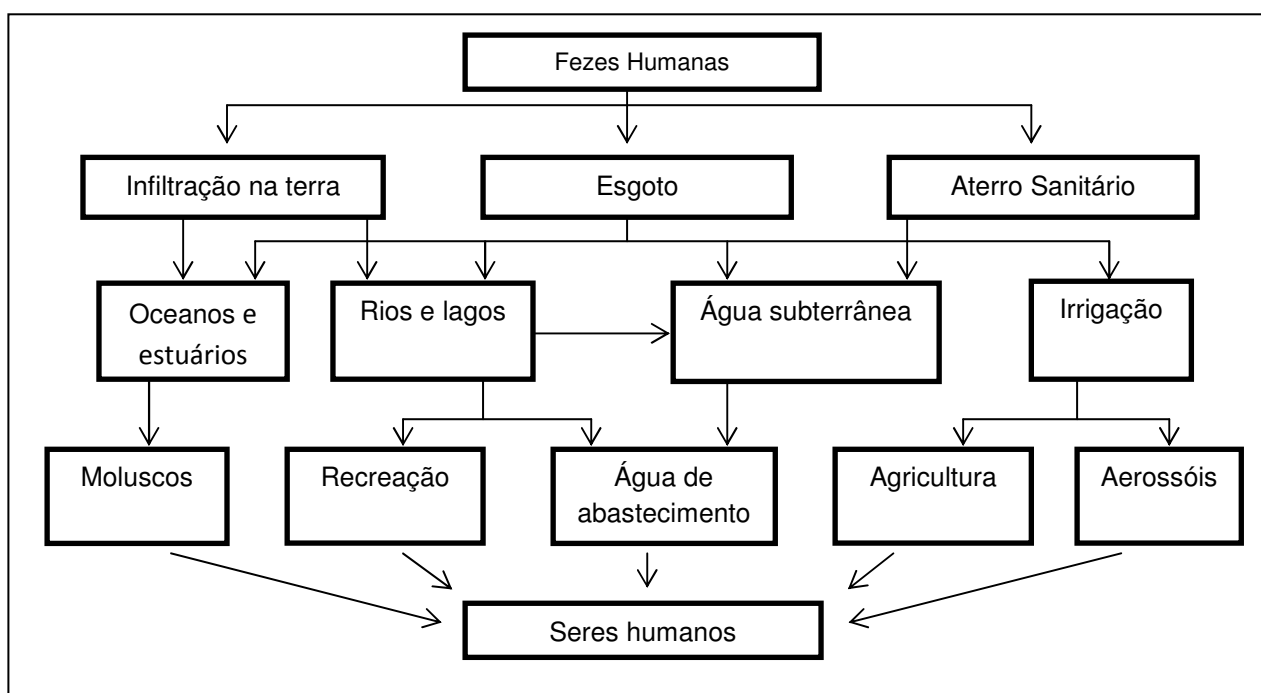


Figura 1: Rotas de transmissão de vírus entéricos no meio ambiente. Adaptado de Metcalf *et al.*, 1995.

Vírus entéricos são reconhecidamente causa de doença em humanos. Causam não apenas gastroenterite, como também meningites, doenças respiratórias e encefalite. Já foram relacionados até com doenças

crônicas, como miocardite e diabetes insulino-dependente. A importância dos vírus como agentes de doenças veiculadas pela água é diminuída pela falta de comunicação da ocorrência de gastroenterites leves e também por diagnósticos equivocados, limitando-se sua detecção em amostras ambientais (Fong & Lipp, 2005).

Os vírus entéricos presentes no trato gastrointestinal são excretados em grandes quantidades nas fezes dos indivíduos infectados e são capazes de contaminar águas e alimentos destinados ao consumo humano, pois possuem a capacidade de sobreviver em ambientes aquáticos e de permanecer infectantes por meses. Sabe-se que sua dose infectante é muito baixa, de 1 a 10 unidades infecciosas e sua capacidade infectante é de 10 a 10000 vezes maior que a das bactérias para o mesmo nível de exposição (Theron & Cloete, 2002).

Mais de 100 tipos diferentes de vírus entéricos já foram descritos na literatura, todos patogênicos aos humanos. Muitos, como o Norovirus e o Rotavirus, demonstraram ser relativamente resistentes ao cloro e já foram identificados, inclusive, em água potável (Theron & Cloete, 2002; Fong & Lipp, 2005).

Os grupos mais estudados de vírus entéricos pertencem às famílias *Picornaviridae* (poliovirus, enterovirus, coxsakievirus, vírus da hepatite A e echovirus), *Adenoviridae* (adenovirus), *Caliciviridae* (norovirus, calicivirus e astrovirus) e *Reoviridae* (reovirus e rotavirus). Os vírus têm sido sugeridos como uma ferramenta promissora no monitoramento da qualidade da água por possuírem especificidade de hospedeiro, o que auxilia na identificação da fonte

contaminante da água e na avaliação de risco de infecção. Adenovirus e Enterovirus são dois dos grupos de vírus de excreção entérica mais bem estudados como potenciais indicadores da qualidade da água (Fong & Lipp, 2005).

Diversos estudos relatam a presença de vírus entéricos em águas de abastecimento, águas de recreação, águas superficiais e esgoto. Um levantamento feito pela CETESB em 2011 detectou vírus entéricos em 85% das 60 amostras de águas brutas analisadas no estado de São Paulo, sendo que em 20% das amostras detectou-se a presença de Enterovirus e em 25%, a de Adenovirus (CETESB, 2011). Estudo feito nos EUA detectou, nos anos de 2007 e 2008, 48 surtos de doenças veiculadas pela água, sendo que dos 32 nos quais foram identificados os agentes biológicos, 5 foram causados por vírus e resultaram em 274 casos de doença (Brunkard *et al*, 2011). Na Europa, um levantamento feito entre os anos 1995-2000, apontou que surtos de gastroenterites virais estavam ligados à contaminação de alimentos e água, em uma proporção de 24% na Finlândia, 17% na Holanda, 14% na Eslovênia, 7% na Espanha, 7% na Inglaterra e em Gales (Lopman *et al*, 2003).

2.1.1 *Enterovirus (EV)*

Os Enterovirus são um grupo de vírus pertencente à família *Picornaviridae*, ordem *Picornavirales*, que contêm genoma formado por RNA de fita simples de polaridade positiva. Seus vírions são não-envelopados, com capsídeo icosaédrico que mede de 27 a 30 nm de diâmetro é formado por quatro proteínas estruturais, VP-1 a VP-4. A dificuldade na sua classificação

causou diversas modificações na sua taxonomia nos últimos anos, sendo a grande variabilidade da sua patogenicidade causada pelas diferenças na estrutura molecular das proteínas virais. A atual classificação proposta pelo *International Committee of Taxonomy of Viruses* (ICTV) divide este gênero em dez subgrupos: rinovírus humano A, B e C, enterovírus humano de A a D, enterovírus bovino, enterovírus de símio A e enterovírus suíno B, sendo os três últimos típicos de animais (Comerlato *et al*, 2011; ICTV, 2013).

Os Enterovirus podem causar uma grande quantidade de doenças em humanos, sendo que todas são transmitidas pela via fecal-oral. São eliminados por longos períodos através das fezes (um mês ou mais) e podem ser encontrados ao longo do ano em diversas partes do mundo, embora relatos de gastroenterites envolvendo este grupo sejam mais frequentes nos meses de verão, provavelmente pela maior exposição através do maior contato com água para atividades recreativas. Animais, como bovinos e suínos, também são infectados por EV. A infecção é frequentemente assintomática, mas pode causar desde diarreias a falhas no sistema reprodutivo e desordens neurológicas (Katayama *et al*, 2002; Fong&Lipp, 2005; Pusch *et al*, 2005; Tavares *et al.*, 2005; Comerlato *et al*, 2011; Wyn-Jones *et al*, 2011).

2.1.2 Adenovírus (AdV)

Os Adenovirus são vírus envelopados e com genoma formado por DNA de fita dupla, o que lhes confere maior resistência, já que uma única fita não-danificada de DNA pode servir de molde para reparos utilizando as enzimas celulares do hospedeiro. São até 60 vezes mais resistentes à radiação UV do que vírus de RNA, como EV e vírus da hepatite A. Os AdV humano do grupo F, tipos 40 e 41 têm sido associados às gastroenterites em crianças, enquanto que os tipos 2, 4 e 5 estão associados a doenças respiratórias agudas; independentemente do tropismo no hospedeiro todos estes grupos podem ser encontrados com frequência em águas contaminadas por fezes humanas. A sua transmissão ocorre pela via fecal-oral e também pela inalação de aerossóis. De forma recorrente, adenovírus associados a infecções do trato respiratório também são encontrados na água contaminada, pois ocorre sua excreção acidental pelo trato digestório. Adenovírus animais específicos também infectam uma grande variedade de espécies animais, como mamíferos, pássaros, répteis, anfíbios e peixes (Tavares *et al*, 2005; Fong & Lipp, 2005; Tong & Lu, 2011; Wyn-Jones *et al*, 2011; McQuaig *et al*, 2012; Vieira *et al*, 2012).

2.2 *Coliformes termotolerantes (CT)*

As bactérias pertencentes ao grupo coliformes são definidas como bacilos Gram-negativos, aeróbios e anaeróbios facultativos, não-formadores de esporos, capazes de se desenvolver em altas concentrações de sais biliares fermentadores da lactose e produtores de ácido ou aldeído em 24h a 35°C – 37°C. Os coliformes termotolerantes e *Escherichia coli* são uma parte do grupo dos coliformes com capacidade de fermentar a lactose em temperaturas mais altas, de 44°C-45°C (WHO, 2011).

A *E. coli* está presente em densidades elevadas nas fezes de humanos e animais e é raramente encontrada na ausência de poluição fecal, enquanto que as outras espécies de CT podem ter origem ambiental. Sendo assim, a *E. coli* é considerada o indicador ideal de contaminação fecal, mas são igualmente aceitáveis para esse fim os coliformes termotolerantes (WHO, 2011).

2.3 *Coliformes termotolerantes (CT) como indicadores de balneabilidade*

Tradicionalmente, a qualidade microbiológica da água é monitorada através da presença de bactérias do grupo dos CT, os quais são aceitos como um indicativo da contaminação de origem fecal da água (Pusch *et al*, 2005). Atualmente, sabe-se que esta avaliação possui deficiências, pois protozoários e vírus podem estar presentes na água sem que bactérias do grupo coliforme sejam detectadas (Strauba & Chandlerb, 2003; Fong & Lipp, 2005).

