UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

HUGO DELLEON DA SILVA

Adenovírus humano em água tratada e avaliação da sua recuperação em solução com sólidos tropicais

Goiânia
2013

TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR AS TESES E DISSERTAÇÕES ELETRÔNICAS (TEDE) NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou download, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

1. Identificação do material bibliográfico: **[ ] Dissertação** **[x] Tese**

2. Identificação da Tese ou Dissertação

Autor (a):	HUGO DELLEON DA SILVA				
E-mail:	hdellon@gmail.com				
Seu e-mail pode ser disponibilizado na página? [x]Sim [ ] Não					
Vínculo empregatício do autor					
Agência de fomento:				Sigla:	
País:		UF:		CNPJ:	
Título:	Adenovírus humano em água tratada e avaliação da sua recuperação em solução com sólidos tropicais				
Palavras-chave:	adenovírus, água tratada, matéria orgânica, pH, qPCR				
Título em outra língua:	Human adenoviruses in tap water and assessment of its recovery in solution with tropical solids				
Palavras-chave em outra língua:	adenovirus, treated water, organic matter, pH, qPCR				
Área de concentração:	Dinâmica do Processo Saúde-Doença				
Data defesa: (10/10/2013)					
Programa de Pós-Graduação:	Ciências da Saúde				
Orientador (a):	Marco Tulio Antonio García-Zapata				
E-mail:	mctulianglobal@gmail.com				
Co-orientador (a):	Carlos Eduardo Anunciação				
E-mail:	carlosgynbr@yahoo.com.br				

3. Informações de acesso ao documento:

Liberação para disponibilização?[1] [x] total [ ] parcial

Em caso de disponibilização parcial, assinale as permissões:
[ ] Capítulos. Especifique: _____
[ ] Outras restrições: _____

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF ou DOC da tese ou dissertação.

O Sistema da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações garante aos autores, que os arquivos contendo eletronicamente as teses e ou dissertações, antes de sua disponibilização, receberão procedimentos de segurança, criptografia (para não permitir cópia e extração de conteúdo, permitindo apenas impressão fraca) usando o padrão do Acrobat.

_____ Data: _____ / _____ / _____

Assinatura do (a) autor (a)

[1] Em caso de restrição, esta poderá ser mantida por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Todo resumo e metadados ficarão sempre disponibilizados.

HUGO DELLEON DA SILVA

Adenovírus humano em água tratada e avaliação da sua recuperação em solução com sólidos tropicais

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Goiás para obtenção do Título de Doutor em Ciências da Saúde.

Orientador: Marco Tulio Antonio García-Zapata

Co-orientador: Carlos Eduardo Anunciação

Goiânia
2013

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
GPT/BC/UFG

Silva, Hugo Delleon da.
S586a Adenovírus humano em água tratada e avaliação da sua recuperação em solução com sólidos tropicais [manuscrito] / Hugo Delleon da Silva. - 2013.
159 f. : figs., tabs.

Orientador: Prof. Dr. Marco Túlio Antonio García-Zapata; Coorientador: Prof. Dr. Carlos Eduardo Anunciação.
Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Goiás, Faculdade de Medicina, 2013.
Bibliografia.
Inclui listas de tabelas, figuras, símbolos, siglas e abreviaturas.
Apêndices.

1. Adenovírus - Água tratada. 2. Adenovírus – Matéria orgânica. I. Título.

CDU: 578.826:628.1

Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde
da Universidade Federal de Goiás

BANCA EXAMINADORA DA TESE DE DOUTORADO

Aluno(a): Hugo Delleon da Silva

Orientador(a): Marco Tulio Antonio García-Zapata

Co-Orientador(a): Carlos Eduardo Anunciação

Membros:

1. Marco Tulio Antonio García-Zapata

2. Mauro Shugiro Tada

3. Nora Katia Saavedra del Aguila

4. Fabiola Souza Fiaccadori

5. Guilherme Rocha Lino de Souza

OU

6. Kátia Alcione Kopp

7. Keili Maria Cardoso de Souza

Data: 10/10/2013

Ministério da Educação
Universidade Federal de Goiás
Faculdade de Medicina
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Goiás

Ata de Defesa Tese de Doutorado realizada por **Hugo Delleon da Silva.** Aos **10 dias do mês de outubro de 2013**, às **08:00** horas, reuniu-se no **IPTSP/UFG**, a Comissão Julgadora infra nomeada para proceder ao julgamento da Defesa de Tese de Doutorado intitulada "**OCORRÊNCIA DE ADENOVÍRUS HUMANO EM ÁGUA TRATADA DA CIDADE DE GOIÂNIA E AVALIAÇÃO DA SUA RECUPERAÇÃO EM SOLUÇÃO COM SÓLIDOS TROPICAIS** ", como parte de requisitos necessários à obtenção do **título de Doutor**, área de concentração **Dinâmica do Processo Saúde-Doença**. O Presidente da Comissão julgadora, **Prof. Dr. Marco Túlio Antônio García-Zapata**, iniciando os trabalhos concedeu a palavra ao candidato, para exposição em até **50** minutos do seu trabalho. A seguir, o senhor presidente concedeu a palavra, pela ordem sucessivamente, aos Examinadores, os quais passaram a argüir o candidato durante o prazo máximo de 30 minutos, assegurando-se ao mesmo igual prazo para responder aos Senhores Examinadores. Ultimada a argüição que se desenvolveu nos termos regimentais, a Comissão, em sessão secreta, expressou seu Julgamento, considerando ao candidato aprovado ou reprovado.

Banca Examinadora	**Aprovado(a)/Reprovado(a)**
Prof. Dr. Marco Túlio A. García-Zapata - Presidente	APROVADO
Prof. Dr. Mauro Shugiro Tada – Membro	APROVADO
Profa. Dra. Nora Kátia S. Del Aguila - Membro	Aprovada
Profa. Dra. Fabíola S. Fiaccadori – Membro	Aprovada
Prof. Dr. Guilherme R. L. de Souza – Membro	APROVADO
Profa. Dra. Kátia Alcione Kopp - Suplente	
Profa. Dra. Keili Maria C. de Souza .– Suplente	

Em face do resultado obtido, a Comissão Julgadora considerou o candidato **Hugo Delleon da Silva** (X) Habilitado ( ) Não habilitado. Nada mais havendo a tratar, eu **Prof. Dr. Marco Túlio Antônio García-Zapata**, lavrei a presente ata que, após lida e achada conforme foi por todos assinada.

Prof. Dr. Marco Túlio A. García-Zapata - Presidente	
Prof. Dr. Mauro Shugiro Tada – Membro	
Profa. Dra. Nora Kátia S. Del Aguila - Membro	
Profa. Dra. Fabíola S. Fiaccadori – Membro	
Prof. Dr. Guilherme R. L. de Souza – Membro	
Profa. Dra. Kátia Alcione Kopp - Suplente	
Profa. Dra. Keili Maria C. de Souza .– Suplente	

A banca examinadora aprovou a seguinte alteração no título da Tese:
Adenovírus humano em água tratada e avaliação da sua recuperação em solução com sólidos tropicais

Doutorando: HUGO DELLEON DA SILVA

Dedico este trabalho...

À minha mãe, que sempre viu na educação um caminho para um futuro promissor.

Ao meu pai, homem de fibra, exemplo de hombridade e dedicação, obrigado pelo apoio, não foi fácil, mas sempre que precisei o senhor estava ao meu lado para auxiliar no que fosse possível.

Aos meus queridos irmãos Douglas e Maycon. Em especial, à minha avó Maria Rosa, sempre presente.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço à Deus por ter “aberto portas”, me encorajado e apaziguado meus pensamentos e coração, sobretudo naqueles momentos mais difíceis, quando eu perdi todas as amostras e reagentes, quando eu estava em meus momentos de solidão escrevendo a Tese ou realizando meus experimentos aos finais de semana. Mas tudo tem um porque, e aprendi que tudo, absolutamente tudo, faz parte da nossa aprendizagem de vida.

Assim, é com muita alegria que chego ao fim dessa jornada de grandes desafios e aprendizagens e é muito bom perceber que eu também pude contar com auxílio de pessoas muito queridas. Assim, meus agradecimentos são para:

Minha família querida: agradeço à minha mãe (Joelita), pai (Adenon) e irmãos (Douglas e Maycon) por todo apoio incentivo e compreensão. Um agradecimento à minha vozinha Maria, pessoa simples, cheia de amor e extremamente focada e dedicada, aprendi muita com essa vozinha! Agradeço à todos os demais membros familiares.

Aos meus Mestres: Prof. Marco T. A. García-Zapata - um exemplo de entusiasmo pela pesquisa! Obrigado pela sua orientação durante o doutorado, apoio, confiança e conselhos. Agradeço ao Prof. Carlos Eduardo, a quem dedico grande estima e carinho, obrigado pelos conselhos, auxílios diversos e por me deixar “criar” e aprender com meus MUITOS erros e POUCOS acertos; e o mais importante, obrigado por acreditar, acreditar que o “patinho” feio poderia se tornar um “patinho mais bonitinho” rsrsrs! Agradeço à Profa Elisângela Silveira-Lacerda, que SEMPRE estendeu seu auxílio, obrigado por todo o apoio técnico, financeiro e pelo carinho.

Aos amigos do NUPEREME: Soinha, Tati, Liliam e Lud. Soninha, uma segunda mãe pra mim, passamos por tanta coisas juntos e sempre nos

ajudando, obrigado por todo o seu apoio e amizade sincera. Tati, obrigado pelos momentos de conversas, desabafos e auxílios diversos.

Aos amigos do LGMC: Agradeço à todos do Lab, especialmente à Aliny e Flávia, amigas que sempre posso contar. MUITO OBRIGADO pelo auxílio nos experimentos e pela amizade verdadeira de vocês!

Amigos de outros Labs da UFG: Obrigado ao Arthur por auxiliar no sequenciamento das amostras, à Lorena Cintra pelos auxílios emergenciais de reagentes, utilização de equipamentos e momentos de conversa no ICB; à toda equipe do PARFOR-Biologia; agradeço à Greyciele Almeida do LVA por me introduzir no mundo da cultura celular.

Às minhas amigas queridas: Gislaine Fongaro, que me ajudou de forma desprendida na parte experimental e à qual tenho profunda gratidão, admiração e carinho! O meu muito obrigado à minha irmãzinha do coração (Giorgia Lay-Ang), mesmo quando longe, sempre mantemos contato e quando estou contigo esqueço os problemas, pois você emana alegria! Mesmo longe, agradeço à minha amiga Sandra, pois sabemos que distância não é um empecilho para nossa amizade.

Ao meu irmão do peito: Marco Aurélio, o que falar... Obrigado por todo o seu aopio e insentivo, seja na parte experimental ou mesmo fora do ambiente de trabalho. Obrigado pela amizade, sei que posso contar contigo!

Aos Professores e técnicos da UFG: Agradeço aos Professores André Kipnis por me auxiliar na parte de cultura de bactérias transformadas; Profa. Wilia Brito por abrir as portas do LVA para que eu pudesse fazer as análises com vírus; Profa Fabiola Fiaccadori e Menira Souza pelo apoio no LVA; Keili Cardoso, sempre gentil e muita prestativa no que fosse possível; Profa. Silvana Petrofeza pelo apoio na realização das qPCR; Elaine Jacob e André, sempre prestativos quando eu precisa utilizar as dependências do Lab. Multiusuário/IPTSP. Por último e não menos importante, agradeço à secretária Valdecina da Pós-graduação em Ciências da Saúde por me ajudar nos auxílios e tramitações junto à Pós-graduação em Ciências da Saúde.

Professores da banca: agradeço aos professores membros das bancas de qualificação e defesa pela participação e contribuições inerentes à melhoria deste estudo.

Instituto Fibra Brasil: Agradeço à família Fibra pelo apoio e compreensão durante a realização do doutorado. Agradeço especialmente a ex-diretora Samira Mikhael pelo carinho e por todo o aporte financeiro que me foi concedido na realização do doutorado.

Suporte financeiro: CAPES pela concessão da bolsa de estudos e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde.

Agradeço à todos que direta ou indiretamente contribuíram para a finalização desta Tese e desde já, peço desculpas se me esqueci de alguma pessoa.

“Aprendi o silêncio com os faladores, a tolerância com os intolerantes, a bondade com os maldosos; e, por estranho que pareça, sou grato a esses professores.”

Khalil Gibran

SUMÁRIO

TABELAS, FIGURAS XII

SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS XIV

RESUMO XVII

ABSTRACT XVIII

1 INTRODUÇÃO 1

1.1 VIROLOGIA AMBIENTAL 1

1.2 CARACTERIZAÇÃO DO MICRO-ORGANISMO DE ESTUDO 5

1.3 ANÁLISE DE VÍRUS EM MEIO AMBIENTE 8
1.3.1 Concentração Viral *8*
1.3.2 Isolamento e detecção viral *9*

1.4 CONTEXTUALIZAÇÃO 12

2 OBJETIVOS 14

2.1 OBJETIVO GERAL 14

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS 14

3 MÉTODO(S) 15

3.1 LOCAIS DE ESTUDO E INSTALAÇÕES 15
3.1.1 Laboratórios parceiros *17*

3.2 PARTE EXPERIMENTAL I 18
3.2.1 Pontos de coleta *18*
3.2.2 Coleta e concentração das amostras de água *19*
3.2.3 Extração de Ácidos Nucléicos *21*
3.2.4 Cultivo bacteriano e extração de DNA plasmidial *21*
3.2.5 Construção da Curva Padrão *21*
3.2.6 Quantificação do Genoma viral *22*
3.2.7 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) *23*
3.2.8 Sequenciamento e análise dos dados *23*

3.3 PARTE EXPERIMENTAL II 25
3.3.1 Ponto de coleta do solo *25*
3.3.2 Preparo do solo *25*
3.3.3 Análise textural e química *26*
3.3.4 Análise instrumental *27*
3.3.5 Preparo e Inoculação de HAdVs *29*
3.3.6 Extração de DNA *32*
3.3.7 Enumeração por PCR em tempo real quantitativa (qPCR) *32*

3.3.8 Ensaio Citotóxico *34*
3.3.9 Ensaio em Placa de Lise *35*

3.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA 36

4 PUBLICAÇÕES 37

ARTIGO 1 – ANÁLISE VIROLÓGICA DA QUALIDADE DA ÁGUA : UMA REVISÃO DAS METODOLOGIAS DE CONCETRAÇÃO E DETECÇÃO VIRAL 38

ARTIGO 2 – WHY THE USE OF ADENOVIRUSES AS WATER QUALITY VIROLOGIC MARKER? 49

ARTIGO 3 - ALTO NÚMERO DE CÓPIAS GENÔMICAS DE ADENOVÍRUS HUMANO C EM ÁGUA TRATADA DE ÁREA NEOTROPICAL 52

ARTIGO 4 - CONTRIBUIÇÃO DO PH E DA MATÉRIA ORGÂNICA NA RECUPERAÇÃO DE ADENOVÍRUS EM CONDIÇÃO SIMULADA COM ÁGUA E SÓLIDOS TROPICAIS 66

5 CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS 96

5.1 CONCLUSÕES 96

5.2 CONSIDERAÇÕES FINAIS: 96

6 - REFERÊNCIAS 99

7 - ANEXOS 109

7.1 INSTRUCTIONS FOR AUTHORS FOOD AND ENVIRONMENTAL VIROLOGY ... 111

7.2 INSTRUCTIONS TO AUTHORS FOR ENVIRONMENTAL SCIENCE AND TECHNOLOGY 121

8 - APÊNDICES 147

APÊNDICE 1 – PONTOS DE COLETA 149

APÊNCICE 2 - BAIRROS DA CIDADE DE GOIÂNIA SOB INFLUÊNCIA DOS RESERVATÓRIOS SENAC, SERRINHA, ATLÂNTICO E CRISTINA 151

APÊNDICE 3 – ENSAIO EM PLACA DE LISE 153

APÊNCIDE 4 – ENSAIO CITOTÓXICO EM PLACA DE 96 POÇOS. 155

APÊNDICE 5 - FRAGMENTOS DE PCR AMPLIFICADOS EM GEL AGAROSE 157

APÊNDICE 6 – GRÁFICOS MOSTRANDO CURVAS DE AMPLIFICAÇÃO POR REAL TIME PCR QUANTITATIVO (QPCR). 159

FIGURAS, TABELAS E QUADROS

Figura 1	Possíveis rotas de transmissão hídrica de vírus entéricos.	Pág. 3
Figura 2	Estrutura tridimensional do adenovírus obtida por uma combinação de microscopia eletrônica e cristalografia de raio-x.	Pág. 7
Figura 3	Fluxograma mostrando o desenho experimental do estudo.	Pág. 16
Figura 4	Mapa do município de Goiânia contemplando a localização dos reservatórios e dos seus respectivos pontos de coleta na rede de distribuição da água.	Pág. 19
Figura 5	Etapas de coleta e concentração da água.	Pág. 20
Figura 6	Ponto de amostragem de solo hidromórfico, em fitofisionomia de vereda, a sudeste do Estado de Goiás, nos limites do município de Bela Vista de Goiás.	Pág. 26
Figura 7	Caracterização da fração argila do solo pelo uso de Difração de raio-x.	Pág. 28
Figura 8	Resultado da espectroscopia de energia dispersiva para a amostra de solo com matéria orgânica (CMO).	Pág. 30
Figura 9	Resultado da espectroscopia de energia dispersiva para a amostra de solo sem matéria orgânica (SMO).	Pág. 31

Tabela 1	Caracterização textural e química do solo.	Pág. 27
Tabela 2	Teor de ferro (g kg^{-1}) na fração argila calculado pelo método de ditionito e pelo oxalato em amostras de solo com matéria orgânica (CMO) e sem matéria orgânica (SMO).	Pág. 28
Quadro 1	Doenças associadas com sorotipos de adenovírus humanos e os principais grupos de risco.	Pág. 8
Quadro 2	Sequências de iniciadores e da sonda utilizada	Pág 22.

SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS

A549	A549 Células Epiteliais de Carcinoma de Pulmão Humano
AdV	Adenovírus
Al	Alumínio
Au	Ouro
CA	Ensaio controle
$CaCl_2$	Cloreto de Cálcio
CCL	Lista de Candidatos Contaminantes
cDNA	DNA complementar
CG	Cópias genômicas
Clay%	Teor de argila (%)
CMO	Com Matéria Orgânica
C-PCR / ICC-PCR	Cultura Celular Integrada à Reação em Cadeia da Polimerase
CTC	Capacidade de troca catiônica
dag	Decagrama (unidade de massa) – dag = 10 g
dATP	Desoxiadenosina 5'-trifosfato
dCTP	Desoxicitidina 5'-trifosfato
dGTP	Desoxiguanosina 5'-trifosfato
dm^3	Decímetro Cúbido (unidade de volume) – dm^3 = 1 L
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Médium
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Desoxiribonucleotídeo trifosfatado
DR-x	Difração de raio-x
dTTP	Desoxitimidina 5'-trifosfato
dUTP	Desoxiuridina 5'-trifosfato
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

Fe	Ferro
Floc	Grau de floculação
g	grama
HAdV	Adenovírus humano
HAdV-5	Adenovírus humano 5
HCl	Ácido Clorídrico
ICC-RT-PCR	Cultura Celular Integrada à Reação em Cadeia da Polimerase
ICC-RT-qPCR	Cultura Celular Integrada à Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real precedida de Transcrição Reversa
K	Potássio
KCl	Cloreto de Potássio
Kpb	Kilo par de base (1 kpb= 1000 nucleotídeos)
LabMic	Laboratório Multiusuário de Microscopia de Alta Resolução
LB	Luria-Bertani
LDGM	Laboratório de Diagnóstico Genético e Molecular
LGMC	Laboratório de Genética Molecular e Citogenética
MEM	Meio Mínimo Essencial com Sais de Eagle's
MEV	Microscópio Eletrônico de Varredura
$MgCl_2$	Cloreto de Magnésio
MO	Matéria orgânica
Mpa	megapascal (1 MPa ≡ 1,000,000 pascal)
N_{ca}	Número total de cópias genômicas de HAdVs permanente no Ensaio Controle
ng	nanograma
N_{prec}	Número total de cópias genômicas de HAdVs permanente no precipitado
N_{sup}	Número total de cópias genômicas de HAdVs permanente no sobrenadante
N_{ta}	Número total de cópias genômicas de HAdVs no Ensaio Teste

NUPEREME	Núcleo de Pesquisa em Agentes Emergentes e Re-emergentes
PBS	Tampão fosfato salino
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PFU	Unidade formadora de Placa (*Plaque-Forming Unit*)
pH	Potencial hidrogeniônico
pI	Ponto isoelétrico
POPs	Procedimentos operacionais padrão
qPCR	Reação em Cadeia da Polimerase Quantitativa / PCR em Tempo Real Quantitativa / PCR quantitativa
rcf	Força centrifuga relativa
RNA	Ácido ribonucleico
rpm	Rotação por minuto
RT	Transcriptase reversa
RT-PCR	Cultura Celular Integrada à Reação em Cadeia da Polimerase precedida de Transcrição Reversa
RT-qPCR	Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real Quantitativa precedida de Transcrição Reversa
SFB	Soro fetal bovino
SMO	Sem matéria orgânica
STD	Sólido total dissolvido
TA	Ensaio teste
TE	Tris-EDTA (Tris - Ethylenediamine Tetraacetic Acid;)
TFSA	Terra fina seca ao ar
Tris-HCl	(base Tris(hidroxilamina)aminometano, ácido HCl)
UFP	Unidade formadora de placa
UNG	Uracil N-glicosilase
USEPA	Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos da América
UV	Ultravioleta
V	Volume (Volume do Sedimento)
WHO	Organização Muncial da Saúde (*World Health Organization*)

RESUMO

O adenovírus humano (HAdV) é indicado como um biomarcador viral para a análise de qualidade da água. Assim, estudos que evidenciam a ocorrência ou mesmo as interações destes em água são de suma importância, já que as pesquisas na área são inexpressivas. Neste contexto, foram objetivos do estudo: (i) detectar, quantificar e caracterizar molecularmente os HAdVs circulantes no sistema de abastecimento de água tratada da cidade Goiânia; (ii) avaliar a infecciosidade e a recuperação de cópias genômicas (CG) de HAdV-5 em soluções simuladas com sólidos tropicais e em condições controladas de pH e presença de matéria orgânica (MO) e (iii) estabelecer uma equação matemática para avaliar a taxa de recuperação de cópias genômicas virais em condições simuladas com solos argilosos. Assim, no segundo semestre de 2012, foram coletadas amostras de água tratada (5 L) em 4 reservatórios e em seus respectivos pontos na rede de distribuição de Goiânia, totalizando 80 amostras. As amostras foram concentradas, quantificadas por PCR em Tempo Real Quantitativa (qPCR) e parte destas sequenciadas. Ao todo, 76,6% (10^0 - 10^9 CG/mL) e 37,5% (10^1 - 10^8 CG/mL) das amostras foram positivas para os reservatórios e seus pontos na rede de distribuição respectivamente. Portanto, a água tratada de Goiânia está contaminada por um elevado número de HAdV tipo C. Quanto ao estudo com os sólidos, amostra de um solo hidromórfico foi subdividida em duas partes: solo com matéria orgânica (CMO) e solo sem matéria orgânica (SMO). Foi adicionado separadamente 5, 25 e 50 mg de solo CMO e SMO em tubos de polipropileno estéreis de 50 mL, adicionado água ultrapura e o pH das soluções ajustado para 6,0 e 8,0. Em seguida, foi adicionado 1 mL de alíquota viral e o volume foi completado para 50 mL. Os tubos em réplica foram agitados a 150 rpm por 1h a 24 ºC e decantados por 1h. O genoma viral foi quantificado (CG/mL) por qPCR e a Infecciosidade por Ensaio em Placa de Lise. A água com sólidos promoveu uma redução na recuperação das CG/mL e na infecciosidade viral. A MO não influenciou na recuperação das CG/mL ($p>0,05$), todavia, foi predudicial à infecciosidade viral, com diminuição de 2 $\log_{10}$ de Unidades Formadoras de Placa por Mililitro (PFU/mL), quando comparado com os tratamentos SMO. O pH 6,0 desfavorece a inativação e a argila é o principal elemento responsável pela interação do HAdV-5. A equação matemática é útil na avaliação da recuperação das cópias genômicas virais em soluções argilosas. Estes dados podem auxiliar em estudos eco-epidemilógicos, de inativação viral ou tratamento da água.

Palavras-chave: adenovírus, água tratada, matéria orgânica, pH, qPCR

ABSTRACT

Human adenovirus (HAdV) is indicated as a viral biomarker of water quality. Thus, studies that show or even the occurrence of these interactions in water are of great importance, since these studies are still scarce. The aims of these studies were: (i) to detect, quantify and molecularly characterize the HAdV serotypes that can to circulate in the water supply treatment in the city of Goiania; (ii) evaluate the infectivity and recovery of genomic copies (GC) of HAdV-5 in simulated condition with solids derived from tropical soils and under controlled conditions of the pH and the presence of organic matter (OM); (iii) establish a mathematical equation to evaluate the recovery rate of virus genome copies in simulated conditions with clay soils. Thus, in the second half of 2012, we collected sample water in a volume of 5 L of 4 treated water reservoir and their respective points in the distribution network in the city of Goiania, totaling 80 samples. The samples were concentrated, quantified by qPCR and sequenced. Altogether 76.6% (10^0 - 10^9 CG/mL) and 37.5% (10^1 - 10^8 CG/mL) of the samples were positive for the reservoir and their respective points in the distribution network respectively. Therefore, Goiânia's treated water is contaminated with a high number of HAdV type C. In the study of the interaction of HAdV-5 with the solid (sediments), a hydromorphic soil sample was divided into two parts: soil organic matter (WOM) and soil less organic matter (LOM). Then, it was added separately 5, 25 and 50 mg of soil WOM and LOM in sterile polypropylene tubes of 50 mL, added ultrapure water and adjusted the pH to 6.0 and 8.0. Then was added 1 mL of viral aliquot and the volume made up to 50 mL. The tubes in replica were shaken at 150 rpm for 1h at 24 °C followed by decantation. The viral genome was quantified (GC/mL) by Real-Time PCR and the Infectivity by Assay Plate Lysis. Water with solids promoted a reduction in the number of GC/mL and viral infectivity. The OM did not affect the recovery of GC/mL ($p > 0.05$). However, the OM was harmfulto to the infectivity of the virus, with a reduction of 2 $\log_{10}$ of Plaque Forming Units per milliliter (PFU/mL), when compared with treatments LMO. The acidic pH is unfavorable to virus inactivation, and the clay is the main element responsible for the interaction of HAdV-5. The mathematical equation is useful in assessing the recovery of viral genomic copies in clay solutions. These data can offer support in eco-epidemiological studies of viral inactivation or water treatment.

Key-words: adenovirus, treated water, organic matter, pH, qPCR

1 INTRODUÇÃO

1.1 Virologia Ambiental

A água é vital aos seres vivos. É a substância mais abundante das células, responsável por quase 70% do peso celular e meio indispensável para a ocorrência da maioria das reações intracelulares (ALBERTS et al., 2010). Apesar dessa importância, infelizmente, o que se tem observado é uma considerável depreciação na qualidade da mesma pelo mundo. Fato associado ao aumento da população, sobretudo urbana, acarretando um expressivo acréscimo no número de fontes poluidoras, e evidentemente, da população de micro-organismos patogênicos (SILVA, 2009).

Dentre esses micro-organismos, uma atenção especial deve ser dada aos vírus, que são importantes patógenos geralmente disseminados ao meio ambiente através da rota fecal-oral (CHAPRON et al., 2000; HARAMOTO et al., 2008). Esses patógenos são provenientes de esgotos domésticos sem tratamento ou tratados e liberados ao meio ambiente (CALGUA et al., 2011), contaminando não somente as fontes de água, mas também o solo.

A pesquisa de vírus em meio ambiente, chamada de virologia ambiental, teve início há mais de meio século (METCALF; MELNICK; ESTES, 1995). O primeiro estudo que se tem relato foi realizado por Melnick (1947), o qual purificou amostras de esgoto da cidade de Nova York e injetou em macacos. Algum tempo depois, lesões características de infecção viral foram detectadas nestes animais. Posteriormente, entre dezembro de 1955 e janeiro de 1956, ocorreu um grande surto de diarreia em Nova Délhi (Índia) com aproximadamente 230.000 casos (MELNICK, 1957; METCALF; MELNICK; ESTES, 1995). O rio Jumoa, fonte primária de abastecimento público, estava contaminado com esgoto (MELNICK, 1957). Após o incidente, o vírus da hepatite E foi identificado como o agente patogênico responsável pelo surto (PURCELL; TICEHUST, 1988).

A expansão da virologia ambiental ocorreu à partir da década de 1990, com a incorporação de metodologias que agregaram maior especificidade e sensibilidade, como a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR – Plimerase Chain Reaction) (SILVA et al., 2011).

O primeiro estudo que efetivamente relatou com sucesso o uso de metodologias moleculares na detecção de vírus em amostras ambientais foi realizado por Tsai et al. (1993), que detectaram enterovírus e vírus da hepatite A em amostras de esgoto e água do mar. Posteriormente, foram detectados adenovírus e enterovírus em água poluída (PUIG et al., 1994).

Desde então, devido à pressão social por água ausene de micro-organismos, os vírus vêm sendo extensamente monitorados em diferentes matrizes ambientais, sobretudo em água de uso e consumo humano (ALBINANA-GIMENEZ et al., 2009). A detecção e o monitoramento ambiental destes patógenos são de suma importância e estão em consonância com as propostas inspiradas em movimentos internacionais, como o modelo das cidades saudáveis da Organização Mundial da Saúde (WHO – *World Health Organization*) (WHO, 1997). Esse modelo apresenta como ponto de convergência, a abordagem de doenças e agravos pautada na epidemiologia social, ou seja, voltado para o completo bem estar-populacional.

Os vírus são patógenos de importância subestimada em amostras ambientais, haja vista a dificuldade em se detectar os mesmos. Ademais, o atual modelo de tratamento da água é ineficaz na remoção e eliminação dos vírus (KOOPMANS et al., 2002; BOSCH et al., 2008), sendo incapaz de fornecer água ausente de vírus (BOSCH et al., 2008). Isso acontece pelo reduzido tamanho e estrutura do capsídeo viral, que confere a passagem destes patógenos pelos sistemas de filtros de areia utilizados nas estações de tratamento de água e pela resistência à cloração, tal como ocorre com o vírus norwalk (KESWICK et al., 1985). Assim como os microsporídios, protozoários esporuláveis de difícil remoção por filtração, a inativação viral requer o uso de luz ultravioleta no reator, metodologia onerosa, que é disponível apenas em alguns países desenvolvidos, e que nem sempre tem

ação efetiva sobre todos os agentes virais (MAMANE-GRAVETZ; LINDEN, 2004). Os adenovírus, por exemplo, são os patógenos mais resistentes ao tratamento com luz ultravioleta (LINDEN et al., 2007). A inativação de 4 log (99,99 %) de adenovírus requer uma dose de 200 mJ/cm^2, enquanto que 30-40 mJ/cm^2 são suficientes para inativar outros grupos virais (GERBA; GRAMOS; NWACHUKU, 2002; SHIN; LINDEN; SOBSEY, 2005).

Os vírus são geralmente eliminados no meio ambiente através da rota fecal-oral (CHAPRON et al., 2000; JIANG; NOBLE; CHU, 2001). Dentre esses vírus, os mais comumente disseminados são: enterovírus, norovírus, vírus da hepatite A, adenovírus, rotavírus e os astrovírus (WU et al., 2011). A Figura 1 ilustra as possíveis rotas de transmissão hídrica dos vírus entéricos.

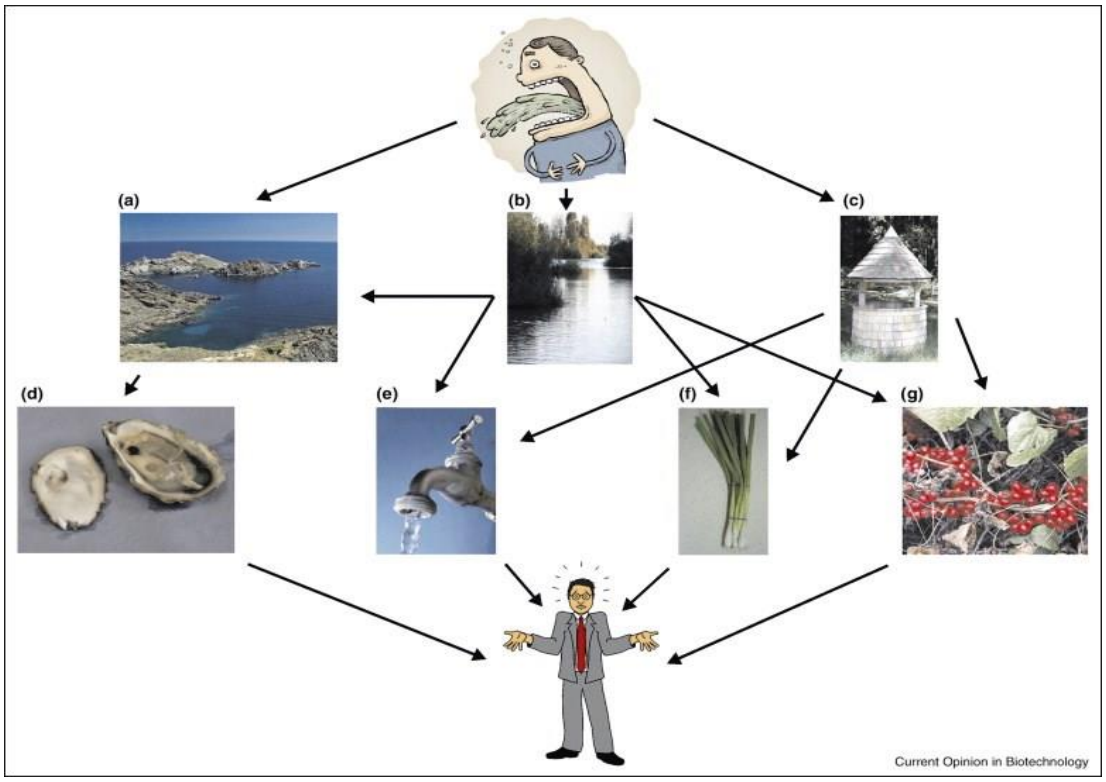


Figura 1 - Possíveis rotas de transmissão hídrica de vírus entéricos. Os vírus são eliminados em número extremamente elevado em fezes, urina e vômito dos indivíduos infectados (na ordem de 10^8 a 10^{11} partículas virais). São introduzidos no ambiente através da descarga de resíduos tratados e não tratados. Em consequência, estes patógenos contaminam o ambiente marinho (a), as águas doces (b) e subterrâneas (c). As águas tratadas (e) têm sido responsáveis por surtos de gastroenterite e hepatite. Alguns alimentos são susceptíveis de contaminação, tais como moluscos bivalves (d), principalmente ostras, mariscos e mexilhões; folhagens (f), como alface, cebolinha verde e outras verduras e frutos (g), como framboesas e morangos. **Fonte**: (BOSCH et al., 2008).

Foram identificados mais de 140 tipos diferentes de vírus no trato gastrointestinal de humanos infectados e que podem ser encontrados em águas (HURST, 1991, p. 113). A presença destes vírus em águas é um sério problema de saúde pública em muitos países (CHEN et al., 2006) e a ingestão destes, mesmo que em baixas concentrações, pode acarretar agravos à saúde (WARD; AKIN; D'ALESSIO, 1984; MENA; GERBA, 2009).

Assim, a pesquisa de vírus em água tratada e demais tipos de matrizes ambientais é de grande interesse em saúde pública, especialmente em países em desenvolvimento, onde há carência de informação sobre vigilância microbiológica, análise de risco e estudos epidemiológicos (RIGOTTO et al., 2011). Nos países industrializados, na vanguarda da virologia ambiental, estes patógenos são implicados como os principais causadores das gastroenterites (LOPMAN et al., 2003).

Na Europa, já se realiza o monitoramento ambiental de vírus desde a década de 1990, com a incorporação do monitoramento de enterovírus nos parâmetros de regulamentação da qualidade da água (PINA et al., 1998). O governo canadense segue parâmetros específicos para a disponibilização da água à população (remoção e/ou inativação mínima de 4 log de vírus) (HEALTH CANADA, 2011). Na Austrália, os biossólidos gerados devem ter < 1 vírus entérico por 100 g de produto final tratado (NRMMC, 2004).

Como não há um indicador viral padrão estabelecido para o monitoramento das diferentes matrizes ambientais, nos últimos anos, diversos pesquisadores têm proposto o uso do adenovírus humano (HAdV) como este indicador (ALBINANA-GIMENEZ et al., 2006; SILVA; GARCÍA-ZAPATA; ANUNCIAÇÃO, 2011; WYN-JONES et al., 2011; FONGARO et al., 2013). No Japão, os adenovírus são os indicadores preferenciais para certificar a qualidade virológica da água (KATAYAMA et al., 2008) e foram incluídos nas três Listas de Candidatos Contaminantes (CCL - *Contaminant Candidate List*) da Agência de Proteção do Meio Ambiente dos Estados Unidos (USEPA, 2012), com provável chance de sair na CCL4.

Os HAdVs são vírus extremamente resistentes (HIJNEN; BEERENDONK; MEDEMA, 2006) e prevalentes em meio ambiente (WONG et al., 2009). Wong et al. (2010) relataram uma alta ocorrência dos HAdVs em biossólidos gerados por digestão anaeróbia. Segundo estes autores, a ocorrência de HAdVs foi de 83% contra 42, 50, 75 e 58% de ocorrência de enterovírus (EV), norovírus genogrupo I (NV GI), norovírus genogrupo II (NV GII) e poliovírus humano (HPyV) respectivamente. Além disso, não foram detectadas amostras positivas para o vírus da hepatite A (HAV) e todas as amostras de HAdVs foram infecciosas. Esses dados são corroborados por Fong et al. (2010), que relataram 100% de amostras de esgoto e efluente contaminadas por HAdVs.

Os adenovírus são mais prevalentes do que o norovírus tanto em água doce quanto salgada e um promissor indicador da qualidade virológica das águas de recreação na Europa (WYN-JONES et al., 2011). Esses dados fazem parte de um grande projeto, chamado Virobathe, composto por 16 laboratórios especialistas da União Europeia e visa à rápida detecção de vírus em águas de recreação.

