



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAPÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
DEPARTAMENTO DE PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

ERINEIDE SILVA E SILVA

**DETECÇÃO DE VÍRUS ENTÉRICOS, COLIFORMES TOTAIS E ESCHERICHIA
COLI EM ÁGUA DE POÇOS DA CIDADE DE MACAPÁ – AP**

**MACAPÁ/AP
2018**

ERINEIDE SILVA E SILVA

**DETECÇÃO DE VÍRUS ENTÉRICOS, COLIFORMES TOTAIS E ESCHERICHIA
COLI EM ÁGUA DE POÇOS DA CIDADE DE MACAPÁ – AP**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, na área de concentração Ensaio Biológicos, como requisito para obtenção do grau de Mestre em Ciências da saúde.

Orientador: Dr. Júlio César Sá de Oliveira

Co-orientadora: Dra. Elza Caroline Alves Muller

MACAPÁ/AP
2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Biblioteca Central da Universidade Federal do Amapá
Elaborado por Mara Patrícia Corrêa Garcia – CRB-2/1248

Silva, Erineide Silva e

Detecção de vírus entéricos, coliformes totais e escherichia coli em água de poços da cidade de Macapá-AP / Erineide Silva e Silva ; orientador, Júlio César Sá de Oliveira ; coorientadora, Elza Caroline Alves Muller. – Macapá, 2018.

76 f.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Amapá, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde.

1. Vírus entéricos. 2. Bactérias. 3. Poços freáticos - Contaminação. 4. Água subterrânea. I. Oliveira, Júlio César Sá de, orientador. II. Muller, Elza Caroline Alves, coorientadora. III. Fundação Universidade Federal do Amapá. IV. Título.

572.8 S586d

CDD. 22 ed.

ERINEIDE SILVA E SILVA

DETECÇÃO DE VÍRUS ENTÉRICOS, COLIFORMES TOTAIS E ESCHERICHIA COLI EM ÁGUA DE POÇOS DA CIDADE DE MACAPÁ – AP

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, na área de concentração Ensaio Biológicos, como requisito para obtenção do grau de Mestre em Ciências da saúde.

Orientador: Dr. Júlio César Sá de Oliveira

Co-orientadora: Dra. Elza Caroline Alves Muller

DATA DE APROVAÇÃO: 17 / 09 / 2018



Orientador: Prof. Dr. Júlio César Sá de Oliveira
Universidade Federal do Amapá



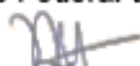
Co-orientadora: Dra. Elza Caroline Alves Muller
Universidade Federal do Amapá



Examinador: Dr. Rafael Lima Resque
Universidade Federal do Amapá



Examinador: Dra. Clarissa Silva Lima
Universidade Federal do Amapá



Examinador: Dra. Mayara Tânia Pinheiro Gomes |
Universidade Federal do Amapá

Macapá/AP
2018

À Deus, por todo seu amor, proteção, e graças que tem dedicado à mim e a minha família. Obrigada meu Deus!

Á minha querida família! Por sempre estarem ao meu lado, pelo carinho, apoio, incentivo e amor incondicional.

AGRADECIMENTOS

Ao Laboratório de Limnologia da Universidade Federal do Amapá por todo suporte científico e logístico na realização desta pesquisa.

Ao Instituto Evandro Chagas – IEC, pelo apoio técnico; e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, pela concessão da bolsa de estudos de mestrado.

A Fundação de Amparo a Pesquisa no Amapá e ao Ministério da Saúde pelo suporte financeiro.

Ao programa de Pós-Graduação Ciências da Saúde – PPCS da Universidade Federal do Amapá, que possibilitou a realização desta pós-graduação.

Aos Professores Doutores Rafael Lima Resque e Clarissa Silva Lima por aceitarem compor a banca examinadora.

À Dra. Elza Caroline Alves Muller, por abrir as novas portas ao conhecimento, pela orientação e coorientação deste trabalho, proporcionando experiências valiosas a minha formação, pela amizade e paciência todo esse período de mestrado. Sempre serei eternamente grata pelos conselhos e pelo admirável espírito guerreiro nas causas de todos. Muito obrigada!

Ao Prof. Dr. Júlio César Sá de Oliveira, pela orientação e pelo desenvolvimento deste trabalho.

Aos estagiários do LABLMINO, que sem o apoio deles as coletas iriam torna-se difíceis em especial à Talita Tavares, Romaro Moraes, Jackson Marinho e Favacho, e por todos os bons momentos que dividimos na convivência no laboratório.

A Dielle Teixeira pesquisadora da Seção de Virologia do IEC, pelo treinamento e por seu amor e paciência em ensinar e sempre disposta a ajudar.

A minha amiga e comadre Nayara Patrícia Reis que apesar dos conflitos e adversidades da vida, sempre esteve ao meu lado, torcendo e motivando para que eu não fracassasse. A Fabiana Estigarribia pelo apoio e incentivo.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho, e que por ventura não tenha citado.

Muito Obrigada!

“No meio da confusão, encontre a simplicidade. A partir da discórdia, encontre a harmonia. No meio da dificuldade reside a oportunidade.”

(Albert Einstein)

RESUMO

Com avanços significativos na área da virologia ambiental, os vírus entéricos têm sido reconhecidos como os agentes causadores de muitos casos de doenças e surtos provenientes de fontes contaminadas de água para consumo, considerando a persistência ambiental desses agentes e a resistência que apresentam a processos convencionais de tratamento de água. Este estudo objetivou detectar a presença de vírus entéricos, coliformes totais e *Escherichia coli* em água de poços da cidade de Macapá-Ap por detecção de vírus entéricos por meio de análise molecular. As amostras foram coletadas entre novembro de 2016 à março de 2017, 2L de água foram coletados mensalmente em 16 bairros da área urbana da cidade. Foram analisados três tipos de vírus (Adenovírus, Rotavírus e Norovírus). A concentração viral foi realizada pelo método de adsorção-eluição em membrana HA, seguido de reconcentração por ultrafiltração no Amicon Ultra-15. Para obtenção do DNA e RNA viral utilizou-se um kit comercial Qiagen. Para a detecção molecular foram empregadas a Reação em Cadeia Mediada pela Polimerase (PCR convencional) e PCR em tempo real para detecção de norovírus. Os produtos positivos das amostras de água foram submetidos a sequenciamento nucleotídico e comparadas a outras obtidas em um banco de dados (GeneBank). A quantificação de coliformes totais e *Escherichia coli*, também foram determinados por meio de cultura (Colipaper). O DNA de Adenovírus humano foi detectado em 152/256 (59,38%) das amostras. A análise filogenética mostrou que os isolados ambientais deste estudo pertenciam a espécie F, subtipo 41 (caracterizado como Adenovírus entérico). A alta similaridade com sequências brasileiras evidencia a circulação endêmica dos isolados do HAdV no Brasil. Nenhuma amostra foi positiva para Norovírus e Rotavírus. As concentrações de coliformes totais e *E. coli*, ultrapassaram em todos os meses os limites estabelecidos pelo Ministério da Saúde (portaria nº 2914/11). A análise de regressão logística demonstrou que não houve associação entre a presença do HAdV e os parâmetros bacteriológicos da água. Os resultados obtidos evidenciaram a circulação de vírus entéricos nesta região, provendo informações adicionais sobre a epidemiologia molecular do HAdV no Brasil, bem como o alto grau de contaminação microbiológica das águas subterrâneas da cidade de Macapá, resultado do deficitário serviço de saneamento básico.

Palavras-chave: Água. Vírus entéricos. Biologia molecular. Coliformes.

ABSTRACT

With significant advances in the field of environmental virology, enteric viruses have been recognized as the causative agents of many cases of diseases and outbreaks from contaminated sources of water for consumption, considering the environmental persistence of these agents and the resistance they present to conventional water treatment. This study aimed to detect the presence of enteric virus, total coliforms and *Escherichia coli* in water from wells in the city of Macapá-Ap due to detection of enteric virus by means of molecular analysis. Samples were collected between November 2016 and March 2017, 2L of water were collected monthly in 16 neighborhoods of the urban area of the city. Three types of virus (Adenovirus, Rotavirus and Norovirus) were analyzed. The viral concentration was performed by the HA membrane adsorption-elution method, followed by reconcentration by ultrafiltration in Amicon Ultra-15. A commercial Qiagen kit was used to obtain viral DNA and RNA. For molecular detection, the Polymerase-Mediated Chain Reaction (conventional PCR) and real-time PCR were used for the detection of norovirus. The positive products of the water samples were submitted to nucleotide sequencing and compared to others obtained in a data batch (GeneBank). Quantification of total coliforms and *Escherichia coli* were also determined by culture (Colipaper). Human Adenovirus DNA was detected in 152/256 (59.38%) of the samples. Phylogenetic analysis showed that the environmental isolates of this study belonged to species F, subtype 41 (characterized as enteric adenovirus). The high similarity with Brazilian sequences evidences the endemic circulation of HAdV isolates in Brazil. No samples were positive for Norovirus and Rotavirus. The concentrations of total coliforms and *E. coli* exceeded in every month the limits established by the Ministry of Health (ordinance no. 2914/11). The logistic regression analysis showed that there was no association between the presence of HAdV and the bacteriological parameters of the water. The results obtained evidenced the circulation of enteric viruses in this region, providing additional information on the molecular epidemiology of HAdV in Brazil, as well as the high level of microbiological contamination of the groundwater of the city of Macapá, resulting from the deficient basic sanitation service.

Keywords: Water. Enteric viruses. Molecular biology. Coliforms.

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Pontos de coleta de água na cidade de Macapá-AP, com seus respectivos códigos de identificação.	32
Quadro 2 – Reagentes, volumes e concentrações da reação de transcriptase reversa	37
Quadro 3 – Reagentes utilizados na PCR para detecção de norovírus.	38
Quadro 4 – Concentrações e volumes dos reagentes utilizados na segunda etapa da reação de semi nested para detecção de norovírus genogrupo GII.	39
Quadro 5 - Iniciadores utilizados na detecção de norovírus genogrupo GII (região parcial do capsídeo) em amostras de água PCR e semi nested.	39
Quadro 6 – Concentrações e volumes dos reagentes utilizados na reação de TaqMan® PCR em tempo real para detecção do genogrupo II de norovírus.	40
Quadro 7 – Condições para reação por TaqMan® PCR em tempo real.	40
Quadro 8 - Iniciadores e sondas utilizados na detecção de norovírus em amostras de água e esgoto por TaqMan® PCR em tempo real.	41
Quadro 9 – Concentrações e volumes dos reagentes utilizados na PCR para detecção de rotavírus.	41
Quadro 10 – Concentrações e volumes dos reagentes utilizados na segunda etapa da reação de nested para detecção de rotavírus.	42
Quadro 11 – Sequências dos oligonucleotídeos iniciadores em cada reação de PCR para detecção de rotavírus.	42
Quadro 12 - Iniciadores utilizados para a detecção do gene <i>hexon</i> de adenovírus humanos por PCR e Nested-PCR em amostras de água de poço.	43
Quadro 13 - Reagentes e suas respectivas concentrações utilizadas para a amplificação por PCR do gene <i>hexon</i> de adenovírus em amostras de água de poço.	43
Quadro 14 – Reagentes e suas respectivas concentrações utilizadas para a amplificação por Nested-PCR do gene <i>hexon</i> de adenovírus em amostras de água.	44
Quadro 15 – Reagentes e volumes utilizados na reação de sequenciamento nucleotídico das cepas de adenovírus detectados em amostras de água de poço na cidade de Macapá-Ap.	46

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Resultados da qualidade bacteriológica da água das amostras provenientes dos dezesseis pontos de amostragem.....	49
Tabela 2 – Presença de Adenovírus, em amostras de água de poço dos bairros de Macapá-ap, no período de novembro de 2016 a março de 2017.....	51
Tabela 3 – Presença de Andenovírus em amostras de água de poço nos dezesseis pontos de amostragem da cidade de Macapá-AP, no período de novembro de 2016 a março de 2017.	51
Tabela 4 – Frequência de detecção de Adenovírus no período de menor (verão) e maior (inverno) precipitação pluviométrica.	52
Tabela 5 – Valores médios de coliformes totais e <i>E. coli</i> e percentual de positividade para o AdV nos dezesseis pontos de amostragem na cidade de Macapá-AP.	53
Tabela 6 – Análise de regressão logística avaliando a relação entre a presença do AdV e parâmetros bacteriológicos da água.....	53
Tabela 7- Resultados da análise filogenética, exibindo o perfil de similaridade nucleotídica entre amostras positivas para AdV e sequenciadas para o gene hexon.	58

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Representação esquemática da partícula de adenovírus.....21
- Figura 2** - Representação esquemática da estrutura da partícula de Rotavírus. *VP: proteína viral; NSP: proteína não-estrutural.23
- Figura 3** - Estrutura do capsídeo e da proteína capsídica VP1 dos norovírus. a, b: representação da superfície e corte transversal da partícula viral (sem genoma) obtida pela criomicroscopia eletrônica, respectivamente. c, d: dímero e monômero da proteína capsídica VP1 dividida nos domínios S e P e subdomínios P1 e P2, respectivamente. e: estrutura linear da proteína VP1.26
- Figura 4** - Representação esquemática do genoma dos norovírus.27
- Figura 5** - Fluxograma orientativo para reconhecimento e classificação da unidade de captação de água subterrânea.....29
- Figura 6** – Localização da cidade de Macapá, Amapá, Brasil e dos 16 pontos de coleta utilizados no estudo.....33
- Figura 7** – Coleta das amostras de água. Frascos utilizados na coleta de água (A); Coleta de água para análise físico-química na saída da bomba (B); Coleta de água depois da bomba (C); Coleta de água antes da água cair na caixa d'água (D); Concentração das amostras virais (E), Análises físico-química e microbiológica das amostras de água (F) e Análise virológica (G).34
- Figura 8** - Fluxograma de todos os procedimentos laboratoriais empregados na análise.....35
- Figura 9** – Gráfico da presença de contaminantes, Coliformes totais e *E. coli*, na água de poços.....50
- Figura 10** – 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 de poços da cidade de Macapá-AP. PM: Peso Molecular (123 pb), 1-29: Amostras de água, C+: Controle positivo e C-: Controle negativo.54
- Figura 11** – Eletroforese em gel de agarose 1,5% dos produtos da semi nested-PCR para detecção de Norovírus (PM: Peso Molecular (123 pb), 1-29: Amostras de água, C+: Controle positivo e C-: Controle negativo).55
- Figura 12** – Eletroforese em gel de agarose 1,5% dos produtos da nested-PCR para detecção de rotavírus (PM: Peso Molecular (123 pb), 1-29: Amostras de água, C+: Controle positivo e C-: Controle negativo).....55
- Figura 13** – Amplificação de Norovírus GII pela PCR em Tempo Real em amostras de água de poços da cidade de Macapá-AP. Os controles (CT) estão representados pelas cores distintas.56

Figura 14 – Análise filogenética baseada na sequência nucleotídica do gene hexon envolvendo 06 amostras positivas para adenovírus encontrados nas amostras ambientais de Macapá, Amapá. Amostras do estudo do estado do Amapá estão grafadas na coloração vermelhas e marcadas com setas vermelhas. O teste foi realizado com 1000 réplicas de *bootstrap* sendo representados apenas os valores maiores de 70%.57

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

AdV: Adenovírus
AP: Amapá
BLAST: Basic local alignment search tool
°C: graus centígrados
C+: Controle positivo
C-: Controle negativo
CACL₂: Cloreto de cálcio
cDNA: DNA complementar.
DMSO: Dimetil sulfóxido
DNA: Ácido desoxirribonucléico
dNTP: 2'-deoxinucleosídeo 5'-trifosfato.
E. coli: Escherichia coli
GI: Norovírus do genogrupo I
GII: Norovírus do genogrupo II
H₂O: Água
H₂SO₄: Ácido sulfúrico
HAdV: Adenovírus humano
HAdE: Adenovírus entérico
HCL: Ácido clorídrico
IBGE: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IEC: Instuto Evandro Chagas
kb: Kilobase
kDa: kilo Dalton
L: Litro
M: Molar
mg/L: Miligrama por litro
mg: miligrama
MgCl₂: Cloreto de magnésio
mL: Mililitro
mm: Milímetros
mM: Milimolar

MS: Ministério da Saúde
NaCl: Cloreto de sódio
NaOH: Hidróxido de sódio
NCBI: National center for biotechnology information
ND: Não detectado
ng: nanogramas
nm: Nanômetro
NoV: Norovírus
nPCR: Nested Reação em cadeia mediada pela Polimerase
OMS: Organização Mundial de Saúde
OR: Odds ratio
ORF: Do inglês *open reading frame* que significa fase de leitura aberta
pb: pares de bases
PCR: Reação em cadeia mediada pela Polimerase
pH: Potencial hidrogeniônico
PM: Peso Molecular
PNI: Programa Nacional de Imunização
P(X): Probabilidade
PD(N): Primer randômico
RPM: Rotações por minuto
RT: Transcriptase reversa
RV: Rotavírus
TA: Temperatura ambiente
TBE: Tris-borato-EDTA
UFC: Unidade formadora de colônia
UV: Ultra-violeta
µL: microlitro

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
1.1	REVISÃO DA LITERATURA.....	18
1.1.1	Virologia Ambiental	18
1.1.2	Adenovírus	20
1.1.3	Rotavírus (Rv)	22
1.1.4	Norovírus	24
1.1.5	Águas Subterrâneas	27
2	OBJETIVOS	31
2.1	OBJETIVO GERAL	31
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	31
3	MATERIAIS E MÉTODOS	32
3.1	ÁREA DE ESTUDO	32
3.2	COLETA DAS AMOSTRAS DE ÁGUA	33
3.3	ENSAIO BACTERIOLÓGICO	34
3.4	PROTOCOLO DE DETECÇÃO VIRAL.....	35
3.5	CONCENTRAÇÃO VIRAL	36
3.5.1	Extração do DNA e RNA Viral	36
3.5.2	Síntese do DNA Complementar (cDNA)	37
3.6	DETECÇÃO DE NOROVÍRUS	38
3.6.1	Reação em Cadeia pela polimerase para detecção molecular de norovírus. 38	
3.6.2	Taqman® PCR em Tempo Real	40
3.7	DETECÇÃO DE ROTAVÍRUS	41
3.7.1	Reação em Cadeia pela Polimerase para Detecção Molecular de Rotavírus	41
3.8	DETECÇÃO DE ADENOVÍRUS	43

3.8.1 Reação em Cadeia pela Polimerase para Detecção Molecular de Adenovirus.....	43
3.9 CONTROLE DE QUALIDADE	44
3.10 PURIFICAÇÃO DO PRODUTO DA PCR.....	45
3.11 QUANTIFICAÇÃO DO DNA.....	46
3.12 REAÇÃO DE SEQUENCIAMENTO DE NUCLEOTÍDEOS.....	46
3.13 PURIFICAÇÃO DO PRODUTO DA REAÇÃO DE SEQUENCIAMENTO	47
3.14 ELETROFORESE EM SEQUENCIADOR AUTOMÁTICO.....	47
3.15 ALINHAMENTO E EDIÇÃO DAS SEQUÊNCIAS PARA CONSTRUÇÃO DA ÁRVORE FILOGENÉTICA.....	47
3.16 ANÁLISE DOS DADOS	48
4 RESULTADOS	49
4.1 ANÁLISE DE COLIFORMES TOTAIS E <i>ESCHERICHIA COLI</i>	49
4.2 DETECÇÃO DE VÍRUS ENTÉRICOS NA ÁGUA	50
4.3 RELAÇÃO ENTRE O Adv E OS PARÂMETROS BACTERIOLÓGICOS	52
4.4 ANÁLISE MOLECULAR DOS ISOLADOS AMBIENTAIS	54
5 DISCUSSÃO.....	59
6 CONSIDERAÇÕES	66
REFERÊNCIAS.....	67

1 INTRODUÇÃO

A água constitui um dos elementos essenciais à saúde de qualquer ser vivo e atualmente tem se tornado um assunto preocupante no mundo e nos países em desenvolvimento quanto à sua qualidade. Isto se deve a falta de um saneamento adequado, que vem trazendo grandes problemas sociais, como também ambientais e de saúde, já que é um fator importante na disseminação de doenças. Torna-se, portanto, uma questão de interesse para a saúde pública, com vista a evitar que pessoas adoeçam pela presença de agentes patogênicos presentes na água de consumo (OMS, 2017).

O saneamento é a estrutura que mais benefícios traz para a população e ainda é motivo de morte no Mundo. Segundo dados da Organização Mundial de Saúde (OMS), cerca de 4,5 bilhões de pessoas no mundo – bem mais da metade da população global atual de 7,6 bilhões de habitantes – não tem acesso a saneamento básico seguro. Aproximadamente uma em cada quatro crianças no mundo menores de 5 anos morrem em razão de diarreia, como resultado do baixo acesso à água tratada e as condições adequadas de higiene, correndo um risco maior a exposição de doenças (OMS/UNICEF, 2017).

No Brasil, apesar de investimentos aplicados na área de saneamento, o país ainda enfrenta problemas em termos de distribuição e acesso aos serviços básicos de saneamento (NUNES, 2015). Segundo dados mais recentes do Sistema Nacional de informações sobre Saneamento (SNIS) e do Instituto Trata Brasil (ITB), referentes a 2016 disponibilizados, mostram cobertura de 83,3% de água e metade da população do país continua sem acesso a sistemas de esgotamento sanitário (51,9% de esgoto no país). O que significa que milhões de pessoas utilizam medidas alternativas para lidar com os dejetos, seja através de uma fossa, ou jogando o esgoto diretamente no rio (GROTT, 2016; ITB, 2017; SNIS, 2018).