A avaliação da balneabilidade das águas brasileiras é regulada pelo Conselho Nacional de Meio Ambiente (CONAMA) através da Resolução n° 274, de 29 de novembro de 2000, que exige o monitoramento da densidade de *E. coli*, representante do grupo dos coliformes termotolerantes, como indicador do grau de contaminação de origem fecal das águas, classificando-as em próprias ou impróprias para uso de contato primário (CONAMA, Resolução n°274, 2000). Esta resolução determina que são aceitáveis para banho águas com até 2500 coliformes termotolerantes ou 2000 *E. coli* por 100 mL de amostra de água coletada.

2.4 Detecção de vírus em águas de recreação

A ocorrência de contaminação de águas de recreação por vírus entéricos é uma preocupação mundial, tendo em vista que a utilização apenas do parâmetro coliformes termotolerantes ou *E. coli* como critério de avaliação da qualidade da água não é capaz de prever a presença de outros patógenos, como os vírus (Tong & Lu, 2011).

Atividades recreativas e esportes aquáticos expõem os seres humanos a doenças transmitidas pela água. Estudos feitos em praias de água salgada e doce demonstram um aumento significativo de doenças gastrointestinais, respiratórias, de ouvido, oftálmicas e de pele em pessoas envolvidas em atividades recreativas aquáticas (Sinclair *et al*, 2009).

Diversas pesquisas demonstram a baixa correlação entre os níveis de coliformes termotolerantes ou *E. coli* e a presença de vírus entéricos em

águas destinadas a recreação primária. Em um estudo feito na Lagoa Rodrigo de Freitas, na cidade do Rio de Janeiro, vírus entéricos, como *Adenovirus*, *Rotavirus* e *Norovirus*, foram encontrados em 50% das amostras classificadas como água apropriada para banho, considerando apenas o parâmetro *E. coli*. Para detecção e quantificação viral foram utilizadas PCR e PCR em tempo real (Vieira *et al*, 2012). Em um estudo realizado em Florianópolis em 2010 foram analisadas 84 amostras de água (água do mar, de lagoa, água potável clorada, esgoto urbano, córrego poluído e água potável não-tratada). Para detecção das cópias genômicas de Adenovírus, vírus da Hepatite A e Rotavírus foram utilizadas as técnicas de PCR e de PCR – Integrado com Cultura Celular. *Adenovirus* foi detectado em 64,2% das amostras, *Rotavirus* em 19% e o vírus da Hepatite A em 8,3% (Rigotto *et al*, 2010). Um estudo feito nos arroios que cruzam a cidade de Manaus (Amazônia), no qual foram coletadas 52 amostras, detectou Torque Teno Vírus em 37% das amostras por PCR convencional e em 92% das amostras por PCR *real time* (Diniz-Mendes *et al*, 2008). Outro estudo feito na Bacia do Rio Amazonas detectou, por PCR *real time*, 92% de positividade para o vírus da Hepatite A nas 52 amostras coletadas (de Paula *et al*, 2007).

Na Califórnia, EUA, estudo feito por McQuaig *et al* (2012) em duas praias marinhas demonstrou que *Adenovirus* e outros micro-organismos marcadores de esgoto humano estavam presentes em amostras que atendiam aos critérios de classificação da legislação vigente, a qual exige apenas a análise de bactérias indicadoras fecais. Neste estudo a detecção viral e de bacterióides foi feito através de PCR. Wong *et al* (2009) encontraram

Adenovirus, *Enterovirus* e *Rotavirus* nas águas de duas praias do Lago Michigan nos Grandes Lagos, demonstrando que a utilização apenas de indicadores fecais bacteriológicos como a *E. coli* não é suficiente para predizer a presença de vírus de origem fecal. Neste estudo foi utilizada a cultura celular com células animais da linhagem BMG, quando ocorria desenvolvimento de efeito citopático, era feita uma confirmação através de uma segunda passagem por cultura celular. Nas amostras com presença de vírus utilizou-se a PCR e PCR em tempo real para identificação dos vírus.

Sinclair *et al* (2009) fizeram uma revisão dos casos de surtos de gastroenterites virais associados a águas de recreação no mundo todo. *Norovirus* foi o mais associado a surtos, responsável por 46% dos casos publicados, seguido de *Adenovirus* (24%), *Echovirus* (18%), vírus da Hepatite A (7%) e *Coxsackievirus* (5%). A maioria dos surtos ocorreu a partir do contato com água de piscinas (49%) e de lagos e lagoas (40%).

2.5 Região hidrográfica do Guaíba

A região hidrográfica do Guaíba banha áreas urbanas de significativa importância para o Estado do Rio Grande do Sul (RS) (Figura 3). Essa bacia abrange uma área de 84.763,54 Km², correspondendo a 30% da área total do RS. A região metropolitana de Porto Alegre e uma faixa de municípios em direção à Caxias do Sul constitui o eixo mais urbanizado da bacia, formado por 251 municípios, com população de 5.869.265 habitantes (FEPAM, 2013).

Nove bacias constituem a região hidrográfica do Guaíba. Os rios Gravataí, Sinos, Caí e Jacuí desembocam no delta do Jacuí, formando o lago Guaíba que banha os municípios de Porto Alegre, Eldorado do Sul, Guaíba, Barra do Ribeiro e Viamão. A densificação e o crescimento urbano nestas cidades contribuíram para o comprometimento de áreas tradicionais de recreação e lazer da população junto ao lago Guaíba, especialmente pelo lançamento inadequado de esgoto doméstico em suas águas (Bendati & Maizonave, 1997).



Figura 2: Localização da cidade de Porto Alegre – RS – Brasil. Fonte: Wikipedia.

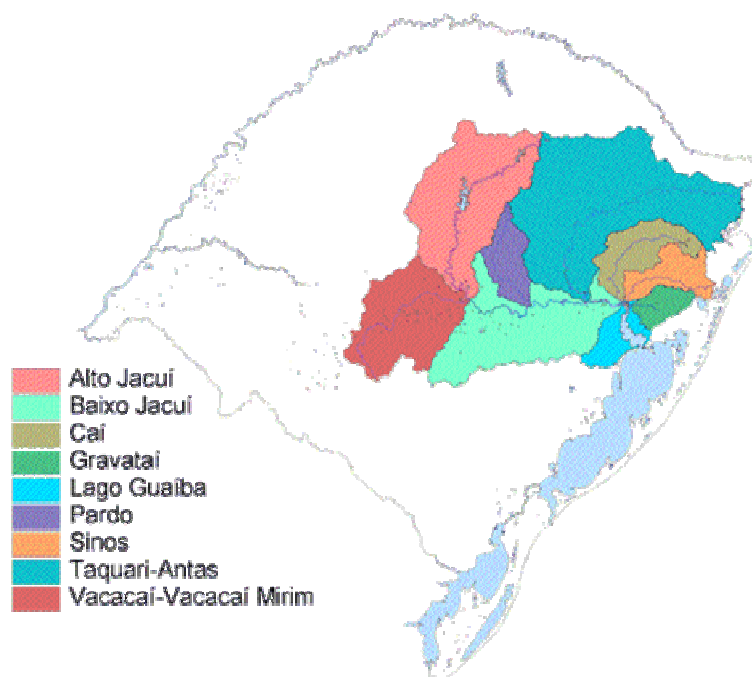


Figura 3: Região Hidrográfica do Guaíba e suas nove bacias. Fonte: <http://www.proguaiba.rs.gov.br/bacias.htm>

No início do século XIX foram implementados os primeiros sistemas de coleta de esgoto sanitário da cidade de Porto Alegre. Por muitos anos, todo o esgoto coletado na cidade foi lançado no lago Guaíba “in natura”. Nos anos 70 o DMAE iniciou um programa de avaliação da qualidade do lago Guaíba, iniciando um longo processo de conscientização da necessidade de preservar a água do lago para fonte de abastecimento da região, recreação e outros usos menos nobres. Apenas nos anos 90 foram efetivadas ações compreendendo a coleta e o tratamento de esgotos pelo processo de lagoas de estabilização, os quais garantem naturalmente a remoção de coliformes termotolerantes e patogênicos sem a necessidade de aplicação de qualquer agente químico (Prefeitura de Porto Alegre, 2010). Estudo feito por Oliveira *et al* (2006) comprovou a eficácia desse sistema de tratamento, verificando a redução nas

cargas microbianas durante o processo de tratamento do esgoto coletado na estação de tratamento Ipanema. Outro estudo conduzido na mesma estação de tratamento por Bechtluft *et al* (2008) constatou uma redução no número de bactérias totais e cepas resistentes a antimicrobianos no efluente, comparado ao afluente da estação.

Atualmente existem 9 estações de tratamento de esgoto na cidade de Porto Alegre e mais duas em fase de construção, porém, até 2002, apenas 27% do volume de esgoto produzido pela população era tratado (DMAE, 2012). Em 2007 a Prefeitura de Porto Alegre deu início ao Projeto Integrado Socioambiental, com o objetivo de ampliar a capacidade de tratamento de esgoto da cidade, contribuindo para a retomada da balneabilidade das águas do Guaíba e para a melhora no sistema de abastecimento de água. Este projeto prevê, até 2025, a ampliação da capacidade de tratamento do esgoto de Porto Alegre para 99% (DMAE, 2013).

As praias do Lami e de Ipanema, localizadas na zona sul da cidade de Porto Alegre, são formadas pelas águas do Lago Guaíba e são tradicionais pontos de lazer e recreação da população. A praia de Ipanema é considerada imprópria para banho pelo Departamento Municipal de Água e Esgotos de Porto Alegre por apresentar índices de contagem bacteriana muito acima dos permitidos pela legislação. A praia do Lami tem três pontos monitorados semanalmente durante os meses do verão e sua balneabilidade é variável (DMAE, 2011).



Figura 4: Baía do Lago Guaíba. As setas indicam as praias de 1 - Ipanema e 2 - Lami. Fonte: Google Earth

3. Materiais e Métodos

3.1 Amostragem

As amostras foram obtidas de três diferentes pontos nas praias de Ipanema e do Lami (Figuras 5 e 6). Os pontos foram escolhidos aleatoriamente. As coletas foram realizadas mensalmente por seis meses durante o período de verão – de novembro de 2011 a abril de 2012. Foram coletados, de forma asséptica e em frascos de vidro esterilizados, 500mL de amostra para análise virológica e 200mL para análise bacteriológica. A amostragem foi feita nas margens do lago Guaíba, em uma profundidade aproximada de 30cm. As amostras foram mantidas refrigeradas até o momento da análise.