Apesar dos avanços em relação à detecção dos adenovírus em diferentes matrizes ambientais, tais como água tratada, de rio ou lago (ALBINANA-GIMENEZ et al., 2009; SILVA et al., 2010; GARCIA et al., 2012), água subterrânea (CHARLES et al., 2009; OGORZALY et al., 2010), de piscinas (VAN HEERDEN; EHLERS; GRABOW, 2005), água do mar (BALLESTER; FONTAINE; MARGOLIN, 2005; WYN-JONES et al., 2011), esgoto e efluente (FONG et al., 2010) e biossólidos (WONG; ONAN; XAGORARAKI, 2010), ainda são escassos os estudos que relatam a dinâmica de permanência desses vírus nestas matrizes.

1.2 Caracterização do micro-organismo de estudo

O primeiro relato de infecção por adenovírus reporta-se da década de 1953, quando tecidos de adenoide e tonsila foram utilizados para estabelecer linhagens celulares, todavia, foi comprovada a infecção destes tecidos por um agente transmissível, causador de degeneração celular

(MENA; GERBA, 2009). Um ano depois, Hilleman e Werner (1954) identificaram agentes virais similares em militares com quadros febris. Finalmente, em 1956 esses agentes foram isolados e denominados adenovírus (ENDERS et al., 1956).

Os adenovírus (AdVs) apresentam capsídeo de simetria icosaédrica, não envelopados, medindo de 70 a 90 nm de diâmetro, com genoma formado por DNA linear fita dupla de 26 a 45 kpb (ENRIQUEZ, 2002; FIELDS; KNIPE; HOWLEY, 2007; ICTV, 2013). A Figura 2 mostra a estrutura tridimensional do vírion obtida por uma combinação de microscopia eletrônica e cristalografia de raio-x.

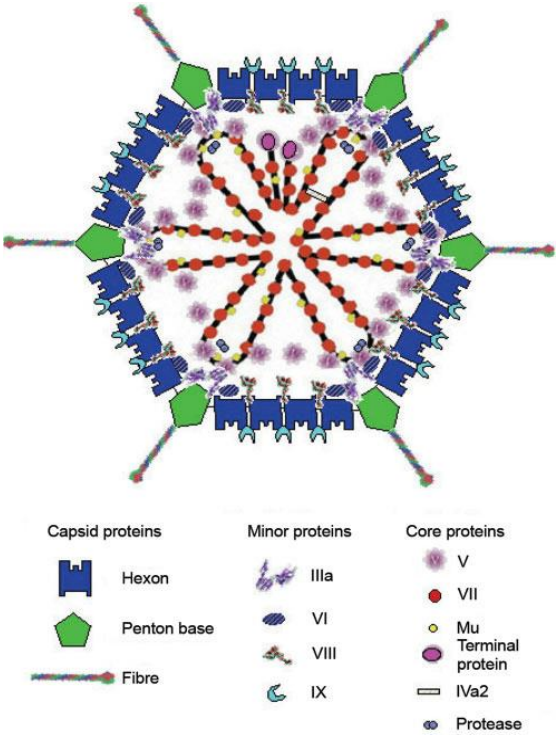


Figura 2 - Estrutura tridimensional do adenovírus obtida por uma combinação de microscopia eletrônica e cristalografia de raio-x. Há 13 tipos diferentes de proteínas. O cápside é constituído por 252 capsômeros: 12 capsômeros do tipo penton, no vértice do icosaedro e 240 capsômeros do tipo hexon, nas faces e arestas. A proteína hexon, uma proteína estrutural, consiste de um trímero formado pelo polipeptídeo II, contendo um poro central e associações com proteínas menores: VI, VIII e IX. Nos pentons, a base consiste de um pentâmero do peptídeo III com mais 5 moléculas de IIIa. Cada penton possui a projeção de uma única fibra, que varia de tamanho de acordo com o sorotipo. Os sorotipos de HAdVs 40 e 41 excepcionalmente possuem 2 fibras projetadas em cada penton (FIELDS; KNIPE; HOWLEY, 2007; TRABULSI; ALTERTHUM, 2008; RUSSELL, 2009). **Fonte:** (RUSSELL, 2009).

Esses vírus são membros da família *Adenoviridae*, que contem os gêneros *Mastadenovirus*, que inclui os vírus de mamíferos (infectam humanos, símios, bovinos, equinos, caninos, suínos, ovinos e roedores), *Aviadenovirus*, de vírus de aves; *Atadenovirus*, que inclui alguns adenovírus de bovinos, ovinos, marsupiais e patos; e *Siadenovirus*, que inclui adenovírus de peru, répteis e sapo, e mais recentemente, o gênero *Adenovirus Icht*, que compreende apenas o adenovírus esturjão branco 1 (WS AdV-1) (FIELDS; KNIPE; HOWLEY, 2007; TRABULSI; ALTERTHUM, 2008; ICTV, 2013). Os HAdVs pertencentes ao gênero *Mastadenovirus* compreendem 57 diferentes sorotipos distribuídos em 7 espécies (A-G) (KING et al., 2011; ICTV, 2013).

A multiplicação inicial pode ocorrer na mucosa da faringe, na conjuntiva ou na mucosa intestinal, e são características as inclusões intracelulares basófilas (MENA; GERBA, 2009). O estado imunitário e a idade acondiciona a resposta à infecção, sendo duradoura, com raros casos de reinfecção.

A biossíntese viral ocorre no núcleo celular e a etapa inicial compreende a adsorção, penetração e transporte até o núcleo, onde ocorre a transcrição e tradução de genes precoces (RUSSELL, 2009). Simultaneamente à replicação, ocorre uma fase tardia, caracterizada pela expressão de genes estruturais. Os capsômeros são estruturados no núcleo e logo em seguida inseridos o DNA e as 12 proteínas do tipo penton, com liberação viral por exocitose ou lise celular (Allard et al. 1992; Horwitz 2001)

Eliminados nas fezes, urina ou excreções respiratórias (Crabtree et al. 1997; Metcalf et al. 1995), podem desencadear uma série de agravos à saúde de pessoas infectadas. Como exemplo, doenças do trato respiratório superior (faringite e amigdalite) e inferior (bronquiolite e pneumonia), conjuntivite, cistite e gastroenterite (Mena e Gerba, 2009), podendo ser letais as infecções ocasionadas em pacientes de alto risco, como imunossuprimidos e crianças (Poddar, 1999). No Quadro 1 são mostrados os principais sorotipos e as doenças que acarretam ao homem.

Doença	Grupos de risco	Sorotipos
Faringite febril aguda	Recém-nascidos e crianças	1-3, 5-7
Febre faringoconjuntival	Crianças em idade escolar	3, 7, 14
Doença respiratória aguda	Militares em regime de confinamento	3, 4, 7, 14 16, 21
Pneumonia	Recém-nascidos, crianças e recrutas em confinamento	1-3, 4, 6, 7, 14, 16
Ceratoconjuntivite epidêmica	Qualquer indivíduo	8-11, 13, 15, 17, 19, 20, 22-29, 37
Conjuntivite folicular	Qualquer indivíduo	3, 7
Gastroenterite	Recém-nascidos e crianças	18, 31, 40, 41
Hepatite e complicações do trato urinário	Transplantados de medula óssea, fígado e rim. Pacientes com AIDS ou imunossuprimidos	34, 35, 42-49, 1, 2, 5

Quadro 1 – Doenças associadas com sorotipos de adenovírus humanos e os principais grupos de risco. Adaptado de Mena e Gerba (2009).

1.3 Análise de vírus em meio ambiente

1.3.1 Concentração Viral

Geralmente, os vírus estão presentes em baixas concentrações em meio ambiente (GRIFFIN et al., 1999; SOULE et al., 2000; CHEN et al., 2006; HAMZA et al., 2009). Assim, é essencial saber escolher a metodologia de concentração mais adequada para cada tipo de vírus e amostra.

A concentração é a primeira etapa na realização da análise de vírus em meio ambiente, objetiva recuperar e concentrar o maior número possível de partículas virais, ou mesmo reter material genético em suspensão (SILVA et al., 2011).

Atualmente, existe uma grande variedade de métodos de concentração e a escolha de um ou outro depende do tipo de amostra, do vírus a ser isolado e mesmo de recursos financeiros do laboratório (SILVA et al., 2011).

Dentre os métodos de concentração, os mais amplamente utilizados são: ultracentrifugação (FORMIGA-CRUZ et al., 2005; HE; JIANG, 2005; ALBINANA-GIMENEZ et al., 2006), adsorção-eluição em membranas de microfiltração polarizadas (KATAYAMA; SHIMASAKI; OHGAKI, 2002; RIGOTTO et al., 2009; SILVA et al., 2010) e ultrafiltração (SOULE et al.,

2000; RAJAL et al., 2007), ocorrendo combinações entre estes e alguns métodos de precipitação, ou mesmo outras metodologias afins.

1.3.2 Isolamento e detecção viral

O cultivo celular é o método padrão para isolar vírus (HUANG et al., 2002). Mas os estudos em virologia ambiental só ficaram mais robustos e acessíveis com o uso da PCR (SILVA et al., 2011), com especial ênfase para o uso da Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real Quantitativa, também chamada PCR em Tempo Real Quantitativa (qPCR).

A qPCR é uma técnica que permite a detecção e quantificação de genomas virais em baixas concentrações na água, sendo rápida, sensível e específica (FONG; LIPP, 2005; HARAMOTO et al., 2010). Todavia, as metodologias baseadas na PCR têm o inconveniente de não distinguirem entre partículas virais infecciosas e não infecciosas (SCHVOERER et al., 2001; HARAMOTO et al., 2010). Além disso, a PCR é seriamente comprometida por compostos inibidores do meio (JIANG; DEZFULIAN; CHU, 2005). A inibição pode ser eficientemente monitorada/controlada pelo uso de controles externos e internos de amplificação (JIANG; DEZFULIAN; CHU, 2005; D'AGOSTINO et al., 2011), diluições do material genético extraído (RIGOTTO et al., 2010; GIBSON et al., 2012), utilização de uracil N-glicosilase (UNG) em reação-mix contendo dUTP, que visa eliminar resultados falso-positivos obtidos da contaminação com fragmentos amplificados de reações passadas (SCHMIDT et al., 1996) e metodologias de extração e purificação de ácidos nucléicos que concentram uma menor concentração de inibidores (SILVA et al., 2011).

As diluições são uma boa estratégia, mas em amostras com pequena quantidade de vírus, pode comprometer a sensibilidade do diagnóstico, oferecendo um resultado falso-negativo. O uso da diluição é tão importante que, Gibson et al. (2012) desenvolveram um método para mensurar a inibição e a partir deste cálculo, utilizar a diluição mais adequada para evitar a sub-quantificação de patógenos por qPCR.

A detecção e quantificação de vírus em meio ambiente pode ocorrer por variações da PCR. Como a maior parte dos vírus patogênicos são do tipo RNA, deve-se realizar uma etapa prévia, a transformação da fita de RNA em cDNA, a qual é realizada pela enzima Transcriptase Reversa e o ensaio é chamado de RT-PCR (Reação em Cadeia da Polimerase precedida de Trascrição Reversa). Quando realizada em associação com a PCR em Tempo Real, é chamada de RT-PCR em Tempo Real ou simplesmente RT-qPCR. Há também os ensaios Real Time PCR com a utilização do fluoróforo *SYBR Green*, mas como não permite ensaios multiplex e quantificações precisas, praticamente não é utilizado na virologia ambiental. Por outro lado, os ensaios qPCR com o uso de sondas (*TaqMan*, *Scorpion* e *Molecular Beacons*), que permitem a quantificação com maior exatidão e sensibilidade (HE; JIANG, 2005), são altamente disseminadas, com especial ênfase para sondas do tipo *TaqMan*.

Metodologias imunológicas, tais como imunoperoxidase (MEHNERT; STEWIEN, 1993), quimioluminescência (GREENING; WOODFIELD; LEWIS, 1999), ensaio imunoenzimático (ELISA) (JIANG; WANG; ESTES, 1995), imunofluorescência (BARARDI et al., 1999; CALGUA et al., 2011) e imunocaptura por Real Time PCR quantitativa (OGORZALY et al., 2013) também são utilizadas. Entretanto, as metodologias de detecção estão praticamente centradas no uso da cultura celular em associação ou não com o uso da PCR ou qPCR.

A PCR ainda é muito utilizada, mas considerar especificidade em *amplicons* (fragmentos amplificados) visualizados sob gel de agarose corado com brometo de etídeo não é o suficiente (SILVA et al., 2010). O quantitativo de material genético no gel pode ser tão baixo que não seja possível visualizar, induzindo a casos de falso-negativo. Por isso, a PCR não é utilizada isoladamente, e muitos estudos têm utilizado a PCR apenas para o preparo de fragmentos para caracterização molecular (FONGARO et al., 2013; MURRAY; MANS; TAYLOR, 2013).

Por outro lado, o material concentrado, quando inoculado em cultivo celular, pode ser extremamente citotóxico à célula (GREENING; HEWITT;

LEWIS, 2002), sendo necessário o uso de diluições não citotóxicas com associação de antibióticos e antifúngicos, o que pode comprometer a sensibilidade da técnica. Além do mais, a cultura celular é uma metodologia extremamente onerosa, laboriosa (FORMIGA-CRUZ et al., 2005) e complexa, pois nem todos os grupos virais podem ser isolados, como o ocorrido com o norovírus humano (DUIZER et al., 2004). Outros vírus são fastidiosos, tais como os HAdVs 40 e 41 (MORRIS et al., 1975; MENA; GERBA, 2009).

Apesar disso, o uso do cultivo celular para isolar vírus em meio ambiente não foi abandonado, e isso provavelmente não acontecerá. Todavia, as metodologias moleculares agregam maior sensibilidade e especificidade ao cultivo celular. Baseado no fato de que somente os vírus infecciosos podem produzir mRNA, a formação desta biomolécula em cultura celular pode ser eficientemente monitorada, mesmo nos sorotipos que não exibem efeito citopático (GREENING; HEWITT; LEWIS, 2002), surgindo a associação chamada de C-PCR (Cultura Celular Integrada à Reação em Cadeia da Polimerase) ou ICC-RT-PCR (Cultura Celular Integrada à Reação da Cadeia da Polimerase precedida de Transcrição Reversa), que monitora vírus infecciosos. Quando se realiza a quantificação, é chamada de ICC-RT-qPCR (Cultura Celular Integrada à Reação da Cadeia da Polimerase em Tempo Real precedida de Transcrição Reversa).

A ICC-RT-qPCR é mais rápida e sensível na detecção de partículas virais quando comparada com o uso do Ensaio em Placa de Lise (Fongaro et al., 2013). Li et al. (2011) analisaram o efeito da cloração sob a infecciosidade e integridade gênica de rotavírus pelos métodos de Ensaio em Placa de Lise, ICC-RT-qPCR e RT-PCR e chegaram a conclusão de que ICC-RT-qPCR foi o método mais sensível e adequado para avaliar a ação do cloro. Já He e Jiang (2005) relatam que a realização de qPCR em etapa única permitiu a detecção de 3-4 vezes mais adenovírus (AdVs) do que o encontrado por isolamento em linhagens HEK-293 em associação com a qPCR. Provavelmente, o uso da qPCR sem a associação com o cultivo celular possa ser mais sensível, mas ainda sim, tem a desvantagem de não inferir infecciosidade.

Os testes de triagem e monitoramento de microrganismos em meio ambiente precisam ser rápidos, sensíveis e de baixo custo (WYN-JONES; SELLWOOD, 2001). Assim, é proposto o uso unicamente de métodos moleculares na detecção de adenovírus (SILVA; GARCÍA-ZAPATA; ANUNCIAÇÃO, 2011). Segundo Charles et al. (2009) a PCR ofereceu boa correlação com a infecciosidade para adenovírus detectados em águas subterrâneas e pode ser utilizada para a avaliação de risco em saúde pública. Recentemente, um estudo contemplando os laboratórios do grupo de pesquisa Virobathe propôs a utilização de um modelo matemático que prediz a existência de HAdVs em águas tratadas utilizando somente o uso de qPCR (WYER et al., 2012). O modelo utiliza os dados do monitoramento de *Escherichia coli* e enterococos intestinais e pode ser uma alternativa eficiente e rápida para a o monitoramento viral em meio ambiente.

1.4 Contextualização

Não existe correlação entre os padrões bacterianos normalmente utilizados para atestar a qualidade microbiológica das águas e os vírus (JIANG; CHU; HE, 2007). Contrária a essa assertiva, no Brasil, a Portaria 2914/2011 do Ministério da Saúde, que normatiza as medidas de controle e vigilância da qualidade da água destinada ao consumo humano (BRASIL, 2004), propõe apenas o monitoramento de bactérias do grupo coliformes totais, termotolerantes e *E. coli*. A Portaria faz uma recomendação de inclusão de enterovírus, mas como não é uma obrigatoriedade, isso não é seguido pelas empresas de tratamento, e há pouco avanço no conhecimento da ocorrência destes patógenos de elevada importância em saúde pública.

Infelizmente, as complexidades analíticas são barreiras para o estabelecimento de padrões, e não um estímulo para o desenvolvimento tecnológico no Brasil (SABESP, 2012). Assim, pesquisas na área de virologia ambiental ainda são inexpressivas no Brasil, e concentram-se principalmente nas regiões Sul e Sudeste do país. Todavia, vem sendo crescente a formação de grupos de pesquisas preocupados com a qualidade virológica da água em outras áreas do país (SILVA, 2009).

Em Goiânia, capital do Estado de Goiás, o Núcleo de Pesquisas em Agentes Emergentes e Re-emergentes (NUPEREME-UFG) em consorciação com o Laboratório de Diagnóstico Genético e Molecular (LDGM-UFG) e o Laboratório de Genética Molecular e Citogenética (LGMC-UFG) vêm realizando investigações exaustivas no campo da microbiologia ambiental desde o ano de 2004 nas águas de rios e lagos do município de Goiânia-Goiás. Primeiramente foi detectada a presença de bactérias patogênicas (*Helicobacter pylori*, *Campylobacter jejuni* e *Campylobacter coli*) (SANTANA JR, 2005) seguida da detecção de parasitos oportunistas (SANTOS, 2008) - e mais recentemente da detecção e do monitoramento virológico destas águas (SILVA, 2009).

Pelos levantamentos previamente realizados foi constatado um alto índice de contaminação dos rios e lagos da cidade de Goiânia por adenovírus (SILVA, 2009; SILVA et al., 2010). Como os rios são utilizados para o abastecimento público, muito provavelmente, as águas tratadas também podem estar contaminadas. Como não há estudos que relataram a ocorrência dos HAdVs em águas tratadas da cidade de Goiânia, foi proposto investigar estes patógenos nessas águas.

LeChevallier e Au (2004) afirmam que a presença de sólidos suspensos aumentam a resistência dos micro-organismos. O que pode aumentar o risco de contaminação da população, sobretudo com a presença de sólidos nas águas tratadas. O fato é preocupante, pois os adenovírus persistem em ambientes onde as bactérias já não mais existem (ENRIQUEZ; HURST; GERBA, 1995).

Assim, o estado da arte, impõe precedente para também avaliar a infecciosidade e taxa de recuperação de cópias genômicas de HAdVs em soluções simuladas com água e sólidos tropicais sob condições controladas de pH e presença de matéria orgânica.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Investigar a ocorrência de adenovírus humano (HAdV) em água tratada da cidade de Goiânia, Goiás e avaliar a recuperação destes vírus em condições simuladas com água e sólidos tropicais

2.2 Objetivos Específicos

- Realizar uma revisão assistemática de literatura dos principais métodos que compõem a análise virológica (concentração e detecção) na água;
- Identificar fatores que auxiliam na elaboração de uma proposta de utilização dos adenovírus como marcadores virológicos da qualidade da água;
- Quantificar e caracterizar molecularmente os HAdVs detectados na água tratada da cidade de Goiânia;
- Avaliar a infecciosidade e a recuperação de cópias genômicas de HAdV-5 em soluções simuladas com sólidos tropicais e em condições controladas de pH e presença de matéria orgânica;
- Estabelecer uma equação matemática para avaliar a taxa de recuperação de cópias genômicas virais em condições simuladas com solos argilosos.

3 MÉTODO(S)

A metodologia deste estudo foi dividida nos eixos teórico e experimental. No primeiro, por meio de revisões assistemáticas de literatura foram gerados dois artigos. No artigo 1 foram discutidas as principais metodologias que compõem a análise virológica da qualidade da água. O segundo artigo, uma comunicação, propôs a utilização do adenovírus como marcador virológico da qualidade da água. Para tal, foram expostos os atributos inerentes a este grupo de vírus e que corroboram para sua indicação.

Já o eixo experimental foi subdividido em outras duas partes: (i) estudo que detectou, quantificou e caracterizou molecularmente os adenovírus encontrados em água tratada da cidade de Goiânia, Goiás, Brasil; e (ii) estudo que avaliou a recuperação genômica e a infecciosidade do HAdV em água artificialmente contaminada com sólidos. A Figura 3 mostra um fluxograma resumido das partes experimentais realizadas.

Na presente pesquisa não ocorreu experimentação humana ou animal. As células da linhagem de carcinoma de pulmão humano (A549) foram adquiridas do *American Type Culture Colletcion* (ATCC, Rockville, MD, USA) e infectadas com HAdV-5. Para a realização do estudo todas as etapas foram realizadas em conformidade com os Procedimentos Operacionais Padrões (POPs) de biossegurança pertinentes ao Laboratório de Virologia Animal do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública/UFG e do Laboratório de Genética Molecular e Citogenética do Instituto de Ciências Biológicas/UFG.

3.1 Locais de estudo e Instalações

Núcleo de Pesquisas em Agentes Emergentes e Re-Emergentes/UFG (NUPEREME/UFG). Coordenado pelo Prof. Dr. Marco Tulio Antônio García-Zapata. O NUPEREME está a cargo da coordenação

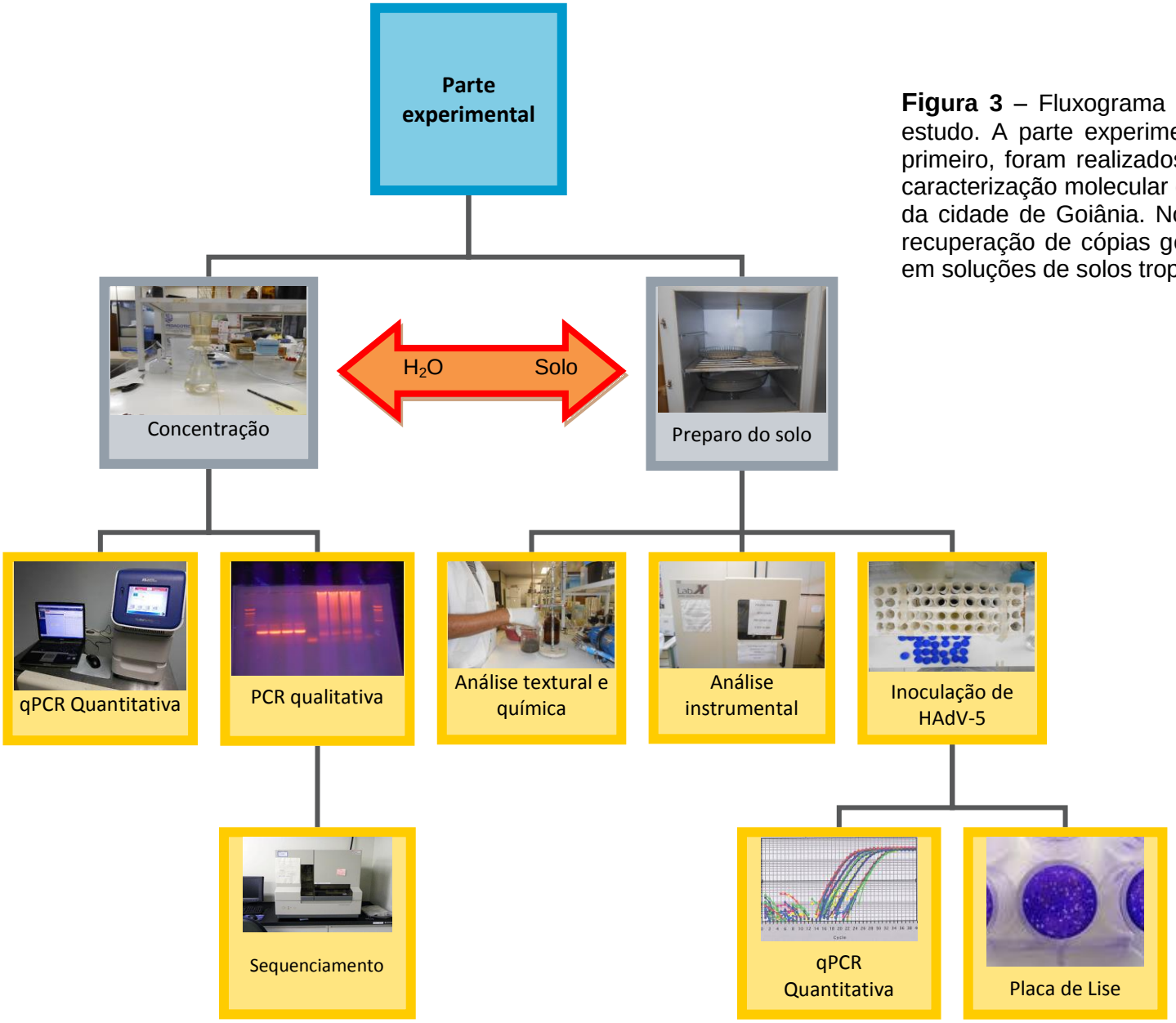


Figura 3 – Fluxograma mostrando o desenho experimental do estudo. A parte experimental foi subdividida em dois eixos. No primeiro, foram realizados estudos de detecção, quantificação e caracterização molecular de HAdVs em amostras de água tratada da cidade de Goiânia. No segundo momento foram avaliadas a recuperação de cópias genômicas e a infecciosidade de HAdVs em soluções de solos tropicais.

geral da pesquisa, sendo incumbido da liberação e divulgação dos dados perante a comunidade científica, autoridades sanitárias e comunidade em geral. Com este propósito, o NUPEREME se compromete a publicar os dados em meios especializados, assim como fornecer apoio técnico-científico em estudos relacionados com doenças emergentes e re-emergentes de interesse médico-sanitário. No presente estudo, o laboratório cedeu suas dependências para a realização da etapa de concentração das amostras de água tratada. Por intermédio do Dr. Marco Tulio também foram utilizadas as dependências do Laboratório de Virologia Animal e do Laboratório Multiusuário/IPTSP, onde foram realizadas todas as metodologias inerentes ao cultivo celular e análise da infecciosidade viral.

Laboratório de Diagnóstico Genético e Molecular/UFG (LDGM/UFG). Coordenado pelo Prof. Dr. Carlos Eduardo Anunciação, o LDGM foi responsável pela realização das extrações de ácidos nucléicos, realização das PCRs qualitativas e purificação das amostras para sequenciamento molecular. Além disso, algumas análises físico-químicas do solo também foram realizadas neste laboratório.

Laboratório de Genética Molecular e Citogenética/UFG (LGMC/UFG). Sob coordenação da Profa. Dra. Elisângela de Paula Silveira-Lacerda, no LGMC foram realizados os procedimentos de PCR e qPCR.

3.1.1 Laboratórios parceiros

Central Analítica do Instituto de Química da Universidade Federal de Goiás. Neste Laboratório foi realizada a difração de raio-x das amostras de solo. A análise mineralógica do solo via espectroscopia de energia dispersiva foi realizada no Laboratório Multiusuário de Microscopia de Alta Resolução (LabMic), sediado no Instituto de Física/UFG. O sequenciamento e análise das amostras foram realizados no Laboratório de Melhoramento de Plantas, na Escola de Agronomia/UFG, Setor de Melhoramento de Plantas.

3.2 Parte experimental I

Foram escolhidos 4 reservatórios públicos de abastecimento de água tratada e 4 respectivos pontos na rede de abastecimento público. O critério de escolha dos pontos de coleta foi a importância estratégica dos mesmos para o município de Goiânia, já que estes reservatórios sofrem uma grande demanda. Os reservatórios recebem água tratada de unidades de tratamento completo (coagulação, floculação, decantação, filtração, desinfecção pelo cloro e correção do pH) e redistribuem esta água para os vários bairros da cidade. Salienta-se que os pontos na rede de distribuição são os mesmos pontos rotineiramente monitorados pela empresa de Saneamento do Estado de Goiás (SANEAGO).

3.2.1 Pontos de coleta

Na Figura 4 apresenta-se um mapa do município de Goiânia contemplando os 8 pontos de coleta utilizados. Foram coletadas amostras em 4 reservatórios: Senac (R1), Serrinha (R2), Atlântico (R3) e Cristina (R4) com seus respectivos pontos na rede de distribuição de água tratada (P1, P2, P3 e P4).

Em Goiânia, as fontes primárias de abastecimento são o rio Meia Ponte (Sistema Meia Ponte) e o Ribeirão João Leite (Sistema João Leite), responsáveis pelo abastecimento de cerca 48,0% e 52,0% da população respectivamente. Os reservatórios R1 e R2 recebem água do Sistema João Leite, enquanto R3 e R4 do Sistema Meia Ponte.

Nos reservatórios, as amostras eram coletadas de torneiras diretamente interligadas à saída do reservatório. As amostras dos pontos na rede de distribuição também foram coletadas de torneiras, mas eram amostras de água da rua, que não passavam pelas caixas d’água.

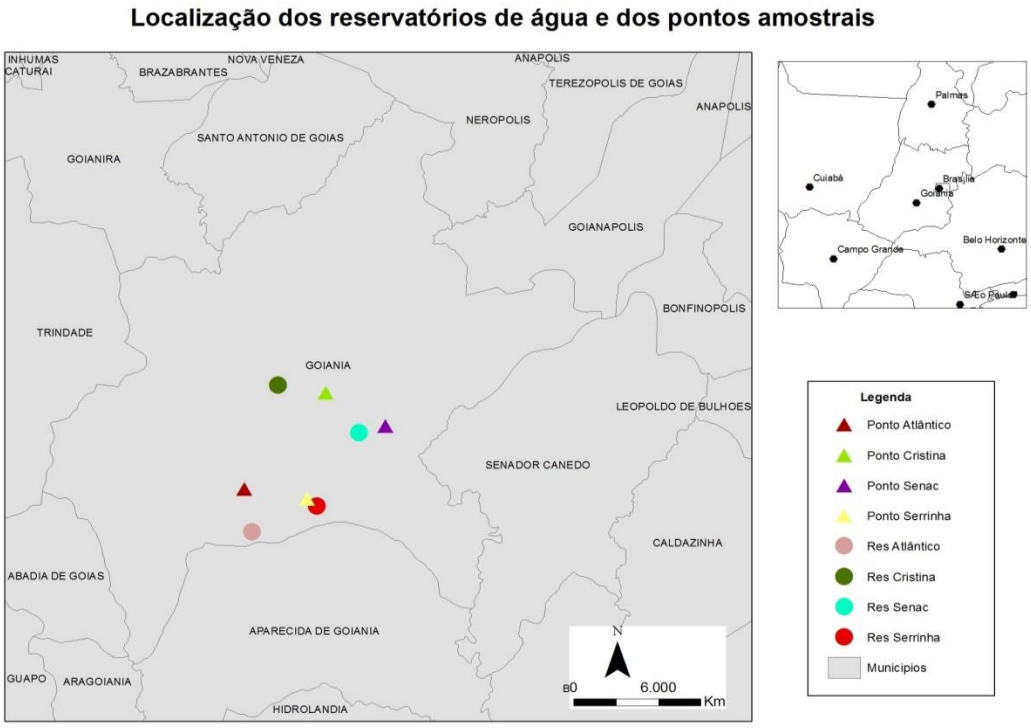


Figura 4 – Mapa do município de Goiânia contemplando a localização dos reservatórios e dos seus respectivos pontos de coleta na rede de distribuição da água. Coordenadas geográficas: Res Senac 16°40''28.82''S e 49°14'14.10''O; Res Serrinha 16°43'26.08''S e 49°15'53.69''O; Res Cristina 16°38'36.03S'' e 49°17'28.45''O; Res Atlântico 16°44'29.02''S e 49°18'27.49''O; Ponto Senac 16°40'11.61''S e 49°13'11.05''O; Ponto Cristina 16°38'53.38''S e 49°15'34.83''O; Ponto Serrinha 16°43'08.13''S e 49°16'16.30''O; Ponto Atlântico 16°42'46.80''S e 49°18'46.77''O. **Fonte**: (LABOGEF, 2013).

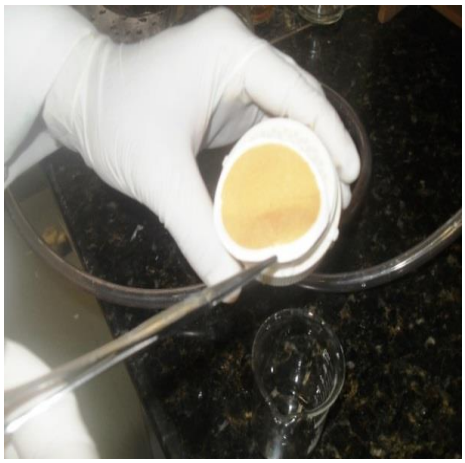
3.2.2 Coleta e concentração das amostras de água

Durante o segundo semestre de 2012 (agosto a novembro) foram coletadas semanalmente10 amostras de cada reservatório e ponto na rede de distribuição de água tratada, totalizando 80 amostras. Essas amostras foram coletadas em galões de polietileno limpos e higienizados (sucessivas lavagens com detergente, hipoclorito de sódio 2% e álcool 70%) com capacidade para 5 litros. As coletas eram realizadas preferencialmente entre 9:00 e 12:00 horas da manhã (DE PAULA et al., 2007), a fim de minimizar os efeitos de variações diurnas refletidas por condições ambientais como temperatura da água, percentual de irradiação por luz U.V. (GRIFFIN et al., 1999).

Realizou-se a concentração das amostras de acordo com Silva et al. (2010). Assim, 5 L de amostra foi filtrada utilizando o sistema Steril Holder (Sistema da Millipore - Steril Holder, 47mm XX1104710) com membrana nylon de 0,45 µm de porosidade e 47 mm de diâmetro, carregada positivamente (HybondTM-N+, Amersham Pharmacia). O filtrado foi eluído em 5 mL de tampão TE pH 8.0 (10 mM Tris-HCl, pH 8.0; 1 mM EDTA) com 0,02% de detergente Tween 20 e estocado a – 80 °C até uso. A Figura 5 mostra as etapas de coleta e concentração da água.

A - Coleta em Galão de Polietileno

B - Concentração por Filtração em Membrana Nylon



C - Membrana Pós-filtração

D - Eluição com auxílio de Agitador Magnético

Figura 5 - Etapas de coleta e concentração da água. Em (A) coleta em Galão de Polietileno; (B) filtração da amostra de água com o sistema Millipore; (C) resultado da pós-filtração, com grande quantidade de material aderido à membrana; (D) eluição com TE e Tween 20 utilizando o agitador magnético para auxiliar no desprendimento das partículas aderidas à membrana carregada positivamente.

3.2.3 Extração de Ácidos Nucléicos

Um volume de 200µL de cada concentrado concentrado foi utilizado para a extração de ácidos nucléicos utilizando o kit comercial QIAamp MinElute Virus Spin Kit (QIAGEN®), seguindo as instruções do fabricante. Após extração, as amostram eram armazenadas em freezer – 80 ºC.

3.2.4 Cultivo bacteriano e extração de DNA plasmidial

Bactérias do tipo *Escherichia coli* contendo o plasmídeo pBR322 clonado com o seguimento de HAdV foram gentilmente doadas pela Profa. Célia Regina Monte Barardi da Universidade Federal de Santa Catarina. Estas bactérias foram propagadas em meio Luria-Bertani (LB) sólido contendo ampicilina na concentração final de 100 µg/mL. As colônias isoladas foram cultivadas em meio LB líquido, ao qual foi adicionado ampicilina na concentração final de 100 µg/mL. Todo o procedimento foi realizado em capela de fluxo laminar e em proximidade com o bico de bunsen. Um volume de 2 mL de bactérias em meio LB foi utilizado para a extração do DNA plasmidial pelo protocolo de lise alcalina (SAMBROOK; RUSSELL, 2001) com posterior armazenamento a – 20 °C.

3.2.5 Construção da Curva Padrão

A curva padrão da qPCR foi construída a partir dos plasmídeos extraídos. A extração de DNA plasmidial foi quantificada por espectrofotometria utilizando o aparelho nanodrop (Thermo Scientific®). Após quantificação, foi realizado o cálculo para a equivalência de quantidade (em g) e número de moléculas de DNA. O tamanho total do inserto com o plasmídeo é de 11.561 pares de base (pb). Para o cálculo do número de moléculas de DNA foi utilizando a seguinte fórmula:

$$[((Xg / \mu L\ DNA) / (tamanho\ do\ plasmídeo\ com\ inserto \times 660))] \times 6.022 \times 10^{23} = Y\ moléculas/\mu l$$

Após o cálculo, diluições seriadas na base 10 foram realizadas (10^{-2} -10^{11}) e testadas no aparelho de real time PCR (StepOne Plus - Applied Biosystems®). Foram utilizadas as diluições de 10^{-2} a 10^{8} /10 µL em

triplicata. A qPCR foi realizada de acordo com Hernroth et al. (2002) e o resultado expresso em cópias genômicas por mililitro (CG/mL). A validação da curva foi obtida pelo coeficiente de correlação (R > 0.98). Foram feitas alíquotas de cada diluição em microtubos de 200 µL e congeladas a – 80 °C. As alíquotas padrões só eram descongeladas na realização da qPCR.

3.2.6 Quantificação do Genoma viral

A fim de quantificar as cópias genômicas de HAdV nas amostras de água coletadas, realizou-se a PCR quantitativa em tempo real (qPCR). As amostras de DNA foram diluídas na proporção 1:10 para evitar inibições. A reação consistiu do uso de 10 µL de DNA em um volume final de reação de 25 µL,contendo 1 x de Master Mix (Applied Biosystems) contendo uracil-N-Glicosilase, 0,9 µM de cada iniciador e 0,225 µM de sonda *TaqMan*. O programa de ciclagem foi de 50 °C 1 min, 95 °C 10 min, seguido de 45 ciclos de 95 °C 15 s. e 60 °C 1 min, com coleta de dados na última temperatura (HERNROTH et al., 2002). No Quadro 2 é mostrado a sequencia dos iniciadores e da sonda utilizada. Todas as amplificações foram feitas em triplicata utilizando 4 padrões em duplicata e 3 controles positivos e três como controle negativo (NTC - *no template control*). O aparelho utilizado foi o StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems).