Em algumas regiões do país, como o Norte, a situação é ainda mais grave: 55,4% da população é atendida por abastecimento de água, e apenas 10,5% por esgoto. Sem investimentos por anos na área de saneamento básico, o Amapá vem sendo considerado o pior estado da região e do país, com 34% e 3,8%, respectivamente (SNIS, 2018). A cidade de Macapá possui uma cobertura mínima na área de saneamento, onde se observa uma grande quantidade de esgoto a céu aberto nas ruas. Desta forma, Macapá, no quesito saneamento, é considerada a 5º pior

cidade no ranking de desempenhos das 100 maiores cidades brasileiras, com 5,44% de cobertura de coleta de esgoto e 36,39% de água (ITB, 2018).

A dificuldade de acesso ao abastecimento de água tratada para toda população da cidade, torna necessária a adoção de medidas alternativas, tais como o consumo de águas subterrâneas por meio de poços. Entretanto, essas águas subterrâneas podem estar contaminadas com fezes humanas e/ou de outros animais através de várias vias, dentre elas fossas e poços, disseminando de forma rápida, um grande número de enfermidades, principalmente, gastroenterites (SOUSA et al., 2016; BRAGA et al., 2018). A Portaria nº2.914/2011 do Ministério da Saúde (MS) estabelece que a água destinada ao consumo humano em qualquer situação, incluindo fontes individuais como poços, minas e nascentes deve ter ausência de coliformes e *E. coli* em 100 mL da amostra (BRASIL, 2011). Quando esses indicadores microbiológicos estão presentes na água, há uma probabilidade da presença de microrganismos patogênicos mais resistentes à infecção, como vírus e protozoários, causadores de diversas doenças infecciosas (VIEIRA et al., 2012; SILVA et al., 2017).

A gastroenterite viral pode ser causada por uma variedade de vírus e ocasiona infecção do trato gastrointestinal, sendo a maior causa de diarreia e a segunda maior causa de doença infecciosa no mundo. A principal manifestação é a diarreia, podendo ou não estar associada a náuseas e vômitos, e as complicações ocorrem devido à desidratação e ao desequilíbrio eletrolítico, podendo causar óbito, principalmente, se a diarreia estiver associada com a desnutrição e doenças crônicas (SANTOS; SOARES, 2015). A transmissão destes vírus ocorre frequentemente através da via fecal-oral, através do consumo de água e alimentos contaminados (MURRAY et al., 2014).

Dentre os principais agentes etiológicos virais causadores de gastroenterites estão o Rotavírus (RV), correspondendo até 60% dos casos; Norovírus (NV) com 5% a 30% dos casos de hospitalização por gastroenterite; Adenovírus podem ser responsáveis por até 20% dos casos de infecção em crianças, sendo o segundo maior causador de gastroenterite (OMS, 2017). Esses vírus são de veiculação hídrica e altamente estáveis no ambiente aquático, possuindo certa resistência aos agentes físicos e químicos de inativação e podem permanecer potencialmente infectantes durante meses na água (PRADO; MIAGOSTOVICH, 2014).

No Estado do Amapá não existem estudos que visem esclarecer os aspectos etiológicos, moleculares e epidemiológicos das gastroenterites de origem viral com

veiculação hídrica, principalmente em populações que consomem água não tratada de fontes alternativas.

A pesquisa de vírus em águas tratadas e não tratadas constitui uma das mais relevantes linhas de investigação em desenvolvimento no mundo, visando a garantia da qualidade da água de uso da população.

1.1 REVISÃO DA LITERATURA

1.1.1 Virologia Ambiental

A virologia ambiental surgiu como área de interesse científico na década de 1950, após um grande surto de diarreia causada pelo vírus da hepatite E ocorrido na cidade de Nova Delhi, na Índia, envolvendo aproximadamente 29 mil pessoas, após a ingestão de água de abastecimento contaminada com esgoto. A origem do surto foi a contaminação do rio Jumoa, o qual era utilizado como fonte primária para alimentar um sistema de tratamento de água, o qual se mostrou eficiente no controle bacteriano. Esse ocorrido levou à formação de grupos especializados em pesquisas de vírus em água e esgotos (MELNICK, 1957; PURCELL; TICEHUST, 1988; BOSCH, 1998; TEIXEIRA, 2014; GURJÃO, 2015)

Desde os anos 80, a virologia ambiental teve avanços significativos, onde os vírus entéricos foram reconhecidos como os agentes causadores de muitos casos de doenças provenientes de fontes contaminadas de água para consumo, águas recreacionais, rios, crustáceos e moluscos provenientes de águas contaminadas. Desta forma a virologia ambiental é de grande importância de conhecimentos para estudos epidemiológicos, conhecendo as vias de transmissão de vários vírus entéricos, de forma a atuar no controle de contaminação (FUMIAN et al., 2013; LUZ; MIAGOSTOVCH, 2017).

Casos como estes são ocasionados por vírus entéricos são frequentemente encontrados em águas superficiais, subterrâneas e residuais, e são responsáveis por uma proporção significativa de casos de gastroenterites (DASHTI et al., 2016). Esses vírus não fazem parte da flora normal do sistema digestivo e são apenas excretados por pessoas infectadas e as taxas de infecção variam consideravelmente de uma área para outra, dependendo da saúde e das condições de saneamento básico. A

circulação desses vírus no ambiente aquático esta diretamente relacionada às condições sanitárias inadequada, estando associados a diferentes quadros de doenças infecciosas (PRADO; MIAGOSTOVICH, 2014).

Além disso, a disseminação em ambientes aquáticos localizados no espaço urbano é preocupante, considerando a persistência ambiental desses agentes, principalmente por serem vírus não envelopados e resistentes a condições adversas, tanto no organismo humano (acidez do estômago) como no ambiente, pois possuem uma alta estabilidade na água e são resistentes a processos físicos e químicos de inativação (TONANI et al., 2013; PRADO; MIAGOSTOVICH, 2014).

No Brasil nos últimos anos, a linha de pesquisa em virologia ambiental tem se intensificado. Teve início na década de 1970 com o desenvolvimento de estudos demonstrando a presença de vírus de disseminação entérica em água, efluentes, águas superficiais e subterrâneas poluídas a partir de grandes volumes de amostras (VILLAR et al. 2007; BARRELLA et al., 2009; FUMIAN et al., 2011; TEIXEIRA, 2014; GUERRA et al., 2015; FERREIRA, 2017).

Uma pesquisa que teve repercussão, foi no período dos jogos olímpicos no Brasil no ano de 2016, onde as águas das instalações olímpicas aquáticas na Baía de Guanabara, na Lagoa Rodrigo de Freitas e nas Praia de Copacabana foram constatadas que estavam altamente contaminadas com esgoto e presença de níveis perigosamente altos de vírus responsáveis por gastroenterite viral. A maior preocupação ocorreu com os atletas que competiram, nadaram e velejaram em águas tão contaminadas por fezes humanas que se arriscaram a contrair alguma doença (SAÚDE, 2016).

Por isso pesquisas para a detecção de vírus no ambiente aquático vem sendo realizada por meio de diferentes metodologias como cultura de células, microscopia eletrônica, métodos imunológicos (GREENING et al., 1999; FONG; LIPP, 2005; WOLD; ISON, 2013). Com a expansão da virologia ambiental à partir da década de 1990, o estabelecimento de análises moleculares como da reação em cadeia da polimerase (*polymerase chain reaction* – PCR), PCR Multiplex, PCR em tempo real e ICC-RT-PCR (*Integrated cell culture*), permitiu ampliar a análise para a detecção de uma variedade de grupos virais (SILVA et al., 2011; KITAJIMA et al., 2012).

Diante dos riscos e fatos evidenciados no Brasil, a portaria nº 2.914/2011 do Ministério da Saúde, onde recomenda a pesquisa de vírus quando dados epidemiológicos apontarem a água como via de transmissão. A mesma portaria recomenda a inclusão do monitoramento de vírus entéricos no(s) ponto(s) de captação

de água proveniente(s) de manancial(is) superficial(is) de abastecimento, com o objetivo de subsidiar estudos de avaliação de risco microbiológico, embora as investigações desses vírus em amostras ambientais ainda estejam restritas a laboratórios de pesquisa (BRASIL, 2011).

Nesse contexto, a virologia ambiental vem adquirindo um importante papel na construção de novos indicadores socioambientais. Tornando-se cada vez mais relevante à medida que, se constitui uma ferramenta útil de avaliação e controle da qualidade sanitária do ambiente e dos riscos à saúde da população (PRADO; MIAGOSTOVICH, 2014).

Atualmente estão descritos cerca de 140 tipos diferentes de vírus entéricos humanos que podem estar presente em ecossistemas aquáticos, dentre estes destacam-se os vírus de genoma RNA fita simples: Norovírus, Calicivírus, Enterovírus, vírus da hepatite A e E; vírus de genoma RNA fita dupla: Rotavírus e Picobirnavírus; e de genoma DNA fita dupla: Adenovírus. Estes agentes virais são causadores de diversas infecções como gastroenterite, conjuntivite, infecções do trato respiratório, hepatite, e outras sérias infecções como meningite, miocardite, encefalite e paralisia (OMS, 2017). Dentre os principais vírus causadores de gastroenterites virais estão os grupos: Adenovírus, Rotavírus e Norovírus.

1.1.2 Adenovírus

Atualmente, estes vírus são a segunda maior causa de gastroenterite infantil, ficando atrás apenas dos rotavírus (LI et al. 2015; LUCHS; TIMENETSKY, 2016; KFOURI et al. 2017). De transmissão fecal-oral e com partículas altamente resistentes no meio ambiente, dissemina-se por veiculação em águas de consumo, de recreação e na forma de aerossóis, além de alimentos contaminados e fômites também têm se mostrado muito importante no ponto de vista epidemiológico (AMARAL, 2015). As infecções causadas por AdV são consideradas variáveis e sua prevalência em países industrializados possui uma amplitude de 1 a 8%, enquanto que em países em desenvolvimento essa amplitude aumenta para até 31% (LIU et al., 2016).

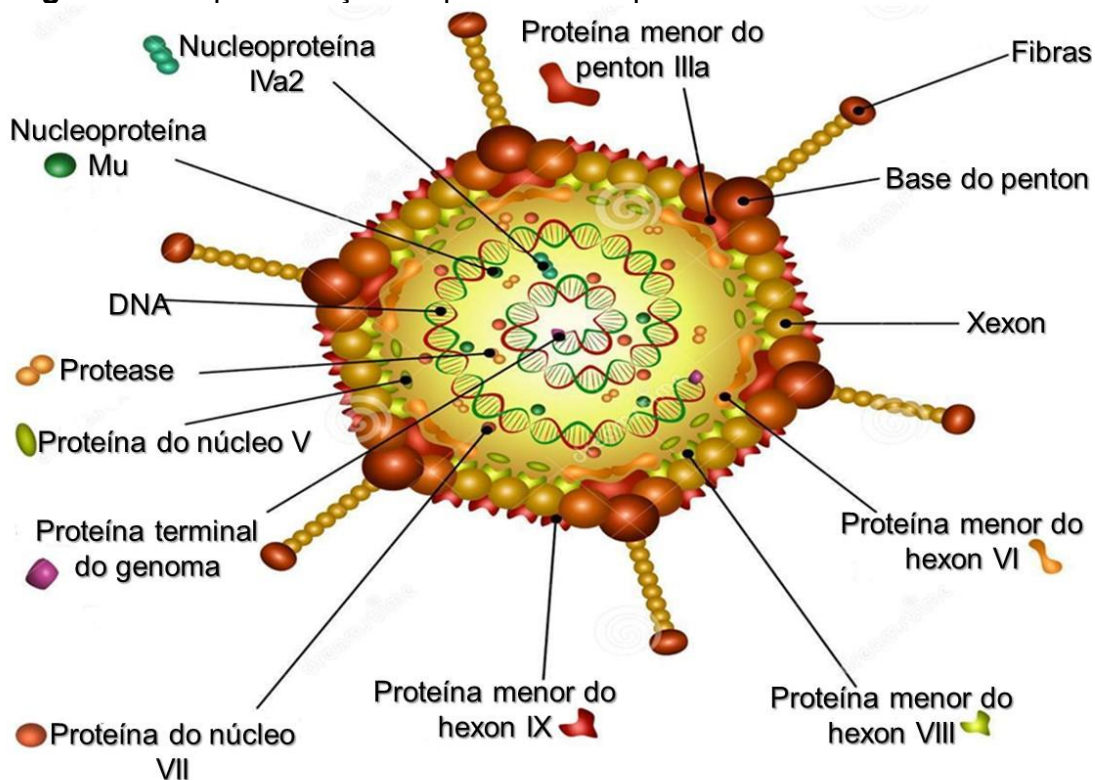
Os adenovírus humanos (HAdV) pertencem à família Adenoviridae e ao gênero *Mastadenovirus*, que contém sete espécies descritos (A-G). Essas espécies compreendem cerca de 67 tipos, com HAdV-D contendo a maioria dos membros

(WOLD; ISON, 2013; GHEBREMEDHIN, 2014). 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, além dos tipos 18 e 31 (espécie A) e tipo 5 (espécie C) (LIU et. al. 2016; MULLER, 2017).

A infecção tem duração de 5 a 12 dias, tendo como principais sintomas diarreia aquosa, vômitos, febre moderada a grave e desidratação leve (WOLD; ISON, 2013; SANTOS; SOARES, 2015). Também podem causar intussuscepção pediátrica (WOLD; ISON, 2013; GINELLI, 2017).

Os AdV são vírus não envelopados de 90 nm de diâmetro, simetria icosaédrica, com um genoma linear de DNA de fita dupla, contendo em média 36 Kb (Figura 1). O vírion é constituído de 11 proteínas, sete das quais estão no capsídeo que é composto por 252 subunidades de capsômeros. Destas, 240 são constituídas pela proteína héxon, as quais compõem as faces do icosaedro, e as demais (12 capsômeros) são compostas pelas proteínas penton-base e fibra que juntas compõem o vértice viral (WOLD; ISON, 2013).

Figura 1 – Representação esquemática da partícula de adenovírus.



Fonte: Dreamstime, 2017

1.1.3 Rotavírus (RV)

O Rotavírus é o principal causador de gastroenterite não bacteriana, que causa infecção em crianças menores de cinco anos em todo o mundo, caracterizada por diarreia, vômitos e febre e cuja evolução leva à desidratação (LIU et al. 2016). Causam a morte de mais de 500 mil crianças pequenas a cada ano, principalmente nas regiões em desenvolvimento do mundo (LI, et al. 2015; LIU et al. 2016). As infecções são transmitidas por via fecal-oral, de pessoa a pessoa, fômites, por ingestão da água ou alimentos, além do contato com superfícies e objetos contaminados, e seu período de incubação varia de um a três dias (SANTOS; SOARES, 2015).

Os Rotavírus pertencem a família Reoviridae e ao gênero Rotavírus, tem partículas virais esféricas, com ≈ 70 a 100nm de diâmetro, com capsídeo de simetria icosaédrica e sem envoltório. O capsídeo é formado por três camadas proteicas: capsídeo interno (core), intermediário e externo. O core contém o genoma viral (ESTES; KAPIKIAN, 2007).

O genoma viral é constituído por 11 segmentos de RNA de fita dupla (RNA_{df}). Cada segmento codifica para uma proteína viral específica, sendo seis proteínas estruturais, denominadas viral protein (VP) – VP1, VP2, VP3, VP4, VP6 e VP7 e seis proteínas não estruturais denominadas non structural protein (NSP) – NSP1, NSP2, NSP3, NSP4, NSP5 e NSP6. Os segmentos dos rotavírus são monocistrômicos, com exceção do segmento 11, o qual codifica para duas proteínas (NSP5 e NSP6) (ESTES; KAPIKIAN, 2007; SANTOS; SOARES, 2015).

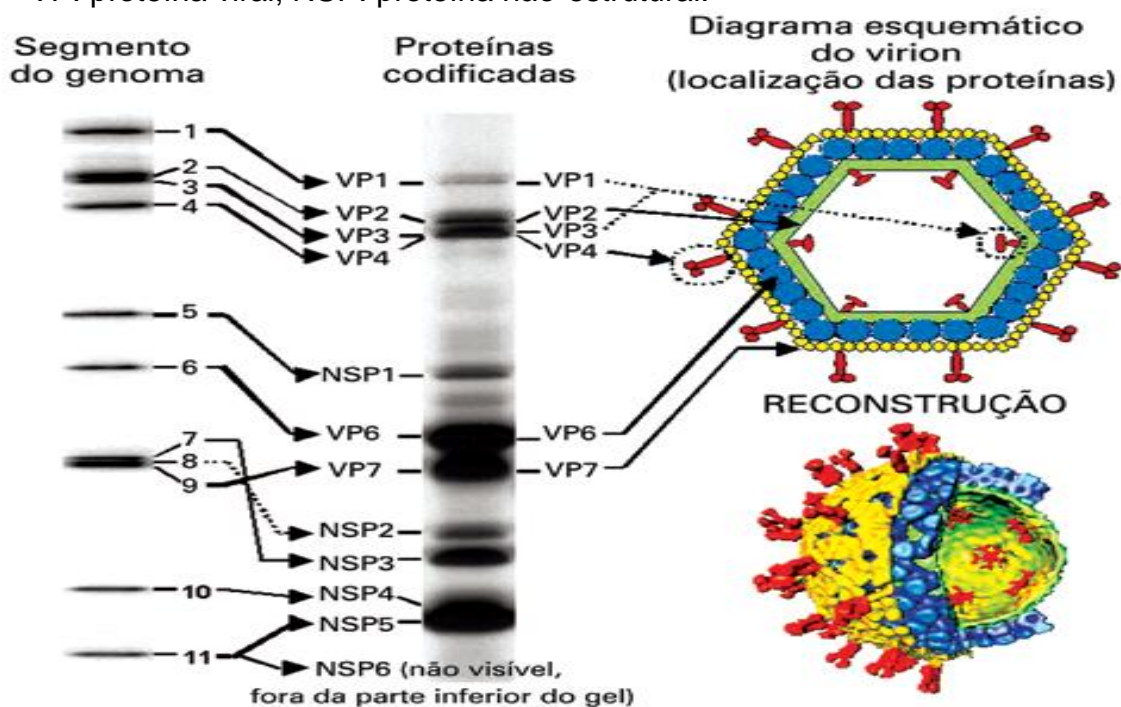
Com base nas propriedades antigênicas da VP6, os RVs foram subdivididos em 5 espécies sorológicas (A-E) e duas espécies tentativas adicionais (F e G) de acordo com o Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus (ICTV) (BALL, 2005; RAHMAN et al., 2010). Os RVs pertencentes às espécies A, B e C (RVA, RVB e RVC) são conhecidos por infectar seres humanos e vários animais, enquanto os RVs das espécies D, E, F e G (RVD, RVE, RVF e RVG), até agora só foram identificados em animais, principalmente pássaros (GRAFF, et al., 2007; RAHMAN et al., 2010).

No grupo A, vários sorotipos já foram caracterizados utilizando anticorpos para as proteínas externas do capsídeo VP7 e VP4. Esse grupo inclui 14 sorotipos de VP7, denominado tipo G (glicoproteína), e pelo menos 15 sorotipos de VP4, chamados de tipo P (sensível à protease) (ESTES; KAPIKIAN, 2007; PALOMBO; BISHOP, 2011). Os genótipos de rotavírus frequentemente detectados, considerados usuais e que

assumem importância epidemiológica universal, são representados pelos tipos G1P[8], G2P[4], G3P[8], G4P[8] e G9P[8], sendo que as amostras G1P[8] prevalecem amplamente. Não obstante, registra-se a emergência de outros tipos como G5, G8, G10, G12, P[6] e P[9], principalmente nos países em desenvolvimento (CASTELLO et al., 2009; LI et al., 2008; LINHARES et al., 2011). Na figura 2 se pode verificar a estrutura da partícula do Rotavírus.

Figura 2 - Representação esquemática da estrutura da partícula de Rotavírus.

*VP: proteína viral; NSP: proteína não-estrutural.



Fonte: Mossel et al., 2016.

Uma característica chave na epidemiologia dos RVA é o seu padrão marcadamente sazonal, entretanto, os mecanismos responsáveis por esse padrão de sazonalidade ainda não estão claros (e.g. umidade relativa, temperatura média, densidade populacional) (MENDES et al., 2013). Em climas temperados, a infecção por RVA ocorre nos meses mais frios e secos do ano (outono e inverno) e, em climas tropicais, as taxas tendem a ser igualmente distribuídas ao longo do ano (MENDES et al., 2013; BÜHLER et al., 2014).

No Brasil, a sazonalidade do RVA é variável, com aumento de incidência entre os meses de maio a setembro (período mais frio e seco) nos Estados das regiões

Central, Sul e Sudeste. Nas regiões Norte e Nordeste do país, a ocorrência de RVA se distribui de maneira uniforme durante o ano todo (COSTA et al., 2016).

O primeiro relato de casos de gastroenterite infantil aguda associado aos RVA na América Latina foi descrito por Linhares et al. (1977) observando por microscopia eletrônica (ME) partículas semelhantes aos RV em fezes de crianças com diarreia aguda em Belém do Pará, Brasil. Desde então, diversos outros trabalhos têm sido publicados demonstrando os casos de GA associados aos RV no país (CARVALHO-COSTA et al. 2011).

Nos humanos, a doença diarreica grave pode ser efetivamente controlada através da vacinação universal contra o RVA (CARMO et al, 2011). Atualmente, existem duas vacinas licenciadas e recomendadas pela OMS, as quais se mostraram seguras e eficientes (CDC, 2015). A RotaTeq® (RV5) (Merck & Co. Inc., West Point, Pennsylvania) é uma vacina oral atenuada pentavalente que contém cinco genótipos virais humanos e bovinos, G1 a G4 + P[8], combinados através de rearranjos (*reassortants*) (CDC, 2015; ROTA, 2016).

A Rotarix® (RIX4414) (GlaxoSmithKline Biologicals, Rixensart, Bélgica) é uma vacina oral atenuada monovalente composta pela cepa G1P1A[8], o qual representa o genótipo humano mais comum de RVA (CDC, 2015). Em 2006, a vacina Rotarix® foi incluída no PNI, prevenindo gastroenterite grave e induzindo uma redução significativa na frequência de detecção de RVA em crianças com gastroenterite (GURGEL et al., 2008). A RotaTeq® também está licenciada no Brasil e disponível apenas nas redes particulares de vacinação.