Figura 5: Localização dos pontos de coleta na praia de Ipanema em Porto Alegre – RS, Brasil. Fonte: Google Earth, 2013.

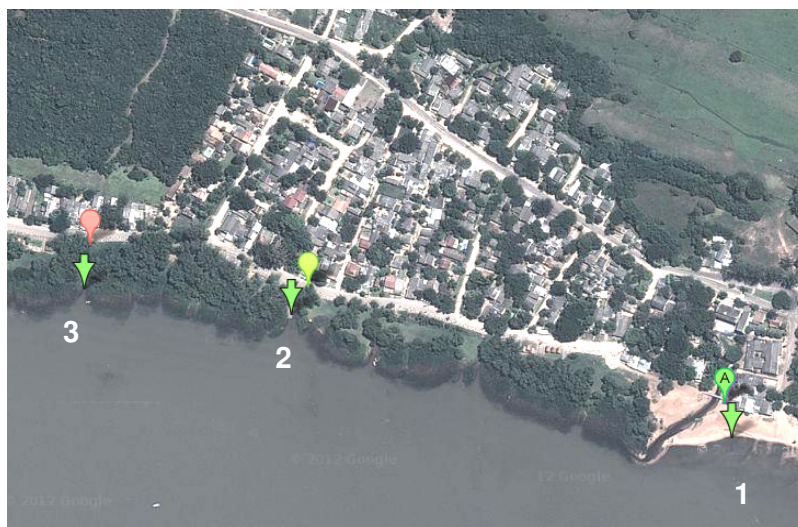


Figura 6: Localização dos pontos de coleta na praia do Lami em Porto Alegre – RS, Brasil. Fonte: Google Earth, 2013.

Tabela 1: Coordenadas geográficas dos pontos onde foram coletadas as amostras.

| Praia | Ponto | Coordenadas |
|---------|---------|-----------------------------------|
| Ipanema | Ponto 1 | -30° 8' 30.85" -51° 13' 38.13" |
| | Ponto 2 | -30° 8' 27.07" -51° 13' 39.40" |
| | Ponto 3 | -30° 8' 22.73" -51° 13' 42.32" |
| Lami | Ponto 1 | -30° 14' 34.04" -51° 4' 44.55" |
| | Ponto 2 | -30° 14' 30.15" -51° 5' 0.07" |
| | Ponto 3 | -30° 14' 29.35" -51° 5' 7.40" |

3.2 Concentração das amostras

Considerando que as partículas virais encontram-se extremamente diluídas nas amostras ambientais, é necessário realizar a concentração das amostras. Para tanto, foi utilizado, com algumas modificações, protocolo descrito anteriormente por Katayama *et al* (2002) no qual, após adição de 0,6 g de $MgCl_2$ e acidificação com H_2SO_4 até pH 4,5 a 5,5, 500 mL de amostra, são

filtrados, com auxílio de uma bomba de vácuo, através de uma membrana de celulose tipo HA com poros de 0,45 µm, carregada negativamente (*Millipore*, MA, USA). Para desacoplar os cátions, a membrana foi lavada com 87,5 mL de H₂SO₄ 0,5 mM. A seguir procedeu-se a eluição, com passagem de 2,5 mL de NaOH 1mM pela membrana. O filtrado foi então neutralizado com 12,5 µL de H₂SO₄ 50 mM e 12,5 µL de tampão Tris-EDTA 100 X concentrado. As amostras foram aliqüotadas e congeladas a -70°C até seu processamento.

3.3 Extração e Detecção de Ácidos Nucléicos Virais

Para extração dos ácidos nucleicos virais foi utilizado o kit comercial RTP DNA/RNA Virus Mini Kit (*Invitek*), seguindo as instruções do fabricante e os ácidos nucleicos extraídos foram estocados a – 80 °C até o processamento.

Para detecção de EV foi realizada a síntese de cDNA antes da amplificação, através do kit comercial High Capacity cDNA Reverse Transcription™ (*Applied Biosciences™*, EUA), com o auxílio de oligonucleotídeos aleatórios e inibidor de RNase (*Applied Biosciences™*, EUA), seguindo as instruções do fabricante.

Para detecção viral foram realizadas reações em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR) com kit comercial (*Platinum® SYBR® Green qPCR Super Mix-UDG–Invitrogen*, USA), seguindo metodologia recomendada pelo fabricante. Para 25 µL de volume de reação, foram utilizados 5µL de ácido nucleico extraído, 1 µL (20 pM) de cada iniciador, 12,5 µL de supermix (SYBR® Green qPCR Platinum® Taq DNA polimerase, SYBR® Green Dye 1,2U) Tris-HCl, KCl, 6mM MgCl₂, 400 µM dGTP, 400 µM dATP, 400 µM dCTP, 800 µM

dUTP, uracil DNA glicosilase (UDG) e 5,5 μL de água destilada livre de RNAses (MilliQ, RNase/ DNase free water system). Para a quantificação das partículas virais por qPCR, foram utilizados controles positivos de uma amostra padrão de adenovírus 5 (AdV-5) e de EV (amostras padrão cultivadas no Laboratório de Microbiologia Molecular da Universidade Feevale), com títulos em doses infectantes (DIs) conhecidos, com os vírus diluídos de forma seriada variando do patógeno puro (título $10^{4,75}$ TCID₅₀/50 μL) ao inferior a 10 doses infectantes ($10^{0,75}$ TCID₅₀/50 μL). A partir da comparação em qPCR foi verificada a quantificação de cópias equivalentes em uma DI, e a partir disso calculada a quantidade de partículas virais em cada amostra. A qPCR foi realizada usando o aparelho iQ5™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad Laboratories) com o software iQ™5 Optical System em sua versão 2.1. A sensibilidade analítica das reações é equivalente a 1250 a 12500 cópias de DNA para 500 μL de amostra, sendo a sensibilidade diagnóstica de 96% e a especificidade de 100%. A reprodutibilidade é alta, considerando-se que se admite apenas reações dentro dos parâmetros de E=90-110%, slope na faixa de 3,2 e R² = 0,98-0,99.

As condições de reação e os oligonucleotídeos utilizados na amplificação dos ácidos nucleicos virais são mostrados na Tabela 2.

Tabela 2: Oligonucleotídeos e condições para amplificação dos fragmentos genômicos de AdV e EV por qPCR

| Vírus | Gene Alvo | Oligonucleotídeo | | | Posição | Temperatura de Anelamento | Amplicon |
|-------|-----------|------------------|-------------------------------|------------|-----------|---------------------------|----------|
| | | Nome | Sequência | Polaridade | | | |
| AdV | Hexon | VTB2 – HadVCr | 5'-GAGACGTA CTT CAGCCTGAAT-3' | Senso | 106-126* | 55°C | 101pb |
| | | VTB2-HAdVCr | 5'-GATGAACCGCAGCGTCAA-3' | Reverso | 190-207* | | |
| EV | 5'UTR | ENT-F1 | 5'-CCTCCGGCCCCTGAATG-3' | Senso | 443-459** | 56°C | 116pb |
| | | ENT-R2 | 5'-ACACGGACACCCAAAGTAG-3' | Reverso | 541-559 | | |

*Sequências de oligonucleotídeos descritas por Wolf *et al.* (2010)

** Sequências modificadas a partir dos oligonucleotídeos descritos por Tsai *et al.* (1993)

3.4 Coliformes termotolerantes

O número mais provável (NMP) de coliformes termotolerantes foi determinado em todas as amostras coletadas. Foi utilizado o método de tubos múltiplos com meio de cultura A-1, conforme procedimento descrito por Rice *et al.*, 2012. Para determinação NMP por 100mL de amostra, utilizou-se a tabela de NMP descrita por Rice *et al.*, 2012 (Anexo I).

As águas do rio Guaíba são monitoradas durante os meses de verão pelo DMAE. A praia de Ipanema é considerada imprópria para banho e a praia do Lami é monitorada semanalmente, através da análise de três pontos ao longo da orla, nos quais são determinadas as concentrações de *Escherichia coli* (Bendati & Maizonave, 1997).

3.5 Dados meteorológicos

Foram coletados os dados meteorológicos referentes à quinzena anterior às coletas e ao período de novembro de 2011 a abril de 2012,

utilizando-se como fonte o INMET - 8º Distrito de Meteorologia, Porto Alegre – RS.

4. Resultados

Em todas as amostras foram determinadas a presença e a quantificação de Adenovirus e Enterovirus, assim como de coliformes termotolerantes. Os resultados obtidos estão nas tabelas 3 e 4. A tabela 4 também contém os resultados de *E. coli* divulgados pelo DMAE. Considerou-se significativa quando houve diferença igual ou superior a 2 Logs entre as concentrações.

Tabela 3: Quantificação de cópias genômicas/L de Adenovirus e Enterovirus e do NMP/100 mL de coliformes termotolerantes nas amostras de água da praia de Ipanema – Porto Alegre – RS

| Coletas | | Ipanema | | |
|------------------|-----|----------------------|----------------------|----------------------|
| | | 1 | 2 | 3 |
| Novembro | AdV | 2,53x10 ² | ND | 1,39x10 ³ |
| | EV | ND | ND | ND |
| | CT | 110 | 22 | 220 |
| Dezembro | AdV | 7,75x10 ² | 4,08x10 ⁴ | 1,51x10 ³ |
| | EV | ND | ND | ND |
| | CT | 23 | 13 | 23 |
| Janeiro | AdV | ND | ND | 1,35x10 ² |
| | EV | ND | ND | ND |
| | CT | 70 | 50 | 23 |
| Fevereiro | AdV | 3,23x10 ³ | ND | 1,62x10 ³ |
| | EV | ND | 1,21x10 ⁴ | ND |
| | CT | 13 | 2 | 4 |
| Março | AdV | 3,06x10 ³ | 1,44x10 ⁴ | 2,03x10 ⁴ |
| | EV | ND | ND | ND |
| | CT | 170 | 2 | 2 |
| Abril | AdV | 2,05x10 ⁴ | 1,82x10 ⁴ | 1,61x10 ⁴ |
| | EV | ND | ND | ND |
| | CT | 8 | 4 | 240 |

AdV = Adenovirus (cópias/L) EV = Enterovirus (cópias/L) CT = coliformes termotolerantes (NMP/100mL) ND = não detectado.