Primer	Sequência	pb	Autor
hex1deg (F)	5'-GCCSCARTGGKCWTACATGCACATC-3'	301	ALLARD et al., (2001)
hex2deg (R)	5'-CAGCACSCCICGRATGTCAAA-3'		
nehex3deg (F)	5'-GCCCGYGCMACIGAIACSTACTTC-3'	171	
Nehex4deg (R)	5'-CCYACRGCCAGIGTRWAICGMRCYTTGTA-3'		
HAdV F	5´-CWTACATGCACATCKCSGG -3´	72	Hernroth et al., (2002)
HAdV R	5´-CRCGGGCRAAYTGCACCAG -3´		
AdDF Sonda	5'-CCGGGCTCAGGTACTCCGAGGCGTCCT-3´		

Quadro 2 – Sequências de iniciadores e da sonda utilizada. Todos os iniciadores flanqueiam uma região altamente conservada do gene hexon (responsável pela síntese da proteína hexon presente no capsídeo) de adenovírus humano. Os iniciadores utilizados para qPCR fazem parte da primeira região do gene hexon de adenovírus e possuem bases degeneradas. A sonda utilizada (marcada com FAM-TAMRA) possui deficiência para a detecção de alguns membros da espécie B: AdV3, -7, -11,-14, -16, -21, -34, -35 e -51.

3.2.7 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Os iniciadores utilizados foram inicialmente descritos por Allard et al. (2001). A PCR foi realizada unicamente para as amostras positivas por qPCR. Para a reação com o par de iniciadores hex1deg e hex2deg foi utilizado 5 µL de DNA extraído em uma reação contendo 1x de tampão (20 mM Tris-HCl pH 8.4, 50 mM KCl), 200 µM de cada dNTP (dATP, dCTP, dTTP e dGTP), 1,5 mM de $MgCl_2$, 0,2 µM de cada iniciador e 0,25 U de Taq DNA Polimerase, para um volume final de 25 µL. O programa de amplificação consistiu de desnaturação inicial a 94 ºC por 5 min seguido de 35 ciclos de 94 ºC para desnaturação durante 30 s., 55 ºC para anelamento por 30 s. e 1 min a 72 ºC para extensão . A extensão final foi de 72 ºC por 7 min.

Na segunda PCR (nested PCR), 5 µL do produto da primeira PCR foram adicionados em uma reação mix com um volume final de 25 µL contendo 0,5 µM de cada iniciador (nehexdeg3 e nehexdeg 4), 1x de tampão (20 mM Tris-HCl pH 8.4, 50 mM KCl), 100 µM de cada dNTP, 1,5 mM de $MgCl_2$ e 0,25 U de Taq DNA Polimerase. O programa de amplificação foi o mesmo utilizado para a PCR.

Os controles positivo (DNA de HAdV-5) e negativo (água ultrapura) foram utilizados em todas as reações. Os produtos amplificados de nested-PCR foram separados por eletroforese em gel agarose 1,5% (UltraPureTM Agarose, Invitrogen®) durante 1h a 120 V e 70 mA e visualizados sob radiação UV e fotografados. Os amplicons que comparados com o peso molecular (100 bp DNA ladder, Invitrogen, Brazil) exibiam ~171 pb foram classificados como positivos. Os amplicons com concentração acima de 50 ng/µL foram selecionados e purificados com o kit AxyPrep DNA Gel Extraction (AXYGEN) e armazenados a – 20 °C.

3.2.8 Sequenciamento e análise dos dados

A partir do amplicon purificado, os seguintes passos foram realizados :

a) Sequenciamento nos dois sentidos da fita (sensi e anti-sensi) utilizando respectivamente os primers nehex3deg e nehex4deg. A reação de sequenciamento realizada em placas de 96 poços consistiu de um volume final de 10 µL contendo:

DNA---------- 2 µL

Tampão-------- 2 µL

DYENAMIC-- 2 µL

$Primer_{(0,5\ \mu M)}$-- 0,2 µL

H_2O---------- 3,8 µL

A programação de ciclagem foi de 30 ciclos de 95 °C 20 s., 55 °C 15 s. e 60 °C 1 min.

b) Precipitação da reação de sequenciamento com DYENAMIC:

Foram adicionados à placa 40 µL de isopropanol 65 % à temperatura ambiente e vortexado por 30 s. A placa foi mantida em temperatura ambiente por 20 min e logo em seguida centrifugada por 45 min a 2.000 rcf. O isopropanol foi descartado e adicionado 250 µL de etanol 60 % a temperatura ambiente e a placa centrifugada a 2.000 rcf por 10 min. O etanol foi descartado e adicionado 100 µL de etanol 60 % a temperatura ambiente e novamente centrifugado a 2.000 rcf. O etanol foi novamente descartado e a placa centrifugada invertida por 1 min a 500 rpm. A placa foi levada ao fluxo e deixada por 10 min a temperatura ambiente para secar. Em seguida, adicionou-se 10 µL de formamida, que ficou agindo por 5 min a temperatura ambiente. Vortexou-se a placa durante 1 min seguido de um *spin*. O produto obtido foi analisado no sequenciador automático 3100 da *Applied Biosystems*.

c) As sequências obtidas pelo sequenciamento, foram comparadas com as sequências depositadas no banco de dados do GenBank utilizando o programa BLAST, na sua versão BLASTn, do NCBI (*The National Center for Biotechnology information*, http://www.ncbi.nlm.gov/BLAST/). As oito amostras de *amplicons* sequenciadas foram alinhadas e editadas utilizando

os softwares ClustalX2 (THOMPSON et al., 1997) e BioEdit (HALL, 1999), respectivamente. Após o alinhamento e edição das sequências, uma matriz de distância genética entre estas oito amostras foi produzida utilizando o modelo evolutivo JC69 (JUKES; CANTOR, 1969). A árvore filogenética elucidativa da relação de semelhança entre as oito amostras foi construída utilizando esta matriz de distância genética com base na metodologia de Neighbour-Joining. Foram utilizados 10.000 bootstraps para validar a confiança dos nós filogenéticos produzidos. A diversidade nucleotídica foi estimada com base nos estimadores de diversidade nucleotídica π (NEI; LI, 1979) e θ utilizando o software MEGA 5.0 (TAMURA et al., 2011). A visualização da árvore filogenética foi feita utilizando o software FigTree (http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree).

3.3 Parte Experimental II

3.3.1 Ponto de coleta do solo

Foram coletadas amostras de solo na profundidade de até 15 cm, proveniente de uma área de vereda remanescente (S17°00' W48° 47'), no município de Bela Vista de Goiás, no Bioma Cerrado do Estado de Goiás (Figura 6).

3.3.2 Preparo do solo

O solo foi coletado no início da estação chuvosa, iniciando o processo de alagamento do mesmo. Durante a coleta foram priorizados os pontos que visualmente apresentavam maior teor de matéria orgânica (pontos mais enegrecidos da área). Em seguida, o solo foi levado a um galpão para secagem lenta ao ar (TFSA – terra fina seca ao ar) e revirado periodicamente para sua secagem ao fundo, evitando o crescimento de fungos. Durante a secagem, o solo passou por peneiramento de 10 mm para a retirada de agregados do próprio solo e restos vegetais (concreções sólidas do solo, gravetos, etc.). Após secagem, o solo foi peneirado a 2 mm, homogeneizado e acondicionado em sacos plásticos transparentes e estocado em geladeira a 4 °C.

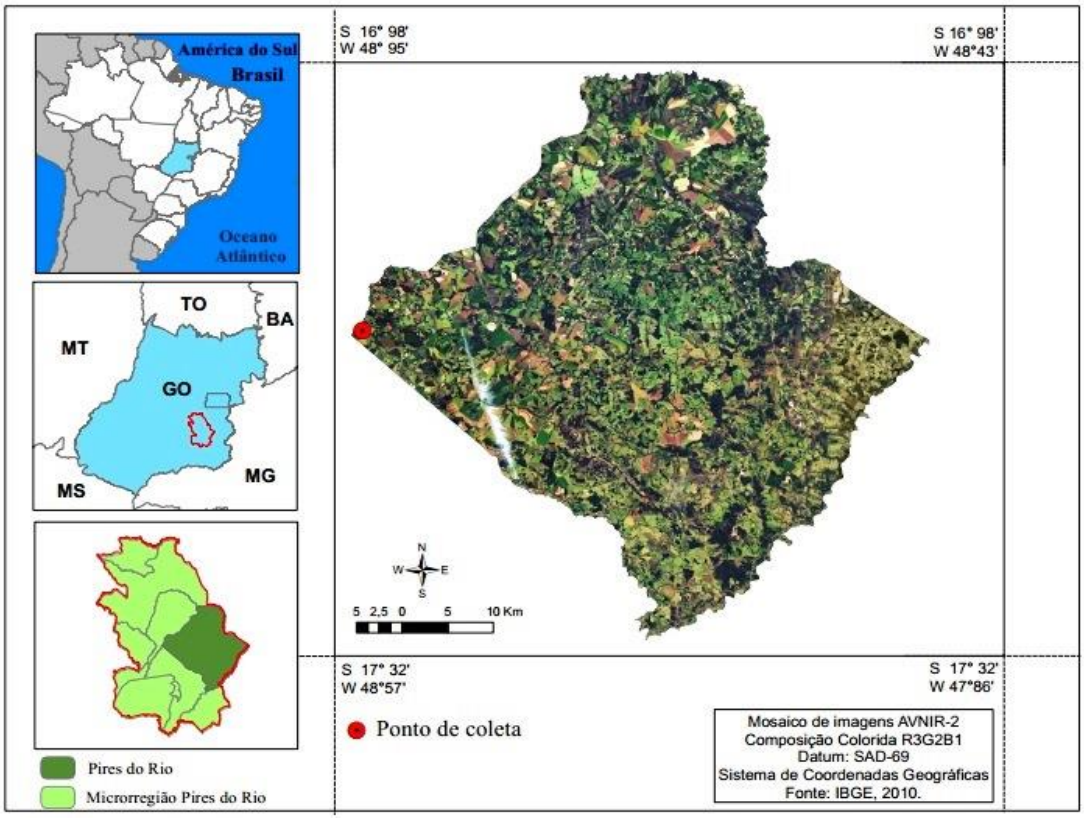


Figura 6 - Ponto de amostragem de solo hidromórfico, em fitofisionomia de vereda, a sudeste do Estado de Goiás, nos limites do município de Bela Vista de Goiás. **Fonte**: (LABOGEF, 2013)

Posteriormente foram retirados os restos vegetais em excesso com o auxílio de uma pinça e lupa. O solo foi subdividido em duas partes: (1) solo com matéria orgânica (CMO) e (2) solo sem matéria orgânica (SMO), este último tratado com peróxido de hidrogênio (WHITTIG; ALLARDICE, 1986) e autoclavado por três vezes a 121 °C e 0,105 Mpa por 3 h com intervalos de 24 h (ZHAO et al., 2008). Para garantir a máxima homogeneidade da matriz, os solos foram macerados e acondicionados em temperatura ambiente.

3.3.3 Análise textural e química

As análises textural e química do solo são mostradas na Tabela 1. O pH foi aferido por potenciômetro com eletrodo combinado, imersão em sobrenadante do solo e por diferença entre água e cloreto de cálcio. Os micronutrientes foram determinados por solução extratora Mehlich com posterior leitura via espectrofotômetro de absorção atômica (WENDT, 1995).

Tabela 1 - Caracterização textural e química do solo

Areia	Silte	Argila	MO	pH . $CaCl_2$	H+Al	CTC	Ca	Mg
dag.dm-^{3}					cmol.dm^{-3}			
36,79	24,2	39	3,07	3,98	8,36	9	0,5	0,08

K	Al	Cu	Fe	Mn	Zn	P
cmol.dm^{-3}		mg.dm^{-3}				
0,08	1,4	2,8	162	0,2	0,7	1,64

Com exceção do resultado de areia, silte e argila (resultado físico ou mesmo textural) os demais dados tratam-se dos resultados químicos da solução da terra in natura, ou seja, não fazem parte da fração mineral constituinte do solo.

3.3.4 Análise instrumental

A fração argila foi determinada por difração de raio-x (DR-X). Foi utilizado o solo SMO para a realização de diferentes tratamentos químicos. As frações silte, argila (fração argila desferrificada e saturada com K, Mg, Mg + glicerol, k + 350 °C e k + 550 °C) e areia também foram separadas na realização do DR-X. Uma análise no solo CMO também foi realizada para comprovar a homogeneidade das frações argila no solo. Nas frações argila foram determinadas as concentrações de ferro pelo método de Ditionito e pelo Oxalato (Tabela 2). O preparo e caracterização mineralógica da amostra por difração de raio-x foi realizado de acordo com Whittig et al. (1986) e Resende et al. (2005).

Tabela 2 – Teor de ferro (g kg^{-1}) na fração argila calculado pelo método de ditionito e pelo oxalato em amostras de solo com matéria orgânica (CMO) e sem matéria orgânica (SMO)

Amostra	Ferro ditionito - Fe_d	Ferro oxalato - Fe_o	Fe_o/Fe_d
	g kg^{-1}		
Argila sem MO	20,2	3,0	0,148
Argila com MO	13,1	4,0	0,305

Foi utilizado o equipamento X Pert Pro (PANalytical) com tubo de cobalto. Os difratogramas foram obtidos numa escala de 4 a 65°2Ɵ e velocidade angular do goniômetro de 1°2Ɵ min-1. A Figura 7 mostra os resultados obtidos pelo uso do DR-X tanto na amostra CMO quanto SMO.

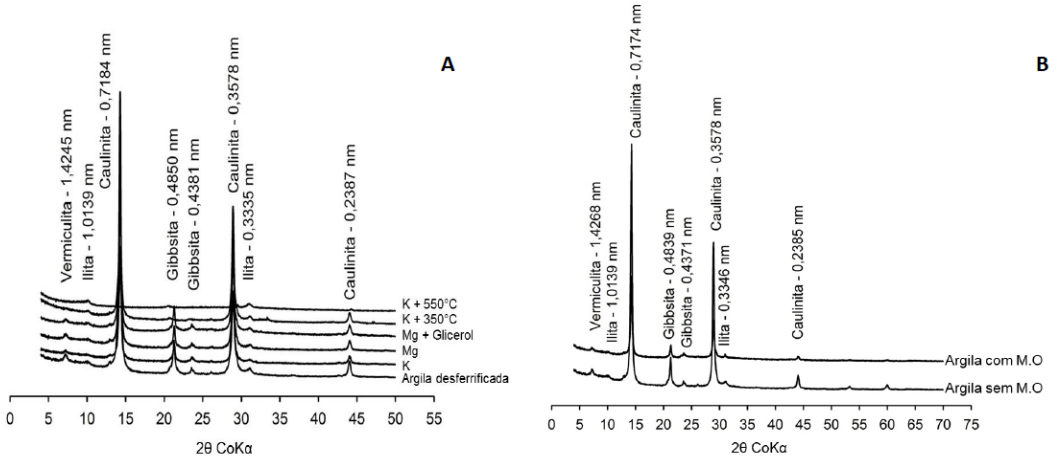


Figura 7 – Caracterização da fração argila do solo pelo uso de Difração de raio-x. Em (A) foi utilizado o solo submetido a remoção da matéria orgânica pelo método do peróxido de hidrogênio (WHITTIG; ALLARDICE, 1986). Para minimizar possíveis ruídos na curva, foram realizados 6 tratamentos diferentes: fração argila desferrificada e saturada com K, Mg, Mg + glicerol, K + 350 °C e K + 550 °C. Em (B) caracterização da fração argila tanto em solo com matéria orgânica (CMO) quanto sem matéria orgânica (SMO). Os minerais do tipo 2:1 encontrados foram vermiculita e ilita. Não foram identificados picos de minerais do grupo dos óxidos de ferro (hematita e goethita). Também não foram encontrados picos característicos para a pirita, pois para a sua formação, são necessários ambientes saturados com água e que tenha uma elevada quantidade de enxofre para que a mesma possa ser formada. Além disso, a forma como foi realizado o pré-tratamento (terra fina seca ao ar) pode oxidar a pirita, transformando-a em jarosita.

Os teores de ferro no solo são baixos, muitos destes associados a compostos de ferro de baixa cristalinidade como ferrihidrita e lepidocrocita. A relação superior a 0,05 (Feo/Fed) indica claramente a presença de formas de baixa cristalinidade.

A análise mineralógica das amostras (SMO e CMO) foi obtida por espectroscopia de energia dispersiva, realizada no microscópio eletrônico de varredura (MEV) – equipamento modelo JSM 6610 da marca JEOL, equipado com EDS, ThermoScientific NSS Spectral Imaging.

As amostras foram metalizadas com equipamento modelo Desk V da marca Denton Vacuum com o seguinte procedimento: o filme de ouro foi depositado em uma câmara com pressão atmosférica entre 50 e 60 mt e

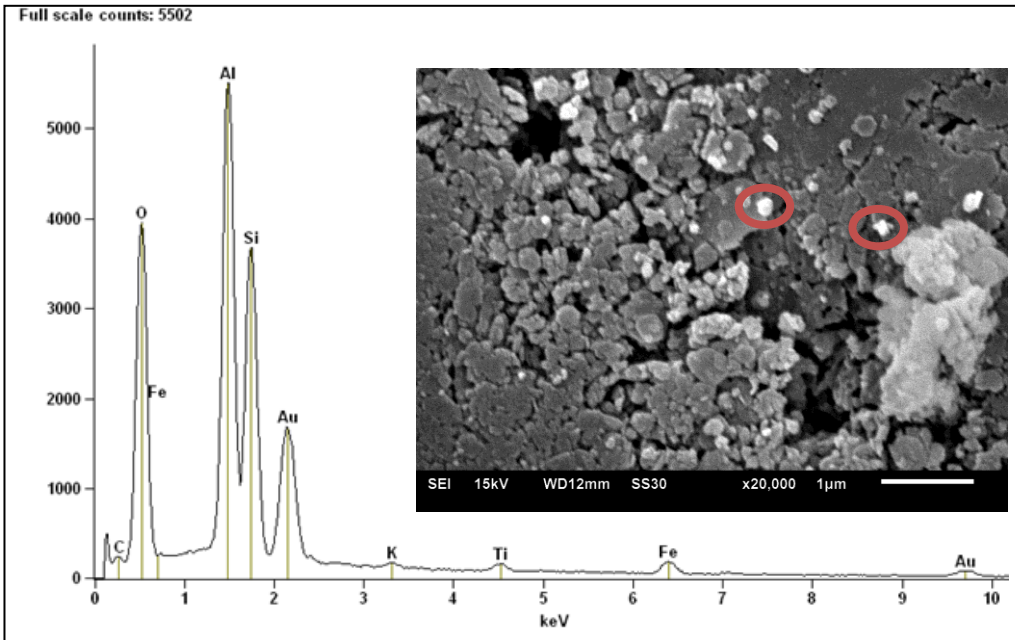
corrente de 15 mA por dois minutos, gerando uma camada de aproximadamente 250 Angstroms de espessura de ouro por cima da amostra. As Figuras 8 e 9 mostram respectivamente os resultados da espectroscopia de energia dispersiva em MEV juntamente com eletromicrografia de varredura da amostra CMO e SMO.

3.3.5 Preparo e Inoculação de HAdVs

Células A549 foram cultivadas em garrafas de cultivo celular (150 cm^2) contendo meio Dulbecco's Modified Eagle Médium (DEMEM Alta Glicose 1X) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e PSA 1% (penicilina G, estreptomicina e anfoterincina B nas concentrações finais de 100 U/mL, 100 µg/mL e 0,25 µg/mL respectivamente). As células foram infectadas com adenovírus humano 5 (espécie C, sorotipo 5 – HadV-5) e cultivadas em estufa de CO_2 5% a 37 ºC até a visualização ao microscópio invertido de efeito citopático. Em seguida, as células foram congeladas e descongeladas três vezes e os debris celulares removidos por centrifugação a 4 ºC por 10 min a 5.000 rpm. O inoculo viral consistiu de alíquotas homogêneas de 1 mL do sobrenadante.

Para a USEPA (2011) e Brasil (2005) o máximo aceitável para sólidos totais dissolvidos (STD) em águas tratadas é respectivamente de 500 e 1000 mg/L com o pH compreendido entre os intervalos de 6,0 a 9,5 para Brasil (2005) e 6,5 e 8,5 para a (USEPA, 2011). Assim, foram realizados experimentos que simulavam os limites máximos de STD em águas contaminadas por HAdV-5. O pH foi outro parâmetro analisado, no qual se utilizou como referência os pH 6,0 e 8,0 (representativos da faixa de valores mais comumente monitorados em águas tratadas).

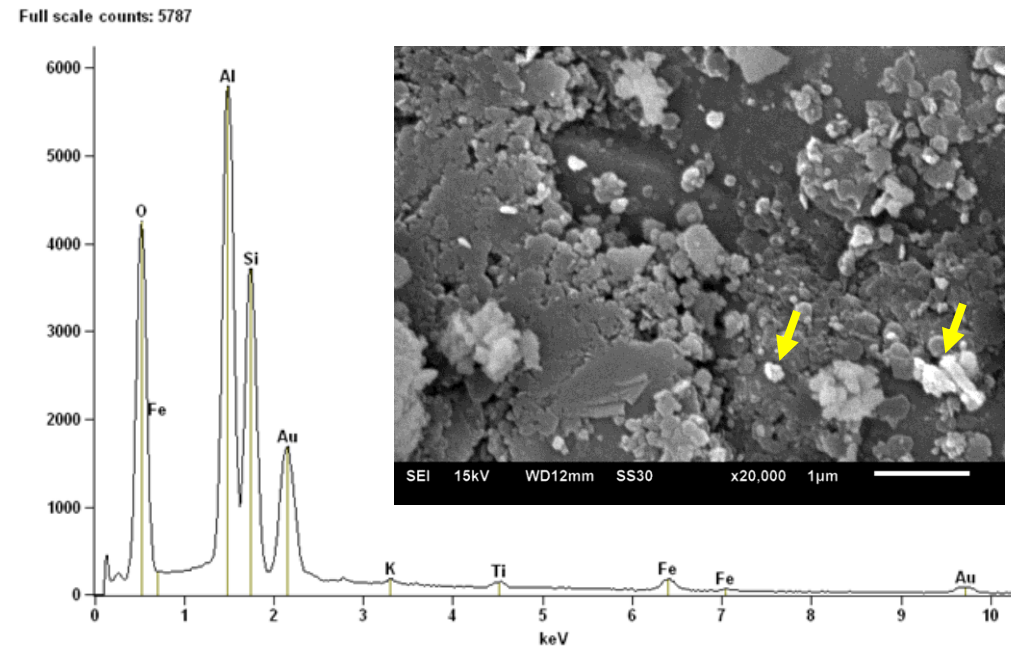
A metodologia consistiu em adicionar separadamente 5, 25 e 50 mg de solo CMO e SMO em tubos de polipropileno estéreis de 50 mL e adicionar 40 mL de água ultrapura e agitar manualmente para obter os sólidos presentes na água (sedimentáveis e não sedimentáveis).



Elemento Linha	Peso %	Peso % Erro	Atom %	Atom % Erro	Formula	Componente %
Al K	42,06	+/- 0,40	46,32	+/- 0,44	Al	42,06
Si K	42,72	+/- 0,60	45,20	+/- 0,63	Si	42,72
K K	0,69	+/- 0,10	0,53	+/- 0,08	K	0,69
Ti K	2,54	+/- 0,30	1,58	+/- 0,19	Ti	2,54
Fe K	11,99	+/- 0,72	6,38	+/- 0,38	Fe	11,99
Total	100,00		100,00			100,00

Figura 8 – Resultado da espectroscopia de energia dispersiva para a amostra de solo com matéria orgânica (CMO). O gráfico mostra os elementos químicos que foram excitados pelo feixe de elétrons e emitiram raios-x característicos. Ao lado é mostrada uma eletromicrografia de varredura da amostra, na qual se pode observar a presença de quartzo (círculo). Os dados obtidos não contemplam a associação destes minerais com o oxigênio.

O pH das soluções de água com sedimento foi ajustado para 6,0 e 8,0 (um pH diferente para cada tipo e concentração de sedimento) utilizando HCl 0,1 M. Em seguida, foi adicionado 1 mL de alíquota viral e completado com água ultrapura até atingir o volume final de 50 mL, obtendo-se respectivamente as concentrações de 100, 500 e 1000 mg/L de sólidos totais. Foi utilizado um controle (ensaio controle – CA) para cada tipo de pH (6,0 e 8,0), no qual foi adicionado apenas a alíquota viral e completado com água ultrapura para obter um volume final de 50 mL. O CA (sem adição de solo) foi processado da mesma forma que os demais tubos dos tratamentos.



Elemento Linha	Peso %	Peso % Erro	Atom %	Atom % Erro	Formula	Componente %
Al K	41,72	+/- 0,37	45,14	+/- 0,40	Al	41,72
Si K	46,70	+/- 0,56	48,53	+/- 0,58	Si	46,70
K K	0,47	+/- 0,10	0,35	+/- 0,08	K	0,47
Ti K	1,97	+/- 0,16	1,20	+/- 0,10	Ti	1,97
Fe K	9,14	+/- 0,76	4,78	+/- 0,40	Fe	9,14
Total	100,00		100,00			100,00

Figura 9 – Resultado da espectroscopia de energia dispersiva para a amostra de solo sem matéria orgânica (SMO). O gráfico mostra os elementos químicos que foram excitados pelo feixe de elétrons e emitiram Raios-x característicos. Ao lado é mostrada uma eletromicrografia de varredura da amostra. As setas na micrografia indicam grãos de quartzo. Os dados obtidos não contemplam a associação destes minerais com o oxigênio e nem carbono.

Os experimentos foram realizados em triplicata. Todas as concentrações foram processadas em réplica, com a repetição do experimento em triplicata.

Os tubos contendo as soluções de vírus com solo (ensaio teste – *TA*) foram agitados a 150 rpm durante 1 h a 24 °C. Foi escolhido este período de interação entre os vírus e as partículas sólidas pois Schijven e Hassanizadeh (2000) demonstraram que entre 1 e 2 h há um equilíbrio entre adsorção e desorção em suspensões líquidas, e a taxa de decaimento é estável entre estes dois períodos. Já Gantzer et al. (1994) reportou um tempo de equilíbrio de 30 min em experimentos em série (*batch*

experiments). Pós-período de agitação, os tubos permaneceram em repouso por 1 h em temperatura de 24 °C para a precipitação dos sólidos.

Após 1 h foram formadas duas fases nítidas: (i) o sobrenadante e (ii) o sedimento. Alíquotas de 200 µl do sobrenadante de cada tubo foram aliquotadas e estocadas a – 80 °C até processamento.

3.3.6 Extração de DNA

A extração de DNA foi realizada de acordo com as recomendações do fabricante. Alíquotas de 200 µl do sobrenadante tiveram os ácidos nucléicos extraídos pelo kit comercial QIAamp Stool Mini kit (QIAGEN). O sobrenadante remanescente dos tubos foi retirado e deixado apenas o *pellet* representativo do material sedimentável, ao qual foi imediatamente acrescido 2 mL de tampão ASL proveniente do kit QIAamp DNA Stool Mini Kit (QIAGEN) e seguido as demais instruções do fabricante para extração de ácidos nucléicos. O QIAamp DNA Stool Mini Kit foi a melhor opção para extração de DNA, pois removeu as impurezas e inibidores comumente encontrados em amostras de solo. Todas as amostras extraídas foram imediatamente armazenadas em freezer – 80 °C.

3.3.7 Enumeração por PCR em tempo real quantitativa (qPCR)

As amostras de DNA foram diluídas na proporção 1:10 para evitar inibições e a PCR quantitativa realizada como descrita por Hernroth et al. (2002). Todas as amplificações foram feitas em duplicata no aparelho StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems), utilizando como padrão o plasmídeo pBR322 contendo parte do gene hexon, gerando uma curva padrão ($R > 0.98$). Os resultados foram analisados para mensurar a quantidade de CG/mL de HAdV-5 na água e no sedimento precipitado, e comparou-se estes com os resultados no *CA*.

Os resultados em CG/mL foram utilizados na estruturação de uma sequência de equações matemáticas que inferem o número total de recuperação de cópias genômicas em relação à concentração de argila tanto em suspensão – simulando os sólidos suspensos em águas tratadas –

quanto no precipitado – para simular os sólidos que podem ser sedimentados no decorrer do transporte de água pelos canos ou recipientes de armazenamento. Para o ensaio teste (*TA*) de todos os tratamentos, o número total de cópias genômicas de HAdVs permanente no sobrenadante (N_{sup}) e no precipitado (N_{prec}) foi calculado respectivamente, de acordo com as seguintes equações:

$$N_{sup} = \left[\left[\left(\left(Clay_{\%} \times V_{cm^3}\right)/_{100}\right) \times Floc\right] \times \ CG/mL\right] \quad (01)$$

$$N_{prec} = \left[\left(V_{cm^3}\right) - \left[\left[\left(V_{cm^3} \times Clay_{\%}/_{100}\right) \times Floc\right] \times \ CG/mL\right]\right] \quad (02)$$

Onde *V*, $Clay_{\%}$ e *Floc* representam, respectivamente, o volume do sedimento (cm^3) no tubo, o teor de argila (%) da matriz e o grau de floculação da mesma. O volume estabelece uma relação direta entre massa (g) e densidade (g/cm^3), onde 1 cm^3 equivale a um mililitro. O teor de argila é encontrado laboratorialmente pela análise textural do solo, e o grau de floculação é a relação entre a argila naturalmente dispersa e a total, obtida após a dispersão (Tabela 1).

O número total de CG no ensaio teste (N_{ta}) foi obtido compilando as equações 1 e 2, e gerando a equação 3 abaixo:

$$N_{ta} = \ (N_{sup} + \ N_{prec}) \quad (03)$$

E a taxa total de recuperação (R_r) em CG foi calculada pela a equação matemática 4:

$$R_{r\,(\%)} = \left[\frac{(N_{ca} - N_{ta})}{N_{ca}}\right] \times \ 100 \quad (04)$$

Onde, N_{ca} corresponde ao número total de CG no *CA*. A equação 04 pode ser reescrita pela seguinte equação:

$$R_{r_{(\%)}} = \left\{ \frac{N_{ca} - \left[\left[\left[\left[\left(\left(Clay_{\%} \times V_{cm^3}\right)/_{100}\right) \times Floc\right] \times CG/mL\right] + \left[\left(V_{cm^3}\right) - \left[\left(\left(V_{cm^3} \times Clay_{\%}\right)/_{100}\right) \times Floc\right] \times CG/mL\right]\right]\right]}{N_{ca}} \right\} \times 100$$

(05)

3.3.8 Ensaio Citotóxico

Células A549 foram propagadas em placas de cultivo celular de 24 cavidades, na concentração de 1,5 x 10^5 células por poço contendo DEMEM 1x com 5% de SFB e 1% de PSA e reservadas.

Alíquotas do sobrenadante CMO foram tratadas com PSA 2% e diluídas em Meio Mínimo Essencial com sais de Eagle's 1x (MEM 1x) nas seguintes proporções: 1:2 até 1:7. Em seguida, um inoculo de 100µl de cada uma das diluições, em tréplica, foi colocado em contato com as células propagadas durante 1h a 37°C em atmosfera de CO_2 5% e agitação uniforme a cada 15 min. Posteriormente, o inoculo foi removido e 1 mL de DEMEM 1x, contendo respectivamente 1% de PSA e SFB foi adicionado às células, três controles celulares foram mantidos e estes continham apenas células e meio de manutenção. As placas foram incubadas a 37°C, em atmosfera 5% de CO_2 e a monocamada celular monitorada nos períodos de 24, 48, 72 e 96 h. Células que continham amostras testes inoculadas foram comparadas com os controles celulares em microscópio invertido. Sequencialmente, as células foram fixadas e coradas com preto de naftaleno (0,1% preto de naftaleno, 5% ácido acético, pH 2,3-2,4). O tapete celular corado foi analisado e a primeira diluição não citotóxica foi instituída para uso em todos os demais ensaios.

3.3.9 Ensaio em Placa de Lise

A padronização do método de titulação por placa de lise do HAdV-5 se baseou no descrito por Cromeans et al. (2008) e Rigotto et al. (2011). Células A549 (cultivadas em meio DMEM 1x alta glicose, 10% SFB) foram semeadas em placas de seis cavidades na concentração 2,5 x 10^5 células/mL. Após 24 horas, período necessário para as células atingirem confluência, a placa foi lavada duas vezes com PBS pH 7,2. Alíquotas do sobrenadante de todos os tubos foram previamente tratadas com PSA 2% e diluídas com MEM 1x na proporção 1:6 (diluição não citotóxica). A placa foi mantida a 37 °C em atmosfera de 5% de CO_2 por 1 h para promover a adsorção viral, sendo homogeneizada a cada 15 minutos. Após esse período, o inoculo viral foi aspirado e foi adicionado 2,5 mL por poço de uma solução na proporção 1:1 de meio DMEM 2x com alto teor de glicose (suplementado com 4% de SFB, 1 % de PSA, 2 % de cloreto de magnésio a 1 M e 2 % de ácido pirúvico a 100 mM) e bácto ágar 0,6 % ainda líquido (temperatura de ~ 50 °C).

O báctor ágar impede a difusão da infecção viral a partir de uma célula infectada, permitindo que o vírus infecte apenas células vizinhas. Após a polimerização do báctor ágar, as placas foram incubadas em estufa a 37 °C com atmosfera de 5 % de CO_2 por sete dias. Decorrido esse tempo, a camada contendo meio de cultura e báctor ágar foi retirada, e o tapete celular corado com preto de naftaleno (0,1% preto de naftaleno, 5% ácido acético, pH 2,3-2,4) e deixado sob agitação por 5 minutos em mesa agitadora. Em seguida, o corante era aspirado e as placas de lise quantificadas. As placas podem ser lidas/contadas sem auxílio de lupa ou microscópio e o título de infecciosidade é expresso pelo número de Unidades Formadoras de Placas/mL (UFP/mL ou PFU/mL):

$$UFP/mL = \frac{número\ de\ focos\ X\ recíproca\ da\ diluição}{Volume\ inoculado\ (mL)}$$

Para analisar o limite de sensibilidade na matriz, foram feitas diluições seriadas na base 10 do sobrenadante de todas as amostras (diferentes concentrações de solo e pH, incluso os ensaios controles) e realizada a infecção e análise em placa de lise celular.

3.4 Análise Estatística

O programa Microsoft® Excel 2007 foi usado para a tabulação dos dados e a análise estatística foi realizada pelo programa SPSS® for Windows®, versão 16.0.

Para comparar os tratamentos CMO e SMO nos dois tipos de pH e em relação ao numero de CG/mL ou de cópias genômicas totais, foi utilizado o teste u Mann-Whitney com nível de significância de 5% ($p<0,05$).

4 PUBLICAÇÕES

Artigo 1 – Análise virológica da qualidade da água: uma revisão das metodologias de concentração e detecção viral

Autores: Hugo Delleon Silva, Carlos Eduardo Anunciação, Sônia de Fátima Oliveira Santos e Marco Tulio Antonio García-Zapata

Revista publicada: Revista Brasileira de Biociências.

Artigo 2 - Why the Use of Adenoviruses as Water Quality Virologic Marker?

Autores: Hugo D. Silva, Marco T. A. García-Zapata, Carlos E. Anunciação

Revista publicada: Food and Environmental Virology.

Artigo 3 – Alto número de cópias genômicas de adenovírus humano C em água tratadas de área neotropical

Autores: Silva, Hugo Delleon et al.

Revista a ser submetido: Food and Environmental Virology

Artigo 4 – Contribuição do pH e da matéria orgânica na recuperação de adenovírus em condição simulada com água e sólidos tropicais

Autores: Silva, Hugo Delleon et al.

Revista a ser submetido: Environmental Science & Technology

Artigo 1 – Análise virológica da qualidade da água : uma revisão das metodologias de concetração e detecção viral

Revista Brasileira de Biociências
Brazilian Journal of Biosciences
ISSN 1980-4849 (on-line) / 1679-2343 (print)

REVISÃO

Análise virológica da qualidade da água: uma revisão das metodologias de concentração e detecção viral

Hugo Delleon Silva[1,2], Carlos Eduardo Anunciação[2], Sônia de Fátima Oliveira Santos[1,2] e Marco Tulio Antonio García-Zapata[1*]

Recebido: 23 de julho de 2010 Recebido após revisão: 04 de janeiro de 2011 Aceito: 15 de março de 2011
Disponível on-line em http://www.ufrgs.br/seerbio/ojs/index.php/rbb/article/view/1674

RESUMO: (Análise virológica da qualidade da água: uma revisão das metodologias de concentração e detecção viral). Muitos vírus patogênicos são excretados em fezes humanas e urina, e a água é um dos possíveis veículos de transmissão destes agentes, representando riscos para a saúde pública. Em alguns países, estes patógenos já são incorporados em rotinas de monitoramento ambiental. Todavia, ainda não há consenso em relação à escolha de um agente viral indicador, e nem em relação a um método padrão de detecção, o que muitas vezes gera divergências e confusões entre os próprios pesquisadores. Neste sentido, o objetivo deste estudo foi de realizar uma revisão atualizada dos principais métodos que compõem a análise virológica (concentração e detecção) da água. Apesar das divergências, constata-se que a metodologia de concentração é baseada sobretudo nos métodos de microfiltração em membranas polarizadas, ultrafiltração e ultracentrifugação, com variações de acordo com o tipo de amostra. Em relação aos métodos de detecção, estes baseiam-se sobretudo no uso da PCR e suas variações.
Palavras-chave: água, concentração, detecção, vírus.

ABSTRACT: (Virological analysis of water quality: a review of the methodologies of concentration and viral detection). Many pathogenic viruses are excreted in human feces and urine, and water is one possible vehicle of transmission, representing a risk for public health. In some countries, these pathogens are already embedded in routine environmental monitoring. However, there is no consensus yet on the choice of an indicator viral agent, and about choosing a method to diagnose them, which often generate confusion and disagreement among the researchers themselves. The objective of this study was to conduct an updated review of the main methods that comprise the virological analysis (concentration and detection) of water. Despite the differences, we observe that the method of virus concentration is mainly based on the methods of microfiltration in polarized membrane, ultrafiltration and ultracentrifugation, with variations according to the type of water sample. Regarding the methods of detection, these are based mainly on the use of PCR and its variations.
Key words: water, concentration, detection, virus.