1.1.4 Norovírus

Os Nov constituem um dos vírus mais comuns presentes em surtos de diarreia e representam o terceiro agente etiológico de importância clínica em casos esporádicos em crianças menores de cinco anos de idade (MACCANNELL et al, 2011). Infectam indivíduos de todas as faixas etárias, mas a maior incidência da doença é entre crianças menores de cinco anos de idade e pessoas idosas, representado um significativo problema de saúde pública no mundo inteiro. Em crianças imunossuprimidas e portadores de câncer, tem sido relatado que os NoV são importantes patógenos oportunistas (MACCANNELL et al, 2011).

Os NoV apresentam distribuição mundial, com picos sazonais que variam de acordo com o continente ou a região estudada. Surtos e casos esporádicos podem ocorrer durante todos os meses do ano. A prevalência detectada nos casos esporádicos de gastroenterites não tem diferença entre os países desenvolvidos e em desenvolvimento. O genótipo mais frequentemente detectado mundialmente é o GII, e o grupo genético mais comum é o GII-4 (AHMED et al., 2013; CHHABRA et al., 2014).

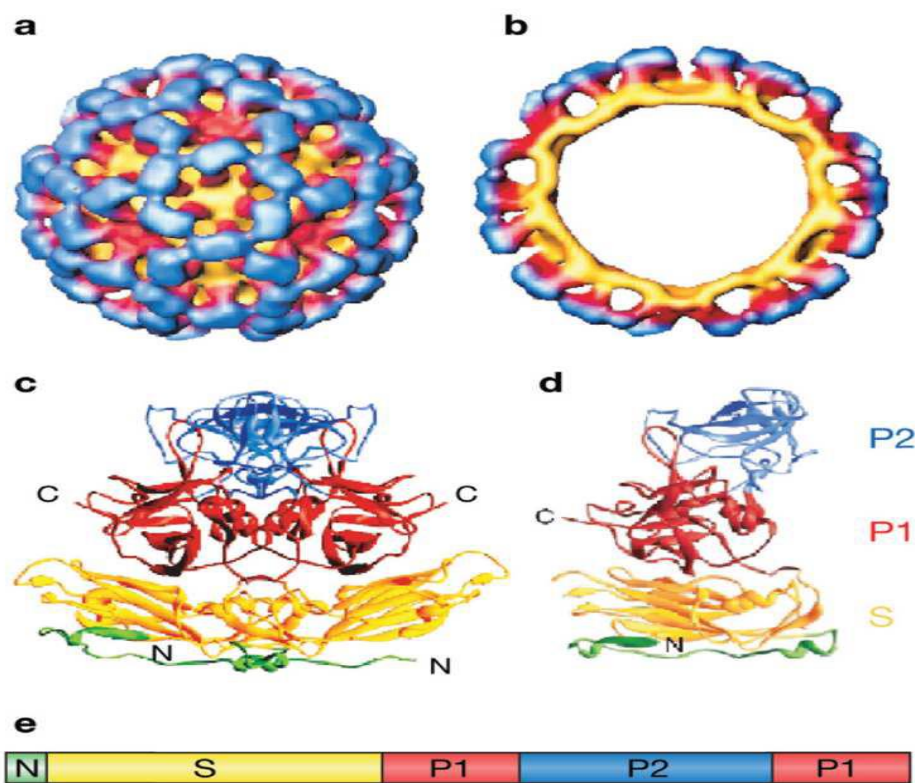
A principal via de transmissão dos NoV é fecal-oral pela ingestão de água ou alimentos contaminados, sendo a transmissão por contato pessoa-pessoa, fômites ou aerossóis (ROBILOTTI et al., 2015). Pessoas infectadas podem eliminar os vírus nas fezes após o período sintomático por mais de 20 dias originando uma fonte de contaminação para possíveis novos casos de gastroenterite. Por estas características, os NoV causam surtos de gastroenterite principalmente em ambientes de uso coletivo tais como hospitais, clínicas geriátricas, escolas, cruzeiros e restaurantes, afetando indivíduos de todos os grupos etários (FERREIRA et al., 2012; LOPMAN et al., 2016).

Os NoV são resistentes e as partículas virais podem permanecer infecciosas por duas semanas em superfícies ambientais e até dois meses em água. O período de incubação do NoV é de 24 a 48 horas, com resolução dos sintomas de 12 a 72 horas, podendo durar até 6 dias (ROBILOTTI et al., 2015).

A família *Caliciviridae* é constituída por quatro gêneros: *Vesivirus*, *Lagovirus*, *Sapovirus* e *Norovirus* (KARST, 2010). O gênero *Norovirus* está dividido em seis genótipos (G): GI, GII, GIII, GIV, GV e GVI, baseados na sequência de aminoácidos do capsídeo. Um sétimo genótipo NoV (GVII) foi proposto recentemente, mas sua classificação ainda é mantida inicialmente em GVI. Somente os genótipos GI, GII e GIV podem infectar seres humanos, com o GII sendo o mais prevalente (> 95% das infecções por NoV) (VINJE, 2015; KRONEMAN, et al., 2013 WHITE, 2014).

A partícula viral dos NOV é esférica com simetria icosaédrica de 27 nm de diâmetro, com número de triangulação (T) igual a três, apresentando 32 depressões grandes na superfície do capsídeo (GLASS et al., 2009). Os 90 capsômeros estão formados por dímeros da proteína capsídica VP1. Esta proteína VP1 tem dois domínios principais: o domínio S, mais interno e o domínio P, mais externo, unidos por uma “dobradiça”. O domínio P está subdividido em dois subdomínios, o subdomínio interno P1 e o externo P2 (Figura 3) (PRASAD et al. 1999).

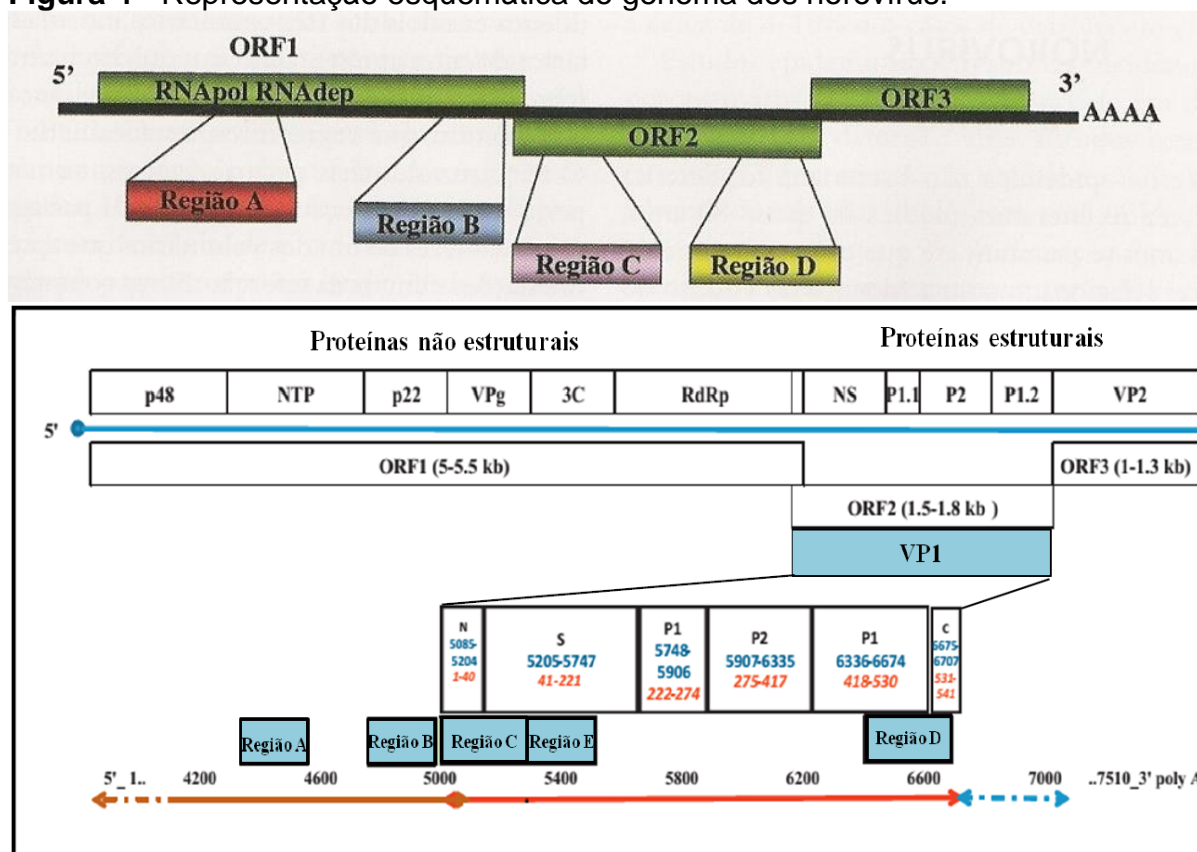
Figura 3 - Estrutura do capsídeo e da proteína capsídica VP1 dos norovírus. a, b: representação da superfície e corte transversal da partícula viral (sem genoma) obtida pela criomicroscopia eletrônica, respectivamente. c, d: dímero e monômero da proteína capsídica VP1 dividida nos domínios S e P e subdomínios P1 e P2, respectivamente. e: estrutura linear da proteína VP1.



Fonte: Tan e Jiang, 2007 com adaptações.

O genoma dos NoV é composto de três regiões abertas de leitura (ORF). A ORF1 (aproximadamente 5kb) está localizada nos dois terços iniciais do genoma e codifica uma poliproteína de aproximadamente 200 kDa, que é processada por proteínas virais originando proteínas não estruturais, entre elas a replicase e a RNA polimerase RNA dependente, essenciais na replicação viral (DONALDSON et al., 2010). A ORF2 com 1,8 kb, codifica a principal proteína do capsídeo viral, a proteína viral 1 (VP1), que numa composição de 180 monômeros, forma o capsídeo viral. A VP1 é dividida em dois domínios, o domínio S ("shell") e o domínio P ("protruding"), o qual é subdividido em dois subdomínios P1 e P2, regiões altamente variáveis e alvo de anticorpos neutralizantes. A ORF3 com 0,6 kb, codifica a proteína "minor" do capsídeo viral com 22 kDa, a VP2 (Figura 4) (DONALDSON et al., 2010).

Figura 4 - Representação esquemática do genoma dos norovírus.



Fonte: Hoa Tran et al., 2013.

1.1.5 Águas Subterrâneas

O acesso as águas subterrâneas tornam-se disponíveis ao uso humano principalmente a partir da perfuração de poços. Possuem elevado padrão de qualidade físico-química e bacteriológica, por serem naturalmente protegidas (mas não imunes) dos agentes de poluição e contaminação, o que dispensam, na maioria dos casos, tratamento. A poluição/contaminação da água subterrânea podem estar relacionadas com as atividades humanas e/ou por processos naturais (BRAGA et al., 2018).

A água pode ser obtida pelo uso de um aquífero confinado e/ou livre, sendo que este último apresenta características mais vulneráveis à contaminação, porém é o mais utilizado por pessoas que não têm acesso a um sistema de abastecimento público, visto que possui baixo custo ao seu acesso (SILVA; ARAÚJO, 2003; BRAGA et al., 2018).

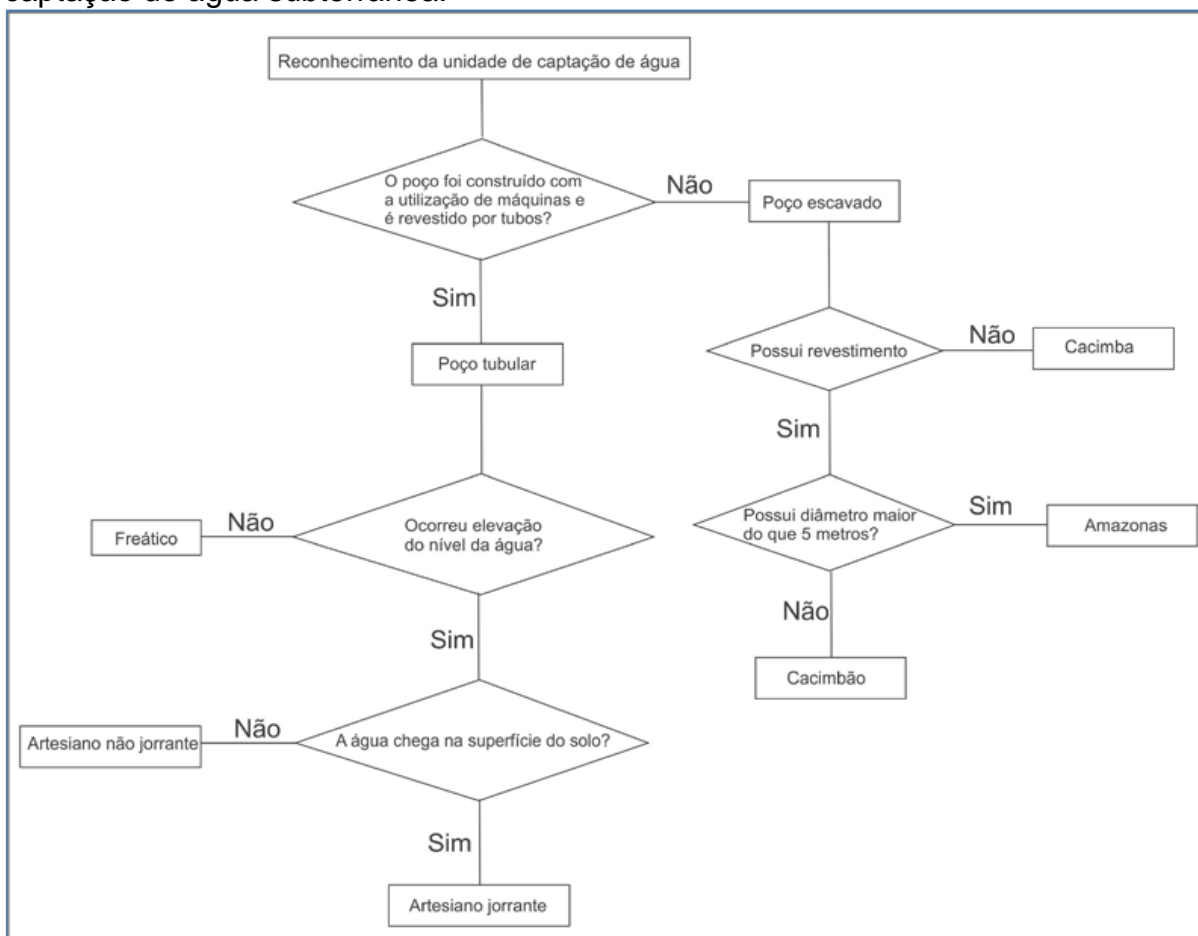
Dentre as fontes de contaminação das águas subterrâneas podem ser a deposição de resíduos sólidos no solo, esgotos, fossas e cemitérios (fontes potenciais de contaminação da água, principalmente por microrganismos). O lançamento de esgotos diretamente sobre o solo ou na água, os vazamentos em coletores de esgotos e a utilização de fossas construídas de forma inadequada constituem as principais causas de contaminação da água subterrânea (SOUSA et al, 2016).

Essas formas comuns de poluição/contaminação através de filtragem vertical descendente polui um aquífero mais profundo pelas águas de um aquífero livre superior (que ocorre acima do primeiro). Os poços mal construídos e/ou abandonados sem critérios técnicos, com revestimento corroído/rachado, sem manutenção e abandonados sem o fechamento adequado (tamponamento), podem constituir vias importantes de contaminação das águas subterrâneas (SOUSA et al, 2016).

Existem duas tipos de poços abordada por Rodrigues (1977) - os rasos e os profundos - sendo os rasos construídos com ferramentas manuais e os profundos com maquinaria especial. O termo raso, apesar de ser empregado em muitos trabalhos referindo-se a captação de aquíferos livres, muitas vezes pode-se tornar vago, pois não se define até qual profundidade iremos considerar um poço como sendo raso (CAPUCCI et al., 2001; VASCONCELOS, 2017).

Segundo Vasconcelos (2014) os poços escavados são caracterizados por possuírem, geralmente, um diâmetro superior a 0,5 com profundidades bastante variadas de um metro a dezenas de metros, dependendo diretamente da litificação da formação geológica. Podem ser subdivididos em três classes mais específicas: cacimba, cacimbão e amazonas. Os poços tubulares, como o próprio nome designa, possuem um revestimento tubular, que geralmente pode ser de policloreto de vinila (PVC), PVC geomecânico (SIMABUKURO, 2000) ou aço. Os diâmetros são geralmente inferiores a 1 metro, podendo em alguns casos apresentar uma redução do diâmetro à medida que aumenta a profundidade da perfuração. Na figura 5 é ilustrado a classificação de poços.

Figura 5 - Fluxograma orientativo para reconhecimento e classificação da unidade de captação de água subterrânea.



Fonte: Vasconcelos, 2017.

O Estado do Amapá está inteiramente inserido na Região Hidrográfica do Amazonas e, portanto, possui mananciais com elevadas disponibilidades hídricas. O próprio rio Amazonas atende a Região Metropolitana de Macapá, sendo também utilizado abastecimento complementar por poços. Com relação aos recursos hídricos subterrâneos, os principais sistemas aquíferos do Estado são o Alter do Chão e Barreiras (ANA, 2010; GROTT, 2016).

O aquífero Barreiras que abrange a cidade de Macapá, de acordo com as análises de seções geológica-hidrogeológicas é possível defini-lo como dos tipos raso e livre à semiconfinado (CABRAL; LIMA, 2005). Quanto a potencialidade hídrica subterrânea da área, o contexto aquífero local é caracterizado pela ocorrência de sedimentos argilosos, intercalados por lentes a delgadas camadas siltico arenosas a arenosas pouco espessos. Esta geometria das camadas permite inferir que os aquíferos na região são do tipo livre (entre 06 e 14 m) e/ou sistemas aquíferos semi-confinados situados entre profundidades de 30 a 70 m (CABRAL; LIMA, 2005).

As águas subterrâneas desses aquíferos são um recurso natural de fundamental importância para o desenvolvimento humano. Elas são fontes de abastecimento diário para mais de 2 bilhões de pessoas, em todo o planeta e são reservas essenciais por estarem disponíveis a qualquer momento, além de proporcionarem baixo custo de armazenamento, constituir-se como fonte alternativa às águas superficiais, sujeitas a alterações mais frequentes na sua qualidade natural (LÖBLER; SILVÉRIO-SILVA, 2015). Essas águas no Brasil, vem tendo a sua exploração cada vez mais intensificando. As águas tanto de poços como de fontes vem sendo utilizada para diversos fins, como por exemplos: abastecimento humano, irrigação, indústria e lazer (ANA, 2011). Braga et al. (2014) ressaltam-se que a entrada continua de contaminante nos recursos subterrâneos, podem ultrapassar a resiliência do ecossistema, levando a perdas dramáticas e possivelmente irreversíveis, pois as águas subterrâneas são recursos de água doce particularmente vulnerável: uma vez contaminada, eles são difíceis e caros para restaurar.

A importância da utilização das águas desses aquíferos pela perfuração de poços é fundamental para a população de Macapá, uma vez que o sistema de abastecimento público da cidade, não atende toda a população e sendo este um sistema frágil e suscetível à contaminação, devido a grande quantidade de poluentes existentes no seu percurso, colocando em risco a saúde dos usuários, pois não se tinha estudos sobre a qualidade das águas a nível virológico que estavam sendo consumidas.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

- Detectar a presença de vírus entéricos, coliformes totais e *Escherichia coli* em amostras de água oriundas de poços da cidade de Macapá-Ap através de análise molecular.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar análise colimétrica em amostras de água de poço;
- Detectar presença de Adenovírus, Rotavirus e Norovirus em amostras de água de poço por amplificação genômica (PCR);
- Realizar a análise filogenética das amostras positivas para vírus entérico;
- Correlacionar a prevalência de vírus entéricos com a sazonalidade;
- Associar a relação entre os indicadores bacteriológicos de qualidade da água e a ocorrência de vírus;
- Comparar o nível de contaminação por vírus entéricos entre as zonas e bairros da cidade;

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 ÁREA DE ESTUDO

A cidade de Macapá-AP possui uma área de 6.407 km² e 381.214 habitantes na área urbana, ficando situada na latitude 00°02'18.84"N e longitude 51°03'59.10"O. Atualmente possui 60 bairros, mas apenas 34 deles são regularizados legalmente. Foram considerados nesta pesquisa apenas os bairros oficializados cadastrados pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística IBGE, segundo dados do censo demográfico de 2010, e para efeitos de amostragem alguns bairros contíguos foram condensados em 27 bairros.