Tabela 4: Quantificação de cópias genômicas/L de Adenovirus e Enterovirus e do NMP/100 mL de coliformes termotolerantes nas amostras de água da praia de Lami – Porto Alegre – RS

| | | Lami | | |
|------------------|------|--------------------|--------------------|--------------------|
| | | 1 | 2 | 3 |
| Novembro | AdV | ND | $3,9 \times 10^3$ | $5,31 \times 10^2$ |
| | EV | ND | $4,93 \times 10^4$ | ND |
| | CT | 50 | 33 | 13 |
| | DMAE | 23 | 38 | 34 |
| Dezembro | AdV | ND | $9,04 \times 10^3$ | $3,65 \times 10^2$ |
| | EV | ND | ND | $5,92 \times 10^3$ |
| | CT | 8 | 2 | 2 |
| | DMAE | 3 | 23 | 16 |
| Janeiro | AdV | ND | $8,72 \times 10^3$ | $3,75 \times 10^3$ |
| | EV | ND | ND | $1,35 \times 10^4$ |
| | CT | 8 | 23 | 13 |
| | DMAE | 110 | 160 | 77 |
| Fevereiro | AdV | $5,46 \times 10^3$ | $4,44 \times 10^3$ | $2,16 \times 10^3$ |
| | EV | $1,81 \times 10^4$ | $1,03 \times 10^4$ | ND |
| | CT | 2 | 23 | 2 |
| | DMAE | 41 | 20 | 17 |
| Março | AdV | $1,36 \times 10^3$ | $1,58 \times 10^3$ | $7,18 \times 10^2$ |
| | EV | $1,93 \times 10^4$ | ND | ND |
| | CT | 2 | 2 | 2 |
| | DMAE | 23 | 16 | 32 |
| Abril | AdV | $6,94 \times 10^3$ | $3,54 \times 10^3$ | ND |
| | EV | ND | ND | $1,91 \times 10^4$ |
| | CT | 170 | 23 | 30 |
| | DMAE | - | - | - |

AdV = Adenovirus (cópias/L) EV = Enterovirus (cópias/L) CT = coliformes termotolerantes (NMP/100mL) ND = não detectado.

Em 30 (83,34%) das 36 amostras coletadas foi detectada a presença de cópias de genomas virais. AdV foi detectado em 28 (77,78%) amostras em concentrações que variaram de $1,35 \times 10^2$ a $4,08 \times 10^4$, enquanto EV foi detectado apenas em 8 amostras (22,22%) em concentrações que variaram de $5,92 \times 10^3$ a $4,93 \times 10^4$. Somente na praia de Ipanema, AdV foi detectado em 14 amostras (77,78%) e EV em 1 amostra (5,56%), totalizando 15 amostras

contaminadas (83,34%). Na praia do Lami, 14 amostras (77,78%) demonstraram a presença de AdV e 7 amostras (38,89%), a presença de EV, totalizando 15 amostras contaminadas (83,34%). O maior número de cópias virais de AdV foi detectado no mês de dezembro na praia de Ipanema ($4,08 \times 10^4$), enquanto que o maior número de cópias virais de EV foi detectado no mês de novembro na praia do Lami ($4,93 \times 10^4$).

Na praia de Ipanema, em relação ao AdV, no ponto 1 de coleta houve pequenas variações no número de cópias virais no período de 6 meses, com exceção do mês de abril com o número um pouco maior e no mês de janeiro onde não houve detecção. No ponto 2 houve pouca oscilação nas concentrações de AdV, com exceção dos meses de novembro, janeiro e fevereiro, onde não foram detectados vírus. Já em relação ao EV, somente no ponto 2 do mês de fevereiro foi detectada a sua presença. No ponto 3 AdV foi detectado em todos os meses e EV não foi detectado em nenhuma amostra.

Em todos os pontos amostrados da praia de Ipanema foram detectados CT. No ponto 1, os meses de maior detecção foram novembro e março. O ponto 2 demonstrou pequenas variações durante os meses analisados, sendo que em janeiro ocorreu a maior detecção neste local. O ponto 3 foi o que demonstrou maiores índices de detecção entre todos os pontos da praia de Ipanema, fato que ocorreu nos meses de novembro e abril.

Na praia do Lami, em relação ao AdV, no ponto 1 de coleta não foram detectados genomas virais nos meses de novembro, dezembro e janeiro, diferentemente do que aconteceu nos outros três meses, onde o número de cópias virais foi na ordem de 10^3 . Já o EV foi detectado somente nos meses de

fevereiro e março, na ordem de 10^3 . No ponto 2 o AdV foi detectado nas amostras de todos os meses, em geral com título de 10^3 . Por outro lado, o EV foi detectado somente nos meses de novembro e fevereiro (10^4). No ponto 3, o AdV foi detectado em todos os meses, com exceção de abril, com títulos mais baixos. Em relação ao EV, houve detecção nos meses de dezembro, janeiro e abril com títulos na ordem de 10^3 ou 10^4 .

Na praia do Lami, assim como na praia de Ipanema, em todos os pontos amostrados houve detecção de CT. No ponto 1 a maior concentração ocorreu no mês de abril, a qual foi a maior detectada na praia do Lami durante os meses analisados. Em todos os outros meses as detecções foram baixas. No ponto 2 e no ponto 3, houve pouca variação nas concentrações. Em relação aos dados de *Escherichia coli* obtidos pelo DMAE, destaca-se o mês de janeiro, no qual houve detecção das maiores concentrações de *E. coli*, sendo este o mês de maior precipitação de chuvas.

Na Tabela 5 são mostrados os dados meteorológicos referentes à quinzena anterior às coletas e ao período de novembro de 2011 a abril de 2012. Durante os seis meses do estudo, apenas no mês de janeiro ocorreu pico de precipitação.

Tabela 5: Dados meteorológicos da quinzena anterior às coletas, de novembro de 2011 a abril de 2012. Fonte: INMET – 8º Distrito de Meteorologia, Porto Alegre - RS

| | Novembro | Dezembro | Janeiro | Fevereiro | Março | Abril |
|-------------------------|----------|----------|---------|-----------|-------|-------|
| Precipitação (mm) | 6,5 | 18,7 | 110,2 | 27,70 | 4,8 | 25,10 |
| Temperatura Máxima (°C) | 29,7 | 30,8 | 25,1 | 31,9 | 31,1 | 26,5 |

Temperatura Mínima (°C) 17,8 18,2 22,2 18,1 17,2 18,3

Umidade Relativa (%) 72 86 79 68 78 92

As Figuras 7, 8 e 9 apresentam resultados comparando cópias genômicas/L de Adenovirus e Enterovirus e do NMP/100 mL de coliformes termotolerantes com a precipitação pluviométrica nas amostras coletadas nos três pontos da praia de Ipanema.

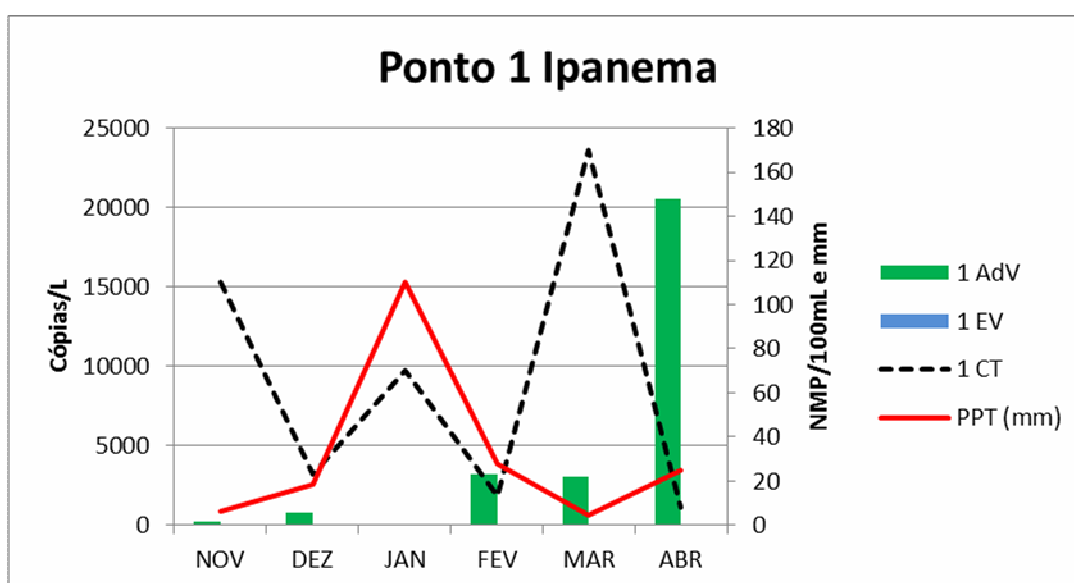


Figura 7: Resultados comparando cópias genômicas/L de Adenovirus e Enterovirus e do NMP/100 mL de coliformes termotolerantes com a precipitação pluviométrica (PPT) nas amostras coletadas no ponto 1 da praia de Ipanema.

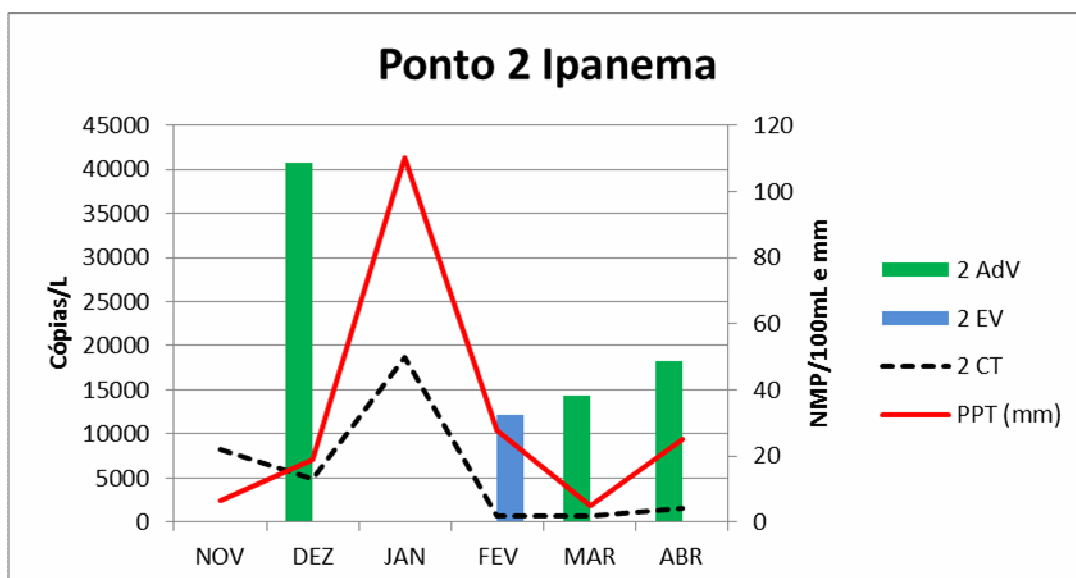


Figura 8: Resultados comparando cópias genômicas/L de Adenovirus e Enterovirus e do NMP/100 mL de coliformes termotolerantes com a precipitação pluviométrica (PPT) nas amostras coletadas no ponto 2 da praia de Ipanema.