INTRODUÇÃO

Indicadores empregados para avaliar a qualidade da água têm sido itens de controvérsia há mais de 50 anos (Rose *et al.* 2006). As bactérias geralmente são utilizadas como microrganismos de escolha no monitoramento microbiológico da água (Hsu *et al.* 2007), para tal, normalmente utilizam-se às bactérias heterotróficas e coliformes (Lee & Kim 2002). Entretanto, os métodos tradicionais de detecção de coliformes fecais e *Escherichia coli* possuem valor preditivo limitado para avaliar a ocorrência de vírus entéricos (Le Guyader *et al.* 2000). Diversos estudos relatam a não associação entre a presença de certos vírus encontrados no meio ambiente e indicadores bacterianos (Grabow *et al.* 2001, Rose *et al.* 2006, Hsu *et al.* 2007).

Vírus entéricos são importantes patógenos que geralmente estão dispersos no meio ambiente e são transmitidos pela via fecal-oral (Chapron *et al.* 2000, Haramoto *et al.* 2008). Até o momento, foram identificados mais de 140 tipos diferentes de vírus que causam uma variedade de doenças em humanos e que podem ser encontrados em águas (Hurst 1991, Hamaza *et al.* 2009). A presença destes patógenos em águas é um sério problema de saúde pública (Chen *et al.* 2006), pois a ingestão de partículas virais infecciosas, mesmo em baixas concentrações, pode acarretar diversos agravos à saúde (Ward & Akin 1984) e, em alguns casos, a ingestão de uma única partícula é o suficiente para desencadear uma infecção (Tavares *et al.* 2005).

Por outro lado, os métodos tradicionais de tratamento de água não são totalmente eficientes para a eliminação dos vírus (Koopmans *et al.* 2002). Assim como os microsporídios, protozoários esporuláveis de difícil remoção por filtração, sua remoção e/ou inativação requer o uso de luz ultravioleta (U.V.) no reator, metodologia onerosa, disponível apenas em alguns países desenvolvidos, e que nem sempre tem ação efetiva sobre todos os agentes virais, já que muitos são altamente resistentes ao tratamento com luz U.V. (Mamane-Gravetz *et al.* 2004).

Inúmeros estudos relatam a detecção de tipos diferenciados de vírus entéricos em águas tratadas e não-

1. Núcleo de Pesquisas em Agentes Emergentes e Re-emergentes, Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, Universidade Federal de Goiás. Caixa Postal 12911, Setor Leste Vila Nova, CEP 74643-970, Goiânia, GO, Brasil.
2. Laboratório de Diagnóstico Genético e Molecular, Instituto de Ciências Biológicas II, Universidade Federal de Goiás. Campus Samambaia, Caixa Postal 131, CEP 74001-970, Goiânia, GO, Brasil.
* Autor para contato. E-mail: nupereme@gmail.com

-tratadas, como o rotavírus (Mehnert 1993, Soule *et al.* 2000), enterovírus (Abbaszadegan *et al.* 1993, Soule *et al.* 2000), vírus da hepatite A (Rose *et al.* 2006, Albinana-Gimenez *et al.* 2006, Barrella *et al.* 2009), adenovírus (Barrella *et al.* 2009, Silva *et al.* 2010a), etc. A *United States Environmental Protection Agency* (USEPA) possui uma lista com os agentes virais que representam perigo à saúde pública e que devem ser monitorados: vírus da hepatite A, adenovírus, calcivírus e enterovírus (Usepa 2009). Esta lista de candidatos contaminantes (CCL) é modificada continuamente pela USEPA, em conformidade com pesquisas realizadas na área.

Dentre os vírus listados na CCL, os enterovírus e adenovírus são conhecidos por serem prevalentes em esgotos e águas poluídas (Vantarakis & Papapetropoulou 1998), sendo sugeridos por muitos autores como indicadores de contaminação viral (Pina *et al.* 1998). Mais recentemente, uma atenção especial tem sido dedicada aos adenovírus (AdVs), pois são considerados indicadores de contaminação humana (Hundesa *et al.* 2006, Carducci *et al.* 2008, Katayama *et al.* 2008), são os patógenos aquático mais resistente à inativação pelo U.V. (Linden et al. 2007), não apresentam correlação com as bactérias coliforme (Jiang & Chu 2004, Haramoto *et al.* 2005, Mena & Gerba 2008), e possuem o genoma constituído por DNA fita dupla, o que possibilita o diagnóstico molecular mais rápido e com menor custo (Silva *et al.* 2010a).

Apesar desta indicação, ainda não há um indicador virológico padrão para análise de águas, não existindo sequer consenso entre os pesquisadores em relação ao volume requerido e ao método de análise virológica a ser empregado. Entretanto, de forma sistematizada, essas análises geralmente obedecem a duas etapas: a concentração e a detecção viral.

Neste sentido, o objetivo deste estudo foi de realizar uma revisão atualizada dos principais métodos que compõem a análise virológica (concentração e detecção) da água.

CONCENTRAÇÃO VIRAL

A concentração é a primeira etapa na realização da análise virológica da água, objetiva recuperar e concentrar o maior número possível de partículas virais, ou mesmo reter material genético em suspensão. Em geral, os vírus estão presentes em baixas concentrações nas águas (Griffin *et al.* 1999, Soule *et al.* 2000, Chen *et al.* 2006, Hamaza *et al.* 2009). Dessa forma, a concentração é uma etapa crítica, trabalhosa e onerosa, que utiliza um grande volume de água (Tavares *et al.* 2005), podendo inviabilizar a aplicação em rotina de monitoramento ambiental.

Existe uma grande variedade de métodos de concentração e a escolha de um ou outro depende do tipo de amostra, do vírus a ser isolado e mesmo de recursos financeiros do laboratório. Assim, a utilização de um bom método de concentração é crucial para a posterior fase de detecção viral. Um método adequado de concentração viral deve cumprir uma série de exigências: (i) ser tecnicamente fácil de conclusão em curto espaço de tempo; (ii) prover alto índice de recuperação viral; (iii) concentrar grande variedade de vírus; (iv) fornecer um pequeno volume de concentrado; (v) não ser caro; (vi) ser capaz de processar grandes volumes de água e (vii) ser repetitivo e reproduzível (Wyn-Jones & Sellwood 2001). Entretanto, o alto custo ainda dificulta a utilização destes testes de forma rotineira.

Dentre os métodos de concentração, os mais amplamente utilizados são: ultracentrifugação (Formiga-Cruz *et al.* 2005, He & Jiang 2005, Albinana-Gimenez *et al.* 2006), adsorção-eluição em membranas de microfiltração polarizadas (Katayama *et al.* 2002, Rigotto *et al.* 2009, Silva *et al.* 2010a) e ultrafiltração (Soule *et al.* 2000, Rajal *et al.* 2007), ocorrendo combinações entre estes e alguns métodos de precipitação, ou mesmo outras metodologias afins.

Microfiltração

É sabido que os vírus entéricos possuem ampla gama de ponto isoelétrico (Ferguson *et al.* 2003), possuindo carga eletrostática predominantemente negativa ou perto do nível de pH neutro quando em meio ambiente (Hamaza *et al.* 2009). Essa carga eletrostática pode ser modificada para positiva pela redução do pH da água para um valor abaixo do ponto isoelétrico das proteínas do capsídeo viral. Baseado nesta propriedade, os vírus podem ser eficientemente recuperados utilizando tanto membranas polarizadas negativamente quanto positivamente (Katayama *et al.* 2002, Silva *et al.* 2010a).

As membranas de microfiltração utilizadas (entre 0,2 a 0,45 µm de porosidade) são geralmente constituídas de nylon, celulose, nitrocelulose ou fibra de vidro, podendo ser simples (única membrana) ou dispostas em cartuchos de filtração, sendo neutras ou polarizadas negativamente ou positivamente, existindo diferenças significativas quanto à utilização destas. A filtração em cartucho utiliza grande volume de água, o que pode aumentar a eficácia da análise virológica. Entretanto, a metodologia se torna trabalhosa e onerosa, e não condiz com o uso rotineiro na análise virológica da água. Por outro lado, amostras ambientais são ricas em contaminantes de origem orgânica e inorgânica, que podem rapidamente saturar as membranas simples e impedir a correta filtração nestas. Esse problema foi solucionado por Silva *et al.* (2010a), que realizaram previamente à microfiltração uma pré-filtração com papel filtro qualitativo, reduzindo o número de contaminantes ambientais. Em outro estudo, Hsu *et al.* (2007) obtiveram uma taxa de recuperação viral de 100% utilizando uma pré-filtração quantitativa com os microfiltros de fibra de AP 15 e AP 20 (Millipore) seguindo de microfiltração em membrana de nitrocelulose com pequena carga eletronegativa.

A *American Public Health Association* (APHA) e a USEPA recomendam o uso de adsorção-eluição em

membranas eletronegativas para concentrar vírus da água (Clesceri *et al.* 2005, Usepa 2001). Entretanto, o uso de membranas eletronegativas requer tratamentos prévios da água para propiciar a interação entre o vírus e a membrana. Estes tratamentos geralmente incluem acidificação da água com adição de sais catiônicos multivalentes ($AlCl_3$ ou $MgCl_2$), modificando a carga do vírus e propiciando interações eletrostáticas entre o capsídeo viral e a superfície eletronegativa das membranas (Chen *et al.* 2006, Victoria *et al.* 2009).

Um método de concentração viral utilizando filtro eletronegativo de 0,45 µm foi desenvolvido (Katayama *et al.* 2002) e recentemente reproduzido com sucesso em vários trabalhos correlatos que detecta vírus em águas ambientais (Haramoto *et al.* 2007a, Miagostovich *et al.* 2008, Katayama *et al.* 2008, Rigotto *et al.* 2009).

Adsorção-eluição de vírus com filtros eletropositivos (por ex. 1MDS Zetapor Virosorb [CUNO, Meriden, CN]) é um dos métodos comumente mais recomendados pela USEPA para recuperar vírus em águas tratadas (Usepa 1996, 2001). Além disso, estes filtros apresentam a vantagem de não requererem a modificação do pH das amostras (Fong *et al.* 2005) e o vírus se aderem diretamente à membrana eletropositiva. Todavia, filtros eletropositvos têm a desvantagem de oferecer uma baixa taxa de recuperação viral em águas salgadas, pois a presença do sal e a alcalinidade da água podem causar baixa adsorção dos vírus aos filtros (Lukasik *et al.* 2000).

No Brasil, desde 1988, trabalhos realizados têm utilizado filtração através de membrana eletropositiva Zeta Plus 60 S (ZP60S), seguida de ultracentrifugação na pesquisa de vírus em amostras ambientais (Mehnert & Stewien 1993, Schvoerer *et al.* 2000). Mais recentemente na cidade de Goiânia, GO, Silva *et al.* (2010a) encontraram 43% de amostras de água positivas para adenovírus concentrados por membrana eletropositiva e detectados por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).

Alternativamente ao uso de micromembranas polarizadas, tem sido testado o método de adsorção-eluição em partículas de vidro para recuperar vírus de amostras ambientais (Lambertini *et al.* 2008). Este método utiliza eluição com óleo mineral e geralmente permite que se realize a adsorção-eluição de vírus sem a necessidade de modificação do pH da água (Lambertini *et al.* 2008, Wyn-Jones *et al.* 2001). Apesar de menos oneroso, o método apresenta uma taxa de recuperação viral muito variável, não apresentando ainda resultados satisfatórios.

Recentemente, Li *et al.* (2010) compararam o uso de um novo filtro composto por fibra eletropositiva de composição não têxtil chamado de "nanoalumina" (Ahlstrom Filtration, LLC, FL) com o uso do já comumente utilizado filtro HA-WP (Millipore, Inc.). Apesar do novo sistema oferecer algumas vantagens,tais como a capacidade para filtrar grandes volumes de água (acima de 10 litros), maior taxa de recuperação de partículas infecciosas (82-91% contra 78-90% pela filtração HA), sem a necessidade de pré-filtração, e ajuste de pH ou adição de cátions multivalentes, apresentou a desvantagem de oferecer menor taxa de recuperação do genoma viral (16-35% contra 29-66% pela filtração HA).

A Tabela 1 mostra as principais membranas e cartuchos de filtração usualmente empregados para realizar a concentração (pré-filtração / filtração) de vírus em águas ambientais.

Ultrafiltração

A ultrafiltração (UF) consiste em filtração em ultramembranas que retêm macromoléculas (ácidos nucléicos e proteínas). Essas membranas contêm poros capazes de reter massas moleculares na ordem de 10.000 a 100.000 Da (Hill *et al.* 2007), sendo geralmente utilizadas em associação com a microfiltração (Haramoto *et al.* 2007a, Miagostovich *et al.* 2008). Os métodos de ultrafiltração têm sido reportados desde a década de 1970 na recuperação de microrganismos em água, com especial destaque para os vírus (Belfort *et al.* 1974). Hill *et al.* (2005) demonstraram que a UF pode ser utilizada de modo eficiente, utilizando um pequeno volume de

Tabela 1. Membranas e cartuchos de microfiltração utilizados para concentrar (pré-filtração/filtração) vírus em águas ambientais.

Tipo	Nome	Porosidade (µm)	Composição	Carga/ Hidrofobicidade
Membrana	Hybond N+ (Amersham pharma)	0,45	Nylon	+
Membrana	Zetapore (AMF Cuno)	0,45	Diatomácea/celulose	+
Membrana	PTFE-LCR (Millipore)	0,45	Teflon	Hidrofilico
Membrana	MF HAW (Millipore)	0,45	Nitrocelulose	-
Membrana	NM04701 020SP	0,22	Nitrocelulose	-
Membrana	HA (Millipore)	0,22-0,45	Mistura de ésteres de celulose	Hidrofilico
Membrana	Anodisc (Whatman)	0,2	Inorgânica (inorganic-alumina)	+
Membrana	Prefilter A1 15 (Millipore)	8,0	Microfibra de vidro	SI
Membrana	Prefilter GF/FC (Whatman)	12,0	Microfibra de vidro	SI
Membrana	AP 15 e AP 20	0,2-0,8	Microfibra de vidro	SI
Membrana	Metricel (Gelman Science)	0,8	Celulose	SI
Cartucho	Zeta-plus (AMF, Cuno)	0,5-1,0	Celulose com carga modificada	+
Cartucho	1-MDS Virozorb (AMF, Cuno)	0,2	Celulose com carga modificada	+
Cartucho	Duo-fine series (Blaston Corp.)	0,45	fibra de vidro com resina epóxi	SI
Cartucho	Filtering tubes (Balston Corp.)	5-8,0	Microfibra de Vidor e resina de epóxi-borsilicato	SI

SI: Sem informações precisas

água (10 L) em condições diferenciadas para recuperar simultaneamente vírus, bactérias e parasitos. Recentemente, Girones *et al.* (2010) constataram que a UF seria uma alternativa viável para o diagnóstico de vírus em águas salgadas (Girones *et al.* 2010).

Métodos de ultrafiltração como a filtragem de fluxo por vórtex (VFF - vortex flow filtration) e a filtragem de fluxo tangencial (TFF - flow filtration) têm sido utilizados como alternativas ao método de adsorção-eluição por microfiltração. VFF tem a vantagem de não requerer pré-filtraçaõ e ter maior taxa de recuperação viral do que TFF (Fong *et al.* 2005). Contudo, é aconselhável realizar uma etapa de pré-filtração qualitativa, pois a realização deste procedimento permite a retirada de matéria orgânica, como restos de algas que saturam as membranas (Silva *et al.* 2010a).

Ultracentrifugação

Na ultracentrifugação, as amostras de água são centrifugadas a uma velocidade superior a 100.000 x g, e isso faz com que os vírus precipitem e possam ser eficientemente eluídos. O método de ultracentrifugação apresenta a vantagem de usar amostras *in natura*. Todavia, sua utilização em amostras ambientais, tais como águas de rios ou lagos (onde a concentração de vírus é baixa), é limitada, pois as ultracentrífugas não possuem capacidade para processar grandes volumes de água. Assim, este método é muito empregado para detecção de vírus em amostras de esgoto (Albinana-Gimenez *et al.* 2006, Myrmel *et al.* 2006), onde a concentração destes patógenos é sabidamente elevada. O método em si é prático e de baixo custo. Todavia, a aquisição e a manutenção de uma ultracentrífuga exigem custos elevados.

Eluição e extração de ácidos nucléicos

A próxima etapa pós-concentração é realizar a eluição das partículas virais adsorvidas em membrana ou no concentrado, normalmente utiliza-se uma solução proteinácea alcalina contendo glicina (~0,5 M) e extrato de carne (1-3%, pH 9-11), também chamada de floculação orgânica (Puig *et al.* 1994, Lambertini *et al.* 2008), a qual promove a recuperação de partículas virais adsorvidas em sólidos (El-Senousy *et al.* 2007). A eluição com extrato de carne é o método mais utilizado. Todavia, diversos pesquisadores têm utilizado eluições diferenciadas, como soluções contendo Tween 80 (Rajal *et al.* 2007), e associação de Tween 20 com Tris-EDTA (Silva *et al.* 2010a), pois o extrato de carne pode inibir as reações de PCR (Abbaszadegan *et al.* 1993). Em razão disso, para a detecção via PCR, alguns pesquisadores têm proposto, como alternativa mais eficaz, a eluição dos vírus em solução de NaOH (pH 10,8) (Haramoto *et al.* 2005, Haramoto *et al.* 2007b), ou mesmo uma associação de H_2SO_4 0,5 mM e NaOH 1 mM (Hsu *et al.* 2007).

Em associação ou não com a etapa de eluição, pode-se utilizar diversas metodologias, denominadas de métodos secundários de concentração, usualmente métodos de precipitação, destacando-se a já mencionada floculação orgânica com extrato de carne (Xagoraraki *et al.* 2007), floculação com alumínio (Farrah *et al.* 1976), floculação com leite em pó desnatado (0,01% w/v) (Calgua *et al.* 2008), precipitação com polietilenoglicol (PEG) (Greening *et al.* 2002), ou precipitação com sais multivalentes (Chang *et al.* 1981). O precipitado é então centrifugado para aumentar a eficiência de sedimentação e, posteriormente, dissolvido em tampões apropriados e submetido à extração do material genético, para diagnóstico molecular, ou segue diretamente para isolamento em cultura celular.

Recentemente, Hamaza *et al.* (2009), comparando vários métodos de eluição, demonstraram que a eluição das membranas com glicina e extrato de carne não apresenta grande eficiência quando em associação com a precipitação com PEG. A concentração com PEG possui a vantagem de obter precipitação em pH neutro ou em altas concentrações iônicas, bem como na ausência de compostos iônicos (Lewis & Metcalf, 1988). Por outro lado, a precipitação com PEG pode não ser muito eficiente para algumas amostras ambientais, pois pode ocasionar concomitante concentração de inibidores da PCR (ácidos húmicos, compostos fenólicos, etc.) (Schvoerer *et al.* 2000). Alguns métodos secundários de concentração também podem ser utilizados para promover uma purificação ou mesmo re-concentração das amostras, diminuindo a concentração de contaminantes orgânicos e inorgânicos.

Alternativamente, um bom método de extração de ácidos nucléicos pode amenizar/solucionar os problemas decorrentes da presença de inibidores das enzimas utilizadas na PCR. Existem diferentes protocolos, que usualmente incluem extração pelo método de fenol-clorofórmio (Sambrook & Russel 2001), extração pelo método da sílica (Boom *et al.* 1990), ou demais variações vigentes, já que os kits sofrem modificações entre laboratórios e podem ser utilizados tanto kits comercias quanto os chamados "kits caseiros", estes últimos muito comuns em análises virológicas de amostras ambientais. Para minimizar os efeitos de compostos inibidores da polimerase pós-extração de DNA, como à ação de ácido húmico, Abbaszadegan *et al.* (1993) utilizaram com sucesso um pré-tratamento de purificação do material genético através de passagem em coluna de cromatografia utilizando Sephadex G-100 e resina do tipo Chelex-100. Isso denota o cuidado que se deve ter na escolha de um bom método de extração de ácidos nucléicos.

DETECÇÃO, ENUMERAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO VIRAL

Culturas celulares

Existem diversos métodos de identificação de vírus em águas baseados na detecção molecular ou na capa-

cidade de replicação ou não dos vírus em culturas celulares (CC) (Wyn-Jones & Sellwood 2001). As culturas celulares são metodologias tradicionais, comumente utilizadas para isolar vírus em águas desde a década de 1990 (Havellar *et al.* 1993). O método consiste em inocular amostras de vírus em uma linhagem celular de escolha e avaliar as células quanto à presença de danos, estes chamados de efeito citopático, um sinal característico da evidência de infecção viral (Fong *et al.* 2005).

A cultura celular, apesar de ser um método muito sensível (Tavares *et al.* 2005) em detectar partículas virais infecciosas, apresenta a desvantagem de ser trabalhosa (Hot *et al.* 2003, Formiga-Cruz *et al.* 2005) e onerosa (Formiga-Cruz *et al.* 2005). Além disso, alguns grupos virais são fastidiosos, como os adenovírus (sorotipo 40/41) e norovírus (Ko *et al.* 2005, Haramoto *et al.* 2004, Mena & Gerba, 2008). Outra desvantagem da metodologia é a necessidade da utilização de uma segunda metodologia, acoplada à cultura celular, para realizar identificação viral específica. Dentre essas se destacam os métodos imunológicos, como imunofluorescência e imunoperoxidase (Mehnert *et al.* 1999), quimioluminescência (Greening *et al.* 1999), ensaio imunoenzimático (ELISA) (Jinag *et al.* 1995) e métodos moleculares como a PCR (Greening *et al.* 2002).

Reação em cadeia da polimerase e variações

Com o a expansão do uso de técnicas moleculares, a partir da década de 1990, e a conseqüente incorporação de metodologias que agregam maior especificidade e sensibilidade, como a PCR, vem sendo crescente o aumento no número de investigações na área da virologia aquática (Castignolles *et al.* 1998, Soule *et al.* 2000, Lee & Kim 2002, Fout *et al.* 2003, Formiga-Cruz *et al.* 2005, Karamoko *et al.* 2005, Rose *et al.* 2006, Lee & Kim 2008, Silva *et al.* 2010a).

Técnicas moleculares como a PCR fornecem alta especificidade, sensibilidade e rápida detecção de patógenos virais em amostras ambientais (Rigotto *et al.* 2005) quando comparada à cultura celular (Fong *et al.* 2005). Porém, em rotina laboratorial, o seu uso em amostras aquáticas pode ser limitado, devido à presença de inibidores da polimerase. Por exemplo, substâncias orgânicas oriundas de ácido húmico podem adsorver proteínas ou enzimas e interferir quimicamente em seus sítios de atividade ou quelar cátions bivalentes, tais como Ca^{2+} e Mg^{2+}, impedindo que estes íons sirvam como cofatores das enzimas utilizadas na PCR (Muller-Wegener, 1988). Alguns métodos têm sido desenvolvidos para sobrepor esses obstáculos, entre eles a Nested-PCR (utilização de um segundo par de iniciadores flanqueando uma região previamente amplificada pela primeira PCR), técnica que tem sido proposta para assegurar detecção específica, eliminar resultados falso-negativos e incrementar a reação (Rigotto *et al.* 2005).

As Nested-PCRs apresentam maior nível de sensibilidade, em comparação com as PCRs, permitindo a detecção de um menor número de partículas virais nas amostras (Puig *et al.* 1994), além de ter a vantagem de concentrar menor quantidade de inibidores da enzima Taq DNA polimerase (Rigotto *et al.* 2005). Alternativamente, tem sido utilizada a semi-Nested PCR para aumentar a sensibilidade das análises (Silva *et al.* 2010a). A Semi-Nested PCR é uma segunda reação de PCR, mas que utiliza um dos *primers* utilizados na primeira PCR em associação com outro *primer* diferente flanqueando uma região já amplificada. Dubois *et al.* (1997), ao detectar rotavírus em amostras de esgoto, constataram que a realização de ensaios Nested-PCR aumenta a sensibilidade da reação em $1{,}83 \times 10^3$, quando comparado com ensaios PCR.

A desvantagem da PCR é que não é capaz de indicar infecciosidade viral (Schvoerer *et al.* 2001). Todavia, em ensaios de reação em cadeia da polimerase com transcrição reversa (RT-PCR), isso é passível de ser analisado pela detecção de cópias de mRNA obtidas de replicação viral em cultura celular (Greening *et al.* 2002). Segundo Metcalf *et al.* (1995), para a detecção de certos vírus em amostras ambientais, RT-PCR é o método de escolha em comparação ao uso dos antígenos utilizados em ensaios ELISA, que não são tão específicos. Mesmo assim, o que se tem observado é a crescente detecção destes patógenos utilizando apenas detecção molecular direta, sem auxílio de cultura celular, haja vista que alguns grupos de vírus monitorados são altamente resistentes a condições ambientais adversas.

Outro método molecular utilizado para detecção viral em amostras hídricas é a PCR quantitativa em tempo real (Q-PCR/qPCR - Real time PCR) (Bofill-Mas *et al.* 2006, Xagoraraki *et al.* 2007, Haramoto *et al.* 2007a). É uma variação da PCR pela utilização de compostos fluorescentes (fluoróforos) que, simultaneamente amplifica, quantifica e analisa a expressão gênica (He & Jiang 2005). Os compostos fluorescentes mais utilizados para detecção de vírus em água por qPCR são o *SYBR Green* e a *TaqMan*.

O *SYBR Green* se liga entre a fita dupla de DNA e, com a excitação da luz emitida pelo sistema ótico do termociclador de qPCR, emite uma fluorescência verde. São (i) vantagens e (ii) desvantagens do *SYBR Green*: (i) baixo custo, facilidade no uso e sensibilidade; (ii) se liga em todo o DNA fita dupla (incluindo dímeros), podendo superestimar a concentração alvo (Novais & Alves 2004). A *TaqMan* é uma sonda de DNA marcada que, durante a PCR, hibridiza com a seqüência da fita simples de DNA complementar alvo, agregando conseqüentemente maior especificidade e sensibilidade à reação. Dessa forma, o uso da sonda *TaqMan* permite que se realize a quantificação de vírus em ambientes aquáticos (La Rosa *et al.* 2010).

Apesar da alta sensibilidade e especificidade dos ensaios de PCR, há divergências quanto a utilização das variações RT, qPCR e Nested-PCR para a detecção de vírus em águas. Van Heerden *et al.* (2005) demonstraram que para a detecção de adenovírus humano, o isolamento em cultura e identificação por RT-PCR fornece alta

sensibilidade e especificidade. Em estudo realizado por Chapron *et al.* (2000), que compara a utilização de cultura celular em associação com Nested-PCR com apenas a utilização de Nested-PCR, foi demonstrada maior sensibilidade na detecção de adenovírus em amostras semeadas em cultura celular. Dado semelhante foi obtido por Xagoraki *et al.* (2007), ao analisarem a detecção de AdVs em amostras ambientais pela associação ou não de cultura celular com ensaio qPCR, ficando evidente a maior sensibilidade da associação cultura celular e qPCR (qPCR-CC). Contraditoriamente, Chapron *et al.* (2000), ao analisarem a integração cultura celular com RT-PCR e Nested-PCR (CC-RT-PCR), obtiveram um aumento da sensibilidade de detecção viral quando comparado ao uso da cultura celular unicamente. Já He & Jiang (2005) relatam que a realização de PCR quantitativo em etapa única permitiu a detecção de 3-4 vezes mais AdVs do que o encontrado por isolamento em linhagens HEK-293 em associação com a qPCR.

A realização de um segundo ensaio de PCR aumenta a sensibilidade e especificidade das reações de detecção de AdVs em águas poluídas (Castignolles *et al.* 1998) e esse fato é inegável. Esse dado é corroborado por estudos realizados por Puig *et al.* (1994) e Vantarakis & Papapetropoulou (1999) em que, respectivamente, 11 e 9 amostras ambientais foram negativas na primeira PCR e confirmadas positivamente após segunda PCR (Nested-PCR). Mas há divergências na comparação do Nested-PCR com o qPCR. Estudo realizado por Noble *et al.* (2003) demonstra que Nested-PCR é mais sensível do que qPCR na detecção de adenovírus. Por outro lado, Jiang *et al.* (2005), assim como Romanova *et al.* (2009), demonstraram que a qPCR foi mais sensível para a detecção de adenovírus em águas ambientais. Beuret *et al.* (2004), detectando norovírus e enterovírus, demonstraram que RT-Real time PCR apresentou um aumento de sensibilidade de uma a duas ordens de magnitude, respectivamente, quando comparada com o protocolo RT-PCR. O mesmo foi observado por De Paula *et al.* (2007), em que qPCR detectou vírus da hepatite A (HAV) em 92% das amostras, comparado com 23% quando utilizado o ensaio de RT-PCR. Isso possivelmente ocorreu porque a qPCR é menos sensível aos inibidores enzimáticos, quando comparada com a PCR qualitativa. Além disso, para a detecção de HAV, a qPCR mostra-se mais eficiente pois combina a amplificação da PCR com o uso de sondas internas (*TaqMan*) para confirmar a especificidade do *amplicon* (Mackay 2004). Ensaio qPCR baseado no uso de sondas *TaqMan* é uma das técnicas mais confiáveis para avaliar a abundância de sorotipos de AdVs na água, pois oferece alta sensibilidade e baixa possibilidade de contaminação cruzada (Haramoto *et al.* 2007). Dessa forma, é notório o aumento no uso da qPCR para o monitoramento microbiológico ambiental e alimentar (Girones *et al.* 2010).

Apesar da inegável sensibilidade e especificidade dos ensaios baseados na amplificação gênica (PCR) confirmar especificidade de amostras positivas por visualização de bandas em gel agarose, mesmo após uma segunda PCR, não é suficiente para a análise virológica de amostras ambientais (Silva *et al.* 2010a). Isso porque os microrganismos de forma geral são mais susceptíveis quando em meio ambiente às mudanças em sua constituição genética, podendo induzir não somente a casos de falso-negativo, mas também de falso-positivo. Desta forma, o sequenciamento de nucleotídeos vem sendo empregado para agregar maior especificidade às amostras positivas. Nesse quesito, a PCR quantitativa pode conseguir mais sucesso, pois juntamente com os *primers forward* e *reverse*, pode-se empregar uma sonda interna, agregando maior especificidade ao teste.

Nas reações de PCR, deve-se ressaltar o uso de um controle interno de amplificação para todas as reações (Silva *et al.* 2010a, Girones *et al.* 2010). Além disso, a presença de potenciais inibidores, que podem afetar a acurácia da quantificação, pode ser avaliada através de amplificações advindas de amostras ambientais puras e diluídas (Girones *et al.* 2010).

A PCR e suas variações é o método mais empregado para detectar ácidos nucléicos virais em amostras ambientais, mas outros métodos estão disponíveis como, por exemplo, o NASBA (*Nucleic Acid Seq*uence-*Based Amplification* - amplificação de ácidos nucléicos baseada em sequência*)*. O NASBA é um método utilizado para amplificar RNA de outras cópias de RNA ou DNA em temperatura única, sendo mais comumente empregado para amplificar RNA (Goodwin & Litaker, 2008).

Citometria de fluxo

Recentemente, uma nova frente em microbiologia ambiental vem sendo desenvolvida com a utilização de metodologias robustas, baseadas na utilização da citometria de fluxo. A citometria é uma técnica utilizada para contar, examinar e classificar partículas microscópicas suspensas em meio líquido em fluxo, permitindo a análise de vários parâmetros (Vives-Rego *et al.* 2000). A citometria utiliza sondas fluorescentes específicas que se ligam ao seu alvo-ligante e emite uma fluorescência padrão após excitação por lasers. As sondas podem ser utilizadas para examinar características estruturais, como conteúdo lipídico, anticorpos ou ácidos nucléicos (DNA ou RNA), sondas de oligonucleotídeos marcadas com fluorescência (Katisuragi & Tani 2000). No caso específico dos AdVs, a detecção desses já é realizada com sucesso através do monitoramento intracelular da taxa de expressão da proteína hexon do capsídeo viral, que é abundantemente expressa entre 18 a 24 h pós-infecção celular (Weaver & Kadan 2000). Todavia, essa metodologia ainda não foi testada em amostras ambientais.

As limitações no uso da citometria de fluxo em virologia ambiental estão relacionadas à pequena dimensão e reduzido conteúdo das moléculas estruturais dos vírus, especialmente DNA e RNA. Apesar dos corantes celulares atualmente utilizados serem bem conhecidos

e aplicados na marcação de células animais, as interações com as células virais são pouco conhecidas (Vives-Rego *et al.* 2000). Embora o método seja promissor no campo da virologia ambiental e haver trabalhos correlatos (Barardi *et al.* 1998, Nebe-Von-Caron *et al.* 2000), esses ainda são incipientes e isso se deve sobretudo porque o aparelho possui um custo elevado e a metodologia exige pessoal altamente qualificado (Vives-Rego *et al.* 2000), o que pode inviabilizar seu uso.

Alternativamente à citometria de fluxo, alguns estudos indicam a utilização do Luminex em trabalhos de microbiologia ambiental (Spiro & Lowe 2002, Peters *et al.* 2007). O Luminex é um pequeno citômetro de fluxo com o propósito de detectar microesferas internamente coradas com uma composição de fluorocromos vermelho e infravermelho (Peters *et al.* 2007). Dentro do analisador Luminex, um laser excita os corantes internos das microesferas e outro laser indica a faixa de fluorocromo capturado pelos antígenos. Há uma variedade de 100 microesferas disponíveis e cada uma com uma composição antigênica diferente. O Luminex pode, assim como o citômetro de fluxo, detectar proteínas, lipídios, ácidos nucléicos e demais biomoléculas pertinentes de detecção.

Na figura 1, é mostrado um fluxograma esquemático das principais etapas a serem realizadas no diagnóstico virológico de amostras de água.

CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os órgãos incumbidos de monitorar a qualidade da água devem ter ciência de que as bactérias do grupo dos coliformes, usualmente empregadas para monitorar a qualidade microbiológica da água, não atestam a qualidade virológica desta. Quando muito, estes testes podem prover algum nível de indicação de vírus enté-

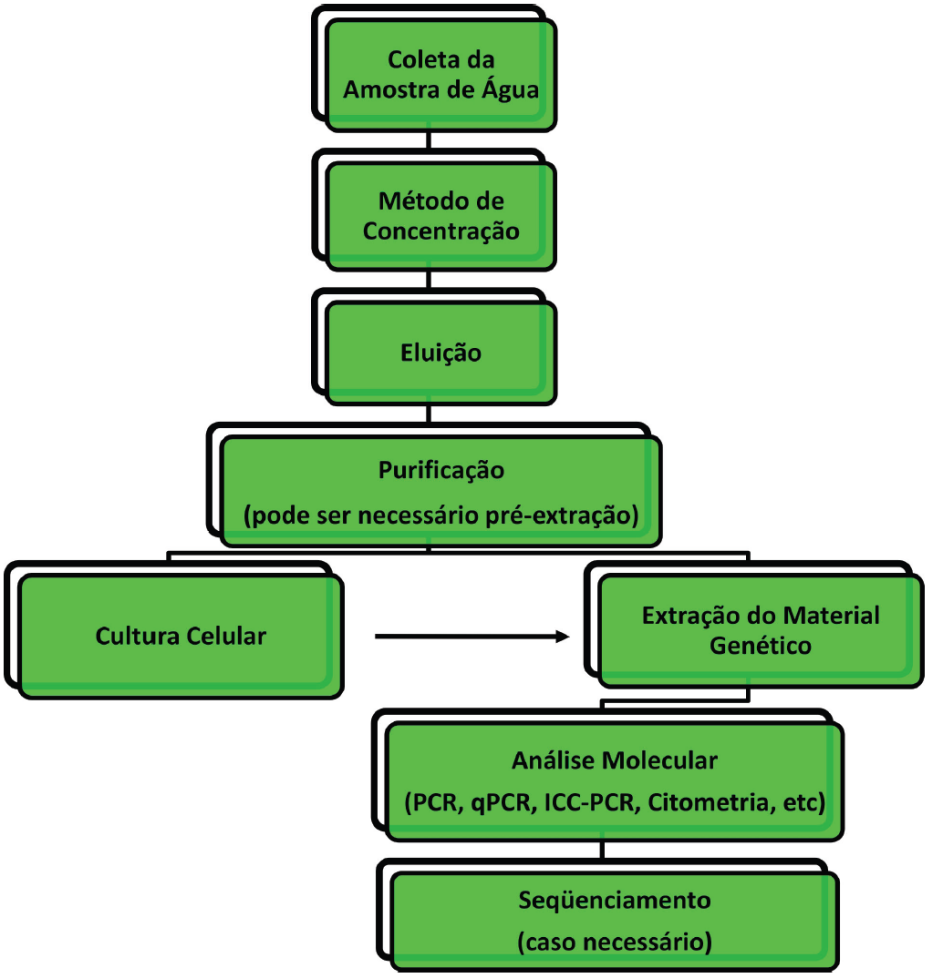


Figura 1. Fluxograma demonstrativo da sequência de eventos necessários para se realizar o diagnóstico virológico em amostras de água.

ricos quando a fonte de contaminação é sumariamente de origem humana (Jurzik *et al.* 2010), o que é uma medida totalmente subjetiva.

Os vírus possuem grande impacto em saúde pública. Nos países industrializados estes patógenos são os principais causadores das gastroenterites (Lopman *et al.* 2003). Nos EUA, entre o período de 1999 e 2002, estes patógenos foram responsáveis por 14% dos surtos e 38% das doenças associadas com águas de consumo humano (Lee *et al.* 2002, Lambertini *et al.* 2008). Possivelmente, nos países pobres e em desenvolvimento, onde é notória a precariedade das condições de saneamento básico, é muito provável que os índices de infecções por vírus entéricos sejam maiores do que os índices estabelecidos nos países desenvolvidos. Nesses, as pesquisas de detecção de vírus em águas encontram-se bem adiantadas, com tendência para a incorporação dos adenovírus como possíveis indicadores virológicos de qualidade da água na Europa (Wyn-Jones *et al.* 2010). Pina *et al.* (1998) e Castignolles *et al.* (1998) já indicavam estes patógenos como bons indicadores de contaminação ambiental. No Japão, estes patógeno são propostos como indicadores preferenciais para certificar a qualidade virológica da água (Katayama *et al.* 2008).