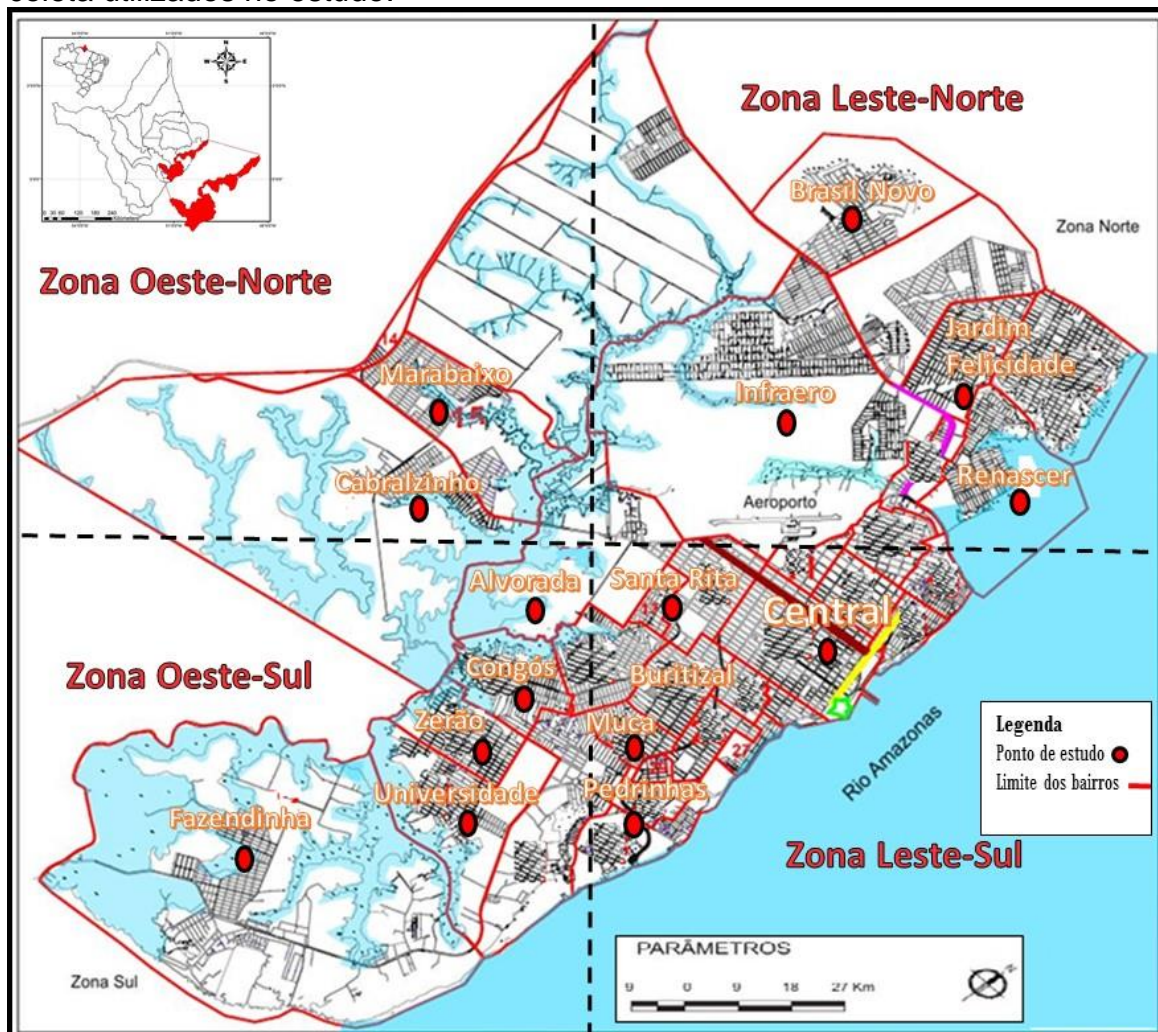
De acordo com a metodologia de Levine et. al., (2000) para o cálculo do tamanho mínimo da amostra utilizou-se a equação para população finita $n = [N \cdot p \cdot q \cdot (Z\alpha/2)^2] / [p \cdot q \cdot (Z\alpha/2)^2 + (N-1) E^2]$, adotando o nível de confiança de 95% e margem de erro de 5%, no qual resultou em 16 bairros. Assim foram plotados 16 pontos de coleta em diferentes poços utilizados para consumo humano (Figura 6).

A área de estudo foi dividida em quatro zonas e foram estabelecidos o tamanho mínimo da amostra por zona, utilizando o tipo de amostragem estratificada proporcional entre as zonas da cidade, utilizando o software Bioestat 5.0 (AYRES et al., 2007). Os pontos de água contemplam as seguintes zonas e bairros: *zona oeste-norte* (Marabaixo, Cabralzinho), *zona leste-norte* (Infraero, Renascer, Jardim Felicidade, Brasil Novo), *zona oeste-sul* (Fazendinha, Universidade, Congós, Zerão, Alvorada), *zona leste-sul* (Central, Muca, Santa Rita, Pedrinhas, Buritizal). Cada ponto de coleta, onde foram coletadas as amostras de água de poço, recebeu um código para facilitar a identificação das amostras (Quadro 1).

Quadro 1 – Pontos de coleta de água na cidade de Macapá-AP, com seus respectivos códigos de identificação.

Pontos de coleta	Código de identificação	Pontos de coleta	Código de identificação
Renascer	P01	Central	P09
Jardim Felicidade	P02	Universidade	P10
Brasil Novo	P03	Fazendinha	P11
Infraero	P04	Buritizal	P12
Muca	P05	Santa Rita	P13
Alvorada	P06	Marabaixo	P14
Zerão	P07	Pedrinhas	P15
Congós	P08	Cabralzinho	P16

Figura 6 – Localização da cidade de Macapá, Amapá, Brasil e dos 16 pontos de coleta utilizados no estudo.



Fonte: Toste, 2013, com adaptações.

3.2 COLETA DAS AMOSTRAS DE ÁGUA

As amostras de água foram coletadas mensalmente por 4 meses em 16 pontos entre novembro de 2016 a março de 2017. A coleta de água para análise de vírus foi realizada utilizando frascos de polipropileno esterilizados, com volume total de 2 L e para a coleta de água para análise dos indicadores bacteriológicos foram utilizados frascos de 100 mL, e todos foram armazenados em caixa térmica contendo gelo e encaminhados para o Laboratório de Limnologia da Universidade Federal do Amapá onde as amostras foram processadas (Figura 7).

Em cada ponto foram coletadas 4 amostras de água de poços diferentes (64 amostras por coleta), totalizando no final 256 amostras de água coletada. Destas

foram realizadas 1.024 análises (768 análises virológicas: 256 análises de adenovírus; 256 análises de Rotavírus e 256 análises de norovírus. E 256 análises bacteriológicas).

Figura 7 – Coleta das amostras de água. Frascos utilizados na coleta de água (A); Coleta de água para análise físico-química na saída da bomba (B); Coleta de água depois da bomba (C); Coleta de água antes da água cair na caixa d'água (D); Concentração das amostras virais (E), Análises físico-química e microbiológica das amostras de água (F) e Análise virológica (G).



Fonte: Elaborada pela autora.

3.3 ENSAIO BACTERIOLÓGICO

Para a análise dos parâmetros bacteriológicos: coliformes totais e *E. coli* seguiu-se a metodologia própria do Kit Básico de Potabilidade da Água Alfakit® (código 2693). Todas as análises foram realizadas no mesmo dia da coleta, em triplicatas, a partir, de uma única coleta.

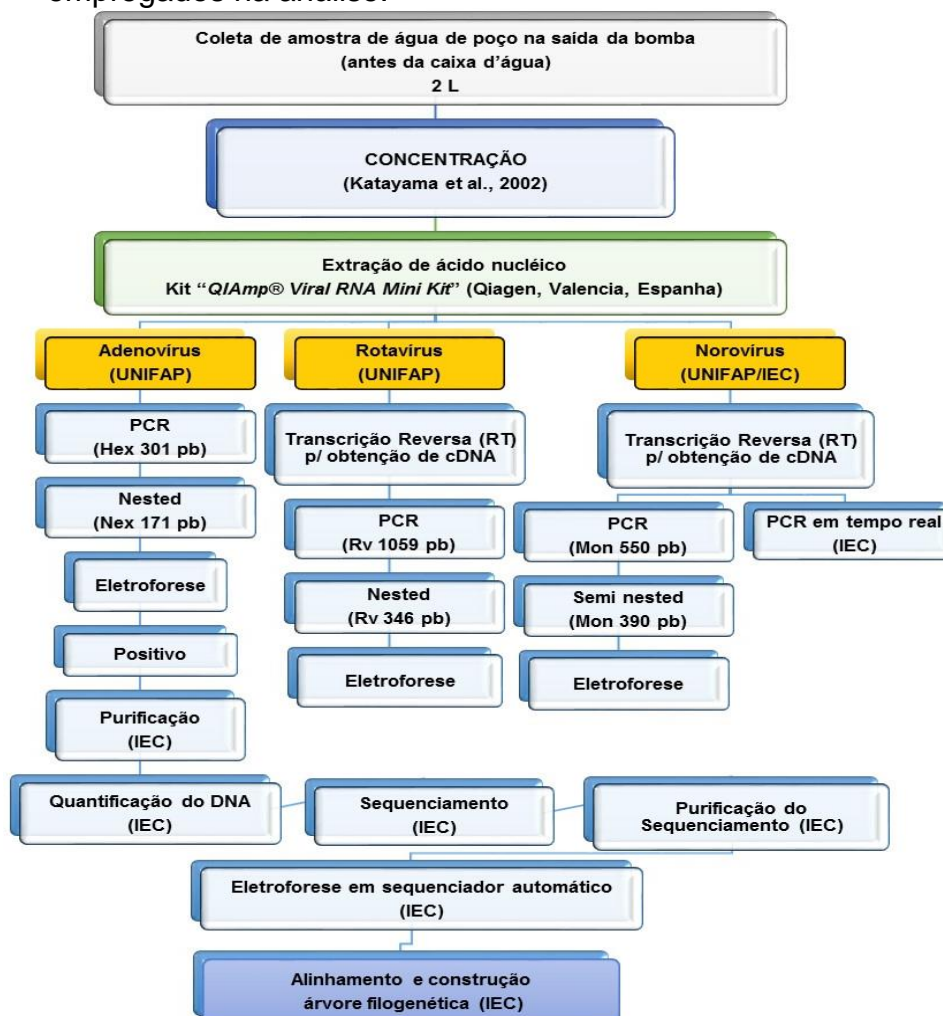
A análise foi realizada a partir de cartelas prontas com o meio de cultura em forma de gel desidratado que é capaz de detectar e quantificar a presença de coliformes totais e *E. coli* (Meio cromogênio em *DIP SLIDE* em papel –*Colipaper* – concentração mínima detectável 80 UFC/100 mL).

Para a leitura do resultado nas cartelas foi utilizado o contador de colônias, os pontos vermelhos, azuis e violeta, na cartela, representavam coliformes totais e pontos azuis e violetas, na cartela, representavam *E. coli*. Para expressar o valor de UFC (Unidade Formadora de Colônia) multiplicou-se o fator de correlação (80) pelo valor encontrado em cada cartela.

3.4 PROTOCOLO DE DETECÇÃO VIRAL

As análises de vírus entéricos em amostras de água são baseadas em duas etapas: Concentração e Detecção viral. A figura 8 demonstra, de maneira esquemática, todos os procedimentos laboratoriais realizados.

Figura 8 - Fluxograma de todos os procedimentos laboratoriais empregados na análise.



Fonte: Elaborada pela autora.

3.5 CONCENTRAÇÃO VIRAL

A concentração de possíveis partículas virais presentes nas amostras foi realizada pelo método de adsorção-eluição adaptado de Katayama et al. (2002). As amostras foram filtradas utilizando um sistema constituído por uma bomba de vácuo, um recipiente de pressão e um suporte de membranas.

Foi adicionado à amostra 1.200 mg de cloreto de magnésio ($MgCl_2$, Vetec, Brasil), ajustando o pH para 5,0 com a adição de ácido clorídrico 6 N (HCl, Merck, Brasil). Em seguida, a mesma foi filtrada em membrana HA (47 mm de diâmetro, malha de 0,45 μm , Millipore®, Brasil) acoplada ao suporte do sistema de filtração. A membrana foi rinsada com 300 mL de ácido sulfúrico 0.5 mM, pH 3 (H_2SO_4 , Merck, Brasil). Os vírus foram eluídos em 15 mL de hidróxido de sódio 1 mM, pH 10,5 (NaOH, Vetec, Brasil) por agitação em placa de Petri durante 10 minutos. O eluato foi neutralizado pela adição de 50 μL de H_2SO_4 50 mM e 50 μL de tampão Tris-EDTA (TE) 100X (10 μM Tris, 1mM EDTA, pH 8,0) e transferido para um concentrador de amostras líquidas Amicon Ultra-15 (Millipore, Brasil). Em seguida, foi realizada centrifugação a 5000 rpm por 15 minutos a 4°C, resultando em um volume final de 2 mL, o qual foi estocado a -20°C para posterior extração do material genético.

3.5.1 Extração do DNA e RNA viral

Para obtenção do DNA e RNA viral utilizou-se o Kit “*QIAmp® Viral RNA Mini Kit*” (Qiagen, Valencia, Espanha) conforme instruções do fabricante, cujo fundamento baseia-se nas propriedades seletivas de ligação do RNA a membrana de sílica-gel combinadas à centrifugação em alta velocidade. Em um microtubo de 1,5 mL contendo substância carreadora de RNA, adicionou-se 565,6 μL de tampão de lise (AVL) e 140 μL da amostra concentrada, sendo homogeneizada por 15 segundos por agitação em vórtex e incubada a temperatura ambiente (15-25 °C) por 10 minutos, tempo suficiente para a completa lise das partículas virais. Após período de incubação, 560 μL de etanol (96 – 100%) gelado foi adicionado à mistura agitando por 15 segundos. Em dois passos, a solução mistura foi transferida para o tubo contendo uma coluna com membrana de sílica-gel em seu interior: 630 μL transferido à coluna e centrifugado a 8.000 rpm por 1 minuto à temperatura ambiente, o tubo coletor

contendo o filtrado foi descartado. Após as centrifugações, 500 µL de tampão de precipitação Buffer AW1 foi cuidadosamente adicionado à coluna e então centrifugado a 8.000 rpm por 1 minuto. A coluna foi transferida para novo tubo coletor, sendo o anterior contendo o filtrado descartado. Um volume de 500 µL de tampão de lavagem Buffer AW2 foi adicionado à coluna e centrifugado a 8.000 rpm por 3 minutos, o filtrado descartado, e uma nova centrifugação a 14.000 rpm por 3 minutos foi realizada para eliminar possíveis traços do tampão AW2, uma vez que pequenas concentrações desse reagente podem interferir na amplificação do RNA. A coluna foi transferida para um microtubo de 1,5 mL estéril, devidamente identificado, sendo em seguida adicionado 60 µL de tampão de eluição Buffer AVE. As amostras foram incubadas durante 1 minuto à temperatura ambiente e centrifugadas a 8.000 rpm durante 1 minuto para recuperação de RNA aderido a membrana de sílica-gel. O DNA e RNA extraídos foram armazenados em freezer a -20 °C.

3.5.2 Síntese do DNA complementar (cDNA)

Para a obtenção do DNA complementar (cDNA), o RNA viral foi submetido à reação de transcrição reversa (RT) utilizando um iniciador randômico pd(N)6 (Invitrogen). A reação de RT foi realizada a partir de 6 µL de RNA juntamente com 1 µL de dimetil sulfóxido (DMSO) e foi desnaturado em termociclador *DynaCyclers DCL* (*Dynalab*) a 97°C por 7 minutos, seguido de choque térmico em banho de gelo durante 2 minutos. A seguir, adicionou-se ao RNA desnaturado 18 µL da mistura de reagentes (Quadro 2), a qual foi inserida em termociclador por 1 hora a 42°C e 10 minutos a 95°C, para a realização da reação de transcrição reversa (RT).

Quadro 2 – Reagentes, volumes e concentrações da reação de transcriptase reversa

Reagentes	Volume (1 reação)
H ₂ O ultra pura livre de DNase e RNase	10,75 µL
dNTP's	1,0 µL
10x Buffer	2,5 µL
MgCl ₂ 50m	1,25 µL
Primer Randômico	1,0 µL
Transcriptase reversa RT	0,5 µL
Total	20 µL

3.6 DETECÇÃO DE NOROVÍRUS

A detecção de NoV foi realizada tanto pela PCR convencional quanto pela PCR em tempo real.

3.6.1 Reação em cadeia pela polimerase para detecção molecular de norovírus.

Para a detecção e amplificação do NoV foi utilizado protocolo adequado para NoV GII, utilizando os iniciadores Mon 431/432 (ANDERSON et al., 2001; FANKHAUSER et al., 2002) e G2SKR (KOJIMA et al., 2002) na primeira etapa (PCR). Inicialmente foi preparada uma mistura de reagentes (Quadro 3).

Quadro 3 – Reagentes utilizados na PCR para detecção de norovírus.

Reagentes	Concentração na reação	Volume na reação (µL)
H ₂ O	-	14 µL
dNTPs	3,2 mM	2 µL
10X Buffer	1X	2,5 µL
MgCl ₂	0,6 mM	0,3 µL
Primers Mon 431/432/G2SKR*	0,72 pmol	0,9 µL
Taq DNA Polimerase	0,06 U	0,3 µL

*Amplicons: 550pb (Mon 431/432/G2SKR)

Em um tubo plástico tipo Eppendorf® de 200µL foram adicionados 20µL de mistura de reagentes e 5µL de cDNA de cada amostra. Os tubos foram colocados em termocicladores programados para a etapa de desnaturação a 94 °C por 2 minutos, 40 ciclos de amplificação de 94 °C por 30 segundos, anelamento a 53,6 °C por 30 segundos e extensão a 72 °C por 1 minuto. A última etapa foi a de alongamento da fita de DNA, a 72 °C por 7 minutos.

Na segunda etapa, foi utilizado o par COG2F/G2SKR (semi nested) para detecção específica de NOV GII (KAGEYAMA et al., 2003). Para a semi nested, 2,0 µL do produto da reação de PCR foi adicionado a 23 µL da mistura de reação (Quadro 4).

Quadro 4 – Concentrações e volumes dos reagentes utilizados na segunda etapa da reação de semi nested para detecção de norovírus genogrupo GII.

Reagentes	Concentração na reação	Volume na reação (µL)
H ₂ O	-	16,6 µL
dNTPs	3,2 mM	2 µL
10X Buffer	1X	2,5 µL
MgCl ₂	2,0 mM	1,0 µL
Primers COG2F/G2SKR*	0,48 pmol	0,6 µL
Taq DNA Polimerase	0,06 U	0,3 µL

***Amplicons:** 390pb (COG2F/G2SKR)

A amplificação da semi *nested* consistiu em desnaturação inicial a 94°C por 3 minutos, seguida de 30 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento a 55°C por 30 segundos e, extensão a 72°C por 1 minuto, acrescido de um ciclo de extensão final a 72°C por 7 minutos.

Ao final das reações todos os produtos amplificados, os controles positivo, negativo e o peso molecular foram submetidos à eletroforese horizontal em gel de agarose a 1,5% e visualizados em aparelho de foto-documentação para gel (Gel-Doc da Vilber Lourmat). Amostras positivas para NoV GII apresentaram fragmentos com tamanho de 390 pb. As sequências de todos os iniciadores utilizados nesse método estão detalhadas no quadro 5.

Quadro 5 - Iniciadores utilizados na detecção de norovírus genogrupo GII (região parcial do capsídeo) em amostras de água PCR e semi nested.

Primer	Sequência 5'-3'	Referência
Mon 431	TGGACIAGRGGICCYAAYCA	Anderson et al., 2001 Fankhauser et al., 2002
Mon 432	TGGACICGYGGICCYAAYCA	Anderson et al., 2001 Fankhauser et al., 2002
G2SKR	CCRCCNGCATRHCCRTTRTACAT	Kojima et al., 2002
COG2F	CARGARBCNATGTTYAGRTGGATGAG	Kageyama et al., 2003

R: A/G; B: C/G/T; Y: C/T; N: A/C/G/T

3.6.2 TaqMan® PCR em tempo real

A TaqMan® PCR em tempo real foi adaptada de Pang et al. (2005), com iniciadores e sondas fluorescentes previamente descritos por Kageyama et al. (2003), os quais são genogrupos específicos. O par de iniciadores COG2-F/COG2-R juntamente com a sonda G2 foram utilizados para detectar o genogrupo II de NoV. A sonda G2 é marcada com os fluoróforos VIC e FAM, respectivamente. Todas as amostras foram testadas em duplicatas. As concentrações e os volumes dos reagentes utilizados para a reação estão apresentados no Quadro 6.

Quadro 6 – Concentrações e volumes dos reagentes utilizados na reação de TaqMan® PCR em tempo real para detecção do genogrupo II de norovírus.

5,0 µL (Templare RNA) + 15 µL Mix = 20,0 µL reação			
	Reagente	Concentração	Volume (µL)
NoV GII	H2O ultra pura livre de DNase e RNase (Gibco)	-	0,9
	TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems)	2x	12,5
	Iniciador COG2-F (senso)	400 µM	0,3
	Iniciador COG2-R (anti-senso)	400 µM	0,3
	Sonda G2 (senso)	200 µM	0,3
	Taq RT-enzyme		0,7
	Total		-

A reação foi realizada no equipamento *7500 Real Time PCR System* (Applied Biosystems) nas seguintes condições apresentadas no quadro 7. As sequências de todos os iniciadores e sondas utilizados na reação estão detalhadas no quadro 8.

Quadro 7 – Condições para reação por TaqMan® PCR em tempo real.

Kit: TaqMan RNA-to-Ct 1-Step (Applied Biosystems)		
Ciclagem		
Transcriptase reversa RT	48°C – 15 min.	
Atividade da Enzima	95° - 10 min.	
Desnaturação	95°C -15 seg	
Anelamento e Extensão	60° - 1 min	40x

Quadro 8 - Iniciadores e sondas utilizados na detecção de norovírus em amostras de água e esgoto por TaqMan® PCR em tempo real.