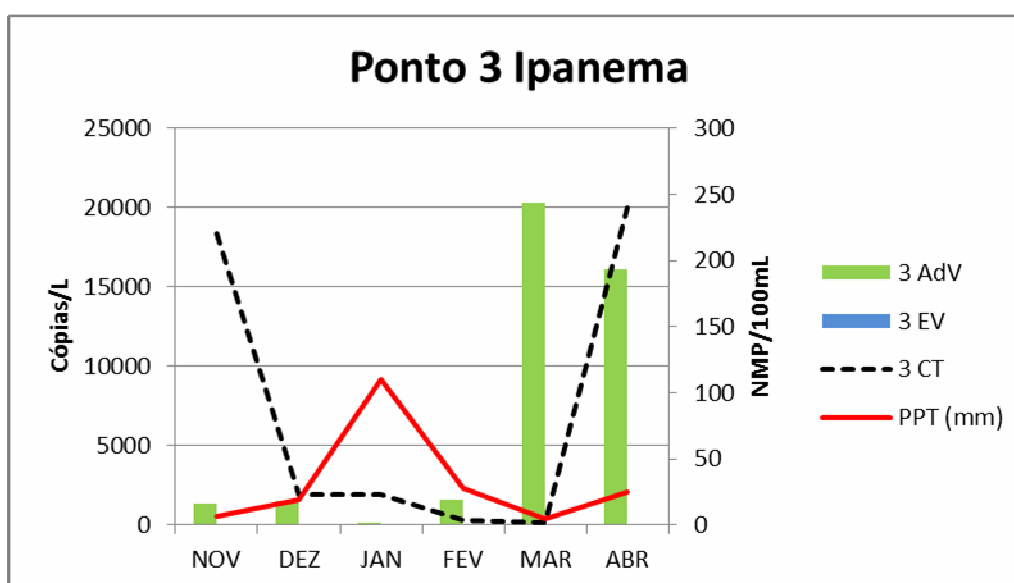


Figura 9: Resultados comparando cópias genômicas/L de Adenovirus e Enterovirus e do NMP/100 mL de coliformes termotolerantes com a precipitação pluviométrica (PPT) nas amostras coletadas no ponto 3 da praia de Ipanema.

Analisando-se as figuras 7, 8 e 9, pode-se observar que, na praia de Ipanema, o ponto com maior detecção de genomas virais foi o 3. Neste local foi detectado AdV em todas as amostras, porém em nenhuma delas foi detectado EV. As taxas de CT foram mais elevadas nos meses de novembro e de abril e

menos elevadas nos meses de fevereiro e março. O maior número de cópias de genomas virais de AdV neste ponto foi detectado no mês de março ($2,03 \times 10^4$) e menor número no mês de janeiro ($1,35 \times 10^2$).

As Figuras 10, 11 e 12 apresentam resultados comparando cópias genômicas/L de Adenovirus e Enterovirus e do NMP/100 mL de coliformes termotolerantes com a precipitação pluviométrica nas amostras coletadas nos três pontos da praia do Lami.

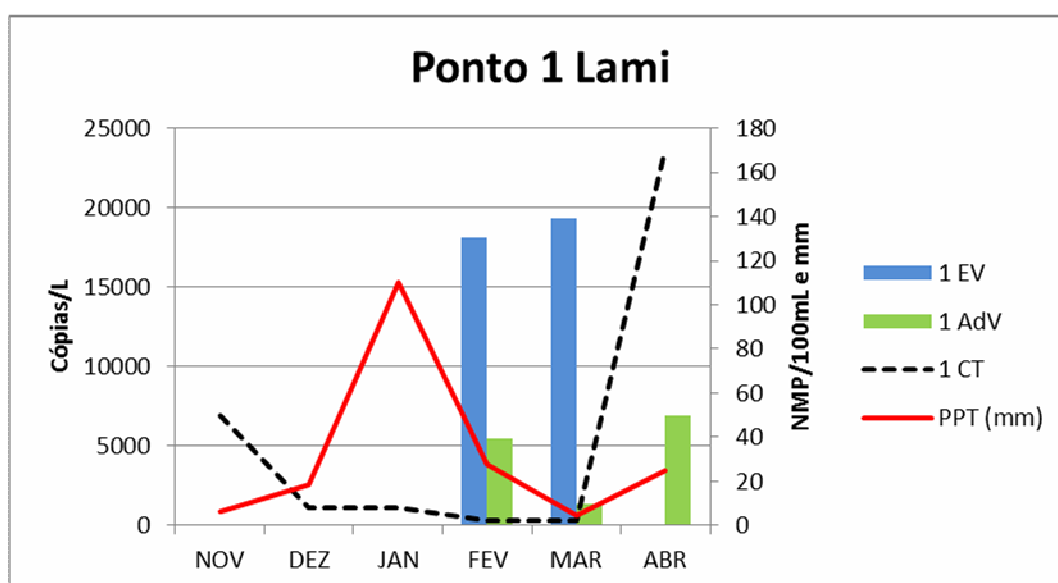


Figura 10: Resultados comparando cópias genômicas/L de Adenovirus e Enterovirus e do NMP/100 mL de coliformes termotolerantes com a precipitação pluviométrica (PPT) nas amostras coletadas no ponto 1 da praia do Lami.

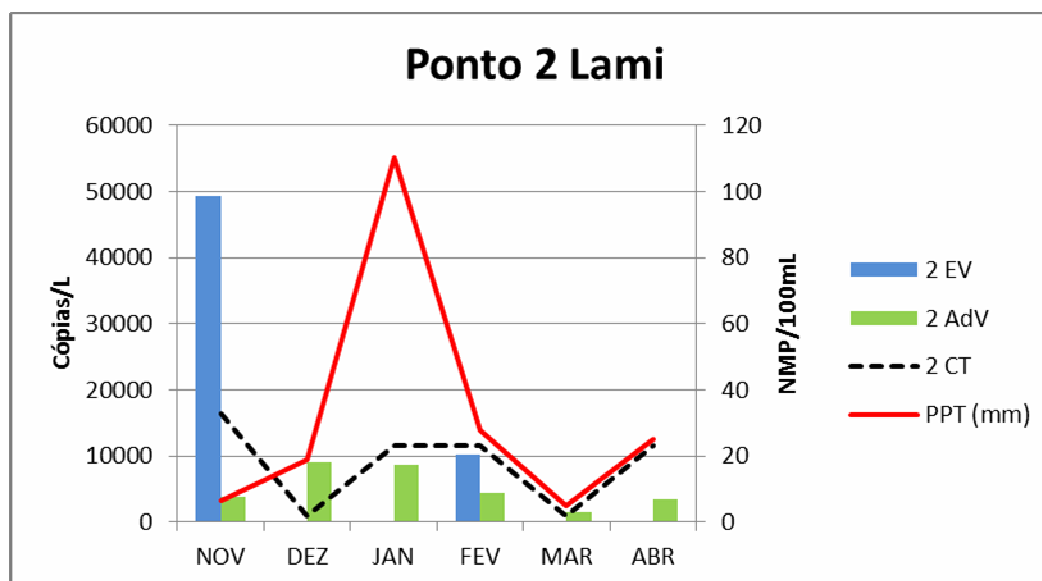


Figura 11: Resultados comparando cópias genômicas/L de Adenovirus e Enterovirus e do NMP/100 mL de coliformes termotolerantes com a precipitação pluviométrica (PPT) nas amostras coletadas no ponto 2 da praia do Lami.

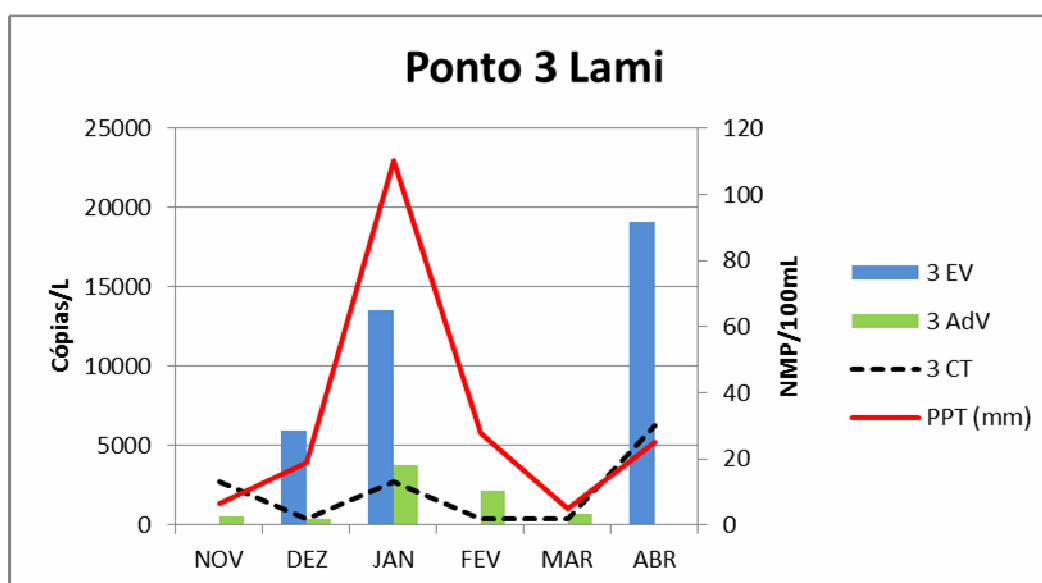


Figura 12: Resultados comparando cópias genômicas/L de Adenovirus e Enterovirus e do NMP/100 mL de coliformes termotolerantes com a precipitação pluviométrica (PPT) nas amostras coletadas no ponto 3 da praia do Lami.