Assim, em alguns países da Europa e no Japão, o monitoramento de vírus em águas já é uma realidade mas, como exposto acima, constata-se a falta de um método padrão para diagnosticá-los. Possivelmente não irá ocorrer para um único tipo de amostra hídrica, pois as taxas de recuperação viral para os vários tipos de águas (águas tratadas, efluentes, águas de rios, dentre outras) não é similar, e a adsorção dos vírus às membranas polarizadas pode ser influenciada por sais, cátions multivalentes, condições ácidas (Haramoto *et al.* 2005, 2006), e compostos orgânicos diversos, que exigem metodologias diferenciadas. Portanto, um mesmo método pode ser mais ou menos sensível do que outro para amostras diferenciadas. Ademais, a sensibilidade e mesmo a especificidade são seriamente influenciadas pelos mecanismos de eluição, métodos secundários de concentração e purificação, assim como pela técnica de detecção, e mesmo pelo agente viral a ser diagnosticado.

Recentemente, Hsu *et al.* (2007) compararam a eficiência de recuperação de enterovírus em água não tratada utilizando três membranas de concentração (membranas de nitrocelulose, eletronegativa e eletropostiva) e dois métodos de eluição [H_2SO_4 0,5 M + NaOH 1mM (*acid rinse)* e Glicina 0,05M pH 9,5 + extrato de carne 1,5% (*glycine rinse*)], totalizando seis combinações diferentes, que foram avaliadas quanto à detecção pelos método do número-mais-provável (MPN - *Most provável number)*-RT-PCR e Real time PCR. O procedimento, utilizando membrana de nitrocelulose e eluição com H_2SO_4 0,5 M + NaOH 1 mM, foi o método mais eficiente para concentração de enterovírus. Em relação ao método de detecção, não foi observado diferença significativa entre o uso de MPN-RT-PCR e qPCR. Entretanto, MPN-RT-PCR é economicamente mais viável.

Gassilloud *et al.* (2007) avaliaram a utilização de 8 tipos de membranas em combinação com diferentes tratamentos de eluição para recuperar poliovirus 1 adsorvidos em garrafas de água mineral previamente contaminadas, seguindo detecção molecular. Ao todo foram realizados 13 tratamentos e foi demonstrado que, para vírus RNA, a membrana de nylon carregada positivamente (Hybond N+ - Amersham pharma) obteve os melhores resultados de recuperação e que o melhor método de eluição das garrafas consiste de uma mistura de dodecil sulfato de sódio (SDS) e um detergente não aniônico (Triton X-100 ou Tween 80) com isotiocianato de guanidina, aquecida a 60°C.

Mais recentemente, Silva *et al.* (2010b) realizaram uma metanálise avaliando a eficácia do uso de três metodologias de concentração viral associadas à detecção molecular de AdVs em amostras de águas não tratadas. Ao todo foram selecionados 33 estudos e concluiu-se que: a) PCR não deve ser o método de escolha para detectar AdVs em amostras ambientais, devendo-se priorizar qPCR ou Nested-PCR; b) para detectar AdVs em amostras de rios ou lagos a metodologia de escolha deve ser uma associação entre ultracentrifugação e Nested-PCR; c) é aconselhável utilizar associação entre microfiltração em membrana, ultrafiltração e qPCR para detectar AdVs em amostras de esgotos tratados e não tratados.

Os estudos de Hsu *et al.* (2007), Gassiloud *et al.* (2007) e Silva *et al.* (2010b) ofereceram grandes contribuições para as pesquisas na área de virologia aquática. Entretanto, como *Silva et al.* (2010b) afirmam, ainda faz-se necessário a agregação de novos estudos na avaliação dos métodos empregados.

Apesar das divergências, muitos métodos para diagnosticar vírus em amostras ambientais ainda estão sendo padronizados ou desenvolvidos, o que muitas vezes gera confusões em relação a qual método utilizar. Espera-se que, com essa revisão atualizada dos métodos de diagnóstico virológico em águas, estes sejam mais bem compreendidos e sirvam como uma orientação para pesquisas acadêmico-científicas na área.

Atualmente, existe uma gama de trabalhos na área, e espera-se que em um futuro próximo o diagnóstico virológico da qualidade da água seja incorporado aos testes rotineiros de qualidade da mesma. Além disso, a detecção destes patógenos permitirá uma melhor definição das políticas de saúde pública e de saneamento público, uma vez que as doenças virais de veiculação hídrica, e até outras de rotas desconhecidas poderão ser identificadas e melhor estudas em um contesto eco-epidemiológico.

REFERÊNCIAS

ABBASZADEGAN, M., HUBER, M.S., GERBA, C.P. & PEPPER, I.L. 1993. Detection of enteroviruses in ground water by PCR. *Applied and Environmental Microbiology, 59*: 1318-1324.

ALBINANA-GIMENEZ, N., CLEMENTE-CASARES, P., BOFILL-MASS, S., HUNDESA, A., RIBAS, F. & GIRONES, R. 2006. Distribution of Human Polyoma-viruses, Adenoviruses, and Hepatitis E Virus in the Environment and in a Drinking-Water Treatment Plant. *Environmental Science & Technology, 40:* 7416-7422.

BARARDI, C.R.M., EMSLIE, K.R., VESEY, G. & WILLIAMS, K.L. 1998. Development of a rapid and sensitive quantitative assay for rotavirus based on flow cytometry. *Journal of Virological Methods, 74*: 31-38.

BARRELLA, K.M., GARRAFA, P., MONEZI, T.A.L., HÁRSI, C.M., SALVI, C., VIOLANTE, P.A.B.C. & MEHNERT, D.U. 2009. Longitudinal study on occurrence of adenoviruses and hepatitis A virus in raw domestic sewage in the city of Limeira, São Paulo. *Brazilian Journal of Microbiology, 40:* 102-107.

BELFORT, G., ROTEM, Y. & KATZENESLSON, E. 1974. Virus concentration using hollow fiber membranes. *Water Research, 9:* 79-85.

BEURET, C. 2004. Simultaneous detection of enteric viruses by multiplex real-time RE-PCR. *Journal of Virological Methods, 37:* 909-913.

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

BOOM, R., SOL, C.J.A., SALIMANS, M.M.M., JANSEN, C.J., WERTHEIMVAN- DILLEN, P.M.E. & VAN DER NOORDA, J. 1990. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *Journal of Clinical Microbiology, 28:* 495-503.

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

CASTIGNOLLES, N., PETIT, F., MENDEL, I., SIMON, L., CATTOLICO, L. & BUFFET-JANVRESSE, C. 1998. Detection of adenovirus in the waters of the Seine river estuary by nested-PCR. *Molecular and Cellular Probes, 12:* 175-180, 1998.

CARDUCCI, A., MORICI, P., PIZZI, F., BATTISTINI, R., ROVINI, E. & VERANI, M. 2008. Study of the viral removal efficiency in a urban wastewater treatment plant. *Science and Technology, 58:* 893-897.

CHANG, L.T., FARRAH, S.R. & BITTON, G. 1981. Positively charged filters for virus recovery from wastewater treatment plant e effluents. *Applied and Environmental Microbiology, 42:* 921-924.

CHAPRON, C.D., BALLESTER, N.A., FONTAINE, J.H., FRADES, C.N. & MARGONLIN, A.B. 2000. Detection of astroviruses, enteroviruses, and adenovirus types 40 and 41 in surface waters collected and evaluated by the information collection rule and an integrated cell culture-nested PCR procedure. *Applied and Environmental Microbiology, 66:* 2520-2525.

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

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

EL-SENOUSY, W.M., GUIX, S., ABID, I., PINTÓ, R.M. & BOSCH, A. 2007. Removal of Astrovirus from Water and Sewage Treatment Plants, Evaluated by a Competitive Reverse Transcription-PCR. *Applied and Environmental Microbiology, 73:* 164-167.

DE PAULA, V.S., DINIZ-MENDES, L., VILLAR, L.M., LUZ, S.L. B., SILVA, L.A., JESUS, M.S., DA SILVA, N.M.V.S. & GASPAR, A.M.C. 2007. Hepatitis A vírus in environmental water samples from the Amazon Basin. *Water Research, 41:* 1169-1176.

DUBOIS, E., LE GUYADER, F., HAUGARREAU, L., KOPECKA, H., CORMIER, M. & POMMEPUY, M. 1997. Molecular epidemiological survey rotaviruses in sewage by reverse transcriptase seminested pcr and restriction fragment length polymorphism assay. *Applied and Environmental Microbiology, 63:* 1794-1800.

FARRAH, S.R., GERBA, C.P., WALLIS, C. & MELNICK, J.L. 1976. Concentration of viruses form large volumes of tap water using pleated membrane filters. *Applied and Environmental Microbiology, 31*: 221-226.

FERGUSON, C., HUSMAN, A.M.D., ALTAVILLA, N., DEERE, D. & ASHBOLT, N. 2003. Fate and transport of surface water pathogens in watersheds. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology, 33:* 299-361.

FONG, T.T., GRIFFIN, D.W. & LIPP, E.K. 2005. Molecular Assays for Targeting Human and Bovine Enteric Viruses in Coastal Waters and Their Application for Library-Independent Source Tracking. *Applied and Environmental Microbiology, 71:* 2070-2078.

FORMIGA-CRUZ, M., HUNDESA, A., CLEMENTE-CASARES, P., ALBIÑANA-GIMENEZ N., ALLARD, A. & GIRONES, R. 2005. Nested Multiplex PCR assay detection of human enteric viruses in shellfish and sewage. *Journal of Virological Methods, 125:* 111-118.

FOUT, S., MARTINSON, B.C., MOYER, M.W. & DAHLING, D.R. 2003. A Multiplex Reverse Transcription-PCR Method for Detection of Human Enteric Viruses in Groundwater. *Applied and Environmental Microbiology, 69:* 3158-3164.

GASSILLOUD, B., HUGUET, L., MAUL, A. & GANTZER, C. Development of a viral concentration method for bottled water stored in hydrophobic support. *Journal of Virological Methods, 142:* 98-104.

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

GOODWIN, K.D. & LITAKER, R.W. 2008. Emerging technologies for monitoring recreational waters for bacteria and viruses. In: WALSH, P.J., SMITH, S.L., FLEMING, L. E., SOLO-GABRIELE, H.M. & GERWICK, W.H. (eds.). *Oceans and Human Health*. Amsterdam: Elsevier, Academic Press. p. 381-404.

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

GREENING, G.E., HEWIT, J. & LEWIS, G.D. 2002. Evaluation of integrated cell culture-PCR (C-PCR) for virological analysis of environmental samples. *Journal of Applied Microbiology, 93:* 745-750.

GREENING, G.E., WOODFIELD, L. & LEWIS, G.D. 1999. RT-PCR and chemiluminescent ELISA for detection of enteroviruses. *Journal of Virolical Methods, 82: 157-166.*

GRIFFIN, D.W., GIBSON, C.J., LIPP, E.K., RILEY, K., PAUL, J.H. & ROSE, J.B. 1999. Detection of viral pathogens by reverse transcriptase PCR and of microbial indicators by standard methods in the canals of the Florida Keys. *Applied and Environmental Microbiology, 65:* 4118-4125.

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

HARAMOTO, E., KATAYAMA, H. & OHGAKI, S. 2004. Detection of noroviruses in tap water in Japan by means of a new method for concentrating enteric viruses in large volumes of freshwater. *Applied and Environmental Microbiology, 70:* 2154-2160.

HARAMOTO, E., KATAYAMA, H., OGUMA, K., YAMASHITA, H. TAJIMA, A., NAKAJIMA, H. & OHGAKI, S. 2006. Seasonal profiles of human noroviruses and indicator bacteria in wastewater treatment plant in Tokyo, Japan. *Water Science and Technology, 54:* 301-308.

HARAMOTO, E., KATAYAMA, H., OGUMA, K. & OHGAKI, S. 2005. Application of cation-coated filter method to detection of noroviruses, enteroviruses, adenoviruses, and torque teno viruses in the Tamagawa River in Japan. *Applied and Environmental Microbiology, 71:* 2403-2411.

HARAMOTO, E., KATAYAMA, H., OGUMA, K. & OHGAKI, S. 2007a. Quantitative analysis of human enteric adenoviruses in aquatic

environments. *Journal of Applied Microbiology, 103:* 2153-2159.

HARAMOTO, E., KATAYAMA, H., OGUMA, K. & OHGAKI, S. 2007b. Recovery of naked viral genomes in water by virus concentration methods. *Journal of Virological Methods, 142:* 169-173.

HARAMOTO, E., KATAYAMA, H., UTAGAWA, E. & OHGAKI, S. 2008. Development of sample storage methods for detecting enteric viruses in environmental water. *Journal of Virological Methods, 151:* 1-6.

HAVELLAR, A.H., VAN OLPHEN, V. & DROST, Y. C. 1993. F-especific RNA bacteriophages are adequate model organism for enteric viruses in fresh-water. *Applied and Environmental Microbiology, 59:* 2956-2962.

HE, J.-W. & JIANG, S.2005. Quantification of enterococci and human adenoviruses in environmental samples by Real-Time PCR. *Applied and Environmental Microbiology, 71*: 2250-2255.

HILL, V.R., KAHLER, A.M., JOTHIKUMAR, N., JOHNSON, T.B., HAHN, D. & CROMEANS, T.L. 2007. Multistate evaluation of an ultrafiltration-based procedure for simultaneous recovery of enteric microbes in 100-liter tap water samples. *Applied and Environmental Microbiology, 73:* 4218-4225.

HILL, V. A., POLACZYK, A., HAHN, D., JOTHIKUMAR, N., CROMEANS, T., ROBERTS, J. & AMBURGEY, J. 2005. Development of a rapid method for simultaneously recovering microbes in drinking water using ultrafiltration with sodium polyphosphate and surfactants. *Applied and Environmental Microbiology, 71:* 6878-6884.

HOT, D., LEGEAY, O., JACQUES, J., GANTZER, C., CAUDRELIER, Y., GUYARD, K., LANGE, M. & ANDREOLETTI, L. 2003. Detection of somatic phages, infectious enteroviruses and enterovirus genomes as indicators of human enteric viral pollution in surface water. *Water Research, 37:* 4703-4710.

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

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

HURST C.J. 1991. *Presence of enteric viruses in freshwater and their removal by the conventional drinking water treatment process*. WHO Bulletin, Switzerland, v. 69, 113-119 p.

JIANG, S., DEZFULIAN, H. & CHU, W. 2005. Real-time quantitative PCR for enteric adenovirus serotype 40 in environmental waters. *Canadian Journal of Microbiology, 51:* 393-398.

JIANG, S., NOBLE, R. & CHU, W. 2001. Human adenoviruses and coliphages in urban runoff-impacted coastal waters of Southern California. *Applied Environmental Microbiology, 67*: 179-184.

JIANG, S., WANG, J. & ESTES, M.K. 1995. Characterization of SRSVs using RT-PCR and a new antigen ELISA-a short communication. *Archives of Virology, 140:* 363-374.

JURZIK, L., HAMZA, I.A., PUCHERT, W., ÜBERLA, K. & WILHELM, M. 2010. Chemical and microbiological parameters as possible indicators for human enteric viruses in surface water. *International Journal of Hygiene and Environmental Health, 213:* 210-216.

KARAMOCO, Y., IBENYASSINE, K., AITMHAND, R., IDAOMAR, M. & ENNAJI, M. M. 2005. Adenovirus detection in shellfish and urban sewage in Morocco (Casablanca region) by the polymerase chain reaction. *Journal of Virological Methods, 126:* 135-137.

KATAYAMA, H., HARAMOTO, E., OGUMA, K., YAMASHITA, H., TAJIMA, A., NAKAJIMA, H. & OHGAKI, S. 2008. One-year monthly quantitative survey of noroviruses, enteroviruses, and adenoviruses in wastewater collected from six plants in Japan. *Water Research, 42:* 1441-1448.

KATAYAMA, H., SHIMASAKI, A. & OHGAKI, S. 2002. Development of a virus concentration method and it's a application to detection of enterovirus and Norwalk virus from coastal seawater. *Applied and Environmental Microbiology, 68:* 1033-1039.

KATSURAGI, T. & TANI, Y. 2000. Screening for microorganisms with specific characteristics by flow cytometry and single-cell storing. *Journal of Bioscience and Bioengineering , 89:* 217-222.

KO, G., JOTHIKUMAR, N., HILL, V.R., MARK, D. & SOBSEY, M.D. 2005. Rapid detection of infections adenoviruses by mRNA real-time RT-PCR. *Journal of Virological Methods, 127:* 148-153.

KOOPMANS, M., BONDDORFF, C.H., VINJE, J., MEDICI, D. & MONROE, S. 2002. Foodborne viruses. *FEMS Microbiology Review, 26:* 87-205.

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

LA ROSA, G., POURSHABAN, M., IACONELLI, M. & MUSELLO, M. 2010. Quantitative real-time PCR of enteric viruses in influent and effluent samples from wastewater treatment plants in Italy. *Annali dell'Istituto Superiore di Sanità, 46:* 266-273.

LEE, S.H., LEVY, D.A., GRAUN, G.F., BEACH, M.J. & CALDERON, R.L. 2002. Surveillance for waterborne-disease outbreaks-United States, 1999-2000. *MMWR Surveill. Summ., 51:* 1-47.

LIDEN, K.G., THURSTON, J., SCHAEFER, R. & JR. MALLEY, J.P. 2007. Enhanced UV inactivation of adenoviruses under polychromatic UV lamps. *Applied and Environmental Microbiology, 73*: 7571-7574.

LEE, S.H. & KIM, S.J. 2002. Detection of infectious enteroviruses and adenoviruses in tap water in urban areas in Korea. *Water Research, 36:* 248-256.

LEE, C. & KIM, S.J. 2008. Molecular Detection of Enteric Viruses in Urban Rivers in Korea. *Journal of Microbiology and Biotechnology, 18:* 1156-1163.

LE GUYADER, F., HAUGARREAU, L., MIOSSEC, L., DUBOIS, E., POMMEPUY, M. 2000. Three-year study to assess human enteric viruses in shellfish. *Applied and Environmental Microbiology, 66*: 3241-3248.

LEEWIS, G.D. & METCALF, T.G. 1988. Polyethylene glycol precipitation for recovery of pathogenic viruses, including hepatitis A virus and human rotavirus, form oyster, water, and sediment samples. *Applied and Environmental Microbiology, 54:* 1983-1988.

LI, D., SHI, H.-C. & JIANG, S.C. 2010. Concentration of viruses from environmental waters using nanoalumina fiber filters. *Journal of Microbiological Methods, 81*: 33-38.

LOPMAN, B.A., REACHER, M.H., VAN DUJNHOVEN, Y., HANON, F.X., BROWN, D. & KOOPMANS, M. 2003. Viral outbreaks in Europe, 1995-2000. *Emerging Infectious Diseases, 9:* 90-96.

LUKASIK, J.T., SCOTT, T.M., ANDRYSHAK, D. & FARRAH, S.R. 2000. Influence of salts on virus adsorption to microporous filters. *Applied Environmental Microbiology, 66:* 2941-2920.

MACKAY, I.M. 2004. Real-time PCR in the microbiology laboratory. *Clinical Microbiology and Infection, 10:* 2943-2952.

MAMANE-GRAVETZ, H. & LINDEN, K.G. 2004. UV disinfection of indigenous aerobic spores: implication for UV validation in unfiltered waters. *Water Research, 38:* 2898-2906.

MENA, K.D. & GERBA, C.P. 2008. Waterborne Adenovirus. *Review of Environmental Contamination and Toxicology, 198:* 133-167.

METCALF, T.G., MELNICK, J.L. & ESTES, M.K. 1995. Environmental virology: from detection of virus in sewage and water by isolation to identification by molecular biology-a trip of over 50 years. *Annual Review of Microbiology, 49:* 461-487.

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

MEHNERT, D.U. & STEWIEN, K.E. 1993. Detection and distribution of rotavirus in raw sewage and creeks in São Paulo, Brazil. *Applied and Environmental Microbiology, 59*: 140-143.

MIAGOSTOVICH, M.P., FERREIRA, F.F.M., GUIMARÃES, F.R.,

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

MULLER-WEGENER, U. 1998. Interaction of humic substances with biota. In: FRIMMEL, F.H. & CHRISTMAN, R.F. (eds). *Humic substances and their role in the environment*. New York: John Wiley & Sons, Inc. p. 179-192.

MYRMEL, M., BERG, E.M.M., GRINDE, B. & RIMSTAD, E. 2006. Enteric viruses in inlet and outlet samples from sewage treatment plants. *Journal of Water and Health, 42:* 197-209.

NEBE-VON-CARON, G., STEPHENS, P. J., HEWIT, C.J., POWELL, J.R. & BADLEY, R.A. 2000. Analysis of bacterial function by multicolour fluorescence flow cytometry and single cell storing. *Journal of Microbiological Methods, 42:* 97-114.

NOVAIS, C.M. & ALVES, M.P. 2004. PCR em tempo real. *Revista Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento, 33:* 10-13.

NOBLE, R.T., ALLEN, S. M., BLACKWOOD, A.D, CHU, W., JIANG, S.C., LOVELACE, L., SOBSEY, M.D., STEWART, J.R. &WAIT, D.A. 2003.Use of viral pathogens and indicators to differentiate between human and non-human fecal contamination in a microbial source tracking comparison study. *Journal of Water and Health, 1:* 195-207.

PETERS, L., SLEDZ, W., JAN, B.H.W. & VAN DER WOLF, J.M. 2007. An enrichment microsphere immunoassay for the detection of Pectobacterium atrosepticum and Dickeya dianthicola in potato tuber extracts. *European Journal of Plant Pathology, 117:* 97-107.

PINA, S., PUIG, M.L.F., JOFRE, J. & GIRONES, R. 1998. Viral pollution in the environment and in shellfish: Human adenovirus detection by PCR as an index of human viruses. *Applied and Environmental Microbiology, 64:* 3376-3382.

PUIG, M., JOFRE, J., LUCENA, F., ALLARD, A., WADELL, G. & GIRONES, R. 1994. Detection of Adenoviruses and Enteroviruses in Polluted Waters by Nested PCR Amplification. Applied and *Environmental Microbiology, 60:* 2963-2970.

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

RIGOTTO, C., SINCERO, T.C.M., SIMÕES, C.M.O. & BARARDI, C.R.M. 2005. Detection of adenoviruses in shellfish by means of conventional-PCR, nested-PCR, and integrated cell culture PCR (ICC/PCR). *Water Research, 39:* 297-304.

RIGOTTO, C., KOLESNIKOVAS, C.K., MORESCO, V., SIMOES, C.M.O. & BARARDI, C.R.M. 2009. Evaluation of HA negatively charged membranes in the recovery of human adenoviruses and hepatitis A virus in different water matrices. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 104:* 970-974.

ROMANOVA, N., CORREDOR, J.C. & NAGY, E. 2009. Detection and quantification of fowl adenovirus genome by a real-time PCR assay. *Journal of Virological Methods, 159:* 58-63.

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

SAMBROOK, J. & RUSSEL, D. 2001. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 3 Ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press Section.

SCHVOERER, E., VENTURA, M., DUBOS, O., CAZAUX, G., SERCEAU, R., GOURNIER, N., DUBOIS, V., CAMINADE, P., FLEURY, H.J.A. & LAFON, M.E. 2001. Qualitative and quantitative molecular detection of enteroviruses in water from bathing areas and from a sewage treatment plant. *Research in Microbiology, 152:* 179-186.

SCHVOERER, E., BONNET, F., DUBOIS, V., CAZAUX, G., SERCEAU, R., FLEURY, H. J.A. & LAFON, M.E. 2000. PCR detection of human enteric viruses in bathing áreas, waste Waters and human stools in southwestern France. *Research in Microbiology, 151:* 693-701.

SILVA, H.D., WOSNJUK, L.A.C., SANTOS, S.F.O., VILANOVA-COSTA, C.A.S.T., PEREIRA, F.C., SILVEIRA-LACERDA, E.P., GARCÍAZAPATA, M.T.A & ANUNCIAÇÃO, C.E. 2010a. Molecular detection of adenoviruses in lakes and rivers of Goiânia, Goiás, Brazil. *Food and Environmental Virology, 2:* 35-40.

SILVA, H.D., ANUNCIAÇÃO, C.E. & GARCÍAZAPATA, M.T.A. 2010b. Avaliação de métodos de concentração e detecção molecular de adenovírus em águas não tratadas - uma metanálise. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología, 30:* 65-71.

SOULE, H., GENOULZ, O., GRATACAP-CAVALLIER, B., CHEVALLIER, P. & LIU, J.-X. 2000. Ultrafiltration and reverse transcription-polymerase chain reaction: an efficient process for poliovirus, rotavirus and hepatitis A virus detection in water. *Water Research, 34:* 1063-1067.

SPIRO, A. & LOWE, M. 2002. Quantitation of DNA sequences in environmental PCR products by a multiplexed, bead-based method. *Applied and Environmental Microbiology, 68*: 1010-1013.

TAVARES, T.M., CARDOSO, D. D. P. & DE BRIT0, W. M. E. D. 2005. Vírus Entéricos Veiculados Por Água: Aspectos Microbiológicos e de Controle de Qualidade da Água. *Revista de Patologia Tropical, 34:* 85-104.

USEPA. 1996. *ICR microbial laboratory manual. EPA 600R95178.* U.S. Environmental Protection Agency. Disponível em: <http://www.epa.gov./nerlcwww/icrmicro.pdf>. Acesso em: 13 jan. 2010.

USEPA. 2001. *Concentration and processing of waterborne viruses by positive charge1mds cartridge filters and organic flocculation.* In: *Manual of Methods for Virology. EPA/600/4-84/013 N9(14).* Cincinnati: U.S. Environmental Protection Agency. Cap. 14.

USEPA. 2009. *Drinking water contaminant candidate list 3; final notice. Fed. Regist. 74, 51850-51862.* Disponível em: <http: //www.epa.gov/EPA-WATER/2009/October/Day-08/w24287.htm>. Acesso em: 15 jul. 2010.

VAN HEERDEN, J., EHLERS, M. M., VIVIER, J. C. & GRABOW, W.O.K. 2005. Risk assessment of adenoviruses detected in treated drinking water and recreational water. *Journal of Applied Microbiology, 99:* 926-933.

VANTARAKIS, A.C. & PAPAPETROPOULOU, M. 1998. Detection of enteroviruses and adenoviruses in coastal waters of SW Greece by nested polymerase chain reaction. *Water Research, 32:* 2327-56.

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

VILLAR, L.M., DE PAULA, V.S., DINIZ-MENDES, L., LAMPE, B. & GASPAR, A.M. 2006. Evaluation of methods used to concentrate and detect hepatitis A vírus in water samples. *Journal of Virological Methods,137:* 169-176.

VIVES-REGO, J., LEBARON, P. & CARON, G.N.V. 2000. Current and future applications of flow cytometry in aquatic microbiology. *FEMS Microbiology Reviews, 24:* 429-448.

XAGORARAKI, I., KUO, D.H.W., WONG, K., WONG, M. & ROSE, J.B. 2007. Occurrence of Human Adenoviruses at Two Recreational Beaches of the Great Lakes. *Applied and Environmental Microbiology, 73:* 7874-7881.

WARD, R.L. & AKIN, E.W. 1984. Minimum infective dose of animal viruses. *Critical Reviews in Environmental Control, 14:* 297-310.

WEAVER, L.S. & KADAN, M.J. 2000. Evaluation of adenoviral vectors by flow cytometry. *Methods, 21:* 297-312.

WYN-JONES, A.P., CARDUCCI, A., COOK, N., D'AGOTINO, M., DIVIZA, M., FLEISCHER, J., GANTZER, C., GAWLER, A., GIRONES, R., HÖLLER, C., HUSMAN, A.M.R., KAY, D., KOZYRA, I., LÓPEZ-PILA, J., MUSCILLO, M., NASCIMENTO, M.S. N., PAPAGEORGIOU, G., RUTJES, S., SELLWOOD, J., SZEWZYK, R. & WYER, M. 2010. *Water Research (Article in Press):* 1-14.

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

Food Environ Virol (2011) 3:138–140
DOI 10.1007/s12560-011-9069-2

COMMUNICATION

Why the Use of Adenoviruses as Water Quality Virologic Marker?

Hugo D. Silva · Marco T. A. García-Zapata · Carlos E. Anunciação

Received: 4 September 2011 / Accepted: 7 October 2011 / Published online: 26 October 2011
© Springer Science+Business Media, LLC 2011

Abstract Adenovirus is the virus that contains the highest amount of features favorable to its use as a virologic marker for water quality. Those pathogens are resistant on the environment, abundant, easily detected by molecular methods and are of great importance in public health.

Keywords Adenovirus · Water · Virologic marker · Public health

Among hydric veiculation viruses, special attention should be given to adenoviruses (AdVs) because they have a number of features that justify their indication as a virologic marker for the quality of water. Human adenovirus (HAdV) are members of the genus *Mastadenovirus* in the *Adenoviridae* family (Echavarría 2008), which comprises 52 serotypes classified into 7 species (A–G) (Calgua et al. 2011).

AdVs are excreted in feces, urine, and respiratory secretions of infected individuals (Cabtree et al. 1997; Metcalf and Estes 1995; Jiang et al. 2001). Those viruses are very important in public health (Silva et al. 2010a), and have been included in the US Environmental Protection Agency's contaminant candidate list (EPA CCL) (USEPA 2009). Being responsible for a series of diseases such as common colds, pharyngitis, amygdalitis, gastroenteritis, and encephalitis and infections may be lethal in high risk patients, like immunosuppressed and children (Poddar 1999; Mena and Gerba 2008).

After rotavirus diseases, HAdVs are the second higher cause of gastroenteritis (Cabtree et al. 1997). Studies performed still in the 1960s already indicated that serotypes 1, 2, and 5 are responsible for 5–10% of the respiratory diseases in children (Brandt et al. 1969).

Among hydric veiculation viruses, studies have indicated the use of HAdVs as virologic indicators of human contamination (Puig et al. 1994; Carducci et al. 2008; Katayama et al. 2008), because they are prevalent in environmental waters (Lee and Kim 2008). Therefore, they are successfully detected in different environmental samples, such as waters in lakes and rivers (Xagoraraki et al. 2007; Silva et al. 2010a), sewage systems (Rodríguez-Díaz et al. 2009), treated waters (Verheyen et al. 2009), and swimming pools (van Heerden et al. 2005a).

Verheyen et al. (2009), analyzing 54 treated water samples have detected 12.9% of those as positive for AdV, against 2.1% of positivity for rotavirus. Lee and Kim (2008), assessing 54 river samples, obtained 45 (77.6%), 32 (55.2%), 12 (20.7%), 4 (6.9%), and 4 (6.9%) positive samples for AdV, enterovirus, reovirus, hepatitis A virus, rotavirus and sapovirus, respectively.

Although, being susceptible to chlorination disinfection (Thurston-Enriquez et al. 2003), studies have demonstrated the presence of viable AdVs in treated waters (van Heerden et al. 2003, 2005b). Furthermore, this is the aquatic pathogen more resistant to inactivation by ultra violet light (UV) (Liden et al. 2007). The inactivation of 4-log of AdVs requires a UV dose of 200 mJ/cm^2, considering that 30–40 mJ/cm^2 are sufficient to inactivate the remaining viruses (Gerba et al. 2002; Shin et al. 2005).

H. D. Silva (✉) · C. E. Anunciação
Laboratório de Diagnóstico Genético e Molecular, Instituto de Ciências Biológicas II, Universidade Federal de Goiás, Campus Samambaia, Caixa Postal 131, Goiânia, GO 74001-970, Brazil
e-mail: hdelleon@gmail.com

M. T. A. García-Zapata
Núcleo de Pesquisas em Agentes Emergentes e Re-emergentes, Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, Universidade Federal de Goiás, Caixa Postal 12911, Setor Leste Vila Nova, Goiânia, GO 74643-970, Brazil

The high infectivity and resistance of AdVs to UV disinfection processes is related to the fact that those viruses utilize the enzymes of the host during replication to repair damage to the DNA (Eischeid et al. 2009); one of the non damaged DNA bands serves as repairing mold (Fong and Lipp 2005); furthermore, the high molecular weight of those viruses also helps with the resistance to UV light (Gerba et al. 2002).

Thus, the inactivation of that virus is seriously compromised and the use of UV light in the treatment of water systems is unfeasible because it does not offer adequate conditions for water disinfection, depending on the desired volume, on the high speed of passage of water, of the short time of exposure to UV and even in relation to the high operational cost.

Moreover, heterotrophic bacteria and fecal coliforms usually utilized to assure the microbiological quality water (Lee and Kim 2002) do not assure the virologic quality; and can be just used to predict the possible viral contamination human (Jurzik et al. 2010).

HAdVs are remarkably resistant when present in the environment (Silva et al. 2011), and assures with reliability the presence of human contamination, because these viruses survive in environments where bacteria do not remain anymore (Enriquez et al. 1995). AdVs are more prevalent than noroviruses both in sea water and fresh water and are promising indicators of water quality in Europe (Wyn-Jones et al. 2011). In Japan, those pathogens are proposed as preferential viral indicators to certify water quality (Katayama et al. 2008). More recently, Silva et al. (2010b) stated that AdVs may possibly become the virologic indicator of choice to perform routine environmental monitoring.

The lack of a standard method for virologic analysis of water makes unfeasible to perform routine tests. Nevertheless, AdVs are being diagnosed with success using several methodologies with emphasis in adsorption–elution methods relying upon electrostatically charged microporous filters (Chen et al. 2006), following molecular detection. We should be sure that possibly we will not achieve a standard method for a single type of sample because the viral recovery rates for several types of water is not similar and the virus adsorption to the charged microporous membranes can be influenced by salts, multivalent cations, acid conditions (Haramoto et al. 2005, 2006), and several organic compounds which require differential methodologies identification. Definitively the cellular culture is not the method of choice for the implementation of virological analysis for adenovirus in aquatic environments (Silva et al. 2010b), which is expensive, labor-intensive and time-cosuming (Formiga-Cruz et al. 2005), and of difficult visualization of the cytopathic effect for serotypes 40 and 41 of the HAdVs (Jiang 2006). Furthermore, molecular techniques like PCR offer higher specificity and sensitivity in the diagnosis (Fong and Lipp 2005).

HAdVs detection as a virological index for water quality is not new, by the contrary, it is extremely defended by many scientists worldwide (Puig et al. 1994; Pina et al. 1998; Albinana-Gimenez et al. 2006; Wyn-Jones et al. 2011). However, it is not clear why these viruses are not yet used in the monitoring of the water's quality.

The use of microbiologic monitoring methods are unsuitable and known to be outdated, year after year have been conniving with virotic outbreaks and in some cases causing the death of individuals. A higher effort by the government is needed to solve this problem. As a measure to control outbreaks is suggested that the HAdVs are to be used as markers with the purpose of monitoring the quality of the water and hereby mentioned.

References

Albinana-Gimenez, N., Clemente-Casares, P., Bofil-Mas, S., Hundesa, A., Ribas, F., & Girones, R. (2006). Distribution of human polyomaviruses, adenoviruses, and hepatitis E virus in the environment and in a drinking-water treatment plant. *Environmental Science and Technology, 40*(23), 7416–7422.

Brandt, C. D., Kim, H. W., Vargosko, A. J., Jeffries, B. C., Arrobio, J. O., Rindge, B., et al. (1969). Infections in 18,000 infants and children in a controlled study of respiratory tract disease. I. Adenovirus pathogenicity in relation to serologic type and illness syndrome. *American Journal of Epidemiology, 90*(6), 484–500.

Cabtree, K. D., Gerba, C. P., Rose, J. B., & Haas, C. N. (1997). Waterborne adenovirus: A risk assessment. *Water Science and Technology, 35*(11–12), 1–6.

Calgua, B., Barardi, C. R. M., Bofil-Mas, S., Rodriguez-Manzano, J., & Girones, R. (2011). Detection and quantification of infectious human adenoviruses and JC polyomaviruses in water by immunofluorescence assay. *Journal of Virological Methods, 171*(1), 1–7.

Carducci, A., Morici, P., Pizzi, F., Battistini, R., Rovini, E., & Verani, M. (2008). Study of the viral removal efficiency in a urban wastewater treatment plant. *Water Science and Technology, 58*(4), 893–897.

Chen, Z., Hsu, F.-C., Battigelli, D., & Chang, H.-C. (2006). Capture and release of viruses using amino-functionalized silica particles. *Analytica Chimica Acta, 569*(1–2), 76–82.

Echavarría, M. (2008). Adenoviruses in immunocompromised hosts. *Clinical Microbiology Reviews, 21*(4), 704–715.

Eischeid, A. C., Meyer, J. N., & Linden, K. G. (2009). UV disinfection of adenoviruses: Molecular indicators of DNA damage efficiency. *Applied and Environmental Microbiology, 75*(1), 23–28.

Enriquez, C. E., Hurst, C. J., & Gerba, C. P. (1995). Survival of the enteric adenoviruses 40 and 41 in tap, sea, and wastewater. *Water Research, 29*(11), 2548–2553.

Fong, T.-T., & Lipp, E. K. (2005). Enteric viruses of human and animals in aquatic environments: Health risks, detection, and potential water quality assessment tools. *Microbiology and Molecular Biology Reviews, 69*(2), 357–371.

Formiga-Cruz, M., Hundesa, A., Clemente-Casares, P., Albinana-Gimenez, N., Allard, A., & Girones, R. (2005). Nested Multiplex PCR assay detection of human enteric viruses in shellfish and sewage. *Journal of Virological Methods, 125*(2), 111–118.

Gerba, C. P., Gramos, D. M., & Nwachuku, N. (2002). Comparative inactivation of enteroviruses and adenoviruses type 2 by UV light. *Applied and Environmental Microbiology, 68*(10), 5167–5169.

Haramoto, E., Katayama, H., Oguma, K., & Ohgaki, S. (2005). Application of cation-coated filter method to detection of noroviruses, enteroviruses, adenoviruses, and torque tenoviruses in the Tamagawa River in Japan. *Applied and Environmental Microbiology, 71*(5), 2403–2411.