Primer/Sonda*	Sequência 5'-3' Genogrupo II de NoV	Tamanho (pb)
COG2-F	CARGARBCNATGTTYAGRTGGATGAG	98
COG2-R	TCGACGCCATCTTCATTCACA	98
G2	FAM-TGGGAGGGCGATCGCAATCT-TAMRA	98

*Kageyama et al., 2003; R: A/G; B: C/G/T; Y: C/T; N: A/C/G/T

3.7 DETECÇÃO DE ROTAVÍRUS

3.7.1 Reação em cadeia pela polimerase para detecção molecular de Rotavírus

Para a amplificação de fragmento específico para rotavírus (RV), um volume de 5,0µL de cDNA foi utilizado com mistura de reação (Quadro 9). A reação ocorreu a 94°C por 5 minutos, seguida de 35 ciclos a 94°C por 20 segundos, 60°C por 20 segundos e 72°C por 30 segundos, e extensão final de 72°C por 7 minutos. 1,0 microlitro do produto da PCR foi utilizado em reação de nested-PCR (Quadro 10). A reação ocorreu a 94°C por 5 minutos, 35 ciclos a 94°C por 30 segundos, 60°C por 30 segundos e 72°C por 1 minuto, seguido por extensão final de 72°C por 5 minutos. Ambas as reações ocorreram na termocicladora *DynaCyclers DCL (Dynalab)*. Os iniciadores utilizados (Quadro 11) nas reações de PCR (VP6-F e VP6-R) e nested-PCR (VP6NR e VP6NF), encontrados em região conservada do gene VP6 para rotavírus do grupo A, foram previamente descritos por Iturriza-Gomara et al. (2002).

Quadro 9 – Concentrações e volumes dos reagentes utilizados na PCR para detecção de rotavírus.

Reagentes	Concentração	Volume na Reação (20 µL)
Água ultrapura	-	9,0 µL
DNTP	3,2mM	2,0 µL
Tampão10X	1X	2,5 µL
MgCl ₂	2,0mM	2,0 µL
VP6-F	0,8pMol/µL	2,0 µL
VP6-R	0,8pMol/µL	2,0 µL
Taq polimerase	0,06U/µL	0,5 µL

Quadro 10 – Concentrações e volumes dos reagentes utilizados na segunda etapa da reação de nested para detecção de rotavírus.

Reagentes	Concentração	Volume na Reação (24 µL)
Água ultrapura	-	13,0 µL
DNTP	3,2mM	2,0 µL
Tampão10X	1X	2,5 µL
MgCl ₂	2,0mM	2,0 µL
VP6-NR	0,8pMol/µL	2,0 µL
VP6-NF	0,8pMol/µL	2,0 µL
Taq polimerase	0,06U/µL	0,5 µL

Quadro 11 – Sequências dos oligonucleotídeos iniciadores em cada reação de PCR para detecção de rotavírus.

	PCR	Primers	Sequência* (5'→3')	Amplicon (pb)	Gene alvo
RVA	1ªPCR	VP6-F	GACGGVGCRACTACATGGT	1356	VP6
		VP6-R	GTCCAATTCATNCCTGGTGG		
	nPCR	VP6-NR	GCW AGA AATTTT GAT ACA	155	
		VP6-NF	GATTCACAAACTGCAGA		

*Código universal de nucleotídeos degenerados (W=A ou T). RVA=rotavírus grupo A;

Para a visualização dos *amplicons*, 10 µL dos produtos da Nested 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 1 hora (100 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 155 pb foram consideradas positivas. Após a eletroforese, as bandas de interesse foram comparadas com o peso molecular.

3.8 DETECÇÃO DE ADENOVÍRUS

3.8.1 Reação em cadeia pela polimerase para detecção molecular de Adenovírus

Para a detecção de HAdV (A-F) foi utilizado o par de iniciadores (Hex1deg/Hex2deg) descrito por Allard et al. (2001) (Quadro 12). Foram utilizados 5 µL do DNA extraído e o volume final de cada reação de PCR foi de 25µL, sendo que os reagentes e suas respectivas concentrações estão apresentadas no quadro 13. 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 *DynaCyclers DCL (Dynalab)* 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 5 minutos.

Quadro 12 - Iniciadores utilizados para a detecção do gene *hexon* de adenovírus humanos por PCR e Nested-PCR em amostras de água de poço.

INICIADOR	SEQUÊNCIA	GENE ALVO	AMPLICON (pb)
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'		

Quadro 13- Reagentes e suas respectivas concentrações utilizadas para a amplificação por PCR do gene *hexon* de adenovírus em amostras de água de poço.

Reagentes	Concentração	Volume na Reação (20 µL)
Água ultrapura	-	12,2 µL
DNTP	3,2mM	2,0 µL
Tampão10X	1X	2,5 µL
MgCl ₂	2,0mM	1,0 µL
Hex1deg	0,8pMol/µL	1,0 µL
Hex2deg	0,8pMol/µL	1,0 µL
Taq DNA polimerase	0,06U/µL	0,3 µL

***Amplicon PCR:** 301pb (Hex1deg/ Hex2deg)

A nested-PCR foi utilizada como tentativa de otimizar o produto gerado pela PCR para a realização de uma maior amplificação do DNA genômico, haja vista a dificuldade que é amplificar um maior número de cópias para a obtenção de sequências com qualidade para análise. Foram utilizados os pares de iniciadores (Nehex3deg/Nehex4deg) descritos por Allard et al. (2001) (Quadro 14). O volume final de cada reação de NESTED foi de 25µL, sendo que os reagentes e suas respectivas concentrações estão apresentadas no Quadro 14. Para a segunda reação, 1,0 µL da 1ª PCR foi adicionado a 24 µL mistura de reação. As reações de amplificação foram realizadas em termociclador 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).

Quadro 14 – Reagentes e suas respectivas concentrações utilizadas para a amplificação por Nested-PCR do gene *hexon* de adenovírus em amostras de água.

Reagentes	Concentração	Volume na Reação (24 µL)
Água ultrapura	-	16,2 µL
DNTP	3,2mM	2,0 µL
Tampão10X	1X	2,5 µL
MgCl ₂	2,0mM	1,0 µL
Nehex3deg	0,8pMol/µL	1,0 µL
Nehex4deg	0,8pMol/µL	1,0 µL
Taq DNA polimerase	0,06U/µL	0,3 µL

*Amplicon PCR: 171 pb (Nehex3deg/Nehex4deg)

3.9 CONTROLE DE QUALIDADE

Em todas as etapas foram utilizados controles de qualidade para avaliar a eficácia da triagem viral tanto dos métodos de concentração quanto da PCR. Foram utilizados dois: controles negativos (água livre de DNase e RNase estéril) e um controle positivo.

Os controles positivos foram obtidos a partir da suspensão de fezes contendo cada um dos vírus pesquisados (isoladamente) de crianças com diarreia, participantes

de outros estudos e cedidas do banco de amostras do Instituto Evandro Chagas, Seção Virologia em Ananindeua/PA.

Para realização do controle positivo, na etapa de concentração inicial, foram inoculadas nas amostras de água, cerca de 500µL de suspensão de fezes a 10%, em tampão Tris/HCl-CaCl₂ (0,01M, 0,0015M) pH=7.2, para cada um dos vírus pesquisados, a fim de garantir que a metodologia utilizada fosse capaz de identificar resultados positivos. Após inoculação, o procedimento seguiu as mesmas etapas realizadas para as amostras ambientais.

3.10 PURIFICAÇÃO DO PRODUTO DA PCR

Os produtos obtidos pela nested-PCR foram purificados, objetivando o posterior sequenciamento de nucleotídeos. Utilizou-se o kit disponível comercialmente denominado QIAQuick® PCR purification (QIAGEN®), dependendo da presença ou não de produtos inespecíficos durante as reações, seguindo as recomendações do fabricante. Em um primeiro momento, adicionou-se 5 vezes o volume do tampão PB para cada volume de nested-PCR usado. Após homogeneização, a mistura foi transferida para a coluna acoplada ao tubo coletor de 2 mL, a qual foi centrifugada (10.000 Xg) por um minuto. O sobrenadante foi descartado e a coluna novamente acoplada ao tubo.

Adicionaram-se 750 µL do tampão PE diluído a coluna e este produto foi centrifugado por um minuto para lavagem. Em seguida, o sobrenadante foi descartado novamente para remoção dos resíduos de reagentes e a coluna centrifugada por 60 segundos sem adição de qualquer outro reagente. Posteriormente, a coluna foi transferida a um tubo coletor e o DNA eluído em 50 µL do Tampão EB (10mM Tris-Cl, pH 8,5). O material foi incubado a Temperatura Ambiente por um minuto e, logo após, centrifugado por um minuto para coleta e armazenamento do produto final a -20°C para ser quantificado e usado na reação de sequenciamento.

3.11 QUANTIFICAÇÃO DO DNA

A quantificação do DNA para a determinação da concentração do mesmo foi realizada segundo o protocolo descrito pelo fabricante com o uso do marcador de peso molecular “Low DNA Mass Ladder” (Invitrogen). O DNA purificado foi aplicado em gel de agarose a 1,5% corado com “Sybr Safe®” em TBE a 1X, sendo aplicado também em outro orifício o peso molecular (Low Mass Ladder). Após eletroforese horizontal, as bandas de interesse no gel foram comparadas com o peso molecular, segundo a intensidade da banda, e a concentração do DNA foi expressa em nanogramas (ng), a qual serviu de parâmetro para a reação de sequenciamento.

3.12 REAÇÃO DE SEQUENCIAMENTO DE NUCLEOTÍDEOS

Foram utilizados os “iniciadores” hex1deg (5'-GCC SCA RTG GKC WTA CAT GCA CAT C-3') e hex2deg (5'-CAG CAC SCC ICG RAT GTC AAA-3'), descritos por Allard et al. (2001) para identificar as espécies e respectivos sorotipos de HAdV.

A reação de sequenciamento foi conduzida segundo o protocolo descrito pelo fabricante do kit Big Dye Terminator (Applied Biosystems®), utilizando-se a mistura da reação conforme se observa no quadro 15. A mistura foi colocada no temociclador nas seguintes condições: 25 ciclos de 96°C por 30 segundos (desnaturação), 50°C por 15 segundos (hibridização) e 60°C por 3 minutos (extensão).

Quadro 15 – Reagentes e volumes utilizados na reação de sequenciamento nucleotídico das cepas de adenovírus detectados em amostras de água de poço na cidade de Macapá-Ap.

Reagentes	1X/ μ L
Iniciador	2
Tampão	2
Big Dye Terminator	2
DNA	Depende da concentração (máximo 4 μ L)
H2O	Depende da quantidade de DNA (máximo 3 μ L)
Total	10

3.13 PURIFICAÇÃO DO PRODUTO DA REAÇÃO DE SEQUENCIAMENTO

O produto dessa reação foi purificado por precipitação com 40µL de isopropanol a 65%, com a finalidade de retirar o excesso de terminadores não incorporados na reação de sequenciamento. Após a precipitação, o produto foi centrifugado a 14.000 rpm por 30 minutos, o sobrenadante foi descartado e o sedimento seco em aparelho Speedvac (Eppendorf) a 60°C por 15 minutos. A seguir, os produtos foram armazenados a -20°C, protegidos da luz para posterior eletroforese.

3.14 ELETROFORESE EM SEQUENCIADOR AUTOMÁTICO

As amostras foram ressuspensas em 10 µL de formamida, transferidas para uma placa de 96 orifícios e desnaturadas a 96°C por 5 minutos em termociclador e colocadas em banho de gelo a 0°C por 3 minutos. Em seguida, a placa foi colocada no sequenciador automático ABI PRISM 3130 xl (Applied Biosystems), para a realização da eletroforese e obtenção das sequências.

3.15 ALINHAMENTO E EDIÇÃO DAS SEQUÊNCIAS PARA CONSTRUÇÃO DA ÁRVORE FILOGENÉTICA

Após o término da eletroforese, foram obtidas as sequências dos genes, os quais foram alinhados e editados no programa Bioedit (v. 6.05), obtendo-se uma sequência consenso para cada amostra. As sequências editadas dos vírus foram sujeitas a uma pesquisa no programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool), disponível no site do NCBI (National Center for Biotechnology Information; <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) para comparar as sequências de adenovírus. As sequências em estudo foram comparadas com sequências inseridas na base de dados do NCBI, de modo a identificar as que apresentavam maior homologia. Através da percentagem de similaridade, foi possível determinar o genótipo provável das sequências dos vírus, e identificar as sequências de referência a utilizar na construção de árvores filogenéticas, designadamente as que apresentam maior identidade.

As árvores filogenéticas foram construídas, a partir das sequências alinhadas obtidas, em programa Mega 5.0 (Análise Weighbor-joining) com boodstrap de 1.000 réplicas.

3.16 ANÁLISE DOS DADOS

Para o armazenamento de dados, elaboração de planilhas e gráficos foi utilizado aplicativo da Microsoft Office Excell 2016[®]. Desta matriz foi realizada a estatística descritiva dos resultados das análises da água com auxílio do software Bioestat 5.3 (AYRES, 2007).

Para verificar possíveis relações entre a presença de vírus entéricos e *E. coli* nas amostras de água foi realizado uma análise de Regressão Logística Simples.

No modelo logístico, utilizou-se os valores de uma série de variáveis independentes para predizer a ocorrência de uma variável dependente, neste caso, a presença de vírus na água. A medida de associação calculada a partir do modelo logístico é o *Odds Ratio*.

A equação geral da regressão logística é:

$$\text{Logit (Pi(y))} = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \beta_3 x_3 \dots + \beta_q x_q$$

Neste caso, a equação foi: $\text{Logit (Y: Enterovirus)} = \beta_0 + \beta_1 x_1(\text{coliformes})$

- Neste caso utilizou-se as seguintes variáveis binárias (x_1) e (Y):
- Variável Y: presença de virus entéricos (presente = 1; ausente = 0);
- Variável X: presença de coliformes (presente = 1; ausente = 0).

A função logística também calcula a probabilidade do efeito ou a probabilidade de chances de ocorrer. Esta função é calculada pela fórmula.

$$P(X) = \frac{1}{1 + e^{-(\alpha + \sum \beta_i X_i)}}$$

4 RESULTADOS

4.1 ANÁLISE DE COLIFORMES TOTAIS E *ESCHERICHIA COLI*

Durante o período de amostragem 72,66% (186/256) das amostras foram positivas para Coliformes totais e 37,5% (96) para *E. coli*. Levando em consideração o padrão de sazonalidade pluviométrico característico da Amazônia, os Coliformes totais e *E. coli* tiveram uma maior frequência de detecção no período mais chuvoso (inverno amazônico), com um percentual de positividade de 85,16% (109) de Coliformes totais e 46,88% (60) de *E. coli* (0 a 7921 UFC/100mL para Coliformes totais e de 0 a 543 UFC/100mL para *E. coli*), enquanto que no período menos chuvoso (inverno amazônico) alcançou um percentual de 60,16% (77) de Coliformes totais e 28,13% (36) de *E. coli*, (0 a 19232 UFC/100mL e de 0 a 955 UFC/100mL respectivamente) (Tabela 1). Os pontos de amostragem de água apresentaram valores acima do limite estabelecido pelo Ministério da Saúde nº2914/11 para águas de consumo humano em todos os meses de coleta, com exceção os bairros do Marabaixo e Cabralzinho.

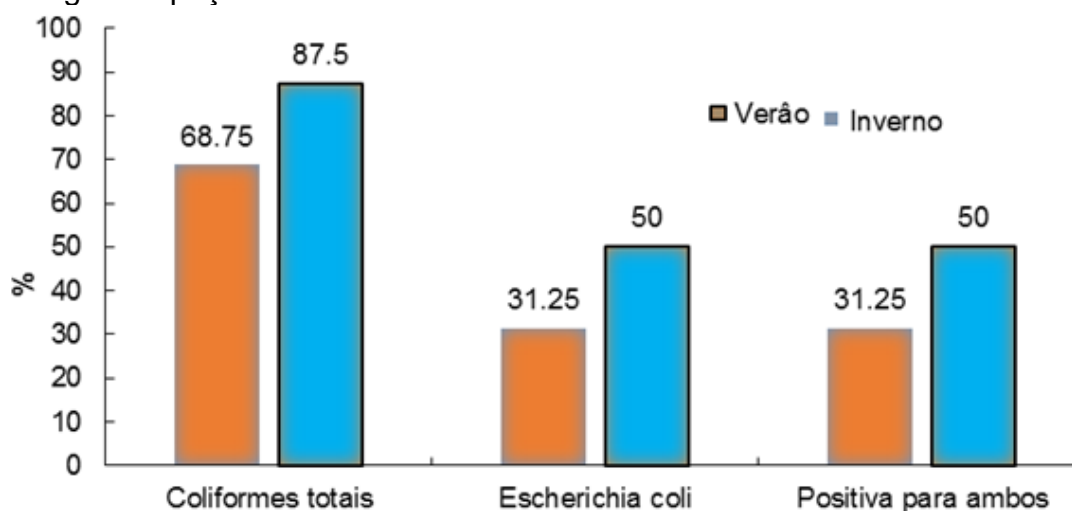
Tabela 1 – Resultados da qualidade bacteriológica da água das amostras provenientes dos dezesseis pontos de amostragem.

	VERÃO*		INVERNO**	
	Coliformes Totais	<i>E. coli</i>	Coliformes Totais	<i>E. coli</i>
Marabaixo	ND	ND	ND	ND
Cabralzinho	ND	ND	ND	ND
Infraero	240	80	540	132
Renascer	160	ND	639	ND
Jardim Felicidade	1462	321	2743	753
Brasil Novo	ND	ND	644	165
Fazendinha	352	ND	754	333
Universidade	123	ND	836	ND
Congós	832	ND	1732	ND
Zerão	243	ND	532	ND
Alvorada	ND	ND	410	200
Central	321	121	2122	533
Muca	ND	ND	345	ND
Santa Rita	321	155	1622	643
Pedrinhas	7921	543	19232	955
Buritizal	231	ND	831	ND

*Novembro/Dezembro; **Fevereiro/Março. **ND**: Não Detectado.

Nota-se um aumento de pontos positivos contaminados por coliformes totais e *E. coli* no período mais chuvoso (inverno amazônico). No verão 68,75% (11 bairros) foram positivos só para Coliformes totais e 31,25% (5) positivos só para *E. coli*. No inverno houve um aumento na quantidade de bairros positivos com 87,5% (14) para Coliformes totais e 50% (8) para *E. coli*. Em relação aos contaminantes Coliformes totais e *E. coli* presentes ao mesmo tempo no mesmo bairro houve também uma diferença nos dois períodos e que, não há obrigatoriedade na correspondência de ambos contaminantes na mesma amostra (Figura 9).

Figura 9 – Gráfico da presença de contaminantes, Coliformes totais e *E. coli*, na água de poços.



4.2 DETECÇÃO DE VÍRUS ENTÉRICOS NA ÁGUA

Das 256 amostras de águas testadas quanto à presença do Adenovírus, no período de novembro de 2016 a março de 2017, 59,38% (152) mostraram-se positivas (Tabelas 2 e 3).

A maior frequência de AdV foi detectada na zona leste-sul e na zona leste-norte, onde os percentuais de positividade alcançaram 90 e 62,5%, respectivamente. Com relação aos pontos de maior positividade estão os bairros Jardim Felicidade, Brasil Novo, Universidade, Zerão, Centro, Santa Rita, Pedrinhas e Buritizal.

Em relação a presença de Norovírus GII e Rotavírus, não foram detectadas amostras positivas durante o período de coleta deste estudo.

Tabela 2 – Presença de Adenovírus, em amostras de água de poço dos bairros de Macapá-ap, no período de novembro de 2016 a março de 2017.

Local de coleta	Positivas/Testadas	Positividade (%)
Zona Oeste-Norte	0/32	0
Marabaixo	0/16	-
Cabralzinho	0/16	-
Zona Leste-Norte	40/64	62.50%
Infraero	0/16	0.00%
Renascer	8/16	12.50%
Jardim Felicidade	16/16	25.00%
Brasil Novo	16/16	25.00%
Zona Oeste-Sul	40/80	50.00%
Fazendinha	0/16	0.00%
Universidade	16/16	20.00%
Congós	8/16	10.00%
Zerão	16/16	20.00%
Alvorada	0/16	0.00%
Zona Leste-Sul	72/80	90.00%
Central	16/16	20.00%
Muca	8/16	10.00%
Santa Rita	16/16	20.00%
Pedrinhas	16/16	20.00%
Buritizal	16/16	20.00%
Total	152/256	59.38%

Tabela 3 – Presença de Andenovírus em amostras de água de poço nos dezesseis pontos de amostragem da cidade de Macapá-AP, no período de novembro de 2016 a março de 2017.

Sítios de amostragem	nov/16	dez/16	fev/17	mar/17
Marabaixo	ND	ND	ND	ND
Cabralzinho	ND	ND	ND	ND
Infraero	ND	ND	ND	ND
Renascer	ND	ND	+	+
Jardim Felicidade	+	+	+	+
Brasil Novo	+	+	+	+
Fazendinha	ND	ND	ND	ND
Universidade	+	+	+	+
Congós	ND	ND	+	+
Zerão	+	+	+	+
Alvorada	ND	ND	ND	ND
Central	+	+	+	+
Muca	ND	ND	+	+
Santa Rita	+	+	+	+
Pedrinhas	+	+	+	+
Buritizal	+	+	+	+

ND – Não Detectado; + - Amostra positiva

Considerando o padrão de sazonalidade pluviométrico característico da Amazônia, os AdV foram detectados com maior frequência no período mais chuvoso (inverno amazônico), com um percentual de positividade de 68.75%, enquanto que no período menos chuvoso (verão amazônico) este estudo identificou um total de 50% de amostras positivas para AdV (Tabela 4).

Tabela 4 – Frequência de detecção de Adenovírus no período de menor (verão) e maior (inverno) precipitação pluviométrica.

	VERÃO*	INVERNO**
Marabaixo	0	0
Cabralzinho	0	0
Infraero	0	0
Renascer	0	8
Jardim Felicidade	8	8
Brasil Novo	8	8
Fazendinha	0	0
Universidade	8	8
Congós	0	8
Zerão	8	8
Alvorada	0	0
Central	8	8
Muca	0	8
Santa Rita	8	8
Pedrinhas	8	8
Buritizal	8	8
Total	64/128	88/128
Porcentagem	50%	68.75%

*Novembro/Dezembro; **Fevereiro/Março

4.3 RELAÇÃO ENTRE O AdV E OS PARÂMETROS BACTERIOLÓGICOS

A Tabela 5 mostra os valores médios de coliformes totais e *E. coli* e a correspondente taxa de detecção do AdV em cada ponto (bairro) analisado. Entre os bairros, os menores índices bacteriológicos foram observados no Marabaixo e Cabralzinho, os quais obtiveram também os menores percentuais para detecção de AdV. Os maiores índices bacteriológicos foram identificados nos bairros Jardim Felicidade, Brasil Novo, Universidade, Zerão, Pedrinhas, Santa Rita e Buritizal, os quais tiveram também maior contaminação viral dentre as amostras analisadas.