Analisando-se as figuras 10, 11 e 12, pode-se observar que na praia do Lami, os pontos 2 e 3 obtiveram o mesmo número de detecções de genomas virais: 8. No ponto 2, AdV foi detectado nas 6 amostras coletadas e EV em 2. Este ponto apresentou, no mês de novembro, a maior taxa de cópias

genômicas de EV por litro de amostra de todas as amostras coletadas neste estudo: $4,9 \times 10^4$. No mês de fevereiro, foram detectadas $1,03 \times 10^4$ cópias genômicas. A maior taxa de detecção de genomas de AdV ocorreu no mês de dezembro ($9,04 \times 10^3$), e a menor, no mês de março ($1,5 \times 10^3$). A presença de CT variou de 2 a 33 NMP/100mL neste ponto. A menor taxa ocorreu no mês de março e a maior, em novembro.

No ponto 3 da praia do Lami houve 8 detecções de genomas virais. Em 5 amostras foi detectada a presença de genomas de AdV e em 3, a presença de genomas de EV. A maior taxa de detecção de AdV ocorreu no mês de janeiro ($3,75 \times 10^3$) e a menor, no mês de abril, no qual não foi detectado genoma de AdV, apenas EV. No mês de abril foi detectada a maior taxa de genoma de EV deste ponto: $1,91 \times 10^4$.

Durante os meses avaliados ocorreu apenas um período de maior precipitação de chuva, o que torna difícil avaliar a influência das chuvas sobre os resultados obtidos.

5. Discussão

As praias do Lami e de Ipanema são importantes áreas de lazer para a população da cidade de Porto Alegre. O lançamento inadequado de esgoto nestas áreas contribuiu para o comprometimento da qualidade da água. Neste estudo foi feita a detecção de genomas virais de origem fecal nas águas destas duas praias, a fim de comparar com os padrões atuais de balneabilidade.

A qualidade da água do lago Guaíba é monitorada durante os meses de verão pelo DMAE. A praia de Ipanema é considerada imprópria para banho e a praia do Lami é monitorada semanalmente, através da análise de três pontos ao longo da orla, nos quais são determinadas as concentrações de *Escherichia coli* (Bendati & Maizonave, 1997; DMAE 2011). O atual sistema de classificação (Resolução n°274/2000 do CONAMA) avalia apenas a quantidade de bactérias do grupo coliformes termotolerantes ou *E. coli* e considera impróprias para banho águas com mais de 2500 coliformes termotolerantes ou 2000 *E. coli* por 100 mL de amostra de água coletada

Conforme a Resolução n°274/2000 do CONAMA, os resultados encontrados no presente trabalho para a análise de CT indicaram que todos os locais amostrados estavam próprios para banho e recreação. Estes resultados estão de acordo com os divulgados pelo Departamento Municipal de Águas e Esgotos (DMAE, 2011), responsável pelo monitoramento da qualidade das águas das praias de Porto Alegre. Embora as quantidades de CT tenham sido baixas, a pesquisa de genomas de AdV e EV demonstrou alta positividade (83,34%), o que demonstra a baixa correlação entre os micro-organismos

utilizados como marcadores fecais e a presença de vírus potencialmente infectantes, indicando a possibilidade de risco à saúde pública, já que estas áreas são amplamente utilizadas pela população para recreação nos meses de verão. Nossos dados corroboram outros estudos, os quais também demonstraram a falta de associação entre as bactérias indicadoras fecais e a contaminação viral em amostras de água superficial (Skraber *et al*, 2004, Pusch *et al*, 2005, Carducci *et a.*, 2008). As águas para recreação não são submetidas a tratamento e são consideradas aceitáveis para atividades recreativas mesmo apresentando certos níveis de bactérias fecais, entretanto a presença de vírus representa um problema para saúde pública que não pode ser desconsiderado (Vieira *et al*, 2012).

Genoma de AdV foi encontrado em maior frequência que de EV entre as amostras analisadas, sendo detectado em 77,78% das amostras. Este fato pode ser justificado pela sua maior resistência no ambiente por ser um vírus com genoma formado por DNA de dupla fita, o qual lhe confere maior estabilidade em condições adversas (Wyn-Jones *et al*, 2011), mas essa variação também se dá conforme o local e amostras analisadas.

Em trabalho realizado em Porto Alegre – RS no Arroio Dilúvio, córrego que deságua no lago Guaíba, por Vechia *et al* (2012), através da PCR convencional, AdV foi detectado em 21,43% das amostras analisadas, enquanto que EV foi detectado em 64,28% e Torque teno vírus em 28,57% das 14 amostras coletadas. Um estudo feito em Florianópolis, Brasil, por Rigotto *et al* (2010), com 84 amostras de água de diferentes fontes, coletadas entre 2007 e 2008, analisadas por métodos moleculares e por cultura celular integrada a

PCR, em 64,2% das amostras foi detectado genoma de AdV, em 19%, de Rotavirus e em 8,3%, de vírus da hepatite A. O estudo de viabilidade viral revelou que das amostras positivas para AdV, 88,8% eram infectantes. Em pesquisa feita por Vieira *et al* (2012) na lagoa Rodrigo de Freitas, no Rio de Janeiro – RJ, Brasil, na qual foram analisadas 144 amostras por técnicas moleculares (qPCR e PCR convencional), AdV foi o vírus com menor prevalência (16,7%), enquanto que Rotavirus do grupo A foi o mais prevalente (24,3%) seguido pelo Norovirus (18,8%). Outro estudo feito em Manaus, Brasil, com água de córregos naturais revelou, através de PCR convencional, que, das 52 amostras coletadas de 13 locais diferentes, 44,2% continham genoma de Rotavírus, 30,8%, genoma de AdV, 15,4%, genoma de Astrovirus e 5,8%, genoma de Norovirus (Miagostovich *et al*, 2008).

No trabalho realizado por Aslan *et al* (2011) nos Grandes Lagos, na região de Chicago (EUA), AdV foi predominante em relação a EV, estando presente em 36% das amostras analisadas, contra 20% de EV. As amostras foram analisadas através de qPCR. Choi *et al* (2005) avaliaram os rios Los Angeles e San Gabriel no sul da Califórnia (EUA). Foram coletadas 144 amostras por um período de um ano. Através de PCR *real time*, em 17% das amostras foi detectado AdV e em 7% foi detectado EV. Neste estudo foi feito, ainda, a cultura de células, utilizando linhagens de tecido humano HEK-293A e A549, para avaliação da relação entre as técnicas moleculares e a infectividade dos genomas de Adv. Nenhuma das amostras positivas por PCR *real time* apresentaram desenvolvimento na cultura celular, o que demonstra que os Adv detectados por técnicas moleculares podem ser não-infecciosos.

Em um estudo feito no Japão por Haramoto *et al* (2010) com 18 amostras do rio Tamagawa, AdV do tipo 40 e 41 foi detectado em maior frequência, em 61,1% das amostras, seguido pelo vírus JC, em 11,1% e Torque teno vírus, encontrado em 5,6% das amostras. Neste estudo nenhuma amostra foi positiva para vírus BK. Para análise das amostras foi utilizada a técnica de PCR quantitativo.

Wyn-Jones *et al* (2011) avaliaram diversos lagos na Europa e encontraram AdV em 36,4% das amostras de água doce e em 27,4% das amostras de água salgada. Norovírus foi encontrado com menor frequência nas amostras de água doce, em apenas 6,3%, enquanto que, nas amostras de água salgada, foi encontrado em 16,4%. As amostras foram analisadas através da técnica de PCR *real time*.

Com relação aos resultados de CT, o mês de janeiro foi o de maior discrepância entre os nossos resultados e os resultados divulgados pelo DMAE. Uma causa para estas divergências pode as prováveis diferenças nos pontos de coleta das amostras, já que o DMAE não divulga a localização exata dos seus pontos de coleta. A pouca profundidade na qual as coletas foram realizadas (aproximadamente 30 cm) também pode ser uma das causas da variabilidade nas contagens encontradas nos diferentes pontos amostrados. Nas margens do rio, a circulação das águas ocorre com menor intensidade, provavelmente ocasionando diferenças nas populações microbianas (Bendati *et al*, 2000), porém é importante a análise nestes pontos, pois é onde ocorre a maior concentração de banhistas.

Em pontos próximos de deságue de arroios é esperado que a carga microbiana seja maior, devido à elevada estagnação e dificuldades de renovação deste tipo de formação. Na praia de Ipanema, próximo ao ponto de coleta 3, há o deságue do Arroio Capivara. Este ponto foi o de maior número de detecções de AdV, talvez provenientes da água do arroio, o qual é um dos arroios mais poluídos que desaguam no lago Guaíba (Bendati *et al*, 2000). Na praia do Lami, há o deságue do Arroio Lami, que ocorre próximo ao ponto de coleta 1. Este ponto foi o que apresentou menor número de detecções virais da praia do Lami, demonstrando um efeito contrário ao observado na praia de Ipanema. Provavelmente o Arroio Lami não está recebendo cargas de poluentes como o Arroio Capivara.

Estudo feito por Bendati *et al* em 2000, demonstrou que as águas à montante do rio são as mais poluídas, pois recebem águas de rios altamente poluídos, como o rio dos Sinos e o Gravataí, e que à jusante do rio a qualidade da água melhora muito. Sendo assim, espera-se que as águas da praia do Lami sejam de melhor qualidade que as águas da praia de Ipanema, porém, os resultados virológicos apresentados aqui demonstram que as duas praias estão igualmente contaminadas. Desde 1997 algumas melhorias foram feitas pela Prefeitura de Porto Alegre com o objetivo de aumentar a qualidade da água do lago Guaíba, como construção de novas estações de tratamento de esgoto e melhora na qualidade dos rios que desembocam no lago Guaíba, e mesmo assim, foram detectadas grandes concentrações de genomas virais em suas águas.

Sabe-se que o excesso de chuvas pode causar a mobilização de patógenos, aumentar a sua penetração no solo e seu transporte até rios, águas superficiais e poços. Por outro lado, longos períodos de clima seco reduzem o volume da correnteza dos rios, o que pode aumentar a concentração de patógenos (Cann *et al*, 2013). Sendo assim, dados meteorológicos foram avaliados com a finalidade de verificar a relação entre a quantidade de chuva no período que antecedeu as coletas e os resultados microbiológicos obtidos. Infelizmente, durante o período avaliado, ocorreu apenas um pico de precipitação, o que torna difícil a avaliação da influência da chuva sobre os locais avaliados.

Como mostrado neste estudo preliminar, apesar da concentração de coliformes termotolerantes encontrar-se dentro dos limites aceitáveis pela legislação vigente, a presença de genomas virais contaminando a água representa um risco potencial de infecções para pessoas que a utilizam para recreação ou mesmo para abastecimento.