Haramoto, E., Katayama, H., Oguma, K., Yamashita, H., Tajima, A., Nakajima, H., et al. (2006). Seasonal profiles of human noroviruses and indicator bactéria in wastewater treatment plant in Tokyo, Japan. *Water Science and Technology, 54*(11–12), 301–308.

Jiang, S. C. (2006). Human adenoviruses in water: Occurrence and health implications: A critical review. *Environmental Science and Technology, 40*(23), 7132–7140.

Jiang, S. C., Noble, R., & Chu, W. (2001). Human adenoviruses and coliphages in urban runoff-impacted coastal waters of southern California. *Applied and Environmental Microbiology, 67*(1), 179–184.

Jurzik, L., Hamza, I. A., Puchert, W., Überla, K., & Wilhelm, M. (2010). Chemical and microbiological parameters as possible indicators for human enteric viruses in surface water. *International Journal of Hygiene and Environmental Health, 213*(3), 210–216.

Katayama, H., Haramoto, E., Oguma, K., Yamashita, H., Tajima, A., Nakajima, H., et al. (2008). One-year monthly quantitative survey of noroviruses, enteroviruses, and adenoviruses in wastewater collected from six plants in Japan. *Water Research, 42*(6–7), 1441–1448.

Lee, S.-H., & Kim, S. J. (2002). Detection of infectious enteroviruses and adenoviruses in tap water in urban areas in Korea. *Water Research, 36*(1), 248–256.

Lee, C., & Kim, S. J. (2008). Molecular detection of enteric viruses in urban rivers in Korea. *Journal of Microbiology and Biotechnology, 18*(6), 1156–1163.

Liden, K. G., Thurston, J., Schaefer, R., & Malley, J. P., Jr. (2007). Enhanced UV inactivation of adenoviruses under polychromatic UV lamps. *Applied and Environmental Microbiology, 73*(23), 7571–7574.

Mena, K. D., & Gerba, C. P. (2008). Waterborne adenovirus. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology, 198*, 133–167.

Metcalf, T. G., & Estes, M. K. (1995). Environmental virology: From detection of virus in sewage and water by isolation to identification by molecular biology—a trip of over 50 years. *Annual Review of Microbiology, 49*, 461–487.

Pina, S., Puig, M., Lucena, F., Jofre, J., & Girones, R. (1998). Viral pollution in the environmental and in shellfish as NA índex of human viruses. *Applied and Environmental Microbiology, 64*(9), 3376–3382.

Poddar, S. K. (1999). Detection of adenovirus using PCR and molecular beacon. *Journal of Virological Methods, 82*(1), 19–26.

Puig, M., Jofre, J., Lucena, F., Allard, A., Wadell, G., & Girones, R. (1994). Detection of adenoviruses and enteroviruses in polluted waters by Nested PCR amplification. *Applied and Environmental Microbiology, 60*(8), 2963–2970.

Rodríguez-Díaz, J., Querales, J., Caraballo, L., Vizzi, E., Liprandi, F., Takiff, H., et al. (2009). Detection and characterization of waterborne gastroenteritis viruses in urban sewage and sewage-polluted river waters in Caracas, Venezuela. *Applied and Environmental Microbiology, 75*(2), 387–394.

Shin, G.-A., Linden, K. G., & Sobsey, M. D. (2005). Low pressure ultraviolet inactivation of pathogenic enteric viruses and bacteriophages. *Journal of Environmental Engineering and Science, 4*(S-1), 7–11.

Silva, H. D., Wosnjuk, L. A. C., Santos, S. F. O., Vilanova-Costa, C. A. S. T., Pereira, F. C., Silveira-Lacerda, E. P., et al. (2010a). Molecular detection of adenoviruses in lakes and rivers of Goiânia, Goiás, Brazil. *Food and Environmental Virology, 2*(1), 35–40.

Silva, H. D., Anunciação, C. E., & Garcíazapata, M. T. A. (2010b). Avaliação de métodos de concentração e detecção molecular de adenovírus em águas não tratadas—uma metanálise. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiologia, 30*(1), 65–71.

Silva, H. D., Santos, S. F. O., Lima, A. P., Silveira-Lacerda, E. P., Anunciação, C. E., & Garcíazapata, M. T. A. (2011). Correlation analysis of the seasonality of adenovirus gene detection and water quality parameters based on yearly monitoring. Water Quality, Exposure and Health. doi:10.1007/s12403-011-0047-6.

Thurston-Enriquez, J. A., Haas, C. N., Jacangelo, J., & Gerba, C. P. (2003). Chlorine inactivation of adenovirus type 40 and feline calicivirus. *Applied and Environmental Microbiology, 69*(7), 3979–3985.

U.S. Environmental Protection Agency - USEPA (2009). *Drinking Water Contaminant Candidate List 3—Final*. Federal Register [Notice] (pp. 51856). Washington, DC.

van Heerden, J., Ehlers, M. M., van Zyland, W. B., & Grabow, W. O. K. (2003). Incidence of adenoviruses in raw and treated water. *Water Research, 37*(15), 3704–3708.

van Heerden, J., Ehlers, M. M., & Grabow, W. O. K. (2005a). Detection and risk assessment of adenoviruses in swimming pool water. *Journal of Applied Microbiology, 99*(5), 1256–1264.

van Heerden, J., Ehlers, M. M., Vivier, J. C., & Grabow, W. O. K. (2005b). Risk assessment of adenoviruses detected in treated drinking water and recreational water. *Journal of Applied Microbiology, 99*(4), 926–933.

Verheyen, J., Timmen-Wego, M., Laudien, R., Boussaad, I., Sen, S., Koc, A., et al. (2009). Detection of adenoviruses and rotaviruses in drinking water sources used in rural areas of Benin, West Africa. *Applied and Environmental Microbiology, 75*(9), 2798–2801.

Wyn-Jones, A. P., Carducci, A., Cook, N., D'Agotino, M., Diviza, M., Fleischer, J., et al. (2011). Surveillance of adenoviruses and noroviruses in European recreational waters. *Water Research, 45*(3), 1025–1038.

Xagoraraki, I., Kuo, D. H.-W., Wong, K., Wong, M., & Rose, J. B. (2007). Occurrence of human adenoviruses at two recreational beaches of the Great Lakes. *Applied and Environmental Microbiology, 73*(24), 6874–7881.

Artigo 3 - Alto número de cópias genômicas de adenovírus humano C em água tratada de área neotropical

Silva, Hugo Delleon.

Núcleo de Pesquisas em Agente Emergentes e Re-emegentes, Universidade Federal de Goiás, Brazil

Resumo

Em áreas neotropicais, são escassas as informações sobre a ocorrência de adenovírus humano (HAdV) em água tratada. Desta forma, o presente estudo propôs quantificar e caracterizar molecularmente os HAdVs detectados em amostras de água tratada de uma região de cerrado do Brasil. Para tal, durante os meses de agosto a novembro de 2012, foram coletadas amostras de água de 4 reservatórios de água tratada e de seus respectivos pontos na rede de distribuição na cidade de Goiânia, totalizando 80 amostras. Amostras de água foram concentradas, analisadas por qPCR e parte destas sequenciadas. A análise de qPCR demonstrou 76,6% (10^0 - 10^9 CG.mL^{-1}) e 37,5% (10^1 - 10^8 CG.mL^{-1}) de amostras positivas para os reservatórios e seus pontos na rede de distribuição respectivamente. Todas as amostras selecionadas para sequenciamento compatíveis com HAdVs espécie C. Este estudo relata um valor de CG.mL^{-1} de HAdV não detectado em nenhum outro trabalho com água tratada. Este dado merece especial atenção, sobretudo das autoridades sanitárias.

Palavras-chave: adenovírus humano, agua tratada, sequenciamento, qPCR.

Introdução

Tradicionalmente, coliformes e bactérias heterotróficas são utilizadas para atestar a qualidade microbiológica da água (Lee e Kim 2002). Todavia, já se sabe que tais parâmetros não asseguram a qualidade virológica da mesma (Le Guyader et al. 2000; Formiga-Cruz et al. 2003; Hsu et al. 2007).

Assim, os adenovírus humano (HAdVs), vírus frequentes em dejetos humanos, têm sido fortemente indicados como marcadores virológicos da qualidade de águas tratadas e não tratadas (Wyn-Jones et al. 2011; Silva et al. 2011a; Fongaro et al. 2013). Os HAdVs fazem parte da família *Adenoviridae*, gênero *Mastadenovirus*, que possui 57 diferentes sorotipos distribuídos em 7 espécies (A-G) (King et al. 2011).

Com a incorporação de técnicas que permitiram a quantificação genômica com maior sensibilidade e especificidade, tal como a Real Time PCR quantitativa (qPCR), e em razão à pressão por água com segurança microbiológica (Albinana-Gimenez et al. 2009), os HAdVs vêm sendo detectados e quantificados com êxito em águas tratadas de diferentes regiões do mundo (Lambertini et al. 2008; Albinana-Gimenez et al. 2009; Ryu et al. 2010).

Além da quantificação, é de suma importância realizar a caracterização molecular dos sorotipos circulantes nas amostras de água tratada, pois é base para estudos eco-epidemiológicos, de análise de risco e tomada de decisões em saúde ambiental.

Geralmente, observa-se certa divergência entre os sorotipos de HAdVs detectados em diferentes regiões. Lee e Kim (2002) encontram em águas tratadas da Coréia os sorotipos 40, 41, 1, 5 e 6. Já van Heerden et al. (2005) detectaram em amostras de água tratada da Alemanha os sorotipos 40, 41 e espécies D.

Estudos que realizam a caracterização molecular de HAdVs detectados em água tratada de áreas neotropicais são escassos e inexistentes na região Centro-Oeste do Brasil, onde encontra-se o bioma cerrado, um dos pontos quentes (*hot spots*) para a conservação da biodiversidade no mundo (Myers et al. 2000). Nesta região, Silva et al. (2010) detectaram adenovírus em águas de rio e lagos da cidade de Goiânia, mas o monitoramento não foi estendido para as águas tratadas e nem realizado a quantificação dos sorotipos circulantes.

Assim, o objetivo deste estudo, foi de quantificar e caracterizar molecularmente os sorotipos de HAdVs detectados no sistema de abastecimento de água tratada da cidade Goiânia, Goiás, Brasil.

Metodologia

Coleta e concentração das amostras

A Figura 1 demonstra um mapa do município de Goiânia contemplando os 8 pontos de coleta utilizados. Foram coletadas amostras em 4 reservatórios: Senac (R1), Serrinha (R2), Atlântico (R3) e Cristina (R4) com seus respectivos pontos na rede de distribuição de água tratada (P1, P2, P3 e P4). Os reservatórios recebem água tratada de ciclo completo (coagulação, floculação, decantação, filtração, desinfecção pelo cloro e correção do pH) e redistribuem esta água para os vários bairros da cidade. Os pontos de distribuição utilizados foram os mesmos pontos monitorados pela empresa de Saneamento Público de Goiás (Saneago/GO).

As amostras foram coletadas durante o segundo semestre de 2012, nos meses de agosto a novembro, totalizando 80 amostras, 10 amostras para cada reservatório e para seu respectivo ponto na rede de distribuição.

Foram coletadas amostras de água em galões de polietileno com capacidade para 5 L diretamente de torneiras na saída dos reservatórios ou na chegada das residências (água da rua). Todo o procedimento de coleta e concentração das amostras foi realizado de acordo com Silva et al. (2010). O concentrado foi armazenado a – 80 °C até uso.

Extração de DNA

Um volume de 200µL de concentrado foi utilizado para a extração de ácidos nucléicos utilizando o kit comercial QIAamp MinElute Virus Spin Kit (QIAGEN).

Quantificação do Genoma viral por PCR quantitativa (qPCR)

A qPCR foi realizada de acordo com Hernroth et al. (2002). As amostras de DNA foram diluídas 1:10 para evitar inibições. Todas as reações foram feitas em triplicata, utilizando-se no mínimo quatro padrões (diluições 1:10 de plasmídeos pBR322 contendo parte do gene hexon) e água ultrapura como controle não-alvo (NTC). Foi utilizado o aparelho StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems) em todos os ensaios. O resultado adquirido em $CG.mL^{-1}$ foi definido com a média dos dados obtidos.

Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Os iniciadores utilizados foram inicialmente descritos por Allard et al. (2001). A PCR foi realizada unicamente para as amostras positivas por qPCR. Para a reação com o par de iniciadores hex1deg e hex2deg foi utilizado 5 µL de DNA extraído em uma reação contendo 1x de tampão (20 mM Tris-HCl pH 8.4, 50 mM KCl), 200 µM de cada dNTP (dATP, dCTP, dTTP e dGTP), 1,5 mM de $MgCl_2$, 0,2 µM de cada iniciador e 0,25 U de Taq DNA Polimerase, para um volume final de 25 µL. O programa de amplificação consistiu de desnaturação inicial a 94 ºC por 5 min seguido de 35 ciclos de 94 ºC para desnaturação durante 30 seg, 55 ºC para anelamento por 30 seg e 1 min a 72 ºC para extensão. A extensão final foi de 72 ºC por 7 min.

Na segunda PCR (nested-PCR), 5 µL do produto da primeira PCR foram adicionados em uma reação mix para um volume final de 25 µL contendo 0,5 µM de cada iniciador (nehexdeg3 e nehexdeg 4), 1x de tampão (20 mM Tris-HCl pH 8.4, 50 mM KCl), 100 µM de cada dNTP, 1,5 mM de $MgCl_2$ e 0,25 U de Taq DNA Polimerase. O programa de amplificação foi idêntico ao utilizado para a PCR.

Os controles positivo (DNA de HAdV-5) e negativo (água ultrapura) foram utilizados em todas as reações. Os produtos amplificados de nested-PCR foram separados por eletroforese em gel agarose 1,5% (UltraPureTM Agarose, Invitrogen) durante 1h a 120 V e 70 mA e visualizados sob radiação UV. Os *amplicons* que comparados com o peso molecular (100 pb DNA ladder, Invitrogen, Brazil) exibiam ~171 pb foram classificados como positivos. Os *amplicons com concentração acima de 50 ng/L*foram selecionados e purificados com o kit AxyPrep DNA Gel Extraction (AXYGEN) e armazenados a – 20 °C.

Sequenciamento e caracterização molecular

Foram selecionados 8 *amplicons* purificados, um para cada reservatório e ponto amostrado, e diretamente sequenciados utilizando o kit DYEnamic ET - *Dye Terminator Cycle Sequencing Kit for MegaBACE DNA Analysis Systems* (*GE Healthcare*) de acordo com recomendações do fabricante. A programação de ciclagem foi de 30 ciclos de 95 °C 20 seg, 55 °C 15 seg e 60 °C 1 min. Os iniciadores da nested-PCR foram utilizados em uma concentração de 0,05 M por reação. Os *amplicons* foram sequenciados nas duas direções da fita de DNA, utilizando o analisador automático de DNA 3100 da *Applied Biosystems*. A análise de base *calling* foi conduzida pelo software *Sequencing Analysis* da *Applied Biosystems*.

As sequências obtidas pelo sequenciamento foram comparadas com as sequências depositadas no banco de dados do GenBank utilizando o programa BLAST, na sua versão BLASTn, do NCBI (*The National Center for Biotechnology information*, http://www.ncbi.nlm.gov/BLAST/). As 8 amostras de *amplicons* sequenciadas foram alinhadas e editadas utilizando os softwares ClustalX2 (Thompson et al., 1997) e BioEdit (Hall, 1999) respectivamente. Após o alinhamento e edição das sequências, uma matriz de distância genética entre estas amostras foi produzida utilizando o modelo evolutivo JC69 (Jukes e Cantor 1969). A árvore filogenética elucidativa da relação de semelhança entre as amostras de *amplicons* foi construída utilizando esta matriz de distância genética com base na metodologia de Neighbour-Joining. Foram utilizados 10.000 *bootstraps* para validar a confiança dos nós filogenéticos produzidos. A diversidade nucleotídica foi estimada com base nos estimadores de diversidade nucleotídica π (Nei e Li 1979) e θ utilizando o software MEGA 5.0 (Tamura et al., 2011). A visualização da árvore filogenética foi feita utilizando o software FigTree (http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree).

Resultados

No total, as análises de qPCR demonstraram que 52,5% (42/80) das amostras foram positivas para o HAdV, correspondendo a 18,75 (15/80) e 33,75% (27/80) das amostras coletadas nos pontos e reservatórios respectivamente (*dados não mostrados*). Analisando em separado, 76,6% (27/40) das amostras dos reservatórios foram positivas, contra 37,5% (15/40) de positividade nos pontos da rede de distribuição. Nos reservatórios, a enumeração de $CG.mL^{-1}$ variou de 10^0 a 10^9 (média de $1,01 \times 10^9$), já nos pontos da rede de distribuição de água, esta variação foi 10^1 a 10^8 (média de $3,42 \times 10^7$). Os resultados das amostras positivas por qPCR são mostrados na Tabela 1. Nos reservatórios, com exceção de R2, o valor das $CG.mL^{-1}$ foram sempre elevadas. Contrariamente, comparado com os demais pontos da rede de distribuição, o ponto do reservatório R2 (P2) apresentou o maior número de $CG.mL^{-1}$ (Tabela 1).

. Os resultados da análise BLASTn mostraram uma cobertura média de 72,50% dos *amplicons* sequenciados em relação às amostras depositadas no banco de dados do NCBI. Em média, 91% dos nucleotídeos sequenciados apresentavam identidade com as amostras do banco de dados, o que produziu um *e-value* médio de 4.10^{-52}.

Todas as amostras sequenciadas apresentaram similaridade entre si, mostrando positividade para o adenovírus humano espécie C. Dentre estas, foi possível identificar que as amostras P3 e R4 correspondiam aos sorotipos 2 e 5, respectivamente.

As amostras apresentaram nível de diversidade nucleotídica (π) mediano, com um $\pi = 0.0842$ e um valor de $\theta = 0.090$. O número de haplótipos identificado foi igual ao número de sequências amostradas, isto é, 8. Dentre os sítios analisados, 104 (24,18%) foram considerados sítios polimórficos e 40 sítios (9,30%) filogeneticamente informativos.

A distância genética média entre as 8 sequênciasfoi de aproximadamente 0.070, mostrando existir uma elevada similaridade genética entre as oito amostras coletadas nos diferentes sítios de coleta (Tabela 2). A árvore filogenética, construída com base na metodologia de Neighbour-Joining (Figura 2), mostrou a existência de dois grupos, ou seja, as oito amostras de *amplicons* podem ser claramente estruturadas em dois subgrupos. Estes grupos não se referem aos locais de coleta específicos. O grupo 1, formado por cinco sequências, refere-se à três amostras coletadas em pontos de abastecimento (P1, P2 e P4) enquanto as outras duas foram coletadas em reservatórios (R2 e R3). O segundo grupo, foi formado por três amostras, duas delas coletadas em reservatórios (R1 e R4) e outra coletada num ponto de abastecimento (P3). É interessante perceber que as amostras identificadas como os sorotipos 2 e 5 formam um grupamento monofilético, indicando elevada semelhança genética entre elas, mesmo que tenham sido coletadas em pontos diferentes.

Discussão

Em Goiânia, as fontes primárias de abastecimento da cidade são o rio Meia Ponte e o Ribeirão João Leite, responsáveis pelo abastecimento de cerca 48,0% e 52,0% da população respectivamente. Nestas fontes, um estudo sazonal realizado por Silva et al. (2010) detectou 47,60% e 55,50% de amostras contaminadas com adenovírus no Ribeirão João Leite e rio Meia Ponte respectivamente. Estes dados estão em consonância com os dados aqui obtidos, pois R1 e R2 recebem água do Sistema João Leite, onde foram detectadas 8 amostras positivas, enquanto R3 e R4 do Sistema Meia Ponte, com 19 amostras positivas. Estes resultados inclusive podem ser extrapolados para os pontos na rede de distribuição, pois foram detectadas 10 amostras positivas para P3+P4, contra 05 amostras positivas para P1+P2. Assim, há uma maior contaminação das águas por adenovírus nos reservatórios e pontos do Sistema Meia Ponte. Isso pode ter ocorrido em razão do rio Meia Ponte sabidamente receber esgoto clandestino antes da captação da água para tratamento (Silva et al. 2010).

Os resultados obtidos são de suma importância em saúde pública, pois mostram que há contaminação da água tratada da cidade de Goiânia por HAdVs. Apesar da qPCR não inferir infecciosidade, muitos estudos relatam a detecção de HAdVs infecciosos em águas tratadas de diferentes regiões do mundo (Rigotto et al. 2010; Dong et al. 2010; Calgua et al. 2011).

A detecção destes patógenos é seriamente influenciada pela metodologia de concentração (Silva et al. 2011b). Normalmente, o volume amostral utilizado para se concentrar adenovírus em água tratada varia de 10 a 1.500 L (Lambertini et al. 2008; Albinana-Gimenez et al. 2009; Dong et al. 2010), sendo que, o volume de amostra utilizado neste estudo (5 L) foi a metade do volume utilizado por Silva et al. (2010) utilizando a mesma metodologia de detecção em água de rios e lagos da cidade de Goiânia.

Assim, era de se esperar que a positividade em águas tratadas da cidade Goiânia fosse menor, mas contrariamente, isso não ocorreu.

Esse elevado número de amostras de água positivas esta relacionado ao elevado grau de contaminação das mesmas, que foi confirmado pela enumeração em $CG.mL^{-1}$ (Tabela 1). As quantificações de HAdVs em água tratada de trabalhos correlatos relatam uma variação de $10^0 – 10^3$ $CG.mL^{-1}$ (Albinana-Gimenez et al. 2009; Lambertini et al. 2008, Fongaro et al. 2013). Em amostras de rios e lagos varia de 10^0 a 10^8 $CG.mL^{-1}$ (Xagroraraki et al. 2007; Albinana-Gimenez et al. 2009; Calgua et al. 2011; Fongaro et al. 2012). Os adenovírus são estáveis em meio ambiente, sendo o vírus mais prevalente em esgotos (Metcalf e Estes 1994; Parasidis et al. 2013) com média de 10^2 a 10^5 $CG.mL^{-1}$ (He Jiang 2005; Muscillo et al. 2008). Assim, os dados aqui obtidos, demonstram que a média tanto dos pontos da rede de distribuição quanto dos reservatórios estão muito acima dos valores detectados em amostras ambientais sem tratamento. Entretanto, deve-se ressaltar que ocorreu uma grande variação nos dados, sobretudo nas amostras oriunda dos R4, R3 e P2, onde a média global foi elevada pela incorporação de amostras com alto valor em $CG.mL^{-1}$.

Ainda em relação à média de $CG.mL^{-1}$, com exceção de R2, a média dos demais reservatórios foi sempre maior do que seus respectivos pontos na rede de distribuição. Além disso, a positividade também foi maior nos reservatórios do que nos seus respectivos pontos na rede de distribuição (Tabela 1). Esta alta positividade nos reservatórios em detrimento dos pontos na rede de distribuição pode ser explicada pelo efeito de diluição dos vírus e degradação dos mesmos durante o percurso até as residências, considerando o sistema como integrado, contínuo e sem contaminações.

Apesar das limitações da qPCR em mensurar infecciosidade, a qPCR pode ser indicada para avaliar a remoção dos vírus em água tratada (Albinana-Gimenez et al. 2009). Assim, deve-se questionar o atual modelo de tratamento da água, que não foi capaz de remover eficientemente os HAdVs presentes na água bruta captada para tratamento. Tal como afirma Koopmans et al. (2002), o atual modelo de tratamento de águas é ineficaz na remoção e eliminação dos vírus (Koopmans et al. 2002; Bosch et al. 2008), sendo incapaz de fornecer água ausente de vírus (Bosch et al. 2008). A situação se torna ainda mais grave, pois no Brasil e demais países neotropicais, não existem leis específicas que asseguram a detecção e o monitoramento virológico da água de uso e consumo humano. Nos países industrializados, na vanguarda da virologia ambiental, estes patógenos são implicados com os principais causadores das gastroenterites (Lopman et al. 2003).

Em relação à caracterização molecular dos sorotipos de HAdV circulantes, todos os *amplicons* sequenciados foram pertencentes a espécie C. Os HAdVs da espécie são conhecidos por causar infecções respiratórias (Wold e Horwitz 2007). Os sorotipos 2 e 5 detectados são responsáveis por desencadear faringites agudas e acometem principalmente crianças e recém-nascidos (Mena e Gerba 2008).

Os valores de *bootstrap* foram elevados, nenhum dado abaixo de 50% e isso indica a confiança na árvore filogenética produzida (Figura 2), que apresenta dois grupos filogenéticos bem delimitados. O Grupo 1 (amostras R2, R3, P1, P2 e P4) e o Grupo 2 (amostras R1, R4 e P3). Pela análise da árvore, existe um forte indício de que as amostras P3 e R4 sejam respectivamente os sorotipos 2 e 5. As

amostras presentes nos grupo 1 podem estar relacionadas com outros sorotipos diferentes dentro da espécie C.

A maior ocorrência de HAdVs da espécie C em águas neotropicais é corroborada por pesquisas desenvolvidas por Moresco et al. (2012) e Fongaro et al. (2013), que encontraram maior prevalência de HAdV-2 em amostras de água ambiental e tratada na região sul do Brasil. Contrariamente, uma maior ocorrência dos sorotipos gastroentéricos (HAdV-40 e 41) são detectados em águas ambientais da América do Norte e da Europa (Chapron et al. 2000; Wyn-Jones et al. 2011).

Tanto os sorotipos respiratórios quanto os gastroentéricos podem ser isolados de águas ambientais (Mena e Gerba 2008). Entretanto, ainda são escassos os dados referentes à prevalência destes patógenos, sobretudo em águas tratadas de regiões neotropicais. Assim, é necessário um incremento de estudos nessa área, para que haja uma melhor compreensão da dinâmica dos HAdVs nas diferentes matrizes de água ao redor do mundo.

Na cidade de Goiânia, de Freitas et al. (2010) relataram a ocorrência clínica de HAdVs em amostras diarreicas de crianças, demonstrando a presença de HAdV-5 e dos sorotipos gastroentéricos (HAdV40/41), que em razão da natureza da amostra, foram os mais frequentes. De qualquer modo, estes achados clínicos em associação com os dados aqui apresentados, mostram que a água tratada pode fornecer algum risco, sobretudo para a população pediátrica, e esta assertiva deve ser avaliada em estudos futuros, acessando a infecciosidade viral e a análise sazonal dos dados.

A pesquisa aqui realizada foi pontual, e uma melhor avaliação dos pontos amostrados deve ser realizada, até mesmo porque os valores de $CG.mL^{-1}$ foram extremamente elevados. A detecção destes patógenos ocorreu em um período chuvoso, em que há maior percolação de matéria orgânica oriunda de dejetos humanos e isso pode ter influenciado no elevado número de cópias genômicas. Além disso, as encanações ao longo da rede de distribuição podem sofrer infiltrações e contaminações exógenas, as quais não foram avaliadas.

É importante também considerar a alta taxa de replicação dos HAdVs nos indivíduos e sua mutabilidade, haja vista que o favorecimento da frequente passagem desses vírus pelos seus hospedeiros pode gerar partículas virais mais patogênicas. Isto aumenta a necessidade do desenvolvimento de eficientes metodologias de monitoramento, remoção e inativação de vírus em água tratada, sobretudo no atual contexto, com o aumento da população de indivíduos mais susceptíveis, como idosos, imunossuprimidos e imunodeprimidos.

Assim, os dados aqui apresentados podem oferecer contribuições importantes na compreensão da eco-epidemiologia das adenoviroses na região central do Brasil, área de cerrado, e mesmo demais patógenos de veiculação hídrica, assim como auxiliar em análise de risco e tomadas de decisões na área de saúde.

Conclusão

Adenovírus humano C estão presentes na água tratada da cidade de Goiânia. O modelo atual de tratamento da água é ineficaz na remoção viral, sugerindo a implementação do HAdV como marcador viral para avaliação da remoção viral pós-tratamento da água.

Referências Bibliográficas

Albinana-Gimenez, N., Miagostovich, M. P., Calgua, B., Huguet, J. M., Matia, L., Girone, R. (2009). Analysis of adenoviruses and polyomaviruses quantified by qPCR as indicators of water quality in source and drinking-water treatment plants. *Water Research*, 43(7), 2011-2019.

Allard, A., Albinsson, B., Wadell, G. (2001). Rapid typing of human adenoviruses by a general PCR combined with restriction endonuclease analysis. *Journal of Clinical Microbiology*, 39(2), 498-505.

Bosch, A., Guix, S., Sano, D., Pintó, R. M. (2008). New tools for the study and direct surveillance of viral pathogens in water. *Current Opinion in Biotechnology*, 19(3), 295-301.

Calgua, B., Barardi, C.R.M., Bofill-Mas, S., Rodriguez-Manzano, J., Girones, R. (2011). Detection and quantification of infectious human adenoviruses and jc polyomaviruses in water by immunofluorescence assay. *J Virol Methods*, 171(1), 1-7.

Chapron, C. D., Ballester, N.A., Fontaine, J. H., Frades, C.N., Margonlin, A.B. (2000). Detection of astroviruses, enteroviruses, and adenovirus types 40 and 41 in surface waters collected and evaluated by the information collection rule and an integrated cell culture-nested PCR procedure. *Appl Environ Microbiol.*, 66(6), 2520-2525.

de Freitas, E. R. L., Borges, A. M. T., Fiaccadori, F. S., e Souza, M. B. L. D., Cardoso, D. das D. P. (2010). Molecular characterization of adenovirus detected from fecal samples obtained from children in the Central West region of Brazil. *Archives of Virology*, 155(10),1693–1696.

Dong, Y., Kim, J., Lewis, G. D. (2010). Evaluation of methodology for detection of human adenoviruses in wastewater, drinking water, stream water and recreation waters. *Journal of Applied Microbiology*, 108(3), 800-809.

Fongaro, G., do Nascimento, M. A., Rigotto, C., Ritterbusch, G., da Silva, A, D. A., Esteves, P. A., Barardi, C. R. (2013). Evaluation and molecular characterization of human adenovírus in drinking water supplies: viral integrity and viability assays. *Virology Journal*, 10, 166.

Fongaro, G., Nascimento, M. A., Viancelli, A., Tonetta, D., Petrucio, M. M., Barardi, C. R. M. 2012. Surveillance of human viral contamination and physicochemical profiles in a surface water lagoon. *Water Science and Technology*, 66(12), 2682-2686.

Formiga-Cruz, M., Allard, A.K., Conden-Hansson, A.C., Hensilwood, H., Hernroth, B.E., Jofre, J., Lees, D.N., Lucena, F., Papapetropoulou, R.E., Rangdale, A., Tsibouxi, A., Vantarakis, A., Girones, R. (2003). Evaluation of potential indicators of viral contamination in shellfish with applicability to diverse geographical areas. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(3), 1556-1563.

Hall, T.A. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, 41:95-98.

He, J.W., Jiang, S. (2005). Quantification of Enterococci and Human Adenoviruses in Environmental Samples by Real-Time PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(5), 2250-2255.

Hernroth, B. E., Conden-Hansson, A. C., Rehnstam-Holm, A. S., Girones, R., Allard, A. K. (2002). Environmental factors influencing human viral pathogens and their potential indicator organisms

in the blue mussel, Mytilus edulis: the first Scandinavian report. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(9), 4523-4533.

Hsu, B.M., Chen, C.H., Kung, C.M., Wan, M.T., Shen, S.M. (2007). Evaluation of enterovirus recovery in surface water by different adsorption and elution procedures. *Chemosphere*, 66(5), 964-969.

Jukes TH and Cantor CR (1969). Evolution of Protein Molecules. *New York: Academic Press*, (pp. 21–132).

King A.M.Q., Adams, M.J., Carstens, E.B., Lefkowitz, E.J., King, A., Lefkowitz, E., Adams, M., Carstens, E. (2011). Virus Taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses. Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses, (pp. 125-141). Elsevier, Academic Press, San Diego.

Koopmans, M., Bonddorff, C. H., Vinje, J., Medici, D., Monroe, S. (2002). Foodborne Viruses. *Microbiology Reviews*, 26 (2), 187-205.

Lambertini, E., Spencer, S. K., Bertz, P. D., Loge, F. Jl, Kieke, B. A., Borchardt, M. A. (2008). Concentration of enteroviruses, adenoviruses, and noroviruses from drinking water by use of glass wool filters. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(10), 2990-2996.

Le Guyader, F., Haugarreau, L., Miossec, L., Dubois, E., Pommepuy, M. (2000). Three-year study to assess human enteric viruses in shellfish. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(8), 3241-3248.

Lee, S.-H., kim, S.-J. (2002) Detection of infectious enteroviruses and adenoviruses in tap water in urban areas in Korea. *Water Research*, 36(1), 248–256.

Lopman, B. A., Reacher, M. H., Van Dujinhoven, Y., Hanon, F.X., Brown, D., Koopmans, M. Viral Outbreaks In Europe, 1995–2000. (2003). *Emerg Infect Dis,United States*, 9(1,9), 90-96.

Mena, K. D., and Gerba, C.P. (2008). Waterborne adenovirus. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, 198, 133-167.

Metcalf, T. G., and Estes, M.K. (1995). Environmental virology: from detection of virus in sewage and water by isolation to identification by molecular biology - a trip of over 50 years. *Annual Review of Microbiology*, 49, 461-487.

Moresco, V., Viancelli, A., Nascimento, M.A., Souza, D.M.S., Ramos, A.P.D., Garcia, L.A.T., Simões, C.M.O., Barardi, C.R.M. (2012). Microbiological and physicochemical analysis of the coastal waters of southern Brazil. *Mar Pollut Bull*, 64, 40-48.

Muscillo, M., Pourshaban, M., Iaconelli, M., Fontana, S., Di Grazia, A., Manzara, S., Fadda, G., Santangel, R., La Rosa, G. (2008). Detection and quantification of human adenoviruses in surface waters by nested PCR, Taqman real-time PCR and cell culture assays. *Water Air Soil Pollut.*, 191(1-4),83-93.

Myers, N., Mittermeier, R.A., Mittermeier, C.G., Fonseca, G.A.B. & Kent, J. (2000). Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature*, 403, 853-858.

Nei, M.; Masatoshi Nei and Wen-Hsiung Li (October 1, 1979). "Mathematical Model for Studying Genetic Variation in Terms of Restriction Endonucleases". *PNAS* 76 (10), 5269–5273.

Parasidis, T. A., Konstantinidis, T. G., Alexandropoulou, I. (2013). Environmental Monitoring of enteric viruses in waste water. *Virology and Mycolog.*, 2, 1.

Rigotto, C., Victoria, M., Moresco, V., Kolesnikovas, C. K., Corrêa, A. A., Souza, D. S. M., Miagostovich, M. P., Simões, C. M. O., Barardi, C. R. M. (2010). Assessment of adenovírus, hepatitis a vírus rotavirus presence in environmental samples in Florianopolis, South Brazil. *Journal of Applied Microbiology*, 109(6), 1979-1987.

Ryu, H., Mayer, B., Abbaszadegan, M. (2010). Applicability of quantitative PCR for determination of removal efficacy of enteric viruses and Cryptosporidium by water treatment processes. *Journal of Water and Health*, 8(1), 101-108,

Silva, H. D., Santos, F. O., Anunciação, C. E., García-Zapata, M. T. A (2011b). Análise virológica da qualidade da água: uma revisão das. *Revista brasileira de Biociências*, 9(3), 405-415.

Silva, H. D., García-Zapata, M. T. A., Anunciação, C.E. (2011a). Why the use of adenoviruses as water quality virologic marker? *Food and Environmental Virology*, 3(3-4), 138-140.

Silva, H. D., Wosnjuk, L. A.C., Santos, S. F. O., Vilanova-Costa, C. A.S.T., Pereira, F. C., Silveira-Lacerda, E.P., et al. (2010). Molecular detection of adenoviruses in lakes and rivers of Goiânia, Goiás, Brazil. *Food and Environmental Virology*, 2(1), 35-40.

Tamura, K.; Peterson, D.; Peterson, N.; Stecher, G.; Nei, M.; Kumar, S. (2011). MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Method. *Molecular Biology and Evolution*, 28(10), 2731–2739.

Thomposon, J. D.; Gibson, T. J.; Plewniak, F.; Jeanmougin, F.; Higgins, D. G. (1997). The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research*, 25(24), 4876-4882.

van Heerden, J., Ehlers, M. M., Heim, A., Grabow, W. O. K. (2005). Prevalence, quantification and typing of adenoviruses detected in river and treated drinking water in South Africa. *Journal of Applied Microbiology*, 99(2), 234-242.

Wold, W.S.M., & Horwitz, M.S. (2007). Adenoviruses. In D.M, Knipe; P.M. Howley (Ed.), Fields virology (pp. 2395-2436.) Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins .

Wyn-Jones, A. P., Carducci, A., Cook, N., D'Agotino, M., Diviza, M., Fleischer, J., et al. (2011). Surveillance of adenoviruses and noroviruses in European recreational waters. *Water Research*, 45(3), 1025-1038.

Xagoraraki, I.; Kuo, D. H.-W.; Wong, K.; Wong, M.; Rose, J. B. (2007). Occurrence of human adenoviruses at two recreational beaches of the great lakes. *Appl Environ Microbiol.*, 73(24), 7874-7881.

Tabela 1 - Porcentagem de amostras positivas, média de CG.mL^{-1} e SD de amostras coletas entre agosto e novembro de 2012 na cidade de Goiânia, Goiás, Brasil (n = 80)

Ponto	**Pos (%)**	**CG.mL^{-1}**	**SD**
Reservatórios			
R1	40,0	6,45 × 106	8,98 × 106
R2	40,0	5,81 × 100	8,21 × 100
R3	90,0	3,00 × 109	2,18 × 109
R4	100,0	1,04 × 109	2,00 ×109
Total	76,6	1,01 × 109	1,05 × 109
Pontos da rede de distribuição			
P1	30,0	9,70 × 104	5,04 × 105
P2	20,0	1,36 × 108	2,71 × 108
P3	30,0	7,14 × 105	1,01 × 106
P4	70,0	8,80 × 103	1,14 × 104
Total	37,5	3,42 × 107	6,81 × 107

R1, R2, R3 e R4: reservatórios Senac, Serrinha, Atlântico e Cristina respectivamente. P1, P2, P3 e P4: pontos abastecidos por água dos reservatórios Senac, Serrinha, Atlântico e Cristina respectivamente. SD = Desvio Padrão; CG.mL^{-1} = cópias genômicas por mililitro; Pos = amostras positivas.