Tabela 5 – Valores médios de coliformes totais e *E. coli* e percentual de positividade para o AdV nos dezesseis pontos de amostragem na cidade de Macapá-AP.

Pontos de Amostragem	CONTAMINAÇÃO		
	Bacteriológica		AdV
	Coliformes totais (UFC/100 mL)	<i>E. coli</i> (UFC /100 mL)	Positividade (%)
Marabaixo	ND	ND	ND
Cabralzinho	ND	ND	ND
Infraero	390	106	ND
Renascer	400	ND	3.13%
Jardim Felicidade	2103	537	6.25%
Brasil Novo	322	83	6.25%
Fazendinha	553	167	ND
Universidade	480	ND	6.25%
Congós	1282	ND	3.13%
Zerão	388	ND	6.25%
Alvorada	205	100	ND
Central	1222	327	6.25%
Muca	173	ND	3.13%
Santa Rita	972	399	6.25%
Pedrinhas	13577	749	6.25%
Buritizal	531	ND	6.25%

Para avaliar a possível relação entre a detecção do AdV e os parâmetros bacteriológicos foi aplicado o teste de regressão logística simples. A Tabela 6 mostra os coeficientes de regressão e o *p-valor* do teste. A análise estatística evidenciou que não houve associação significativa entre a presença do AdV e os parâmetros bacteriológicos da água.

Tabela 6 – Análise de regressão logística avaliando a relação entre a presença do AdV e parâmetros bacteriológicos da água.

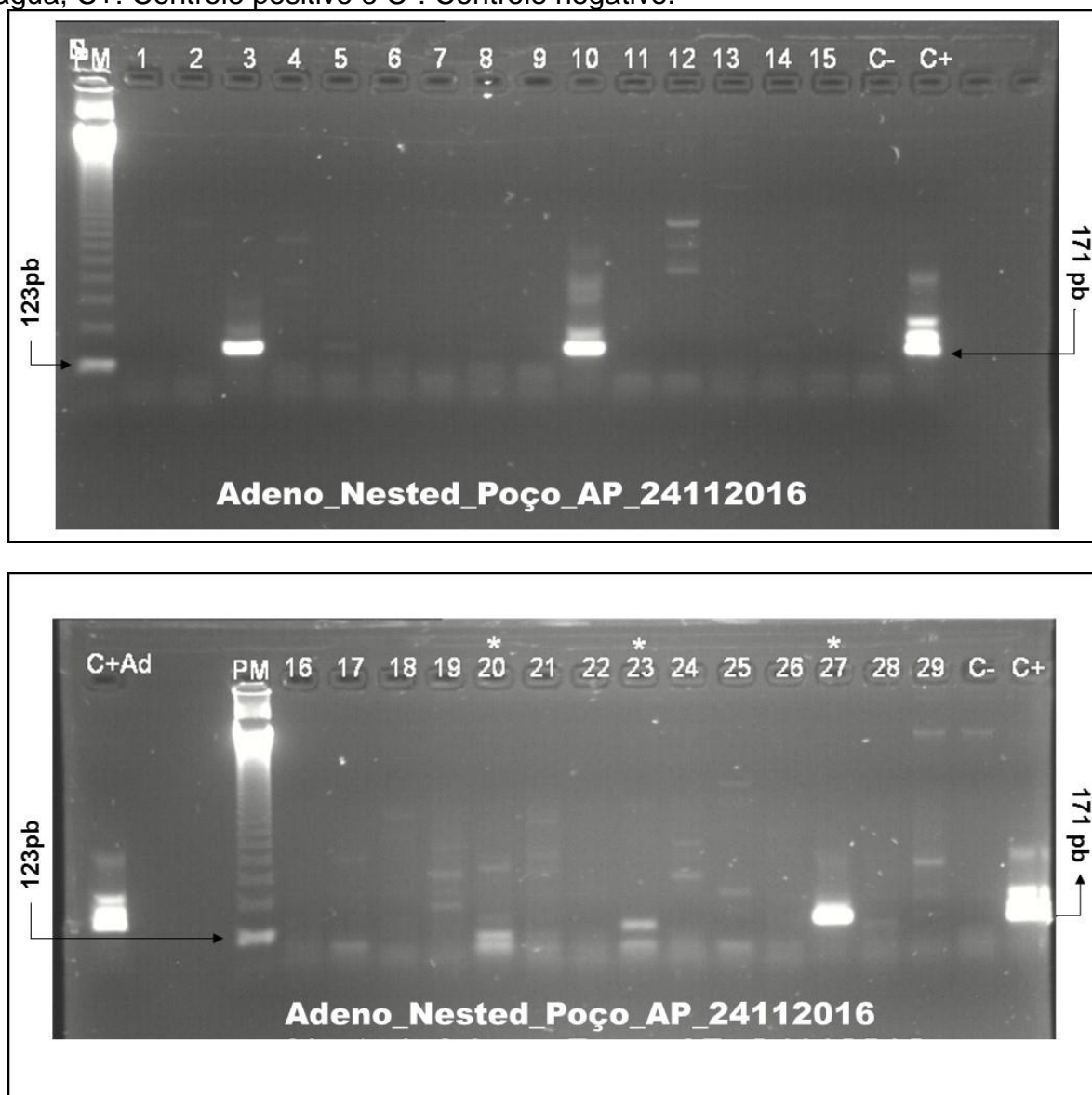
Parâmetros	OR [IC 95%]	<i>p- valor</i>	P(x0)	P(X1)
Coliformes totais	3,00 [0,28 – 31,63]	0,3607	50%	75%
<i>E. coli</i>	1,80 [0,21 – 15,41]	0,5916	62.50%	75%

* OR: *odds ratio*; IC: intervalo de confiança.

4.4 ANÁLISE MOLECULAR DOS ISOLADOS AMBIENTAIS

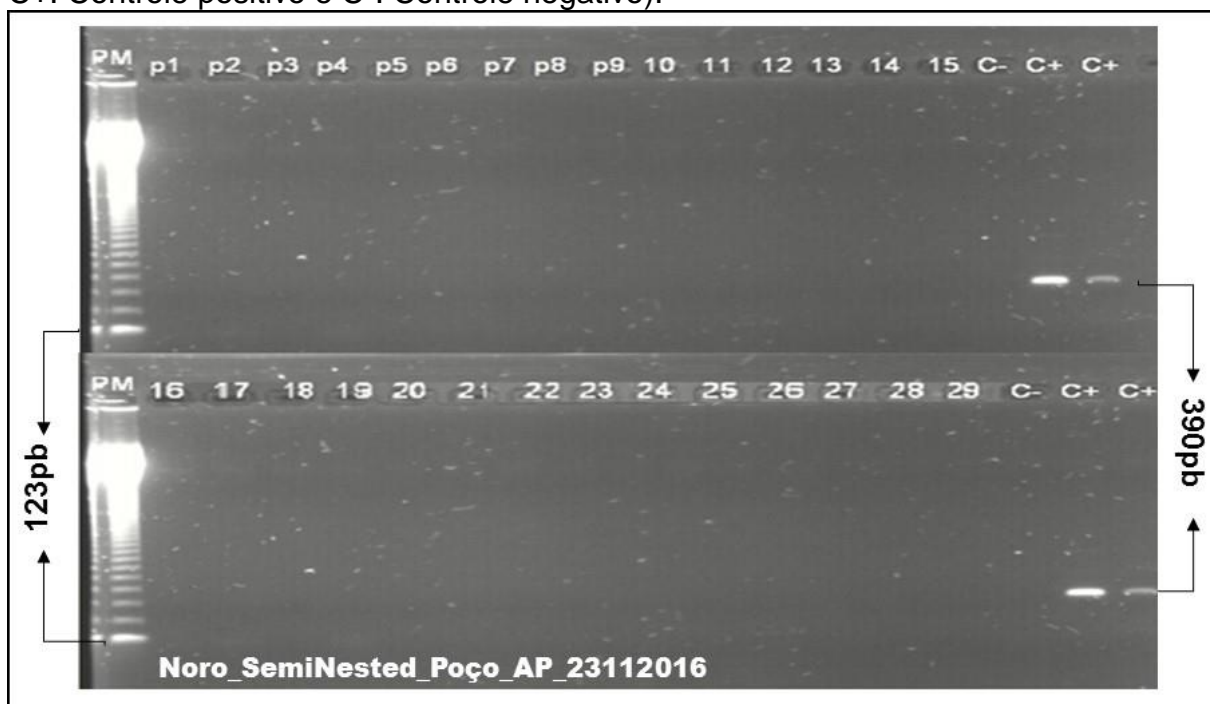
Um total de 256 amostras positivas para AdV, 59,4% (152/256) denotaram amplificação pelos iniciadores Nehex3deg (forwaed) e Hex2Deg (reverse) figura 10. Nenhum isolado ambiental apresentou amplificação para os iniciadores de Norovírus (Figura 11) e Rotavírus (Figura 12).

Figura 10 – 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 de poços da cidade de Macapá-AP. PM: Peso Molecular (123 pb), 1-29: Amostras de água, C+: Controle positivo e C-: Controle negativo.



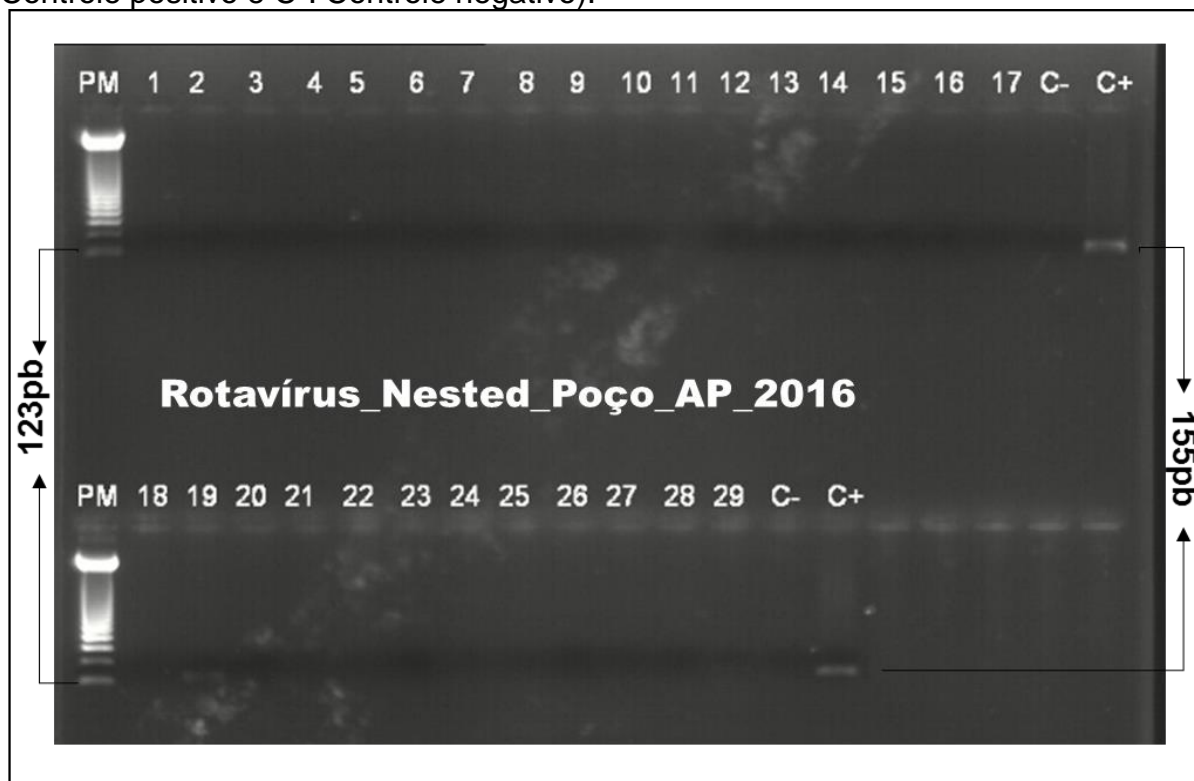
Fonte: Instituto Evandro Chagas

Figura 11 – Eletroforese em gel de agarose 1,5% dos produtos da semi nested-PCR para detecção de Norovírus (PM: Peso Molecular (123 pb), 1-29: Amostras de água, C+: Controle positivo e C-: Controle negativo).



Fonte: Instituto Evandro Chagas

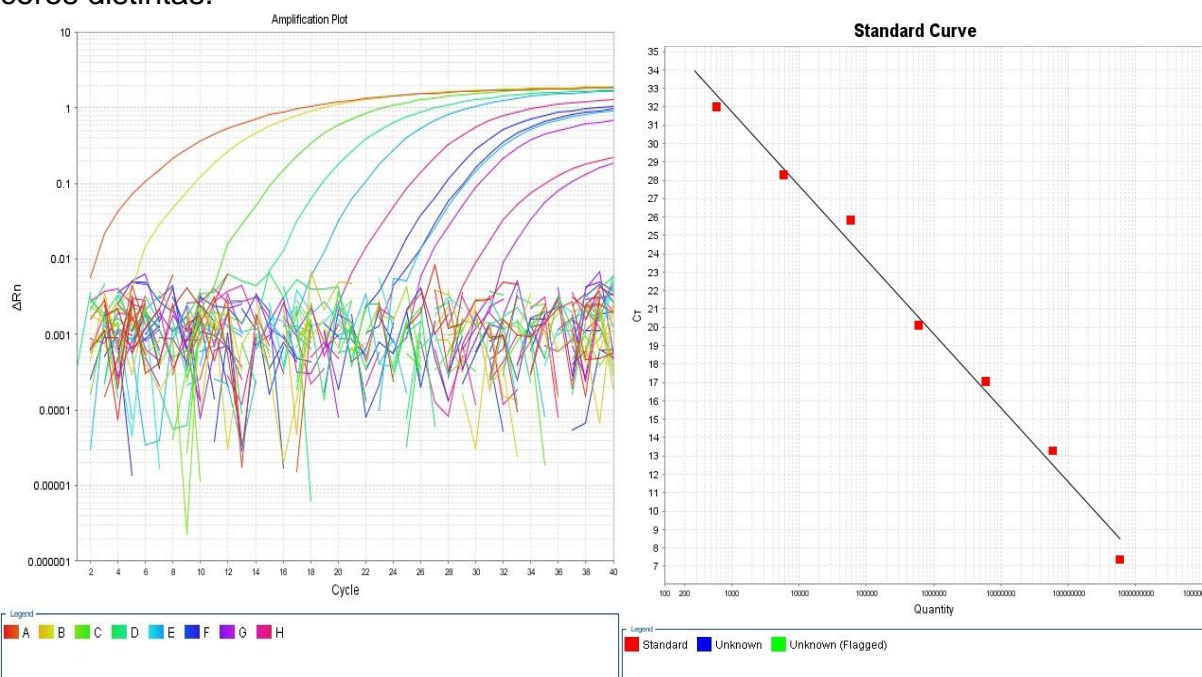
Figura 12 – Eletroforese em gel de agarose 1,5% dos produtos da nested-PCR para detecção de rotavírus (PM: Peso Molecular (123 pb), 1-29: Amostras de água, C+: Controle positivo e C-: Controle negativo).



Fonte: Instituto Evandro Chagas

As amostras de água foram testadas por PCR em tempo real para detecção de Norovírus GII (Figura 13). No entanto, esta metodologia não detectou a presença deste vírus.

Figura 13 – Amplificação de Norovírus GII pela PCR em Tempo Real em amostras de água de poços da cidade de Macapá-AP. Os controles (CT) estão representados pelas cores distintas.

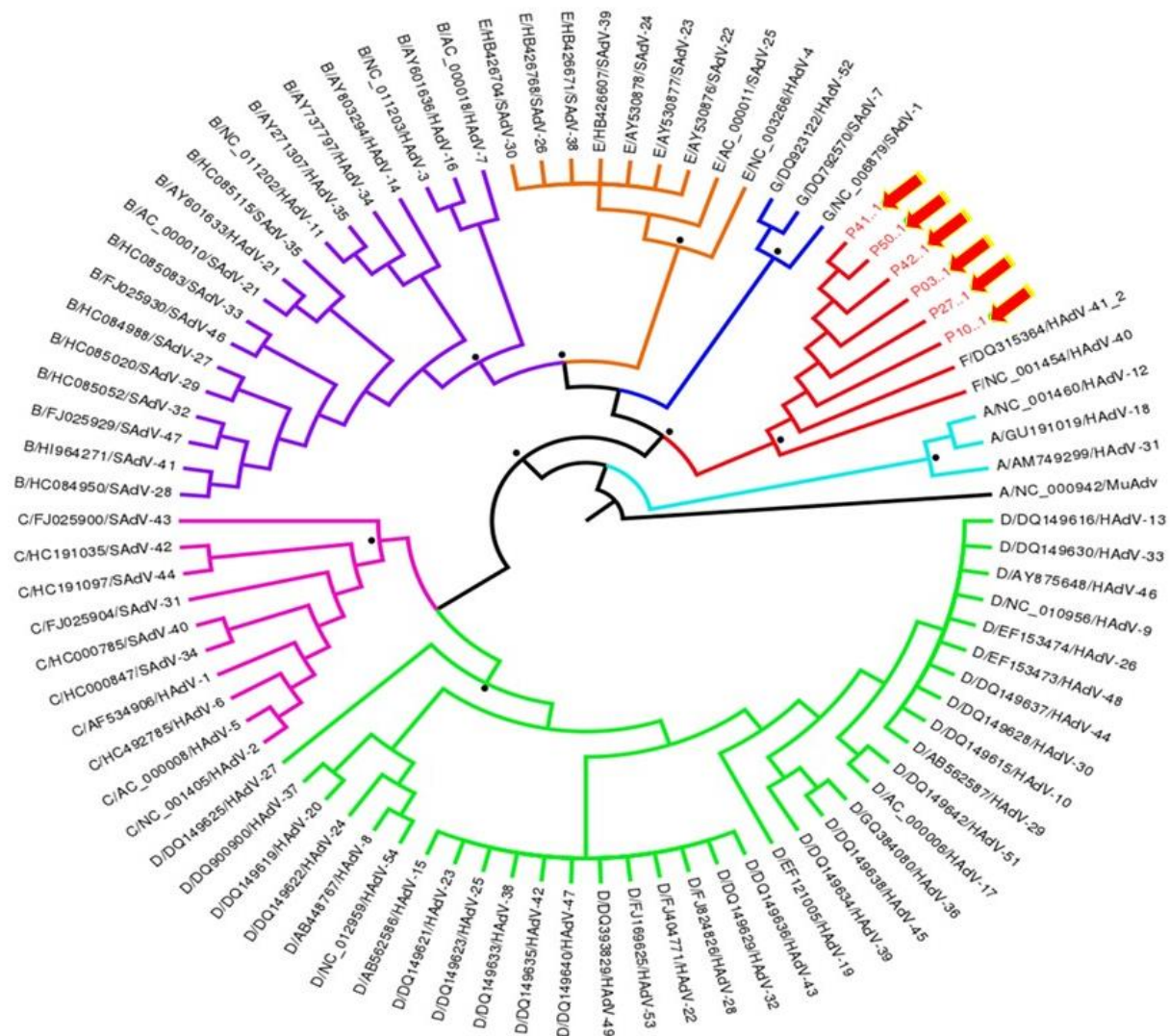


Fonte: Instituto Evandro Chagas

Um total de seis amostras positivas para AdV (P02; P05; P07; P09; P13 e P15) tiveram seu produto amplificado para a utilização no sequenciamento genômico. O resultado apontou 100% de identificação com a espécie F, caracterizadas com HAdE (Adenovírus entérico), e pertencentes ao subtipo 41.

Os resultados da análise filogenética destes seis espécimes estão representados na Figura 14 e demonstram o agrupamento das amostras selecionadas entre as espécies A a G.

Figura 14 – Análise filogenética baseada na sequência nucleotídica do gene hexon envolvendo 06 amostras positivas para adenovírus encontrados nas amostras ambientais de Macapá, Amapá. Amostras do estudo do estado do Amapá estão grafadas na coloração vermelhas e marcadas com setas vermelhas. O teste foi realizado com 1000 réplicas de *bootstrap* sendo representados apenas os valores maiores de 70%.



As amostras positivas de Adenovírus sequenciadas tiveram similaridade nucleotídica entre si de 94,4%. Ao compararmos a espécie F com os demais protótipos inseridos na Figura 14, a similaridade entre os grupos de espécies foi de 94,1%.

As amostras deste estudo positivas para a espécie F do tipo 41 apresentaram similaridade nucleotídica de 92,8% com espécime descrita por Lemiale et al, (2008), nos Estados Unidos (DQ315364) (Tabela 7).

Tabela 7- Resultados da análise filogenética, exibindo o perfil de similaridade nucleotídica entre amostras positivas para AdV e sequenciadas para o gene hexon.

Similaridade Nucleotídica			
Espécie	Entre as amostras do estudo (Macapá/AP)	Entre o grupo de espécies	Lemiale et. al. (2008) (DQ315364)
F tipo 41	94,4%	94,1%	92,8%

5 DISCUSSÃO

O estudo bacteriológico das águas de poços da cidade de Macapá revelou que a maioria das fontes utilizadas para consumo humano, estão contaminadas por intensa presença de coliformes. Estes resultados devem ser encarados como um sinal de alerta, indicando a possibilidade de poluição ou contaminação fecal. A Portaria nº2.914/2011 do Ministério da Saúde (MS) estabelece que a água destinada ao consumo humano em qualquer situação, incluindo fontes individuais como poços, minas e nascentes deve ter ausência de coliformes e *E. coli* em 100 mL da amostra (BRASIL, 2011). Quando esses indicadores microbiológicos estão presentes na água, há uma probabilidade da presença de microrganismos patogênicos mais resistentes à infecção, como vírus e protozoários, causadores de diversas doenças infecciosas (VIEIRA et al., 2012; SILVA et al., 2017).