Vale ressaltar que este é o primeiro estudo de detecção viral nas águas do rio Guaíba em Porto Alegre – RS (Brasil). De acordo com os resultados obtidos, a detecção viral deveria ser considerada para avaliação da qualidade da água para recreação, tendo em vista o risco à saúde que estes micro-organismos representam. Entretanto deve-se considerar que a PCR detecta apenas material genético, não possibilitando distinguir vírus infecciosos e fragmentos de material genético, sendo necessários futuros estudos para avaliar a infectividade dos vírus detectados neste trabalho.

6. Conclusões

Este estudo demonstrou a presença de *Adenovirus* e *Enterovirus* em amostras de águas qualificadas como próprias para recreação, de acordo com o critério de classificação baseado na quantificação de bactérias de origem fecal. Os resultados deste trabalho evidenciam a importância da inclusão de indicadores virais na classificação das águas de recreação, porém, há necessidade de futuros estudos para avaliação da infectividade viral e do risco associado ao uso dessas áreas pela população.

7. Bibliografia

ASLAN, A.; XAGORARAK, I.; SIMMONS, F.J.; ROSE, J.B.; DOREVITCH, S. Occurrence of adenovirus and other enteric viruses in limited-contact freshwater recreational areas and bathing waters. *Journal of Applied Microbiology*. v. 111. n. 5. p. 1250-1271, 2011.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução 2914, de 12 de dezembro de 2011.

BRASIL. Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA). Resolução nº274, de 29 de novembro de 2000.

BECHTLUFFT, M.P.; BENEDUZI, A.; VAN DER SAND, S.T.; CORÇÃO, G. Antimicrobial resistance of enteric bacteria isolated from a sewage treatment plant. *Biociências*. v. 16. n. 1. p. 19-27, 2008.

BENDATI, M.M.A.; MAIZONAVE, C.R.M. *Balneabilidade da Praia do Lami (Porto Alegre – RS) no Período de 1990-1996: Avaliação da Recuperação da Qualidade da Água*. In: Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental, 19, 1997, Foz do Iguaçu. Anais... Foz do Iguaçu: ABES, p. 2322-2332. 1997.

BENDATI, M.M.A.; SCHWARZBACH, M.S.R.; MAIZONAVE, C.R.M.; ALMEIDA, L.B.; BRINGHENTI, M.L. *Avaliação da qualidade da água do lago Guaíba (Rio Grande do Sul, Brasil) como suporte para a gestão da bacia hidrográfica*. In: Congresso Interamericano de Engenharia Sanitária e Ambiental, 2000, Porto Alegre. Anais... Porto Alegre: ABES, p. 1 – 20, 2000.

BRUNKARD, J.M.; AILES, E.; ROBERTS, V.A.; HILL, V.; HILBORN, E.D.; CRAUN, G.F.; RAJASINGHAM, A.; KAHLER, A.; GARRISON, L.; HICKS, L.; CARPENTER, J.; WADE, T.J.; BEACH, M.J.; YODER, J.S. Surveillance for waterborne disease outbreaks associated with drinking water---United States, 2007--2008. *Morbidity and Mortality Weekly Report. Surveillance Summaries*. v. 60. n. 12. p. 38-68, 2011.

CANN, K.F.; THOMAS, D.R.; SALMON, R.L.; WYN-JONES, A.P.; KAY, D. Systematic Review – Extreme water-related weather events and waterborne disease. *Epidemiology and Infection*. v. 141. n. 4. p. 671-686, 2013.

CARDUCCI, A.; MORICI, P.; PIZZI, F.; BATTISTINI, R.; ROVINI, E.; VERANI, M. Study of the viral removal efficiency in an urban wastewater treatment plant. *Water Science and Technology*. v.58. n. 4.p. 893-897, 2008.

CETESB – Companhia Ambiental do Estado de São Paulo. L5.406 - Coliformes termotolerantes: determinação em amostras ambientais pela técnica de tubos múltiplos com meio A-1 – método de ensaio. São Paulo, 2007.

CETESB - Companhia Ambiental do Estado de São Paulo. Levantamento e diagnóstico de Enterovírus em mananciais que abastecem os principais municípios do estado de São Paulo. Disponível em: http://www.cetesb.sp.gov.br/userfiles/file/laboratorios/publicacoes/relatorio_tecnico/2011-levantamento-diagnostico.pdf. Acessado em: 17 abr 2013.

CHOI, S.; JIANG, S.C. Real-Time PCR Quantification of Human Adenoviruses in Urban Rivers Indicates Genome Prevalence but Low Infectivity. *Applied and Environmental Microbiology*. v. 71. n. 11. p. 7426-7433, 2005.

COMERLATO, J.; OLIVEIRA, L.K.; SPILKI, F.R. Enterovírus como indicadores de qualidade da água. *Revista Brasileira de Biociências*. v. 9. n. 1. p.: 114-125, 2011.

DE PAULA, V.S.; DINIZ-MENDES, L.; VILLAR, L.M.; LUZ, S.L.B.; SILVA, L.A.; JESUS, M.S.; DA SILVA, N.M.V.S.; GASPARG, A.M.C. Hepatitis A virus in environmental water samples from Amazon Basin. *Water Research*. v. 41. p.1169-1176, 2007.

DINIZ-MENDES, L.; DE PAULA, V.S.; LUZ, S.L.B.; NIEL, C. High prevalence of human Torque teno virus in streams crossing the city of Manaus, Brazilian Amazon. *Journal of Applied Microbiology*. v.105. p. 51-58, 2008.

Departamento Municipal de Águas e Esgotos (DMAE), Prefeitura Municipal de Porto Alegre. Condições de Balneabilidades da Praia do Lami. Porto Alegre, 2011. Disponível em: http://www2.portoalegre.rs.gov.br/dmae/default.php?_secao=223 Acessado em : 21 abr 2011.

Departamento Municipal de Águas e Esgotos (DMAE), Prefeitura Municipal de Porto Alegre. Esgoto. Dados. Disponível em: http://www2.portoalegre.rs.gov.br/dmae/default.php?p_secao=186. Acessado em 21 abr 2013.

Departamento Municipal de Águas e Esgotos (DMAE), Prefeitura Municipal de Porto Alegre. Projetos e Ações. Projeto Integrado Socioambiental. Disponível em <http://www2.portoalegre.rs.gov.br/pisa/>. Acessado em 21 abr 2013.

FEPAM – Fundação Estadual de Proteção Ambiental Henrique Luiz Roessler – RS. Qualidade Ambiental – Região Hidrográfica do Guaíba. Disponível em: <http://www.fepam.rs.gov.br/qualidade/guaiba.asp>. Acessado em 15 Abr 2013.

FONG, T.T.; LIPP, E. K. Enteric Viruses of Humans and Animals in Aquatic Environments: Health Risks, Detection, and Potential Water Quality

Assessment Tools. *Microbiological and Molecular Biology Reviews*. v. 69. n. 2. p. 357–371, 2005.

GARRAFA, PATRÍCIA. *Avaliação da qualidade virológica do efluente doméstico tratado e disponibilizado para reuso na cidade de São Paulo*. São Paulo, 2009. 79 p. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

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 Research*. v. 44. n. 6. p. 1747-1752, 2010.

ICTV - *International Committee on Taxonomy of Viruses*. In: Lista de taxonomia de vírus. Disponível em: <<http://www.ictvonline.org/virusTaxonomy.asp>. Acessado em 15 Abr 2013.

KATAYAMA, H.; SHIMASAKI, A.; OHGAKI, S. Development of a Virus Concentration Method and Its Application to Detection of Enterovirus and Norwalk Virus from Coastal Seawater. *Applied and Environmental Microbiology*. v. 68. n. 3. p. 1033–1039, 2002.

LECLERC, H.; SCHWARTZBROD, L.; DEI-CAS, E. Microbial Agents Associated with Waterborne Diseases. *Critical Reviews in Microbiology*. v. 28. n. 4. p. 371–409, 2002.

LOPMAN, B.A.; REACHER, M.H.; DUIJNHOUVER, Y.; HANON, F.X.; BROWN, D.; KOOPMANS, M. Viral Gastroenteritis Outbreaks in Europe, 1995-2000. *Emerging Infectious Diseases*. v. 9. n. 1. p. 90-96, 2003.

MCQUAIG, S.; GRIFFITH, J.; HARWOOD, M.J. Association of Fecal Indicator Bacteria with Human Viruses and Microbial Source Tracking Markers at Coastal Beaches Impact by Nonpoint Source Pollution. *Applied and Environmental Microbiology*. v. 18. n. 18. p. 6423-6432, 2012.

METCALF, T.G.; MELNICK, J.L.; ESTES, M.K. Environmental Virology: From Detection of Virus in Sewage and Water by Isolation to Identification by Molecular Biology – A Trip of Over 50 Years. *Annual Reviews in Microbiology*. v. 49. p. 461-487, 1995.

MIAGOSTOVICH, M.P.; FERREIRA, F.F.M.; GUIMARÃES, F.R.; FUMIAN, T.M.; DINIZ-MENDES, L.; LUZ, S.L.B.; SILVA, L.A.; LEITE, J.P.G. Molecular Detection and Characterization of Gastroenteritis Viruses Occurring Naturally in the Stream Waters of Manaus, Central Amazônia, Brazil. *Applied and Environmental Microbiology*. v. 74. n. 2. p. 375-382, 2008.

MOURA, B.L.A.; CUNHA, R.C.; AQUINO, R.; MEDINA, M.G.; MOTA, E.L.A.; MACINKO, J.; DOURADO, I. Principais causas de internação por condições

sensíveis à atenção primária no Brasil: uma análise por faixa etária e região. *Revista Brasileira de Saúde Materno Infantil*. v. 10. n. 1. p. 83-91, 2010.

OLIVEIRA, M.F.; PILZ, E.B.; BELLINCANTA, G.S.; LIMBERGER, N.; MACEDO, N.T.; CORÇÃO, G.; GERMANI, J.C.; VAN DER SAN, S.T. Avaliação da eficácia do tratamento de esgotos de um sistema de lagoa de estabilização através da identificação de população bacteriana. *Acta Scientiae Veterinariae*. v. 34. n. 1. p. 31-37, 2006.

Organização Mundial das Nações Unidas. UN-Water Statement on Water Quality. World Water Day, March 22, 2010. Disponível em: www.unwater.org. Acessado em 03 fev 2013.

Prefeitura Municipal de Porto Alegre – Departamento Municipal de Água e Esgotos. Plano Diretor de Esgotos – Atualização 2006-2009. 5ª Edição, 2010.