Tabela 2 - Matriz de distância genética entre as amostras estimada pelo modelo evolutivo JC69.

	R3	P4	P2	P3	R4	P1	R1	R2
R3_EU867453.1	0							
P4_C_JX173084.1	0,056	0						
P2_C_JX173077.1	0,083	0,046	0					
P3_2_EU867453.1	0,129	0,106	0,111	0				
R4_5_AB330086.1	0,123	0,089	0,094	0,067	0			
P1_C_JX173077.1	0,078	0,035	0,051	0,111	0,083	0		
R1_C_JX173084.1	0,14	0,111	0,106	0,078	0,083	0,094	0	
R2_C_JX173084.1	0,03	0,056	0,083	0,129	0,123	0,083	0,14	0

R1, R2, R3 e R4: reservatórios Senac, Serrinha, Atlântico e Cristina respectivamente. P1, P2, P3 e P4: pontos abastecidos por água dos reservatórios Senac, Serrinha, Atlântico e Cristina respectivamente.

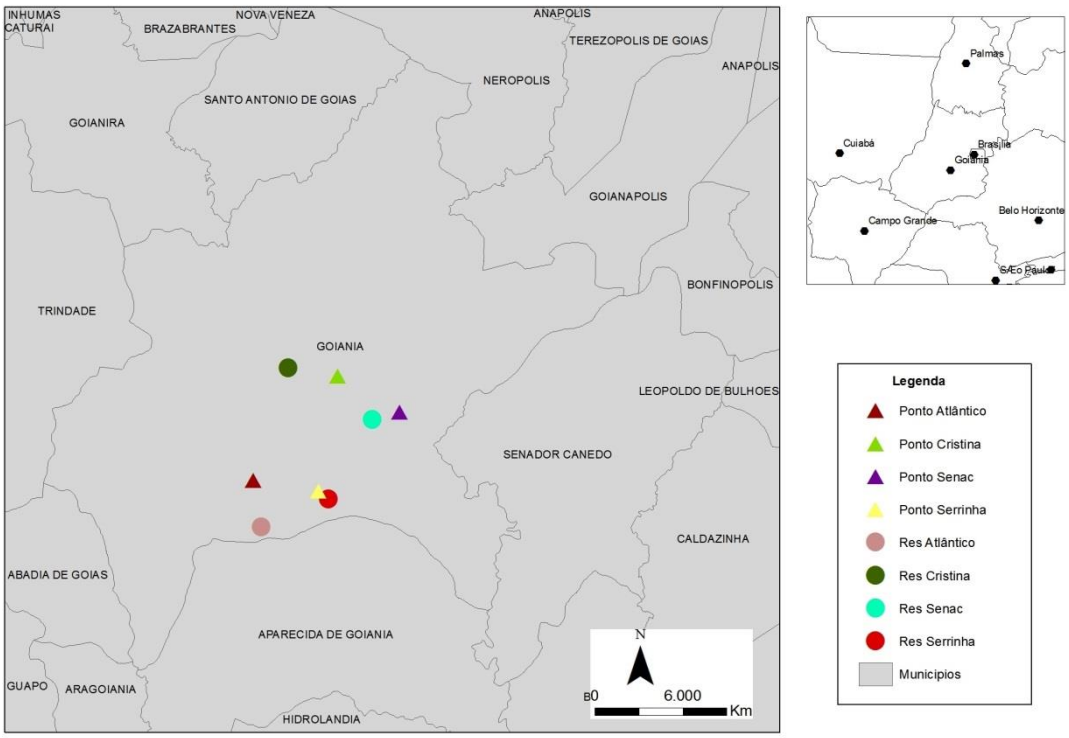


Figura 1 – Mapa do município de Goiânia contemplando a localização dos reservatórios e dos seus respectivos pontos de coleta na rede de distribuição da água. Coordenadas geográficas: Res Senac 16°40''28.82''S e 49°14'14.10''O; Res Serrinha 16°43'26.08''S e 49°15'53.69''O; Res Cristina 16°38'36.03S'' e 49°17'28.45''O; Res Atlântico 16°44'29.02''S e 49°18'27.49''O; Ponto Senac 16°40'11.61''S e 49°13'11.05''O; Ponto Cristina 16°38'53.38''S e 49°15'34.83''O; Ponto Serrinha 16°43'08.13''S e 49°16'16.30''O; Ponto Atlântico 16°42'46.80''S e 49°18'46.77''O. Goiânia é a capital do estado de Goiás, localizada na região central do Brasil, área de cerrado. Atualmente, a cidade possui cerca de 1.393.579 habitantes (IBGE, http://www.ibge.gov.br/cidadesat/index.php).

.

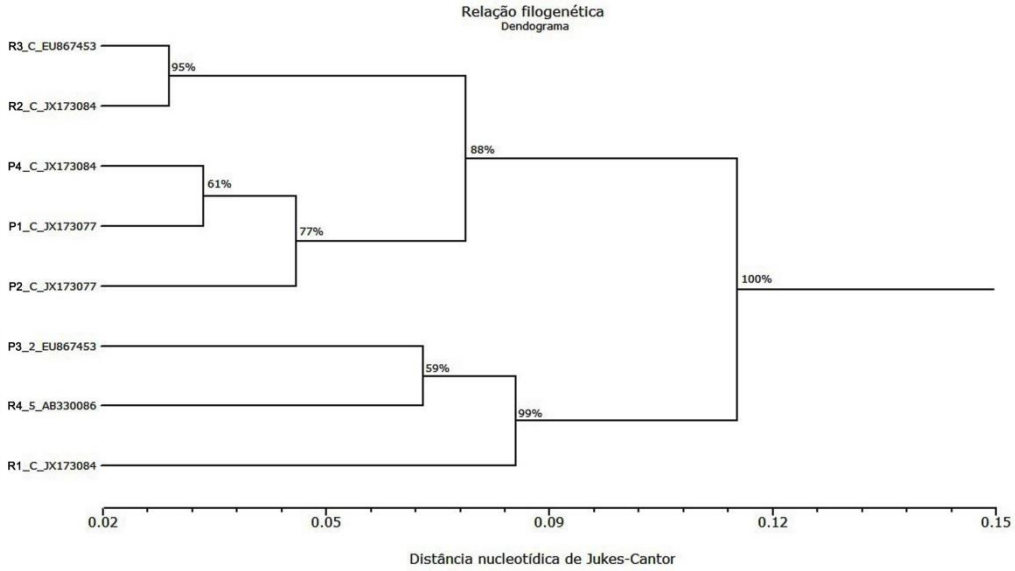


Figura 2 – Árvore filogenética inferida pela análise da região do gene hexon de HAdV. A árvore filogenética foi construída utilizando o método de Neighbour-Joining com 10.000 *bootstraps*, utilizando o modelo evolutivo de Jukes-Cantor para calcular a distância nucleotídica. Há dois grandes grupos formados: Grupo 1 (amostras R2, R3, R4, P1, P2, P4) e Grupo 2 (amostras P3, R4 e R1).

Artigo 4 - Contribuição do pH e da matéria orgânica na recuperação de adenovírus em condição simulada com água e sólidos tropicais

[1,2]Silva, Hugo Delleon et al.
[1]Nucleo de Pesquisas em Agente Emergentes e Re-emegente, Instituto de Patologia e Saúde Pública, Universidade Federal de Goiás, Brasil
[2]Laboratório de Diagnóstico Genético e Molecular, Instituto de Ciências Biológicas II, Universidade Federal de Goiás

Resumo

Este estudo relata a contribuição do pH e da matéria orgânica (MO) na infecciosidade e na recuperação de cópias genômicas de adenovírus humano 5 (HAdV-5) em águas contaminadas artificialmente com solo tropical. Para tal, também foi proposto o uso de uma equação matemática baseada no grau de floculação da argila para avaliar a taxa de recuperação de CG totais nestes ambientes simulados. Os dados obtidos indicam que a água com sólidos promoveu uma redução no número de CG/mL e na infecciosidade viral. A MO não influenciou na taxa de recuperação das CG/mL ($p>0,05$), mas proporcionou uma diminuição de 99% (2 $\log_{10}$) no valor de PFU/mL, indicativo de que a infecciosidade e integridade gênica foram medidas contrárias. Há uma tendência de que o pH ácido desfavoreça à inativação viral e que a argila seja o principal elemento responsável pela interação do HAdV-5. Espera-se que estes dados possam auxiliar em estudos eco-epidemiológicos e de inativação viral, ou mesmo, servir de parâmetro para estudos relacionados à análise e ao tratamento da água.

Palavras-chave: adenovírus humano, infecciosidade, qPCR, matéria orgânica, pH

INTRODUÇÃO

Os adenovírus humanos (HAdVs) pertencem à família *Adenoviridae,* gênero *Mastadenovirus* e compreendem 57 diferentes sorotipos distribuídos em 7 espécies (A-G) (King et al., 2011). São icosaédricos, não envelopados e DNA linear fita dupla (Enriquez 2002). Estes vírus possuem grande importância em saúde pública (Silva et al., 2010), excretados via fezes, urina ou excreções respiratórias (Metcalf & Estes, 1995; Jiang et al., 2001), podem desencadear uma série de agravos à saúde de pessoas infectadas. Como exemplo, pode-se citar doenças do trato respiratório superior (faringite e amigdalite) e inferior (bronquiolite e pneumonia), conjuntivite, cistite e gastroenterite (Mena & Gerba, 2008).

Os HAdVs são estáveis em meio ambiente e resistentes aos tratamentos da água (Thompson et al., 2003), com especial resistência ao tratamento com luz U.V. (Liden et al., 2007). Além disso, são prevalentes em meio ambiente durante todo o ano (Katayama et al., 2008).

A detecção de HAdV em água de uso e consumo e humano é realizada com sucesso tanto por meio de técnicas moleculares quanto pela associação destas com o cultivo celular (Wyn-Jones et al., 2011; Garcia et al., 2012). Assim, os HAdVs são indicados como biomarcadores virais no que diz respeito à qualidade de águas ambientais e de consumo humano (Wyn-Jones et al., 2011; Silva et al., 2011).

Apesar deste avanço na detecção de HAdV em diferentes matrizes aquáticas, faltam informações sobre a relação destes vírus com os sólidos, sedimentos ou sólidos suspensos nas águas em que estes são detectados.

No que diz respeito ao comportamento de adsorção viral em sólidos, sabe-se que se trata de um processo extremamente complexo (Schijven & Hassanizadeh, 2000), em que as variações ocorrem até mesmo dentre cepas de um mesmo tipo viral (Singh et al., 1986). Contrariamente, os estudos que reportam o comportamento de adsorção viral em sólidos usualmente empregam bacteriófagos como modelos (Schijven & Hassanizadeh, 2000). Estes estudos são válidos, mas somente como modelos de predição, e não podem inferir o real comportamento de permanência de vírus infecciosos tais como os HAdVs. Isso ocorre devido às variações do ponto isoelétrico (pI), tamanho da partícula viral, hidrofobicidade, proteínas expressas no capsídeo

(Schijven & Hassanizadeh, 2000), dentre outras que sequer foram descobertas.

Os HAdVs são mais prevalentes do que norovírus, enterovírus, vírus da hepatite A e poliovírus humano em biossólidos (Wong et al., 2010). Fong et al. (2010) detectaram 100% de amostras de esgoto e efluente infecciosas para HAdV. Estes dados sugeriram que os sólidos da matriz podem ter um papel crucial na integridade gênica e na infecciosidade dos HAdVs.

A interação de HAdVs em soluções de solo foi recentemente analisada em dois estudos. No primeiro, Wong et al. (2012) investigaram a influência de diferentes concentrações de íons inorgânicos no comportamento de agregação e deposição de HAdVs em solos arenosos. E no segundo, Wong et al. (2013) avaliaram o papel do carbono orgânico na adsorção de HAdVs. Estes dois estudos analisaram o comportamento de adsorção utilizando PCR em Tempo Real Quantitativa (qPCR), mas não avaliaram a influência dos sólidos e da matéria orgânica total na infecciosidade dos HAdVs.

A qPCR é uma técnica altamente sensível e capaz de detectar pequeno número de micro-organismos (Botes et al., 2013), mas utilizada isoladamente, não é capaz de distinguir entre partículas virais infecciosas e não infecciosas. Além disso, as interações do vírus com as partículas sólidas podem levar a inativação viral pelo rompimento do capsídeo viral com consequente liberação do material genético (Schijven & Hassanizadeh, 2000), que pode ser quantificado via qPCR tanto como uma partícula infecciosa quanto não infecciosa. Assim, este estudo teve por objetivo: (i) avaliar a infecciosidade e a recuperação de cópias genômicas de HAdV-5 em soluções simuladas com sólidos tropicais e em condições controladas de pH e presença de matéria orgânica; (ii) estabelecer uma equação matemática para avaliar a taxa de recuperação de cópias genômicas virais em condições simuladas com solos argilosos.

Materiais e métodos

Para a USEPA (2011) e Brasil (2005) o máximo aceitável para sólidos totais dissolvidos (STD) em águas tratadas é respectivamente de 500 e 1000 mg/L, com o pH compreendido entre os intervalos de 6,0 a 9,5 (Brasil,

2005) e 6,5 e 8,5 (USEPA, 2011). Assim, foram realizados experimentos que simulavam os limites máximos de sólidos em águas contaminadas por HAdV-5. O pH foi outro parâmetro analisado, e foram utilizadas as referências de pH 6,0 e 8,0 (representativos da faixa de valores mais comumente monitorados em águas tratadas e não tratadas).

Caracterização e Preparo do solo

Foram coletadas amostras de solo na profundidade de até 15 cm de uma área de vereda remanescente no município de Bela Vista do Goiás, Estado de Goiás, no Bioma Cerrado (S17° 00' W48° 47'). O solo foi submetido à secagem lenta ao ar (TFSA) seguido por peneiramento com malha de 2 mm de porosidade e retirada de restos vegetais em excesso com o auxílio de uma pinça e lupa.

O solo foi subdividido em duas partes: (i) solo com matéria orgânica (CMO) e (ii) solo sem matéria orgânica (SMO), este último tratado com peróxido de hidrogênio (Whittig & Allardice, 1986) e posteriormente autoclavado por três vezes a 121 °C e 0,105 Mpa por 3 h com intervalos de 24 h (Zhao et al., 2008). Para garantir a máxima homogeneidade da matriz, os solos foram macerados e acondicionados em temperatura ambiente. A análise físico-química e instrumental das amostras de solo CMO e SMO é mostrada na Tabela 1.

A fração argila foi determinada por Difração de Raio-x (DR-X). As frações silte, argila (fração argila desferrificada e saturadas com K, Mg, Mg + glicerol, K+ 350 °C e K + 550 °C) e areia também foram separadas na realização do DR-X. O preparo e a caracterização da amostra por DR-X foram realizados de acordo com Whittig et al. (1986) e Resende et al. (2005). Na Figura 1 é mostrado o difratograma gerado pelo DR-X.

Preparo do inoculo viral

Células A549 foram cultivadas em garrafas de cultivo celular (75 cm^2) contendo meio Dulbecco's Modified Eagle Médium (DEMEM Alta Glicose 1x) suplementado com 10% de SFB e PSA 1% (penicilina G, estreptomicina e anfoterincina B nas concentrações finais de 100 $U.mL^{-1}$ 100 $\mu g.mL^{-1}$ e 0,25 $\mu g.mL^{-1}$ respectivamente). As células foram infectadas com adenovírus

humano 5 (espécie C, sorotipo 5 – HadV-5) e cultivadas em estufa de CO_2 5% a 37 ºC até a visualização ao microscópio invertido de efeito citopático. O tapete celular foi congelado e descongeladas três vezes e os debris celulares removidos por centrifugação a 5.000 rpm a 4 ºC por 10 min. O inoculo viral consistia de alíquotas de 1 mL do sobrenadante.

Inoculação dos HAdVs

A Figura 2 mostra o desenho experimental do estudo. A metodologia consistiu em adicionar separadamente 5, 25 e 50 mg de solo CMO e SMO em tubos de polipropileno estéreis de 50 mL e acrescentar 40 mL de água ultrapura, seguido de breve agitação manualmente para obter os sólidos suspensos e sedimentados.

O pH das soluções de água com sedimento foram ajustados para 6,0 e 8,0 (um pH diferente para cada tipo e concentração de solo) utilizando HCl 0,1 M. Em seguida, foi adicionado 1 mL de alíquota viral e o volume completado para 50 mL com água ultrapura, obtendo-se respectivamente as concentrações de 100, 500 e 1000 mg/L de sólidos totais. Foi utilizando um controle (0 mg/L) para cada pH, no qual foi adicionado apenas a alíquota viral em um volume final de 50 mL de água ultrapura. O tubo controle foi processado da mesma forma que os demais tubos dos tratamentos. O mesmo experimento processado para o solo CMO foi simultaneamente realizado com o solo SMO. Todas as concentrações foram processadas ao menos em réplica, com a repetição do experimento em triplicata.

Os tubos contendo as soluções de vírus com sedimentos foram agitados a 150 rpm durante 1 h em uma temperatura de 24 °C. Foi escolhido este período de interação entre os vírus e as partículas sólidas pois Schijven e Hassanizadeh (2000) demonstraram que entre 1 e 2 horas há um equilíbrio entre adsorção e desadsorção de vírus em suspensões líquidas, com uma taxa de decaimento estável entre estes dois períodos. Já Gantzer et al. (1994) reportou um tempo de equilíbrio de 30 min em experimentos em série (*batch experiments)*. Pós-período de agitação, os tubos permaneceram em repouso por 1 h a temperatura de 24 °C para a precipitação dos sólidos sedimentáveis.

Ocorreu a formação duas fases nítidas: (i) o sobrenadante e (ii) o sedimento. Alíquotas de 200 µL do sobrenadante de cada tubo foram colhidas

e estocadas a – 80 °C até processamento. O sobrenadante remanescente dos tubos foi retirado e deixado apenas o *pellet* representativo do material sedimentável, ao qual foi imediatamente acrescido 2 mL de tampão ASL proveniente do kit QIAamp DNA Stool Mini Kit (QIAGEN) e seguido as demais instruções do fabricante para extração de ácidos nucléicos. As alíquotas de 200 µL do sobrenadante também tiveram os ácidos nucléicos extraídos com a utilização do mesmo kit. Todas as amostras extraídas foram imediatamente armazenadas em freezer -80 °C.

Enumeração por PCR em tempo real quantitativa (qPCR)

As amostras de DNA foram diluídas na proporção 1:10 para evitar inibições e a PCR quantitativa realizada como descrita por Hernroth et al. (2002). Todas as amplificações foram feitas em duplicata no aparelho StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems), utilizando como padrão o plasmídeo pBR322 contendo parte do gene *hexon*, gerando uma curva padrão (R > 0.98). Os resultados foram analisados para mensurar a quantidade de CG/mL de HAdV-5 na água e no sedimento, e comparou-se estes com os resultados no *CA*.

Utilizou-se os resultados em CG/mL na estruturação de uma sequência de equações matemáticas que inferem o número total de recuperação de cópias genômicas em relação à concentração de argila tanto em suspensão – simulando os sólidos suspensos em águas tratadas – quanto no precipitado – para simular os sólidos que podem ser sedimentados no decorrer do transporte de água pelos canos ou recipientes de armazenamento. Para o ensaio teste (*TA*) de todos os tratamentos, o número total de cópias genômicas de HAdVs permanente no sobrenadante (N_{sup}) e no precipitado (N_{prec}) foi calculado respectivamente, de acordo com as seguintes equações:

$$N_{sup} = \left[\left[\left(\left(Clay_{\%} \times V_{cm^3}\right)/_{100}\right) \times Floc\right] \times \ CG/mL\right] \quad (01)$$

$$N_{prec} = \left[\left[(V_{cm^3}) - \left[\left[\left(V_{cm^3} \times Clay_{\%}/_{100}\right) \times Floc\right] \times CG/mL\right]\right]\right] \qquad (02)$$

Onde *V*, *Clay*% e *Floc* representam, respectivamente, o volume do sedimento (cm^3) no tubo, o teor de argila (%) da matriz e o grau de floculação da mesma. O volume estabelece uma relação direta entre massa (g) e densidade (g/cm^3), onde 1 cm^3 equivale a um mililitro. O teor de argila é encontrado laboratorialmente pela análise textural do solo, e o grau de floculação é a relação entre a argila naturalmente dispersa e a total, obtida após a dispersão (Tabela 1).

O número total de CG no ensaio teste (N_{ta}) foi obtido, compilando as equações 1 e 2, e gerando a equação 3 abaixo:

$$N_{ta} = (N_{sup} + N_{prec}) \qquad (03)$$

E a taxa total de recuperação (R_r) em CG foi calculada pela a equação matemática 4:

$$R_{r_{(\%)}} = \left[\frac{(N_{ca} - N_{ta})}{N_{ca}}\right] \times 100 \qquad (04)$$

Onde, N_{ca} corresponde ao número total de CG no *CA*. A equação 04 pode ser reescrita pela seguinte equação:

$$R_{r_{(\%)}} = \left\{\frac{N_{ca} - \left[\left[\left[\left(\left(Clay_{\%} \times V_{cm^3}\right)/_{100}\right) \times Floc\right] \times CG/mL\right] + \left[(V_{cm^3}) - \left[\left[\left(\left(V_{cm^3} \times Clay_{\%}\right)/_{100}\right) \times Floc\right] \times CG/mL\right]\right]\right]}{N_{ca}}\right\} \times 100$$

(05)

Ensaio citotóxico

Células A549 foram propagadas em placas de cultivo celular de 24 cavidades, na concentração de 1,5 x 10^5 células por poço contendo DEMEM 1x com 5% de SFB e 1% de PSA e reservadas.

Alíquotas do sobrenadante CMO foram tratadas com PSA 2% e diluídas em MEM 1x, nas seguintes proporções: 1:2 até 1:7. Em seguida, um inoculo de 100µl de cada uma das diluições, em tréplica, foi colocado em contato com as células propagadas durante 1h, a 37°C em atmosfera de CO_2 5% e agitação uniforme a cada 15 min. Posteriormente, o inoculo foi removido e 1 mL de DEMEM 1x, contendo respectivamente 1% de PSA e SFB foi adicionado às células, três controles celulares foram mantidos e estes continham apenas células e meio de manutenção. As placas foram incubadas a 37°C, em atmosfera 5% de CO_2 e a monocamada celular foi monitorada nos períodos de 24, 48, 72 e 96 h. Células que continham amostras testes inoculadas foram comparadas com os controles celulares em microscópio invertido. Sequencialmente, as células foram fixadas e coradas com preto de naftaleno (0,1% preto de naftaleno, 5% ácido acético, pH 2,3-2,4). O tapete celular corado foi analisado e a primeira diluição não citotóxica foi instituída para uso em todos os demais ensaios.

Enumeração de HAdV pelo Ensaio de Placa de Lise

Para inferir a presença de HAdVs infecciosos, amostras em tréplica do sobrenadante de todos os tratamentos, incluso os controles celulares, foram tratadas com PSA 1%. Alíquotas de 250 µL (na diluição não citotóxica 1:6) foram inoculadas em placas de 6 cavidades contendo monocamada confluente de células A549 para análise em placa de lise, como descrito por Cromeans et al. (2008) e adaptado por Rigotto et al. (2011). Resumidamente, as células foram incubadas por 1 h a 37 °C com agitação uniforme a cada 15 min. Em seguida, o inoculo foi removido e a monocamada lavada 2x com PBS pH 7,2. Adicionou-se em cada cavidade 2,5 mL de uma mistura contendo 0,6 % de Bacto-ágar (previamente aquecido), em uma proporção 1:1 com DEMEM 2x alta glicose contendo 4% de SFB, 0.1mM de piruvato de sódio, 2% de PSA e $MgCl_2$ a 25 mM. As placas foram incubadas a 37°C em atmosfera de CO_2-5% por sete dias e as repetições experimentais realizadas ao menos em duplicata.

Foi calculado o número de unidades formadoras de placa por mililitro (PFU/mL) para HAdV-5 infeccioso de todos os sobrenadantes. Tendo o *CA* como referência padrão, foi calculado a perda de HAdV-5 (diferença entre *CA*

e *TA*) e posteriormente a porcentagem de perda. Os adenovírus perdidos foram tidos como interagindo com o sedimento (forma infecciosa ou não infecciosa: com o capsídeo íntegro ou na forma de DNA livre) ou presentes no sobrenadante na forma não infecciosa.

Para analisar o limite de sensibilidade na matriz, foram feitas diluições seriadas na base 10 do sobrenadante de todas as amostras (incluso os ensaios controles) e realizada a análise em placa de lise.

Análise Estatística

O programa Microsoft® Excel 2007 foi usado para a tabulação dos dados e a análise estatística foi realizada pelo programa SPSS® for Windows®, versão 16.0.

Para avaliar a infecciosidade e o número de cópias genômicas em relação às variáveis concentração de sólidos, pH e presença ou ausência de MO entre os tratamentos e entre estes e o ensaio controle, foi utilizado o teste u Mann-Whitney. Foi utilizado como nível de significância o valor de 5% ($p<0,05$).

Resultados

A avaliação da recuperação de cópias genômicas foi realizada pela comparação dos resultados de qPCR obtidos em CG/mL , entre os tratamentos (ensaios testes - *TA*), e entre estes e o ensaio controle (*CA*). A média de CG/mL tanto em pH 6,0 quanto 8,0 foi de $4,75 \times 10^{15}$ (*dados não mostrados*), e indicou que a variação do pH não influenciou nas taxas de recuperação das cópias genômicas dos *CA*.

A presença ou ausência de MO não foi uma variável estatisticamente significante ($p>0,05$) para apontar variações na enumeração em CG/mL de HAdV-5 tanto no sobrenadante quanto no sedimento dos *TA* (Tabelas 2 e 3).

Na comparação das médias em CG/mL do sobrenadante e do sedimento dos diferentes tratamentos com o resultado do *CA*, observou-se uma diferença estatística significativa ($p<0,001$). Isso significa que, a água com sólidos, nas condições aqui estabelecidas, promoveu a redução no número de CG/mL tanto no sobrenadante quanto no sedimento de todos os tratamentos. Apesar disso, a taxa de recuperação em CG/mL tanto no

sobrenadante quanto no sedimente ficaram sempre acima de 99% quando comparado os ensaios *TA* e *AC* (*dados não mostrados*). Um alto valor *Rr* (99,8%) também foi obtido com o uso da equação matemática (Tabela 4). A *Rr* utilizando a equação matemática foi extremamente elevada tanto no pH 6,0 quanto 8,0 (Tabela 4), e não ocorreu diferença estatisticamente significante entre as diferentes taxas de recuperação dos tratamentos avaliados ($p>0,05$).

Além disso, o sedimento de cada tratamento concentrou maior número de CG/mL do que o sobrenadante destes (Tabelas 2 e 3). Ou seja, os vírus, ou mesmo o DNA livre estão de alguma forma interagindo melhor com os sólidos sedimentáveis do que os em suspensão.

O pH não foi uma variável estatisticamente significativa ($p>0,05$) para atestar diferenças na enumeração de CG/mL entre os tratamentos CMO e SMO (Tabelas 2 e 3). Por outro lado, ocorreu variação entre os tratamentos SMO pH 8,0 ($p>0,028$) (*dados não mostrados*).

Em relação à participação da microbiota autóctone do solo, uma possível participação desta pode ser inferida, haja vista que o solo SMO foi esterilizado (sem microbiota autóctone). Assim, como não ocorreu variação no número de CG/mL entre os diferentes tratamentos CMO e SMO (Tabelas 2 e 3), uma possível participação desta microbiota na recuperação das cópias genômicas foi descartada.

A enumeração de HAdV-5 infecciosos no sobrenadante e a porcentagem de perda é mostrada na Figura 3. O valor médio em PFU/mL mensurado nos *CA* pH 6,0 e 8,0 foram respectivamente de $3,0 \times 10^9$ e $1,0 \times 10^8$. Estes valores iniciais, quando comparados com os valores dos ensaios testes, indicam que a presença de sólidos teve efeito inativamente sobre o HAdV-5 ($p<0,001$), com uma tendência de que, quanto menor a concentração de sólido, maior a enumeração de vírus infecciosos no sobrenadante (Figura 3).

Assim, com exceção das amostras pH 6,0 na concentração de 100 mg/L (log de 10^6), todas as demais amostras CMO após tratamento estavam no log de 10^5 (Figura 3). A MO proporcionou um incremento de ~2 $\log_{10}$ (99%) na perda da infecciosidade viral, quando comparado as médias dos tratamentos CMO e SMO.

Os tratamentos SMO foram menos prejudiciais ao vírus (diminuição de 1 a 3 $\log_{10}$ na infecciosidade) do que os tratamentos CMO (diminuição de 3 a 4 $\log_{10}$). Ademais, foi observado que o pH 6,0 não influenciou na enumeração de vírus infecciosos no sobrenadante ou na taxa de perda em PFU/mL entre os tratamentos CMO e SMO (p 0,082). Por outro lado, no pH 8,0 foram observadas variações tanto na recuperação quanto na taxa de perda (p 0,003). Além disso, o pH 6,0 demonstrou uma menor taxa de perda em PFU/mL (Figura 3).

A Tabela 4 mostra a enumeração total de cópias genômicas de HAdV-5 nos ensaios testes utilizando o modelo matemático aqui desenvolvido. Com os dados obtidos, foi demonstrado que no pH 8,0 ocorreu uma diferença estatisticamente significante entre o N_{ta} dos tratamentos CMO e SMO (p 0,001), sendo que, nos tratamentos CMO foi observado uma maior quantidade de CG totais. No pH 6,0 o quantitativo de CG também foi maior nos tratamentos CMO respectivamente para N_{sup} (p 0,045), N_{prec} (p 0,003) e N_{ta} (p 0,004) (Tabela 4).

Discussão
Enumeração viral

A alta taxa de recuperação em CG/mL ou CG totais entre os tratamentos SMO e CMO (Tabelas 2,3 e 4) foi um forte indicativo de que a presença ou ausência de MO não foi um parâmetro que influenciou na recuperação de cópias genômicas, possivelmente não interferindo na integridade gênica. Este resultado confirma a alta estabilidade do genoma de adenovírus em amostras de esgoto (Bofill-Mas et al., 2006) e a sua resistência à luz U.V. (Gerba et al., 2002).

Wong et al. (2013) relataram um aumento no número de cópias genômicas de adenovírus na fase líquida ao se adicionar ácido húmico. Como ácidos húmicos fazem parte da composição da matéria orgânica, este dado é contrário ao encontrado aqui. Os resultados obtidos sugerem que a MO (não dissolvida ou dissolvida) enfraquece a ligação eletrostática entre sólidos e os vírus (Kimura et al., 2008). Como a maior parte da matéria orgânica normalmente se encontra dissolvida, isso pode ter favorecido para que um maior número de CG/mL fosse encontrado no sedimento de todos os tratamentos. Os dados aqui apresentados são corroborados pelo estudo realizado por Yoshimoto et al. (2012), que demonstraram uma correlação negativa entre a adsorção viral e MO em solos. Ademais, o DNA livre também é pobremente adsorvido à matéria orgânica de solos (Saeki & Sakai, 2009).

Em relação à infecciosidade, os sólidos foram altamente prejudiciais ao HAdV-5 e apesar da menor concentração de sólidos indicar uma maior enumeração de vírus infecciosos, sobretudo quando se analisa o tratamento SMO pH 6,0 (Figura 3), esta inferência necessita de avaliações futuras. Concomitantemente, a MO favoreceu ainda mais na perda da infecciosidade viral (Figura 3). Isso ocorreu porque a associação do vírus com a matéria orgânica inativa os vírus (Gerba et al., 1984). O vírion em contato com a matéria orgânica deixou de ser infeccioso, mesmo mantendo a integridade do capsídeo, e não obstante, a partícula viral pode ter sido lisada, com consequente liberação do material genético ao meio (Schijven & Hassanizadeh, 2000). Desta forma, a qPCR pode ter enumerado tanto vírus

infecciosos como não infecciosos e mesmo material genético em suspensão ou adsorvido aos sólidos.

Recentemente, Wong et al. (2012) analisaram a adsorção de HAdV-2 em areia com diferentes concentrações de sal utilizando apenas a qPCR, nestes estudo, é provável que uma parcela dos HAdV-2 detectados não eram infecciosos, mesmo mantendo a integridade do capsídeo, ademais o DNA pode ter sido liberado em solução. Esta situação foi demonstrada pelo estudo realizado por Fongaro et al. (2013) que avaliou a integridade do capsídeo viral em fontes de água da cidade de Florianópolis, Brasil, pela adição de DNAse. Segundo Fongaro et al. (2013), após o ensaio de DNAse foi possível mensurar HAdVs íntegros, mas isso não garantiu que os mesmos eram infecciosos e por isso o ensaio de ICC-RT-qPCR foi realizado, podendo-se assim acessar vírus em replicação (pela quantificação de mRNA). Desta forma, no presente estudo, a qPCR foi utilizada unicamente para avaliar a taxa de recuperação em cópias genômicas entre os diferentes tratamentos com sólidos e pH.

Em condições normais, 1 $\log_{10}$ de PFU/mL corresponde a 3 $\log_{10}$ de CG/mL (Fongaro et al., 2013). Nos dados aqui obtidos, a diferença entre os resultados em CG/mL no sobrenadante dos ensaios testes com o valor obtido em PFU/mL foi superior a 10 $\log_{10}$ de diferença. Esta redução foi extremamente alta, indicando que a integridade gênica e a infecciosidade foram parâmetros inversamente proporcionais. Estes achados são condizentes aos resultados obtidos por Vijayavel et al. (2010), que demonstraram que a redução da infecciosidade não necessariamente coincide com a redução na quantificação do genoma viral de HAdVs.

Além disso, a MO agiu de forma a proporcionar uma expressiva redução na infecciosidade viral, é possivelmente umas das razões pelo qual Horswell et al. (2010) encontraram mínima sobrevivência de HAdVs em amostras contendo solução de esgoto e solo.

Em relação ao estudo do pH, no sedimento do tratamento SMO pH 8,0, não foi possível estabelecer qual fator provocou a diferença estatística observada no número de CG/mL entre os tratamentos. Sugere-se que as interações dos HAdV-5 neste pH tenham se tornado mais instáveis, contribuindo na variação do número de CG/mL (Gerba et al., 1984).

Em comparação com os demais ensaios, os vírus ficaram em maior quantidade no sobrenadante dos *TA* pH 6,0. Isso provavelmente aconteceu porque o pH ácido conferiu um efeito protetor ao vírus, e não porque havia uma maior quantidade de vírus interagindo no sedimento destes tratamentos, já que não ocorreu diferença na enumeração de CG/mL entre os sedimentos dos tratamento analisados ($p>0,05$). Segundo Kovač et al. (20120) o pH ácido protege o HAdV da inativação. Isso ocorre porque a estabilidade do capsídeo do adenovírus 5 é significativamente aumentada com a diminuição do pH (Rexroad et al., 2005). Este resultado, pode explicar o maior valor de PFU/mL obtidos nos tratamentos em pH ácido.

Interação com a matriz

O solo é uma matriz extremamente complexa (Saeki & Sakai, 2009), que sofre variação de vários fatores, tais como concentração de areia, silte, argila, e diferentes compostos de matéria orgânica, pH, metal, óxidos e todos estes podem afetar de alguma forma na infecciosidde viral (Zhao et al., 2008). Assim, a caracterização desta matriz é de suma importância nos estudos que de alguma forma utilizam esta matriz, o que foi contemplado neste estudo.

Aqui, o resultado do PCZ demonstrou que os sólidos suspensos ou sedimentáveis possuem carga ácida. Como o HAdV-5 com pI de 4,5 (Trilisky & Lenhoff, 2007) é negativo nestas condições de pH, e o DNA suspenso também é negativo, muito provavelmente, o HAdV-5 interagiu com os sólidos por meio de ligações hidrofóbicas ou pontes de van der Waals. Segundo Bales et al. (1991), as ligações hidrofóbicas representam o tipo de interação mais importante para explicar a adsorção de vírus em sólidos. As interações podem ser entre o vírus ou o DNA com a própria matéria orgânica, que possui grupos hidrofóbicos (Schijven and Hassanizadeh, 2000) ou com óxidos.

Assim, os vírus podem ter interagindo com os óxidos de alumínio, silício, titânio, potássio e ferro (Tabela 1). A participação dos mesmos não foi avaliada, mas podem também contribuir para os mecanismos de inativação viral (Zhao et al., 2008; Zhang et al., 2010). Sugere-se que a argila contribua acentuadamente para as interações dos HAdV-5 com os sólidos. A argila normalmente possui carga heterogênea de distribuição, com pontos contendo

carga negativa e positiva (Schijven and Hassanizadeh, 2000; Kimura et al., 2008) e isso facilita as interações virais.

Equação matemática

A equação matemática proposta foi desenvolvida para a quantificação total de vírus em soluções artificialmente contaminadas com sólidos contendo argila em sua constituição mineralógica, e que não foram centrifugadas para a precipitação da mesma. Esta é a primeira equação matemática que considerou a argila como sendo a principal fonte de interação dos vírus com sólidos tropicais.

No material sedimentado nos *TA* havia basicamente três constituintes: areia, silte e argila não floculada. A areia é formada predominantemente por quartzo, que assim como o silte, não apresentam carga (Klute & Lee, 1994). Dessa forma, o que se propõe é que os vírus interagem com o precipitado pela presença da argila e quiçá auxiliado por óxidos de ferro, alumínio e titânio, ou mesmo alguns traços de matéria orgânica. Mas pelos resultados apresentados, a MO não teve um papel primordial nesta interação, caso contrário, a maior parte das cópias genômicas, ou mesmos dos vírus infecciosos, seriam detectados no sobrenadante, onde havia maior quantidade de MO.

A equação matemática desenvolvida considerou o grau de floculação da argila, que está dispersa em sua forma mais reativa no sobrenadante, mas em maior quantidade no precipitado. As argilas promovem fortes ligações, e pode inibir a inativação quando os vírus estão adsorvidos na mesma (Schijven & Hassanizadeh, 2000). Segundo Gantzer et al. (1994), a inativação de poliovírus foi insignificante em água do mar com concentrações de 3-15 mg/L de montmorilonita. Todavia, em uma concentração de 500 mg/L a inativação viral foi significante.