Considerando que as amostras foram coletadas de poços à uma profundidade entre 14 a 40 metros e captados de aquíferos livres, apresentam características mais vulneráveis à contaminação por fezes humanas e de animais, podendo ocorrer em função da falta de rede de esgoto, aterros sanitários, que conseqüentemente podem contaminar lençóis (SPILK, 2015). Os contaminantes que podem estar presentes na água oriundos dos esgotos domésticos são constituídos, primeiramente por matéria orgânica biodegradável e microrganismos (bactérias, vírus, protozoários) (SILVA, 2012). Desta forma, esta situação coloca em risco a saúde da população de Macapá que consome essas águas.

Um ponto que merece destaque é o bairro Pedrinhas, a água de poço sofre maior influência de esgoto doméstico da comunidade adjacente. Trata-se de uma área com frequentes alagamentos sobre influência da maré do rio Amazonas e por estes pontos estarem localizados ao lado da Estação de Tratamento de Efluentes (lagoa de estabilização), reflete na qualidade microbiológica. Um fator importante a ser considerado na construção de poços é a localização destes, os quais devem atender a alguns requisitos básicos, como o afastamento de locais inundados por água de chuva, estar o mais longe possível e acima de qualquer fonte potencialmente poluidora, como fossas e depósitos de resíduos sólidos (CAPUCCI et al., 2001; MENDES, 2008).

Outro ponto relevante deste estudo refere-se à contaminação no bairro Santa Rita, o qual está localizado próximo a um cemitério. Os cemitérios, sendo repositórios

de cadáveres e ambientes de decomposição de matéria orgânica, apresentam riscos que exigem cuidados técnico-científicos na sua implantação e operação. Podem apresentar problemas hidrogeoambientais, ou seja, contaminação no aquífero, por meio da liberação do necrochorume, nos lençóis freáticos, transportados pelas chuvas infiltradas nas covas ou pelo contato dos corpos com a água subterrânea (LEITE, 2009; FRANCISCO et al. 2017; FERNANDES, 2014). Afinal, o necrochorume contém uma carga tóxica e microbiológica alta, inclusive, de vírus e bactérias. Por isso, é um risco para o equilíbrio do meio ambiente e para a saúde da população (SOUZA et al., 2017).

Nos outros pontos, a presença de contaminação pode estar relacionada com a falta de uma limpeza eficiente dos poços e a exposição ao ambiente externo, o que pode alterar a qualidade da água. Em vários pontos observou-se que as fossas estavam instaladas a menos de 15 metros dos poços, não atendendo as normas técnicas de segurança. E como existe pontos que eram de poços amazonas (não precisam de cadastramento), são construídos e utilizados sem critérios técnico-sanitários adequados. Mas poços tubulares também foram construídos próximos de fossas e estão fora das normas técnicas para construção de fossas sépticas (ABNT 1992; ANA, 2005). As fontes de captação de água devem ficar distantes dos ramais de esgoto sanitário, a fim de evitar a contaminação em casos de vazamento. Quando essas medidas não são tomadas, o risco de vazamento e contaminação dos lençóis freáticos aumenta exponencialmente (HOWARD et al., 2006), colocando em risco à saúde humana e ao manancial subterrâneo.

Dois pontos do estudo (marabaixo e cabralzinho) não apresentaram contaminação microbiológica, estando estas águas, a nível microbiológico, próprias para consumo humano. Esses bairros estão mais distantes do centro da cidade, isso pode significar maior ou menor distância de fontes ativas de contaminação, que seriam, portanto, os fatores preponderantes na caracterização e/ou diferenciação microbiológica de um poço em uma área urbana. Por serem bairros distantes da área urbana, não têm sérios problemas ambientais. A ausência da contaminação fecal pode estar associada à característica do solo, à profundidade dos poços, ao desnível do terreno (MOURA et al., 2009), a presença de uma área de preservação ambiental (Lagoa dos Índios) e a população apresenta um poder aquisitivo diferenciado dos centros urbanos, atendendo em seus domicílios uma construção de abastecimento seguindo os padrões das normas técnicas da ABNT.

O manejo inadequado dos dejetos animais e humanos por meio de fossas sépticas pode levar à contaminação da água por microrganismos de origem fecal, que podem ser carreados do solo para fontes de águas superficiais ou sofrerem percolação, podendo atingir lençóis de água subsuperficial, causando contaminação, principalmente em época de alta pluviosidade (VILLAR, 2016a). Devido a precariedade do saneamento na cidade de Macapá, vários fatores podem ser responsáveis pela contaminação, como a falta de manutenção do reservatório; localização inadequada do poço; e a falta de cuidado e higiene com a água antes do consumo (SILVA et al., 2018a).

A inexistência ou baixa eficiência dos sistemas de drenagem de águas pluviais faz com que todas as impurezas do solo, detritos encontrados em ruas e pavimentos sejam levados até os cursos de água (TUCCI et al., 2007). Uma forma de evitar essa contaminação seria a substituição gradativa de fossas sépticas por redes coletoras de esgoto, para atenuar a quantidade de cargas contaminantes no subsolo (FOSTER et al., 2003).

A avaliação das amostras de água quanto a presença de Rotavírus e Norovírus não detectou positividade em todo o estudo. Como as amostras foram coletadas durante um dia inteiro, pode ter sofrido influências, pois de acordo com Queiroz et al. (2001), as amostras submetidas à análise devem ser coletadas, preferencialmente, no período da manhã, aproximadamente entre 8h e 9h e durante os dias da semana, a fim de minimizar os efeitos de variações diurnas refletidas por condições ambientais como temperatura da água, percentual de irradiação por luz UV, precipitação e alterações consequentes da ocupação e atividades humanas (GRIFFIN et al., 1999).

De um modo geral, apesar dos vírus serem concentrados por diferentes metodologias com sucesso, alguns deles, como os rotavírus, são mais susceptíveis às variações de pH durante o processamento das amostras e a outros componentes orgânicos que possam estar presentes na água, o que dificulta a recuperação dessas partículas virais em relação aos outros vírus (WYN-JONES; SELLWOOD, 2001; TAVARES et al., 2005).

O rotavírus A continua sendo o principal agente causador de diarreia na criança, a despeito da ampla utilização de vacinas nos programas públicos de vacinação em todo mundo. No Brasil, a vacina monovalente foi introduzida no Programa Nacional de imunização (PNI) em 2006, e a segurança da vacina está bem documentada em diferentes estudos pré e pós-licenciamento (KFOURI et al. 2017). No entanto, seu

genoma RNA segmentado pode levar ao surgimento de cepas novas ou incomuns na população humana, por meio de transmissão entre espécies e eventos de rearranjo (LUCBS et al, 2016). Existem também evidências de transmissão interespecie e de rearranjos entre rotavírus humanos e animais vêm se acumulando na literatura. Algumas espécies em particular, como cães, gatos, porcos e bois, parecem contribuir de maneira mais incisiva e frequente para a diversidade genética encontrada em humanos (MARTELLA et al., 2010).

Apesar da infecção por Norovírus ocorrer em todas as faixas etárias, inclusive em adultos, o índice de detecção do vírus em crianças menores de cinco anos é aproximadamente cinco vezes maior (FERREIRA et al, 2012; LOPMAN et al, 2012). O Norovírus GII.4 (genogrupo II, genótipo 4) é o agente etiológico mais comum e estudado em surtos por Norovírus no mundo (MARSHALL; BRUGGINK, 2011; VINJE, 2015; MORILLO et al, 2017). Diferente de outros agentes como Rotavírus, Astrovírus e Adenovírus, cujo principal grupo de risco são as crianças, o Norovírus atinge todas as faixas etárias (GLASS et al, 2000). A incidência anual e o perfil etiológico da diarreia variam conforme os fatores de risco apresentados nos diferentes grupos populacionais: deficiências nutricionais; práticas inadequadas de higiene dos alimentos, dos objetos e do ambiente em que estão inseridos; aglomerações no domicílio e em instituições; ausência de saneamento básico no local de residência; e épocas quentes do ano (SOUZA et al, 2002).

Em idosos a doença diarreica tem importante impacto na morbidade e mortalidade devido a imunidade baixa, disfunção da motilidade intestinal, desnutrição e outras causas associadas. A diarreia pode causar confusão mental e desidratação o que aumenta o risco de quedas, fraturas, hospitalizações e tempo de internação. Em instituições de longa permanência a doença pode ser grave e o tratamento mais longo (TRINH; PRABHAKAR, 2007). As crianças apresentam hábitos que facilitam a disseminação de doenças, tais como levar as mãos e objetos à boca, falta de prática de hábitos higiênicos, necessidade de contato físico direto constante com adultos e também pela imaturidade do sistema imunológico (NESTI; GOLDBAUM, 2007).

A detecção de Adenovírus (HAdV) em 59,38% das amostras, evidencia a possibilidade de contaminação das águas de poços por material de origem fecal. Para elucidar a origem dos contaminantes biológicos dos bairros estudados, especialmente os virais, provavelmente os pontos positivos nos dois períodos, pode-se discriminar que as fossas, o cemitério, a estação de tratamento ineficiente de esgoto, bem como

do carregamento de resíduos pela chuva e os esgotos a céu aberto, podem ser os principais elementos fontes dos mesmos. O AdV tem sido considerado um vírus com potencial risco à saúde associados com surtos de doenças por veiculação hídrica, sendo este envolvido em surtos por gastroenterites principalmente em crianças menores de 5 anos (GONELLA et al., 2016; LIU, 2016). É de grande importância da integração entre a virologia ambiental e as políticas urbanas a fim de encontrar soluções eficazes para a prevenção e controle de doenças relacionadas com a água principalmente em áreas onde o saneamento básico ainda é incipiente (MACHADO, 2013).

No que diz respeito à identificação genética dos tipos de HAdV detectados, os adenovírus da espécie F, sorotipos 40 e 41, são vírus de veiculação hídrica importantes, relativamente resistentes aos tratamentos convencionais de esgoto e são identificados como o segundo agente mais comum nos casos de gastroenterite em crianças depois de RV (AMARAL et al., 2015; DASHITI et al., 2016). E são os principais adenovírus associados a infecções entéricas. Variantes de adenovírus pertencentes ao subgrupo F foram encontradas tanto nas amostras ambientais quanto nas amostras clínicas, evidenciando também que elas possam ter desempenhado um papel importante nos casos de gastroenterite infantil associados aos adenovírus (MULLER, 2017).

Os resultados desta pesquisa revelam uma circulação de HAdV de origem entérica nos diferentes poços estudados em Macapá e, conseqüentemente, apontam a necessidade de um monitoramento frequente nas águas subterrâneas da cidade, haja vista o fato de estarem associados direta ou indiretamente com o cotidiano da população. Estudos envolvendo a pesquisa de vírus em água 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 riscos e estudos epidemiológicos (PRADO; MIAGOSTOVICH, 2014). Durante os meses de monitoramento realizado nas águas de poços, os vírus entéricos foram detectados em praticamente todo o período, independente da variação encontrada na concentração das bactérias indicadoras de poluição fecal. Os vírus são capazes de permanecer viáveis por muito tempo na água, até mesmo em águas subterrâneas, resistindo em condições ambientais desfavoráveis, tais como extremos de pH, temperaturas elevadas e salinidade alta (WYN-JONES; SELLWOOD, 2001; TAVARES et al., 2005).

A ausência de sazonalidade verificada coincide com os dados registrados para países em desenvolvimento, os quais possuem a maioria dos casos de gastroenterite, principalmente de etiologia viral, durante todo o ano, enquanto nos países desenvolvidos, essas doenças predominam no inverno (COSTA *et al.*, 2016). Semelhantes aos dados de Ferreira (2017) para água subterrânea de distribuição pública na cidade de Macapá, mas diferente para águas superficiais que apresentou sazonalidade para Adenovírus na cidade.

A presença dos adenovírus nas amostras de água de poços (subterrânea) em que as condições bacteriológicas estiveram de acordo com a legislação brasileira, fortalece o indício de que esse grupo de vírus é um potencial indicador de contaminação fecal. A presença deste vírus entérico onde a contaminação fecal por indicadores bacterianos não é evidente, enfatizam que os mesmos podem ser utilizados como ferramenta importante para o monitoramento ambiental, principalmente quando é demonstrada a presença de genomas virais (BOFILL-MAS, *et al.*, 2006; SERRACCA, *et al.*, 2010; HE, *et al.*, 2012).

Levando em consideração a elevada densidade bacteriana encontrada, criou-se a expectativa de um alto percentual de detecção de vírus entéricos na maioria dos bairros, uma vez que estes se encontram fortemente impactados pela contaminação fecal. O presente monitoramento revelou que independente da variação observada dos indicadores bacterianos de poluição fecal, os vírus entéricos analisados estiveram sempre presentes nas amostras de água. Estudos mostraram não existir associação direta entre a prevalência de vírus entéricos e os indicadores bacterianos de poluição fecal em águas ambientais (MIAGOSTOVICH, *et al.*, 2008; MORESCO, *et al.*, 2012; Vieira *et al.*, 2012a; LEE, *et al.*, 2013). Nessas regulamentações, têm-se os coliformes fecais como indicadores da qualidade microbiológica da água para consumo humano, aceitando serem adequados para a presença de outros agentes, tais como outras bactérias, vírus e protozoários. E aí reside grande parte da limitação de nossos sistemas de monitoramento. Os coliformes têm se mostrado marcadores insuficientes e limitados, pois podem não atestar a contaminação por outros patógenos, especialmente vírus, no ambiente (SILVA *et al.*, 2017).

Os países em desenvolvimento, como o Brasil, ainda não estabeleceram um padrão para determinar o risco de infecção viral da água ambiental destinado ao consumo na legislação atual. A prevalência de vírus entéricos em que as densidades de indicadores bacterianos estavam abaixo do limite recomendado em legislação,

confirma que indicadores bacterianos não são bons indicadores de contaminação viral, como já foi relatado por outros pesquisadores (RIGOTTO, 2010; GURJÃO, 2015). A presença de coliformes na água nem sempre indica a obrigatoriedade de existência de agentes patogênicos e, por isso não podem ser considerados indicadores plenos da potabilidade da água (ARAÚJO, 2010).

A falta de saneamento básico tem íntima relação com a transmissão das doenças de veiculação hídrica em diferentes países. A comparação de dados referentes a surtos, morbidade e mortalidade de gastroenterites (doenças caracterizadas por diarreia e vômito) em qualquer levantamento mundial de casos notificados não deixa dúvidas: o impacto dessas enfermidades em países onde os sistemas de saneamento são deficitários é muito maior do que naqueles onde as condições de tratamento de esgoto estão em níveis satisfatórios. Bactérias, vírus e protozoários estão arrolados como as principais causas de gastroenterites (HASSINE-ZAAFRANE; AOUNI, 2012).

A adoção de uma metodologia simplificada e rápida, que possibilite a recuperação de vírus entéricos humanos de amostras ambientais com diferentes características, empregando técnicas clássicas e moleculares, é ferramenta essencial em futuras avaliações sobre o risco em se utilizar como coadjuvante em água de consumo humano.

A presença de patógenos virais nas amostras de água de poços revela o potencial destas águas em disseminar estes agentes no meio ambiente. Este estudo é pioneiro no Estado do Amapá em se tratando de vírus entéricos em águas de poços de consumo humano e os resultados, além de revelarem potenciais indicadores virais de contaminação fecal nestas águas, têm aplicações importantes para programas de controle da qualidade da água subterrânea utilizada em todo o país, apresentando dados para subsidiar uma futura legislação.

6 CONSIDERAÇÕES

Os valores de coliformes totais e *E. coli* encontrados, apresentaram-se acima do recomendado pela Portaria nº 2914 do Ministério da Saúde, na maioria dos pontos de coleta de água subterrânea;

À evidência da presença do Adenovírus nas águas de poços, em especial nos bairros Santa Rita e Pedrinhas, mostra a insatisfatória condição sanitária da cidade de Macapá;

Os isolados ambientais do HAdV deste estudo pertencem a espécie F, com circulação dos sorotipos 41, e acompanham o mesmo padrão de distribuição do HAdV no país; A alta similaridade genômica dos HAdV detectados com sequências brasileiras confirmam as evidências da circulação endêmica dos isolados do HAdV no país;

Houve um aumento de pontos (bairros) positivo para a presença de vírus entéricos no inverno amazônico e observou-se menos pontos encontrados vírus nas amostras no verão;

Não houve associação entre a presença do HAdV e os parâmetros bacteriológicos da água;

Neste estudo verificou-se que os vírus podem ser encontrados em um grande número de amostras de águas subterrâneas e que podem estar associados às fossas, cemitério, estação de tratamento, carreamento de resíduos pela chuva e os esgotos a céu aberto.

REFERÊNCIAS

AGÊNCIA NACIONAL DE ÁGUAS-ANA. **Panorama da qualidade das águas subterrâneas no Brasil**. Brasília, 2005.

_____. ANA. **Atlas Brasil: abastecimento urbano de água: resultados por estado**. Brasília, 2010.

AHMED, S. M.; LOPMAN, B. A.; LEVY, K. A systematic review and meta-analysis of the global seasonality of Norovirus. **PloS One**, v.8, n.10, p.1-7, 2013.

ALLARD, A.; ALBINSSON, B.; WADELL, G. Rapid Typing of Human Adenoviruses by a General PCR Combined with Restriction Endonuclease Analysis. **J Clin Microbiol**. v.39, n.2, p.498-505, 2001.

AMARAL, M. S. et al. The prevalence of norovirus, astrovirus and adenovirus infections among hospitalised children with acute gastroenteritis in Porto Velho, state of Rondônia, western Brazilian Amazon. **Mem Inst Oswaldo Cruz**. v.110, n.2, p.215-21, 2015.

ANDERSON, A. D. et al. OUTBREAK INVESTIGATION TEAM. Multistate outbreak of Norwalk-like virus gastroenteritis associated with a common caterer. **Am J Epidemiol**, v. 154, p. 1013-1019, 2001.

ARAÚJO, M.C.S.P. **Indicadores de vigilância da qualidade da água de abastecimento da cidade de Areia (PB)**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Civil e Ambiental) – Universidade Federal de Campina Grande. Centro de Tecnologia e Recursos Naturais. Campina Grande, 2010.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS-ABNT. **NBR 12244: Construção de poço para captação de água subterrânea**. Rio de Janeiro, 1992.

AYRES, M et al. **BioEstat 5.0** – Aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas. Sociedade Civil Mamirauá MCP – CNPq. 2007.

BALL, L. A. A taxonomia universal dos vírus em teoria e prática. In: FAUQUET, C. M.; MAYO, M. A.; MANILOFF, J. et al. **Taxonomia de vírus: Oitavo Relatório do Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus**. Elsevier, Academic Press; Amsterdã, Holanda. pp. 3-8, 2005.

BARRELLA, K. M.; GARRAFA, P.; MONEZI, T. A. et al. Longitudinal study on occurrence of adenoviruses and hepatitis A virus in raw domestic sewage in the city of Limeira, São Paulo. **Braz J Microbiol**. v.40, p.7-102, 2009.

BOFILL-MAS, S. et al. Quantification and stability of human adenoviruses and polyomavirus JCPyV in wastewater matrices. **Appl Environ Microbiol**. v.72, p.7894-96, 2006.

BOSCH, A. et al. New tools for the study and direct surveillance of viral pathogens in water. **Curr Opin Biotechnol**. v.19, n.3, p.295-301, 2008.

BRAGA, E. S. et al. Avaliação da qualidade de águas subterrâneas localizadas no litoral, serra e sertão do Estado do Ceará destinadas ao consumo humano. **Águas Subterrâneas**. Estudos de Caso e Notas Técnicas. v.32, n.1, p.17-24, 2018.

BRASIL, Ministério da Saúde. **Portaria nº 2.914**, de 12 de dezembro de 2011. Brasília, 2011.

BÜHLER, H. F.; IGNOTTI, E.; NEVES, S. M. A. S.; HACON, S. S. Análise espacial de indicadores integrados determinantes da mortalidade por diarreia aguda em crianças menores de 1 ano em regiões geográficas. **Cienc Saude Coletiva**, v.19, n.10, p.4131-40, 2014.

DO CARMO, G. M.; YEN, C.; CORTES, J. et al. Decline in Diarrhea Mortality and Admissions after Routine Childhood Rotavirus Immunization in Brazil: A Time-Series Analysis. **PLoS Med**, v.8, n.4, p.100-1024, 2011.

CABRAL, N. M. T.; LIMA, L. M. Qualidade da água do Aquíferos Barreiras em bairros de Belém/PA. **Águas Subterrâneas**, v. 19, n. 2, p. 37-53, 2005.

CAPUCCI, E.; MARTINS, A. M.; MANSUR, K. L.; MONSORES, A. L. M. **Poços tubulares e outras captações de águas subterrâneas: orientação aos usuários**. Rio de Janeiro, 2001.

CASTELLO, A. A. et al. Characterization of genotype P[9]G12 rotavirus strains from Argentina: high similarity with Japanese and Korean G12 strains. **J Med Virol**, v.81, n.2, p.371-381, 2009.

CARVALHO-COSTA, F. A.; VOLOTÃO, E. M.; DE ASSIS, R. M. et al. Laboratory-based rotavirus surveillance during the introduction of a vaccination program, Brazil, 2005- 2009. **Ped Infect Dis J**, v.30, p.35-41, 2011.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. CDC. MMWR. **Sustained Decrease in Laboratory Detection of Rotavirus after Implementation of Routine Vaccination – United States, 2000-2014**. v.64, n.13, p.337-342, 2015.