PUSCH, D.; OH, D.-Y.; WOLF, S.; DUMKE, R.; SCHRÖTER-BOBSIN, U.; HÖHNE, M.; RÖSKE, I.; SCHREIER, E. Detection of enteric viruses and bacterial indicators in German environmental waters. *Archives of Virology*. v. 150. p. 929–947, 2005.

RICE, E.W.; BAIRD, R.B.; EATON, A.D.; CLESCERI, L.S. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 22nd Ed. Washington: APHA; AWWA; WEF, 2012. 1496 p.

RIGOTTO, C.; VICTORIA, M.; MORESCO, V.; KOLESNIKOVAS, 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 Florianópolis, South Brazil. *Journal of Applied Microbiology*. v. 109. p. 1979-1987, 2010.

SINCLAIR, R.G.; JONES, E.L.; GERBA, C.P. Viruses in recreational waterborne disease outbreaks: a review. *Journal of Applied Microbiology*. v. 107. n. 6. p. 1769-1780, 2009.

SKRABER, S.; GASSILLOUD, B.; SCHWARTZBROD, L.; GANTZER, C. Survival of infectious Poliovirus-1 in river water compared to the persistence of somatic coliphages, thermotolerant coliforms and Poliovirus-1 genome. *Water Research*. v. 38. n. 12. p. 2927-2933, 2004.

STRAUBA, T.M.; CHANDLERB, D.P. Towards a unified system for detecting waterborne pathogens. *Journal of Microbiological Methods*. v. 53. p. 185– 197, 2003.

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. *Revista de Patologia Tropical*. v. 34. n. 2. p. 85-104, 2005.

THERON, J.; CLOETE, T.E. Emerging Waterborne Infections: Contributing Factors, Agents, and Detection Tools. *Critical Reviews in Microbiology*. v. 28. n. 1. p. 1–26, 2002.

TONG, H.; LU, Y. Effective detection of human adenovirus in Hawaiian waters using enhanced PCR methods. *Virology Journal*. v. 8. n. 57. p. 1-6, 2011.

TSAI, Y.; SOBSEY, M.D.; SANGERMANO, L.R.; PALMER, C.J. Simple method of concentrating enteroviruses and hepatitis A virus from sewage and ocean water for rapid detection by reverse transcriptase polymerase chain reaction. *Applied and Environmental Microbiology*. v. 59. n. 10. p. 3488-3491, 1993.

WHO - World Health Organization. Guidelines for Drinking-water Quality. 4 ed. Geneva, 2011.

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.; SEELWOOD, J.; SZEWZYK, R.; WYER, M. Surveillance of adenoviruses and noroviruses in European recreational waters. *Water Research*. v. 45. p. 1025-1038, 2011.

WOLF, S.; HEWITT, J.; GREENING, G.E. Viral multiplex quantitative PCR assays for tracking sources of fecal contamination. *Applied and Environmental Microbiology*. v. 76. n. 5. p. 1388-1394, 2010.

WONG, M.; KUMAR, L.; JENKINS, T.M.; XAGORARAKI, I.; PHANIKUMAR, M.S.; ROSE, J.B. Evaluation of public health risks at recreational beaches at Lake Michigan via detection of enteric viruses and a human-specific bacteriological marker. *Water Research*. v. 43. p. 1137-1149, 2009.

VECCHIA, A.D.; FLECK, J.D.; COMERLATO, J.; KLUGE, M.; BERGAMASCHI, B.; DA SILVA, J.V.S.; DA LUZ, R.B.; TEIXEIRA, T.F.; GARBINATTO, G.N.; OLIVEIRA, D.V.; ZANIN, J.G.; VAN DER SAND, S.; FRAZZON, A.P.G.; FRANCO, A.C.; ROEHE, P.M.; SPILKI, F.R. First description of Adenovirus, Enterovirus, Rotavirus e Torque teno virus in water samples collected from the Arroio Dilúvio, Porto Alegre, Brasil. *Brazilian Journal of Biology*. v. 72. n. 2. p. 323-329, 2012.

VIEIRA, C.B.; MENDES, A.C.O.; GUIMARÃES, F.R.; FUMIAN, T.M.; LEITE, J.P.G.; GASPAR, A.M.C.; MIAGOSTOVICH, M.P. Detection of enteric viruses in recreational waters of an urban lagoon in the city of Rio de Janeiro, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. v. 107. n. 6. p. 778-784, 2012.

8. Anexo I

Índice de NMP e de limites de confiança de 95% para várias combinações de resultados positivos quando cinco tubos são utilizados por diluição (10mL, 1,0mL, 0,1mL) (Rice *et al*, 2012).

| Combinação de positivos | NMP/100mL | Limites | | Combinação de positivos | NMP/100mL | Limites | |
|-------------------------|-----------|----------|----------|-------------------------|-----------|----------|----------|
| | | Inferior | Superior | | | Inferior | Superior |
| 0-0-0 | < 1,8 | - | 6,8 | 4-0-3 | 25 | 9,8 | 70 |
| 0-0-1 | 1,8 | 0,09 | 6,8 | 4-1-0 | 17 | 6,0 | 40 |
| 0-1-0 | 1,8 | 0,09 | 6,9 | 4-1-1 | 21 | 6,8 | 42 |
| 0-1-1 | 3,6 | 0,7 | 10 | 4-1-2 | 26 | 9,8 | 70 |
| 0-2-0 | 3,7 | 0,7 | 10 | 4-1-3 | 31 | 10 | 70 |
| 0-2-1 | 5,5 | 1,8 | 15 | 4-2-0 | 22 | 6,8 | 50 |
| 0-3-0 | 5,6 | 1,8 | 15 | 4-2-1 | 26 | 9,8 | 70 |
| 1-0-0 | 2,0 | 0,10 | 10 | 4-2-2 | 32 | 10 | 70 |
| 1-0-1 | 4,0 | 0,7 | 10 | 4-2-3 | 38 | 14 | 100 |
| 1-0-2 | 6,0 | 1,8 | 15 | 4-3-0 | 27 | 9,9 | 70 |
| 1-1-0 | 4,0 | 0,71 | 12 | 4-3-1 | 33 | 10 | 70 |
| 1-1-1 | 6,1 | 1,8 | 15 | 4-3-2 | 39 | 14 | 100 |
| 1-1-2 | 8,1 | 3,4 | 22 | 4-4-0 | 34 | 14 | 100 |
| 1-2-0 | 6,1 | 1,8 | 15 | 4-4-1 | 40 | 14 | 100 |
| 1-2-1 | 8,2 | 3,4 | 22 | 4-4-2 | 47 | 15 | 120 |
| 1-3-0 | 8,3 | 3,4 | 22 | 4-5-0 | 41 | 14 | 100 |
| 1-3-1 | 10 | 3,5 | 22 | 4-5-1 | 48 | 15 | 120 |
| 1-4-0 | 10 | 3,5 | 22 | 5-0-0 | 23 | 6,8 | 70 |
| 2-0-0 | 4,5 | 0,79 | 15 | 5-0-1 | 31 | 10 | 70 |
| 2-0-1 | 6,8 | 1,8 | 15 | 5-0-2 | 43 | 14 | 100 |
| 2-0-2 | 9,1 | 3,4 | 22 | 5-0-3 | 58 | 22 | 150 |
| 2-1-0 | 6,8 | 1,8 | 17 | 5-1-0 | 33 | 10 | 100 |
| 2-1-1 | 9,2 | 3,4 | 22 | 5-1-1 | 46 | 14 | 120 |
| 2-1-2 | 12 | 4,1 | 26 | 5-1-2 | 63 | 22 | 150 |
| 2-2-0 | 9,3 | 3,4 | 22 | 5-1-3 | 84 | 34 | 220 |
| 2-2-1 | 12 | 4,1 | 26 | 5-2-0 | 49 | 15 | 150 |
| 2-2-2 | 14 | 5,9 | 36 | 5-2-1 | 70 | 22 | 170 |

| Combinação de positivos | NMP/100mL | Limites | | Combinação de positivos | NMP/100mL | Limites | |
|--------------------------------|------------------|-----------------|-----------------|--------------------------------|------------------|-----------------|-----------------|
| | | Inferior | Superior | | | Inferior | Superior |
| 2-3-0 | 12 | 4,1 | 26 | 5-2-2 | 94 | 34 | 230 |
| 2-3-1 | 14 | 5,9 | 36 | 5-2-3 | 120 | 36 | 250 |
| 2-4-0 | 15 | 5,9 | 36 | 5-2-4 | 150 | 58 | 400 |
| 3-0-0 | 7,8 | 2,1 | 22 | 5-3-0 | 79 | 22 | 220 |
| 3-0-1 | 11 | 3,5 | 23 | 5-3-1 | 110 | 34 | 250 |
| 3-0-2 | 13 | 5,6 | 35 | 5-3-2 | 140 | 52 | 400 |
| 3-1-0 | 11 | 3,5 | 26 | 5-3-3 | 170 | 70 | 400 |
| 3-1-1 | 14 | 5,6 | 36 | 5-3-4 | 210 | 70 | 400 |
| 3-1-2 | 17 | 6,0 | 36 | 5-4-0 | 130 | 36 | 400 |
| 3-2-0 | 14 | 5,7 | 36 | 5-4-1 | 170 | 58 | 400 |
| 3-2-1 | 17 | 6,8 | 40 | 5-4-2 | 220 | 70 | 440 |
| 3-2-2 | 20 | 6,8 | 40 | 5-4-3 | 280 | 100 | 710 |
| 3-3-0 | 17 | 6,8 | 40 | 5-4-4 | 350 | 100 | 710 |
| 3-3-1 | 21 | 6,8 | 40 | 5-4-5 | 430 | 150 | 1100 |
| 3-3-2 | 24 | 9,8 | 70 | 5-5-0 | 240 | 70 | 710 |
| 3-4-0 | 21 | 6,8 | 40 | 5-5-1 | 350 | 100 | 1100 |
| 3-4-1 | 24 | 9,8 | 70 | 5-5-2 | 540 | 150 | 1700 |
| 3-5-0 | 25 | 9,8 | 70 | 5-5-3 | 920 | 220 | 2600 |
| 4-0-0 | 13 | 4,1 | 35 | 5-5-4 | 1600 | 400 | 4600 |
| 4-0-1 | 17 | 5,9 | 36 | 5-5-5 | >1600 | 700 | - |
| 4-0-2 | 21 | 6,8 | 40 | | | | |