_____. CDC. **Epidemiology and Prevention of Vaccine-Preventable Diseases**. The Pink Book: Course Textbook - 13th Edition, 2015.

CHHABRA, P.; SAMOILOVICH, E.; YERMALOVICH, M. et al. Viral gastroenteritis in rotavirus negative hospitalized children <5 years of age from the independent states of the former Soviet Union. **Infect Genet Evol**, v.28, p.283–288, 2014.

COSTA I, LINHARES AC, CUNHA MH, TUBOI S, ARGÜELLO DF, JUSTINO MC, et al. Sustained Decrease in Gastroenteritis-related Deaths and Hospitalizations in Children Less Than 5 Years of Age After the Introduction of Rotavirus Vaccination: A Time-Trend Analysis in Brazil (2001-2010). **Pediatr Infect Dis J**, v.35, n.6, p.180-90, 2016.

DASHTI, A. S.; GRAHREHMANI, P.; HASHEMPOOR, T.; KARIMI, A. Molecular Epidemiology of Enteric Adenovirus Gastroenteritis in under-Five-Year-Old Children in Iran. **Gastroenter. Res Practic**, v.16, p.1-5, 2016

DEPARTAMENTO NACIONAL DE PRODUÇÃO MINERAL. **Informe Mineral Amazônia** 2007/2008. Disponível em: <http://www.dnpm.gov.br/mostra_Arquivo.asp?IDBancoArquivoArquivo=2742.2008>. Acesso em: 10 maio 2018.

DENNEHY, P. H. Rotavirus vaccines: an overview. **Clin Microbiol**, v.21, n.1, p.198-208, 2008.

DONALDSON, E. F. et al. Viral shapeshifting: norovirus evasion of the human immune system. **Nat. Rev. Microbiol.** v.8, p.231–241, 2010.

ESTES, M. K.; KAPIKIAN, A. Z. Rotaviruses and their replication. In: FIELDS et al. **Virology**. 5 ed. Philadelphia: Lipincott p.1917-1974, 2007.

FANKHAUSER, R. L. et al. Epidemiologic and molecular trends of "Norwalk-like viruses" associated with outbreaks of gastroenteritis in the United States. **J Infect Dis**, v.186, p.1-7, 2002.

FERREIRA, M. S. R. et al. Assessment of Gastroenteric Viruses Frequency in a Children's Day Care Center in Rio De Janeiro, Brazil: A Fifteen Year Study (1994–2008). **PLoS ONE**, v.7, p.1-7, 2012.

FERREIRA, C. S. **Avaliação bacteriológica, virológica e físico-química da água fornecida a população de Macapá pelo sistema de abastecimento público da companhia de água e esgoto do Amapá**. Dissertação. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, 2017.

FOSTER, S. et al. **Groundwater quality protection: defining strategy and setting priorities** GW-MATE Briefing Note n.8. 2003.

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**, v.69, p.357-371, 2005.

FUMIAN, T. M.; VIEIRA, C. B.; LEITE, J. P. G.; MIAGOSTOVICH, M. P. Assessment of burden of virus agents in urban sewage treatment plant in Rio de Janeiro, Brazil. **J Water Health**, v.11, p.110-9, 2013.

FUMIAN, T. M. **Detecção e caracterização molecular de vírus entéricos em águas residuárias na cidade do Rio de Janeiro**. Rio de Janeiro. Tese (doutorado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular, 2011.

GHEBREMEDHIN, B. Human adenovirus: viral pathogen with increasing importance. **Eur J Microbiol Immunol**, v.4, n.1, p.26-33, 2014.

GINELLI, A. et al. **Intussuscepção**. Disponível em: <<http://ctscan.com.br/casosclinicos/clinicamedica/intussuscepcao/index.php>> Acesso: 03 abr 2017.

GLASS, R. I.; PARASHAR, U. D.; ESTES, M. K. Norovirus gastroenteritis. **N Engl J Med**, v.361, n.18, p.1776-1785, 2009.

GONELLA, J. M.; TONANI, K. A. A.; BRISA MARIA FREGONESI, B. M. Adenovírus e rotavírus em águas superficiais do córrego Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil. **O Mundo da Saúde**, v.40, n.4, p.474-480, 2016.

GRAFF, J. W. et al. Zinc-binding domain of rotavirus NSP1 is required for proteasome-dependent degradation of IRF3 and autoregulatory NSP1 stability. **J Gen Virol**, v.88, p.613-620, 2007.

GREENING, G. E.; WOODFIELD, L.; LEWIS, G. D. RT-PCR and chemiluminescent ELISA for detection of enteroviruses. **J Virol Methods**, v.82, p.157-166, 1999.

GRIFFIN, D.W.; GIBSON, C.J. III; LIPP, E.K. et al. Detection of viral pathogens by reverse transcriptase PCR and of microbial indicators by standard methods in the canals of the Florida Keys. **Appl Environ Microbiol**, v.65, p.4118-4125, 1999.

GROTT, S. L. **Água subterrânea para consumo humano em Macapá: subsídios às políticas públicas de saneamento e recursos hídricos**. Dissertação (mestrado) – Fundação Universidade Federal do Amapá, Programa de Pós-graduação em Direito Ambiental e Políticas Públicas. Macapá, 2016.

GURJÃO, T. C. M. **Genótipos do Vírus da Hepatite A (VHA) Detectados em Diferentes Ecossistemas Aquáticos e a Relação do VHA com os Indicadores de Qualidade da Água, Belém, Pará, Brasil**. Dissertação (Mestrado em Biologia de Agentes Infecciosos e Parasitários) Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará. 2015.

GURGEL, R. Q.; CORREIA, J. B. CUEVAS, L. E. Effect of rotavirus vaccination on circulating virus strains. **Lancet**, v.371, p.301-302, 2008.

HASSINE-ZAAFRANE, M.; AOUNI, M. "Viral Gastroenteritis: Etiologic Agents, Epidemiology and Management", In: Bandopadhyay, A. et al. **Gastroenteritis: Epidemiology, Management and Prevention**, pp.21-36, 2012.

HE, X. et al. Molecular detection of three gastroenteritis viruses in urban surface waters in Beijing and correlation with levels of fecal indicator bacteria. **Environ Monit Assess**, v.184, p.5563-5570, 2012.

HOA TRAN, T. N. et al. Molecular epidemiology of noroviruses associated with acute sporadic gastroenteritis in children: global distribution of genogroups, genotypes and GII.4 variants. **J Clin Virol**, v.56, n.3, p.185-193, 2013.

HOWARD, G. et al. Groundwater and public health. In: SCHMOLL, O. et al. **Protecting groundwater for health: managing the quality of drinking-water sources**. Londres: IWA Publishing, 2006.

INSTITUTO TRATA BRASIL. **Ranking do Saneamento Trata Brasil 2017** - As 100 maiores cidades do Brasil. Disponível em: <<http://www.tratabrasil.org.br/datafiles/estudos/ranking/2016/relatorio-completo.pdf>> Acesso em: 11 maio 2017.

ITURRIZA-GÓMARA, M. et al. Molecular characterization of VP6 genes of human rotavirus isolates: correlation of genogroups with subgroups and evidence of independent segregation. **J Virol**, v.76, n.13, p.6596-6601, 2002.

KAGEYAMA, T. et al. Broadly reactive and highly sensitive assay for Norwalk-like viruses based on real-time quantitative reverse transcription-PCR. **J Clin Microbiol**, v.41, p.1548-1557, 2003.

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**, v.68, p.1033-1039, 2002.

KFOURI, R. A. et al. Vacina rotavírus: segurança e alergia alimentar – Posicionamento das Sociedades Brasileiras de Alergia e Imunologia (ASBAI), Imunizações (SBIIm) e Pediatria (SBP). **Arq Asma Alerg Imunol**, v.1, n.1, p.49-54, 2017.

KITAJIMA, M.; HARAMOTO, E.; PHANUWAN, C. et al. Molecular detection and genotyping of human noroviruses in influent and effluent water at a wastewater treatment plant in Japan. **J Appl Microbiol**, v.112, p.605-613, 2012.

KOJIMA, S. et al. Genogroup-specific PCR primers for detection of Norwalk-like viruses. **J Virol Method**, v.100, n.1-2, p.107-114, 2002.

KARST, S. M. Pathogenesis of Noroviruses, Emerging RNA Viruses. **Viruses**, v.2, p.748-781, 2010.

KRONEMAN, A. et al. Proposal for a unified norovirus nomenclature and genotyping. **Archives in Virology**, v.158, n.10, p.2059-2068, 2013.

LEE, G. C. et al. A 5-year survey (2007-2011) of enteric viruses in Korean aquatic environments and the use of coliforms as viral indicators. **Microbiol Immunol**, v.57, p.46-53, 2013.

LEMIALE, F. et al. Novel adenovirus vaccine vectors based on the enteric-tropic serotype 41. **Vaccine**, v.25, n.11, p.2074-2084, 2008.

LEVINE, D. M.; BERENSON, M. L.; STEPHAN, D. **Estatística: Teoria e Aplicações usando Microsoft Excel em Português**. Rio de Janeiro: LTC, 2000.

LI, D. D. et al. Molecular characterization of unusual human G5P[6] rotaviruses identified in China. **J Clin Virol**, v.42, n.2, p.141-148, 2008.

LI, D. et al. Genotype of Rotavirus Vaccine Strain LLR in China is G10P[15] Bing du xue bao=Chinese. **J Virol**, v.31, p.170-173, 2015.

LINHARES, A. C. et al. Burden and typing of rotavirus group A in Latin America and the Caribbean: systematic review and meta-analysis. **Rev Med Virol**, v.21, p.89-109, 2011.

LINHARES, A.C.; PINHEIRO, F.P.; SCHMETZ, C. et al. Duovirus (rotavirus) em Belém do Pará. **Rev Insti de Med Trop**, v.19, p.278-279, 1977.

LIU, J.; PLATTS-MILLS, J.; JUMAT, J. et al. Use of quantitative molecular diagnostic methods to identify causes of diarrhoea in children: a reanalysis of the GEMS casecontrol study. **Lancet**, v.388, p.1291–301, 2016.

LOPMAN, B. A.; STEELE, D.; KIRKWOOD, C. D.; PARASHAR, U. D. The vast and varied global burden of Norovirus: prospects for prevention and control. **PLoS Med**, v.13, n.4, p.1-12, 2016.

LUCHS, A.; TIMENETSKY, M. C. Gastroenterite por rotavírus do grupo A: era pós-vacinal, genótipos e transmissão zoonótica. **Einstein**, v.14, n.2, p.278-87, 2016.

LUZ, I. S.; MIAGOSTOVICH, M. P. Norovírus em alimentos. **Vigil. Sanit**, v.5, n.3, p.100-115, 2017.

MACCANNELL, T. et al. Guideline on the prevention and control of Norovirus gastroenteritis outbreaks in healthcare settings. HICPAC Guideline. **Infect Control Hosp Epidemiol**, v.32, n.10, p.939-969, 2011.

MACHADO, C. J. S. et al. Promoção da relação saúde–saneamento–cidade por meio da Virologia Ambiental. **Revista de Informação Legislativa**. 50(199):321-345, 2013.

MARTELLA, V. et al. Zoonotic aspects of rotaviruses. **Vet Microbiol**, v.140, n.3-4, p.246-55, 2010.

MATTHIJNSSENS, J. et al. Uniformity of rotavirus strain nomenclature proposed by the Rotavirus Classification Working Group (RCWG). **Arch Virol**, v.156, n.8, p.1397-413, 2011.

MENDES, D. C. T. **Abastecimento de Água para Consumo Humano na Área Urbana de São Luís: Onde está a Qualidade?** Dissertação (Mestrado em Saúde e Ambiente). Universidade Federal do Maranhão. São Luís, 2008.

MENDES, P. S. A, RIBEIRO, J. R. MENDES, C. M. C. Temporal trends of overall mortality and hospital morbidity due to diarrheal disease in Brazilian children younger than 5 years from 2000 to 2010. **J Pediatr**, v.89, n.3, p.315-25, 2013.

MELNICK, J. L. A water-borne urban epidemic of hepatitis. In: LOGRIPPO, G. A. et al. **Hepatitis Frontiers**. Boston: Little, Brown, 1957.

MIAGOSTOVICH, M. P. et al. Molecular detection and characterization of gastroenteritis viruses occurring naturally in the stream waters of Manaus, Central Amazônia, Brazil. **Appl Environ Microbiol**, v.74, n.2, p.375-382, 2008.

MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE – MMA. **Águas subterrâneas: um recurso a ser conhecido e protegido**. Brasília, DF: Ministério do Meio Ambiente. Secretaria de Recursos Hídricos e Ambiente Urbano, 2007.

MORESCO, V. et al. Microbiological and physicochemical analysis of the coastal waters of southern Brazil. **Marine Pollution Bulletin**, v.64, p.40-48, 2012.

MORILLO, S. G.; LUCHS, A.; CILLI, A. et. al. Characterization of rotavirus strains from day care centers: pre- and post-rotavirus vaccine era. **J Pediatr**, v.86, n.2, p.155-8, 2017.

MOSSEL, E.; ESTES, M.; RAMIG, F. **Coding assignments and virion locations of rotavirus proteins and 3D structure of the rotavirus particle**. 2016. Disponível em: http://www.reoviridae.org/dsrna_virus_proteins/rotavirus%20figure.htm Acesso: 12 abr. 2017

MOURA, M. H. G. et al. Análise das águas dos poços artesianos do campus CAVG – UFPEL. **2ª Mostra de Trabalhos de Tecnologia Ambiental**. Rio Grande do Sul: Pelotas, 2009.

MULLER, E. C. A. **Epidemiologia molecular das infecções por adenovírus em crianças com gastroenterite aguda grave, após a introdução da vacina contra Rotavírus na cidade de Belém, Pará**. Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Pará. Belém, 2017.

MURRAY, P. R.; ROSENTHAL, K. S.; PFALLER, M. A. **Microbiologia Médica**. 7º ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2014.

NUNES, V. R. S. **O setor de saneamento no Brasil: Desafios e perspectivas**. Rio de Janeiro: UFRJ/Escola Politécnica, 2015.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE – OMS. **Guidelines for drinking-water quality**, 4 ed. Geneva, 2017a.

_____. OMS/UNICEF. **Progress on Drinking Water, Sanitation and Hygiene**. Geneva, 2017.

_____. OMS/UNICEF. **Progress on Sanitation and Drinking Water** Geneva, 2015.

PALOMBO, E. A.; BISHOP, R. F. **Rotaviruses**. eLS. John Wiley & Sons, Ltd: Chichester, 10p. 2011.

PANG, X. L.; PREIKSAITIS, J. K.; LEE, B. Multiplex real time RT-PCR for the detection and quantitation of norovirus genogroups I and II in patients with acute gastroenteritis. **J Clin Virol**, v.33, p.168-171, 2005.

PRADO, T.; MIAGOSTOVICH, M. P. Virologia ambiental e saneamento no Brasil: uma revisão narrativa. **Cad. Saúde Pública**, v.30, n.7, p.1367-1378, 2014.

PRASAD, B. V. V. et al. X-ray crystallographic structure of Norwalk virus capsid. **Science**, v.286, p.287-290, 1999.

PURCELL, R. H.; TICEHUST, J. R. Enterically transmitted non-A, non-B hepatitis: epidemiology and clinical characteristics. In: ZUCKERMAN, A. J. (Ed.). **Viral Hepatitis and Liver Disease**. New York, NY: Liss, p.131-37, 1988.

QUEIROZ, A. P. et al. Electropositive filter membrana as an alternative for the elimination of PCR inhibitors from sewage and water samples. **Appl Environ Microbiol**, v.67, n.10, p.4614–4618, 2001.

RAHMAN, M.; MATTHIJNSSENS, J.; SAIADA, F. et al. Complete genomic analysis of a Bangladeshi G1P[8] rotavirus strain detected in 2003 reveals a close evolutionary relationship with contemporary human Wa-like strains. **Infect Genet Evol**, v.10, p.746–754, 2010.

RIGOTTO, C. et al. Assessment of adenovirus, hepatitis A virus and rotavirus presence in environmental samples in Florianópolis, South Brazil. **J Appl Microbiol**, v.109, p.1979-1987, 2010.

ROBILOTTI, E.; DERESINSKI, S.; PINSKY, B. A. Norovirus. **Clin Microbiol Rev**, v.28, p.134-164, 2015.

ROTA Council. **Rotavirus: common, severe, devastating, preventable**. The latest evidence & what's needed to stop illnesses and deaths. 2016. Disponível em: <http://rotacouncil.org/resources/White-paper-FINAL-v2.pdf>. Acesso em: 18 de out. de 2016.

SAÚDE do Viajante – **OLIMPIADAS E PARAOLIMPIADAS RIO 2016**. Disponível em: <http://www.saudedoviajante.pr.gov.br/2016/06/42/OLIMPIADAS-E-PARAOLIMPIADAS-RIO-2016.html> Acesso em: 14 maio 2018.

SANTOS, N. S. O; SOARES, C. C. Virologia Clínica: viroses entéricas. In: SANTOS, N. S. O. et al. **Virologia Humana**. Guanabara Koogan. 3 ed. 209-215p., 2015.

SERRACCA, L. et al. Evaluation of Adenovirus and *E. coli* as indicators for human enteric viruses presence in mussels produced in La Spezia Gulf (Italy). **Letter Appl Microbiol**, v.50, p.462-467, 2010.

SILVA, L. P.; BARBOSA, J. P.; SILVA, G. A. Análise exploratória de dados da qualidade da água de poços amazonas na cidade de Macapá, Amapá, Brasil. **Águas Subterrâneas**, v.32, n.1, p.43-51, 2018.

SILVA, F. V. **Avaliação da contaminação das águas subterrâneas por atividade cemintrial na cidade de Maceió-AL**. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Recursos Hídricos e Saneamento) – Centro de Tecnologia, Universidade Federal de Alagoas, Maceió, 2012.

SILVA, H. D.; ANUNCIÇÃO, C. E.; SANTOS, S. F. O.; GARCÍA-ZAPATA, M. T. A. Análise virológica da qualidade da água: uma revisão das metodologias de concentração e detecção viral. **Rev Bras Bioc**, v.9, n.3, p.405-415, 2011.

SILVA, R. C. A.; ARAÚJO, T. M. Qualidade da água do manancial subterrâneo em áreas urbanas de Feira de Santana (BA). **Ciênc Saúde Colet**, v.8, n.4, p.1019-1028, 2003.

SISTEMA NACIONAL DE INFORMAÇÕES SOBRE SANEAMENTO - SNIS. **Diagnóstico dos serviços de água e esgotos** – 2016. Brasília: SNSA/MCIDADES, 2018.

SOUSA, R. S. et al. Água e Saúde no município de Igarapé-Açu, Pará. **Saúde Soc**, v.25, n.4, p.1055-1107, 2016.

TAN, M.; JIANG, X. Norovirus – host interaction: implications for disease control and prevention. **Exp Rev Mol Med**, v.9, n.19, p.1-22, 2007.

TAVARES, T. M.; CARDOSO, D. D. P.; DE BRITO, W. M. E. D. Vírus entéricos veiculados por água: aspectos microbiológicos e de controle de qualidade da água. **Rev Patol Tropic**, v.34, n.2, p.85-104, 2005.

TEIXEIRA, D. M. **Detecção e genotipagem de norovírus em diferentes amostras de água e esgoto não tratado na cidade de Belém, Pará, Brasil, 2008 a 2010**. Mestrado (Programa de Pós-Graduação em Doenças Tropicais do Núcleo de Medicina Tropical, da Universidade Federal do Pará), 2014.

TONANI, K. A. A et al. Persistence of Giardia, Cryptosporidium, Rotavirus and Adenovirus in Treated Sewage in São Paulo State, Brazil. **J Parasitol**, v.99, p.1144-1147, 2013.

TUCCI et al. **Hidrologia: ciência e aplicação**. 4 ed. Porto Alegre: Ed. UFRS/ABRH, 2007.

VASCONCELOS, M. B. O que são poços? Um panorama das terminologias utilizadas para captações de águas subterrâneas. **Revista Águas Subterrâneas**, v.31, n.2, p. 44-57, 2017.

VIEIRA, C. B. et al. Detection of enteric viruses in recreational waters of an urban lagoon in the city of Rio de Janeiro, Brazil. **Mem Instit Oswaldo Cruz**, v.107, n.6, p.778-784, 2012.

VIEIRA, C. B.; MENDES, A. C. O.; DE OLIVEIRA, J. M. et. al. Vírus entéricos na Lagoa Rodrigo de Freitas. **Oecologia Australis**, v.16, p.540-65, 2012.

VILLAR, P. C. As águas subterrâneas e o direito à água em um contexto de crise. **Amb & Societ**, v.19, n.1, p.83-102, 2016a.

VILLAR, L. M.; DE PAULA, V. S.; DINIZ-MENDES, L.; GUIMARÃES, F. R.; FERREIRA, F. F. M.; SHUBO, T. C. et al. Molecular detection of hepatitis A virus in urban sewage in Rio de Janeiro, Brazil. **Lett Appl Microbiol**, v.45, p.168-73, 2007.

VINJÉ J. Advances in laboratory methods for detection and typing of norovirus. **J Clin Microbiol**, v.53, p.373-381, 2015.

WALDMAN, E. A. et al. Gastroenterites e infecções respiratórias agudas em menores de 5 anos, em área da região sudeste do Brasil, 1986-1987. II – Diarreias. **Rev Saude Publica**, v.31, n.1, p.62-70, 1997.

WHITE, P. A. Evolution of Norovirus. **Clin Microbiol Infect**. 2014.

WOLD, W. S. M.; ISON, M. G. Adenoviruses. In: FIELDS, B. N. et al. **Virology**. 6 ed. Cap 56, pp.1732-1762, 2013.

WYN-JONES, A. P.; SELLWOOD, J. A review: Enteric viruses in aquatic environment. **J Appl Microbiol**, v.91, p.945-962, 2001.