O solo aqui utilizado é predominante argiloso, composto de caolinita, gibsita e vermiculita (Figura 1). Babich e Stotzky (1980) estudando a inativação de fago por argila mensurou uma ordem de inativação na qual seria, da maior para a menor inativação: atapalgita, vermiculita, montmorilonita e caolinita. Como a MO não influenciou na enumeração das CG/mL, e como a argila é altamente abundante e reativa, foi concluído que as

perdas em cópia genômicas ocorreram pela presença da argila. Como a integridade gênica foi comprometida (menor taxa de recuperação de cópias genômicas), a argila também interferiu na infecciosidade, mas não foi possível mensurar o grau de contribuição.

Os resultados indicam que o grau de recuperação das cópias genômicas totais foi parecido com o obtido pela análise em CG/mL, e que realmente, a argila tem um papel chave na interação do HAdV-5. Contudo, contrariamente ao que foi exposto com os resultados de qPCR em CG/mL, ocorreu um aumento no incremento de HAdV-5 (CG) quando na presença de MO no N_{ta} do pH 8,0, e no N_{sup}, N_{prec} e C_{ta} do pH 6,0. Todavia, quando se analisou a taxa de recuperação (R_r) tanto para o pH 6,0 quanto 8,0, não observou-se diferença estatisticamente significante no grau de recuperação (p 0,110 e 0,287 respectivamente para pH 6,0 e 8,0). E por isso, será considerado que todos os testes foram iguais e não ocorreu intervenção de nenhum parâmetro analisado. A equação matemática desenvolvida é passível de uso na avaliação da recuperação de CG virais em ambientes simulados com solos, mas como o foco do modelo matemático não é a respeito da MO, e sim sobre a argila, pode ser que este seja um viés, e mereça ser melhor avaliado em futuros estudos com o emprego desta equação.

Os resultados obtidos diferem dos resultados clássicos com bacteriófagos e demais vírus. Isso já era esperado, pois a adsorção viral é altamente dependente do tipo viral (Kimura et al., 2008). Além disso, varrições podem ocorrer até mesmo dentro de uma mesma espécie. Hartmann et al. (2012) analisaram a estabilidade de diferentes sorotipos de HAdVs durante 4 semanas a 4 ºC e comprovaram que os sorotipos 1, 2, 11, 22 e 41 possuem maior estabilidade gênica do que o HAdV-5. Outro fator que pode comprometer as varrições em uma mesma espécie é o tamanho do genoma. Segundo Kennedy & Parks (2009) há uma relação direta entre estabilidade da partícula viral e tamanha do genoma, em que vírus com maior genoma são mais estáveis e resistentes.

Aplicação Ambiental

Este estudo é pioneiro no que diz respeito à participação do pH e da MO na avaliação da recuperação de cópias genômicas e da infecciosidade de HAdV-5 em soluções contendo sólidos.

Os HadVs são vírus de grande importância em saúde pública (SILVA et al., 2010), três vezes inseridos na Lista de Candidatos Contaminantes da USEPA (2013) e promissor bioindicador viral de qualidade da água. Devido à pressão por água com maior segurança microbiológica (Albinana-Gimenez et al., 2009), o estudo das características físico-químicas que podem afetar a infecciosidade ou mesmo a integridade gênica destes patógenos é de grande valia, sobretudo porque o monitoramento deste patógeno é extensamente realizado pela pesquisa de seu material genético.

Assim, os resultados obtidos neste estudo podem auxiliar em investigações eco-epidemiológicos ou servir de parâmetro para pesquisas relacionadas com a análise e o tratamento da água. Estes vírus podem sobreviver suspensos em água, e apesar de se ligarem eficientemente aos sólidos, esta interação não necessariamente os protege, apesar do importante papel do pH aqui demonstrado.

Como as amostras de água geralmente possuem baixos níveis de sólidos dissolvidos, com pH por volta de 6,0 - estes vírus podem ser potencialmente mais patogênicos nestas águas do que em águas ambientais, contrariando algumas pesquisas realizadas com bacteriófagos (Straub et al., 1992; Hussein et al., 1994).

Agradecimentos

Os autores agradecem à Profa Dra. Célia Regina Monte Barardi da Universidade Federal de Santa Catarina, por gentilmente ter cedido amostras de plasmídeos pBR322 contendo parte do gene hexon de HAdVs e ao Sr. Olavo André Oliveira de Souza que gentilmente confeccionou o *graphical abstract*.

Referências Bibliográficas

Albinana-Gimenez, N.; Miagostovich, M. P.; Calgua, B.; Huguet, J. M., Matia, L.; Girone, R. Analysis of adenoviruses and polyomaviruses quantified by qPCR as indicators of water quality in source and drinking-water treatment plants. *Water Research*. **2009**, 43, 2011-2019.

Bales, R. C.; Hinkle, S. R.; Kroeger, T. W.; Stocking, K. Bacteriophage adsorption during transport through porous media: chemical pertubations and reversibility. *Environ Sci Technol*. **1991**, 25 (01), 2088-2095.

Babich, H.; Stotzky, G. Reductions in inactivation rates of bacteriophages by clay minerals in lake water. *Water Res*. **1980**, 14 (01), 185–187.

Bofill-Mas, S.; Albinana-Gimenez, N.; Clemente-Casares, P.; Hundesa, A.; Rodriguez-Manzano, J.; Allard, A.; Calvo, M.; Girones, R. Quantification and Stability of Human Adenoviruses and Polyomavirus JCyV in Wastewater Matrices. *Applied and Environmental Microbiology*. **2006**, 72, 7894-7896.

Botes, M.; de Kwaadsteniet, M.; Cloete, T. E. Application of quantitative PCR for detection of microorganisms in water. *Anal Bioanal Chem*. **2013,** 405, 91-108.

Brasil. Ministério da Saúde. Portaria MS n.º 518/2004 / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Coordenação-Geral de Vigilância em Saúde Ambiental – Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2005.

Cromeans, T. L.; Lu, X. Y.; Erdman, D. D.; Humphrey, C.D.; Hill, V. R. Development of plaque assays for adenoviruses 40 and 41. *Journal of Virological Methods*. **2008**, 151, 140–145.

Embrapa. *Manual de métodos de análise de solo*. Centro Nacional de Pesquisa de Solos. 2. Ed. Revisada e. Atualizada. Rio de Janeiro, 1997, 212p.

Enriquez, C.E.; Adenoviruses. In: *Encyclopedia of environmental microbiology – Vol. 1;* Bitton G.; John Wiley & Sons, Inc., New York, NY, 2002, pp. 92-100.

Fong, T.T.; Phanikumar, M. S.; Xagoraki, I;. Rose J. B. Quantitative Detection of Human Adenoviruses in Wastewater and Combined Sewer Overflows Influencing a Michigan River. *Applied and Environmental Microbiology*. **2010**, 76 (3), 715–723.

Fongaro, G.; do Nascimento, M. A.; Rigotto, C.; Ritterbusch, G.; da Silva, A, D. A.; Esteves, P. A.; Barardi, C. R. Evaluation and molecular characterization of human adenovírus in drinking water supplies: viral integrity and viability assays. *Virology Journal*. **2013**, 10,166.

Gantzer, C., Quignon, F., and Schwartzbrod, L. Poliovirus-1 adsorption onto and desorption form montmorillonite in seawater, survival of the adsorbed virus. *Environ. Technol*. **1994**, 15, 271-278.

Garcia, L. A. T.; Viancelli, A.; Rigotto, C.; Pilotto, M. R.; Esteves, P. A.; Kunz, A.; Barardi, C. R. M. Surveillance of human and swine adenovírus, human norovirus and swine circovirus in water samples in Santa Catarina, Brazil. *Journal of Water and Health*. **2012**, 10, (3), 445-452.

Gerba, C. P. Applied and theoretical aspects of vírus adsorption to surfaces. *Adv. Appl. Microbiol*. **1984**, 30, 133-168..

Gerba, C. P.; Gramos, D. M.; Nwachuku, N. Comparative inactivation of enteroviruses and adenoviruses type 2 by UV light. *Applied and Environmental Microbiology*. **2002**, 68, (10), 5167–5169.

Hartmann, M. N.; Darscht, M.; Szewzyk, R.; Selinha, H.C. Monitoring of adenovirus serotypes in environmental samples by combined PCR and melting point analyses. *Virology Journal* **2012**, 10, 190.

Hernroth, B. E.; Conden-Hansson, A. C.; Rehnstam-Holm, A. S.; Girones, R.; Allard, A. K. Environmental factors influencing human viral pathogens and their potential indicator organisms in the blue mussel, Mytilus edulis: the first Scandinavian report. *Applied and Environmental Microbiology*. **2002**, 68, 4523–4533.

Horswell, J.; Hewitt, J.; Prosser, J.; Van Schaik, A.; Croucher, D.; Macdonald, C.; Burford, P.; Susarla, P.; Bickers, P.; Speir, T. Mobility and survival of Salmonella Typhimurium and human adenovirus from spiked sewage sludge applied to soil columns. Journal of Applied Microbiology. **2010**, 108, 104-114.

Hussein M.E.; El-Hawa M.E.A.; El Dydamony G. Population and persistence of Zag-1 phage and cowpea Rhizobium in two sterile soils. *Egypt J. Microbiol*. **1994**, 29, 270-283.

Jiang, S. C.; Noble, R.,; Chu, W. Human adenoviruses and coliphages in urban runoff-impacted coastal waters of southern California. *Applied and Environmental Microbiology*. **2001**, 67(1), 179–184.

Katayama, H.; Haramoto, E.; Oguma, K.; Yamashita, H.; Tajima, A.; Nakajima, H.; Ohgaki, S. One-year monthly quantitative survey of noroviruses, enteroviruses, and adenoviruses in wastewater collected from six plants in Japan. *Water Research*. **2008**, 42, (6-7), 1441-1418.

Kennedy, M. A.; Parks, R. J. Adenovirus Virion Stability and the Viral Genome: Size Matters. *The American Society of Gene & Cell Therapy*. **2009**, 17 (10) 1-3.

Klute, A.; Lee Page, A. Methods of soil analysis - Part 1 - Physical and mineralogical methods. *Soil Science Society of America* (SSSA), Wisconsin, USA., 1994.

King, A.M.Q.; Adams, M.J.; Carstens, E.B.; Lefkowitz, E.J.; Eds. *Virus Taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses*. Ninth Report of the

International Committee on Taxonomy of Viruses. Elsevier, Academic Press, San Diego, 2011.

Kimura, M.; Jia, Z. J.; Nakayama, N.; Asakawa, S. Ecology of viroses in soils: Past, presente and future perspectives. *Soil Science and Plant Nutrition*. **2008**, 54, 1-32.

Lee, S. H.; Kim, S. J. Detection of infectious enteroviruses and adenoviruses in tap water in urban areas in Korea. *Water Res*. **2002**, 36, 1, 248–256.

Liden, K. G.; Thurston, J.; Schaefer, R.; Malley, J. P. Enhanced UV inactivation of adenoviruses under polychromatic UV lamps. *Applied and Environmental Microbiology*. **2007**, 73, (23), 7571–7574.

Mena, K.D.; Gerba, C.P. 2008. Waterborne Adenovirus. *Review of Environmental Contamination and Toxicology.* **2008**, 198, 133-167.

Metcalf, T. G.; Estes, M. K. Environmental virology: From detection of virus in sewage and water by isolation to identification by molecular biology—a trip of over 50 years. *Annual Review of Microbiology*. **1995**, 49, 461–487.

Resende, M.; Curi, N.; Ker, J. C.; Rezende, S. B. *Mineralogia dos Solos Brasileiros: interpretação e aplicações.* Lavras: UFLA, 2005.

Rexroad, J.; Evans, R.K.; Middaugh, C.R. Effect of pH and ionic strength on the physical stability of adenovirus type 5..*Journal Pharm Sci.* **2006**, 95 (2), 237-47.

Rigotto, C.; Hanley, K.; Rochelle, P.A.; De Leon, R.; Barardi, C.R.M.; Yates M.V. Survival of Adenovirus Types 2 and 41 in Surface and Ground Waters Measured by a Plaque Assay. *Environmental Science and Technology*. **2011**, 45, 4145 – 4150.

Saeki, K.; Sakai, M. The Influence of Soil Organic Matter on DNA adsorptions on Andosols. *Microbes Environ*. **2009**, 24, (2): 175-179.

Schijven, J. F.; Hassanizadeh, S. Removal of viroses by soil passage: overview of modeling, processes, and parameters. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*. **2000**, 30 (1), 49-127.

Silva, H. D.; Wosnjuk, L. A. C.; Santos, S. F. O.; Vilanova-Costa, C. A. S. T.; Pereira, F. C.; Silveira-Lacerda, E. P. Molecular detection of adenoviruses in lakes and rivers of Goiânia, Goiás, Brazil. *Food and Environmental Virology.* **2010**, 2 (1), 35–40.

Silva, H. D.; García-Zapata, M. T. A.; Anunciação, C. E. Why the use of adenoviruses as water quality virologic marker? *Food and Environmental Virology*. **2011**, 3 (3-4), 138–140.

Singh, S. N.; Bassous, M.; Gerba, C. P.; Kelley, L. M. Use of dyes and proteins as indicators of virus adsorption to soils. *Water Research*. **1986**, 20, 267-272.

Straub T.M.; Pepper I.L.; Gerba C.P. Persistence of viruses in desert soils amended with anaerobically digested sewage sludge. *Appl. Environ. Microbiol*. **1992**, 58, 636–641.

Thompson S.S.; Jackson J.L.; Suva-Castillo M.; Yanko W.A.; El Jack Z.; Kuo J.; Chen C.L.;, Williams F.P.; Schnurr D.P. Detection of infectious human adenoviruses in tertiarytreated and ultraviolet-disinfected wastewater. *Water Environ Res*. **2003**, 75: 163–170.

Trilisky, E.I.; Lenhoff, A.M. Sorption processes in ion-exchange chromatography of viruses. *J Chromatogr*. **2007**. A 1142, 2–12.

USEPA – US Environmental Protection Agency. Water: Contaminant Candidate List. http://water.epa.gov/scitech/drinkingwater/dws/ccl/. Acesso em: 14 de Agosto de 2013.

Vijayavel, Kannappan; Fujioka, Roger; Ebdon, James; Taylor, Huw. Isolation and characterization of Bacteroides host strain HB-73 used to detectsewage specific phages in Hawaii. Water Research. **2010**, 44, 3714-3724.

Whittig, L. D.; Allardice, W. R. X-ray diffraction techniques, In: *Methods of Soil Analysis. Physical and Mineralogical Methods*, Kute, A., Ed.; Second edition.: Agronomy, 1986; pp. 331 – 362.

Wong, K.; Onan, B. M.; Xagoraki, I. Quantification of Enteric Viruses, Pathogen Indicators, and Salmonella Bacteria in Class B Anaerobically Digested Biosolids by Culture and Molecular Methods. *Applied and Environmental Microbiology*. **2010**, 76 (19), 6441–6448.

Wong, K.; Mukherjee, B.; Kahler, A. M.; Zepp, R.; Molina, M. Influence of inorganic ions on aggregation and adsorption behaviors of human adenovirus. *Environmental Science and Technology*. **2012**, 46, 11145-11153.

Wong, K.; Voice, T. C.; Xagoraraki, I. Effect of organic carbon on sorption of human adenovirus to soil particles and laboratory containers. *Water Research*. **2013**, 47, 3339-3346.

Wyn-Jones, A. P.; Carducci, A.; Cook, N.; D'Agotino, M.; Diviza, M.; Fleischer, J. Surveillance of adenoviruses and noroviruses in European recreational waters. *Water Research*. **2011**, 45 (3), 1025–1038.

Yoshimoto, R.; Sasaki, H.; Takahashi, T.; Kanno, H.; Nazyo, M. Contribution of soil components to adsorption of Pepper Mild Mottle Virus by Japanese soils. *Soil Biology & Biochemistry*. **2012**, 46 196-102.

Zhang, H.; Zhang, J.; Zhao, B.; Zhang, C. Removal of bacteriophages MS2 and phiX174 form aqueous solutions using a red soil. *Journal of Hazardous Materials*. **2010**, 180, 640-647.

Zhao, B.; Zhang, H.; Zhang, J.; Jin, Y. Virus adsorption and inactivation in soil as influenced by autochthonous microorganisms and water content. *Soil Biology & Biochemistry*. **2008**, 40, 649-659.

Tabela 1 – Análise físico-química e instrumental das amostras de solo com matéria (CMO) orgânica e sem matéria orgânica (SMO)

Análise	Unidade	CMO	SMO
Matéria Orgânica (MO)[a]	$dag.dm^{-3}$	3,07	ND
Alumínio (Al)[b]	% (wt)	42,06	41,72
Silício (Si)[b]	% (wt)	47,72	46,70
K (Potássio) [b]	% (wt)	0,69	0,47
Ti (Titânico) [b]	% (wt)	2,54	1,97
Fe (Ferro) [b]	% (wt)	11,99	9,14
Ferro – Fe_d[c]	$_g kg^{-1}$	131,1	20,2
Ferro – Fe_o[d]	$_g kg^{-1}$	4,0	3,0
Areia[e]	$dag.dm^{-3}$	36,79	ND
Silte[e]	$dag.dm^{-3}$	24,2	ND
Argila[e]	$dag.dm^{-3}$	39	ND
Grau de Floculação[f]	%	27	ND
Ponto de Carga Zero (P	*	5,41	4,20
Densidade[h]	*	1,60	ND

a Determinação por calcinação (Brasil, 1988).
B Espectroscopia de energia dispersiva utilizando o microscópio eletrônico de varredura (dados semi-quantitativos).
C Concentração de ferro na fração argila pelo método de oxalato (Whitting et al.,1986).
D Concentração de ferro na fração argila pelo método de ditionito (Whitting et al.,1986).
E Dispersão total (Método da Pipeta) (Embrapa, 1997).
F Relação argila dispersa naturalmente e argila total (Vettori et al., 1969, Embrapa, 1997).
G PCZ- Método da titulação potenciométrica (Embrapa, 2007).
H Densidade de partículas (Embrapa, 2007).
* Adimensional.

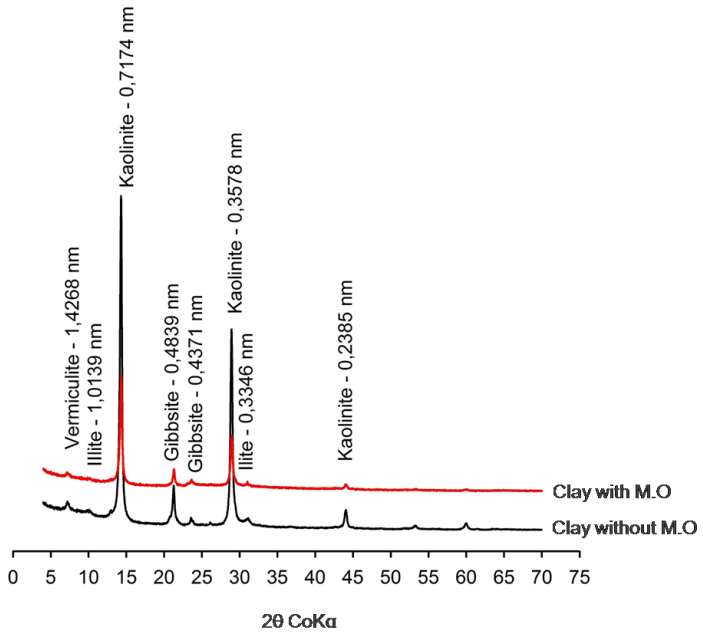


Figura 1 – Análise de DR-X mostrado a sobreposição dos difratogramas do solo CMO e SMO. Presença de argila do tipo 1:1 (caulinita), bem como de argilas 2:1 (vermiculita e ilita). Esta composição oferece indícios sobre o grau de intemperismo do solo, sobretudo pela presença da caulinita e da gibsita – argilas presentes em solos intemperizados.

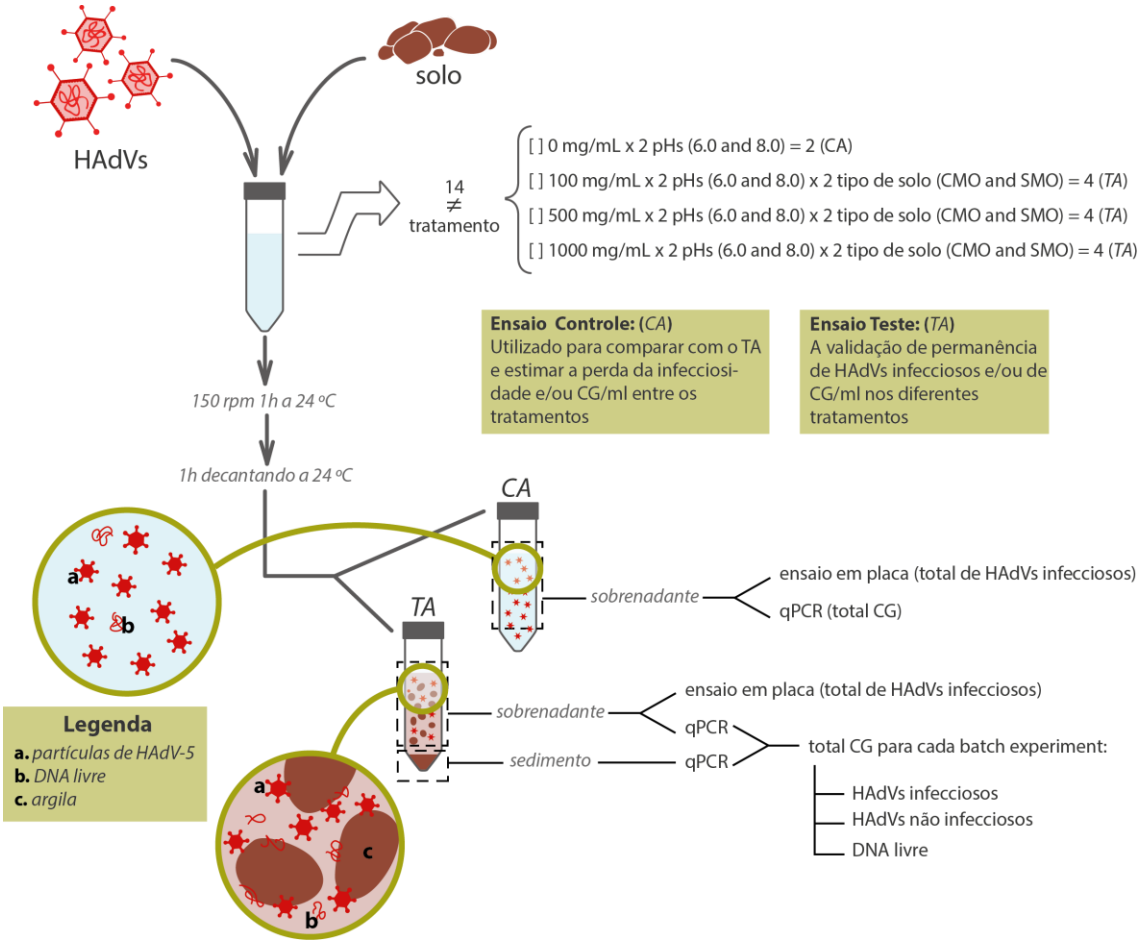


Figura 2 – Enumeração de cópias genômicas e de HAdV-5 infecciosos em águas simuladas com sólidos obtidos de solos tropicais e sob condições controladas de pH e presença de matéria orgânica.

Tabela 2 – Número de CG/mL de HAdV-5 no sobrenadante de soluções simuladas com solo CMO e SMO em dois diferentes tipos de pH (6,0 e 8,0)

Sobrenadante	Média	DP	Min	Max	p
pH 8,0 (CG/mL)					
CMO	$4,04 \times 10^{12}$	$3,96 \times 10^{12}$	$4,03 \times 10^{11}$	$9,26 \times 10^{12}$	0,300
SMO	$2,49 \times 10^{12}$	$1,75 \times 10^{12}$	$3,95 \times 10^{11}$	$5,04 \times 10^{12}$	
Total	$3,26 \times 10^{12}$	$3,07 \times 10^{12}$	$3,95 \times 10^{11}$	$9,26 \times 10^{12}$	
pH 6,0 (CG/mL)					
CMO	$2,66 \times 10^{12}$	$1,07 \times 10^{12}$	$1,19 \times 10^{12}$	$3,67 \times 10^{12}$	0,112
SMO	$1,69 \times 10^{12}$	$1,36 \times 10^{12}$	$1,95 \times 10^{11}$	$3,77 \times 10^{12}$	
Total	$2,18 \times 10^{12}$	$1,29 \times 10^{12}$	$1,95 \times 10^{11}$	$3,77 \times 10^{12}$	

Teste u Mann-Whitney. Teste u Mann-Whitney. HAdV-5: adenovírus humano espécie C sorotipo 5; CG/mL: cópias genômicas por mililitro quantificadas por Real time PCR Quantitativa; SMO: sem matéria orgânica; CMO: com matéria orgânica.

Tabela 3 – Número de CG/mL de HAdV-5 no sedimento de soluções simuladas com solo CMO e SMO em dois diferentes tipos de pH (6,0 e 8,0)

Sedimento	Média	DP	Min	Max	p
pH 8,0 (CG/mL)					
CMO	$2,30 \times 10^{13}$	$4,03 \times 10^{13}$	$9,50 \times 10^{9}$	$9,50 \times 10^{13}$	0,469
SMO	$3,45 \times 10^{13}$	$3,57 \times 10^{13}$	$1,07 \times 10^{9}$	$9,50 \times 10^{13}$	
Total	$2,88 \times 10^{13}$	$3,77 \times 10^{13}$	$1,07 \times 10^{9}$	$9,50 \times 10^{13}$	
pH 6,0 (CG/mL)					
CMO	$3,20 \times 10^{13}$	$3,14 \times 10^{13}$	$4,30 \times 10^{8}$	$9,50 \times 10^{13}$	0,397
SMO	$2,01 \times 10^{13}$	$3,58 \times 10^{13}$	$6,07 \times 10^{5}$	$9,50 \times 10^{13}$	
Total	$2,61 \times 10^{13}$	$3,35 \times 10^{13}$	$6,07 \times 10^{5}$	$9,50 \times 10^{13}$	

Teste u Mann-Whitney. HAdV-5: adenovírus humano espécie C sorotipo 5; CG/mL: cópias genômicas por mililitro quantificadas por Real Time PCR Quantitativa; SMO: sem matéria orgânica; CMO: com matéria orgânica.

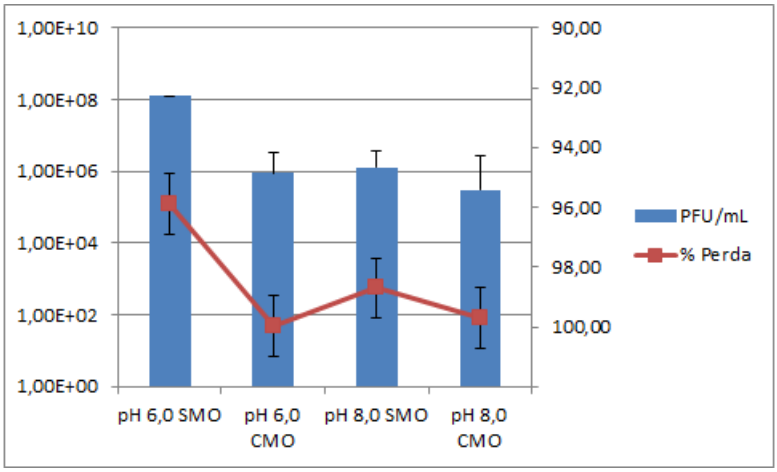


Figura 3 - Enumeração da média de HAdV-5 infecciosos em PFU/mL obtido pelo ensaio em placa de lise e porcentagem de perda viral (HAdV infeccioso espécie C, sorotipo 5 que não foi detectado no sobrenadante, morto no sobrenadante ou interligados de alguma forma ao sedimento) nos diferentes ensaios testes. E = logaritmo.

Tabela 4 – Número total de CG.mL^{-1} de HAdV-5 no sobrenadante (N_{sup}), precipitado (N_{prec}), ensaio teste (C_{ta}) e taxa final de recuperação (R_r) entre os três tipos de concentração (mg.L^{-1}) de solo CMO e SMO e com diferença de pH (6,0 e 8,0), utilizando o modelo matemático desenvolvido neste estudo.

pH	**solo**	**[ ]**	N_{sup}	N_{prec}	N_{ta}	R_r **(%)**
6,0	CMO	100	$3{,}49 \times 10^{12}$	$6{,}96 \times 10^{10}$	$3{,}56 \times 10^{12}$	99,925
		500	$1{,}24 \times 10^{12}$	$3{,}48 \times 10^{11}$	$1{,}50 \times 10^{12}$	99,996
		1000	$3{,}26 \times 10^{12}$	$1{,}34 \times 10^{7}$	$3{,}26 \times 10^{12}$	99,931
	SMO	100	$1{,}57 \times 10^{12}$	$6{,}05 \times 10^{9}$	$1{,}58 \times 10^{12}$	99,965
		500	$3{,}29 \times 10^{12}$	$3{,}72 \times 10^{8}$	$3{,}29 \times 10^{12}$	99,923
		1000	$2{,}18 \times 10^{11}$	$2{,}81 \times 10^{6}$	$2{,}18 \times 10^{11}$	99,995
	p		0,045	0,003	0,004	0,110
8,0	CMO	100	$2{,}52 \times 10^{12}$	$9{,}49 \times 10^{10}$	$2{,}61 \times 10^{12}$	99,945
		500	$9{,}17 \times 10^{12}$	$1{,}62 \times 10^{7}$	$9{,}17 \times 10^{12}$	99,807
		1000	$4{,}18 \times 10^{11}$	$4{,}07 \times 10^{11}$	$8{,}25 \times 10^{11}$	99,983
	SMO	100	$2{,}69 \times 10^{12}$	$9{,}49 \times 10^{10}$	$2{,}78 \times 10^{12}$	99,941
		500	$4{,}15 \times 10^{11}$	$1{,}62 \times 10^{7}$	$4{,}15 \times 10^{11}$	99,991
		1000	$4{,}36 \times 10^{12}$	$4{,}07 \times 10^{11}$	$4{,}77 \times 10^{12}$	99,900
	p		0,196	1,000	0,001	0,287

Teste u Mann-Whitney. HAdV-5: adenovírus humano espécie C sorotipo 5; CG/mL: cópias genômicas por mililitro quantificadas por Real Time PCR Quantitativa; SMO: sem matéria orgânica; CMO: com matéria orgânica.

5 CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS

5.1 Conclusões

- Não há um método padrão para a análise virológica em água;
- Os adenovírus possuem características favoráveis à sua indicação como marcadores virológicos da qualidade da água;
- Adenovírus humano sorotipo C estão presentes em elevado número de cópias genômicas na água tratada da cidade de Goiânia;
- O pH e a matéria orgânica são parâmetros que influenciam na infecciosidade de HAdV-5 e contrariamente, não influenciam na recuperação de cópias genômicas de HAdV-5 em ambientes simulados com água e sólidos tropicais;
- A equação matemática desenvolvida é útil na avaliação da taxa de recuperação de cópias genômicas virais em ambientes simulados com água e sólidos argilosos.

5.2 Considerações Finais:

É interessante relatar que este estudo sofreu diversas limitações metodológicas. Dentre estas, a falta de energia que ocorreu nos Institutos de Ciências Biológicas no final do ano de 2012, e que perdurou por 3 dias ininterruptos. O incidente foi reportado à Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-graduação (PRPPG/UFG), mas esta em nenhum momento se mostrou solidária em auxiliar financeiramente na reposição de importantes reagentes deteriorados .

Diante deste incidente, toda a metodologia da pesquisa foi modificada, e não raro, na tentativa de cumprir os prazos, reagentes tiveram que ser comprados com a verba particular dos membros da equipe pesquisadora. Foi assim que, de um estudo anteriormente delimitado na área de epidemiologia molecular, foi realizado um estudo experimental de

avaliação da estabilidade de HAdV-5 frente à condições simuladas em laboratório.

Não obstante, o projeto de pesquisa sofreu com inúmeros problemas de contaminação de cultura, reagentes embargados na ANVISA e acidentes de graves proporções tanto no LDGM quanto LGMC, que comprometeram sobremaneira as análises.

Após iniciadas as análises com sólidos, e em razão de uma aluna de mestrado ter iniciado novamente os experimentos com água tratada, foi decidido retomar os experimentos inerentes à detecção de HAdVs em água tratada. Todavia, foi dado prosseguimento à pesquisa com os sólidos. Desta forma, a Tese conta com dois eixos bem delimitados na parte experimental, mas que de certa forma se correlacionam, pois ambos visam à pesquisa de adenovírus em água, sendo uma em água tratada, e outra em água simulada com sólidos tropicais.

Desta forma, os dados aqui apresentados podem ser de grande valia, pois este é um estudo pioneiro no estado de Goiás, pois efetivamente detectou HAdVs em amostras de água tratada da cidade de Goiânia e também os quantificou e realizou a caracterização molecular dos mesmos. Os dados apresentados podem servir de base para outros estudos na área de virologia ambiental e mesmo para mitigar tomadas de decisões na área de saúde ambiental, já que fica comprovado à incapacidade da remoção de vírus durante o tratamento da água, e os vírus quantificados estão em um valor muito acima da média normalmente detectada em outras localidades do país e do mundo.

Os adenovírus são extremamente prevalentes em diferentes matrizes ambientais, utilizando com sucesso diferentes metodologias biomoleculares e de cultivo celular, todavia, até o momento, nenhum estudo propôs estudar a estabilidade destes patógenos em sólidos frente à variações simultâneas de pH e matéria orgânica, que são condições normalmente encontradas em meio ambiente. Assim, os dados aqui

apresentados, também são muito úteis na tentativa de melhor entender as interações ambientais destes patógenos.

É proposta uma mudança de paradigma quanto à monitorização de vírus em água. Diante dos dados obtidos, é recomendado:

- Utilizar o HAdV como marcador virológico da qualidade da água e para inferir a remoção viral pós-tratamento;
- Consolidação dos grupos de pesquisas emergentes na área de microbiologia ambiental, com enfoque para os micro-organismos de interesse médico-sanitário;
- Fomentar a pesquisa de novas metodologias de saneamento que favoreçam à remoção de vírus em sistemas de tratamento de água;
- Realizar parcerias com os órgãos incumbidos na monitoração e certificação da água tratada e ambiental, oferecendo o serviço de monitoramento virológica da água no município de Goiânia.

6 - REFERÊNCIAS

ALBERTS, B. et al. **Biologia Molecular da Célula**. 5ª ed. Porto Alegre: Artes Médicas, 2010.

ALBINANA-GIMENEZ, N. et al. Distribution of human polyomaviruses, adenoviruses, and hepatitis E virus in the environment and in a drinking-water treatment plant. **Environ Sci Technol,** v. 40, n. 23, p. 7416-22, Dec 1 2006.

ALBINANA-GIMENEZ, N. et al. Analysis of adenoviruses and polyomaviruses quantified by qPCR as indicators of water quality in source and drinking-water treatment plants. **Water Res,** v. 43, n. 7, p. 2011-9, Apr 2009.

ALLARD, A.; ALBINSSON, B.; WADELL, G. Detection of adenoviruses in stools from healthy persons and patients with diarrhea by two-step polymerase chain reaction. **J Med Virol,** v. 37, n. 2, p. 149-57, Jun 1992.

_____. Rapid typing of human adenoviruses by a general PCR combined with restriction endonuclease analysis. **J Clin Microbiol,** v. 39, n. 2, p. 498-505, Feb 2001.

BALLESTER, N. A.; FONTAINE, J. H.; MARGOLIN, A. B. Occurrence and correlations between coliphages and anthropogenic viruses in the Massachusetts Bay using enrichment and ICC-nPCR. **J Water Health,** v. 3, n. 1, p. 59-68, Mar 2005.

BARARDI, C. R. et al. Flow cytometry and RT-PCR for rotavirus detection in artificially seeded oyster meat. **Int J Food Microbiol,** v. 49, n. 1-2, p. 9-18, Aug 1 1999.

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, Jun 2008.

BRASIL. Ministério da Saúde: : Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Dispõe sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade**. Portaria nº. 2.914, de 12 de dezembro de 2011.**Brasília, DF**, 2011.

_____. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde, **Coordenação-Geral de Vigilância em Saúde Ambiental. Portaria MS n.º 518/2004**. Brasília: Editora do Ministério da Saúde. 518/2004 2005.

CALGUA, B. et al. Detection and quantitation of infectious human adenoviruses and JC polyomaviruses in water by immunofluorescence assay. **J Virol Methods,** v. 171, n. 1, p. 1-7, Jan 2011.

CHAPRON, C. D. et al. Detection of astroviruses, enteroviruses, and adenovirus types 40 and 41 in surface waters collected and evaluated by the information collection rule and an integrated cell culture-nested PCR procedure. **Appl Environ Microbiol,** v. 66, n. 6, p. 2520-5, Jun 2000.

CHARLES, K. J. et al. Assessment of the stability of human viruses and coliphage in groundwater by PCR and infectivity methods. **J Appl Microbiol,** v. 106, n. 6, p. 1827-37, Jun 2009.

CHEN, Z. et al. Capture and release of viruses using amino-functionalized silica particles. **Analytica chimica acta,** v. 569, n. 1, p. 76-82, 2006.

CRABTREE, K. D. et al. Waterborne adenovirus: a risk assessment. **Water Science and Technology,** v. 35, n. 11, p. 1-6, 1997.

CROMEANS, T. L. et al. Development of plaque assays for adenoviruses 40 and 41. **J Virol Methods,** v. 151, n. 1, p. 140-5, Jul 2008.

D'AGOSTINO, M. et al. Nucleic acid amplification-based methods for detection of enteric viruses: Definition of controls and interpretation of results. **Food and Environmental Virology,** v. 3, n. 2, p. 55-60, 2011.

DE PAULA, V. S. et al. Hepatitis A virus in environmental water samples from the Amazon Basin. **Water Res,** v. 41, n. 6, p. 1169-76, Mar 2007.

DUIZER, E. et al. Laboratory efforts to cultivate noroviruses. **J Gen Virol,** v. 85, n. Pt 1, p. 79-87, Jan 2004.

EMBRAPA. **Manual de métodos de análise de solo. Centro Nacional de Pesquisa de Solos**. Rio de Janeiro: Ed. Revisada e. Atualizada, 1997. 212

ENDERS, J. F. et al. Adenoviruses: group name proposed for new respiratory-tract viruses. **Science,** v. 124, n. 3212, p. 119-20, Jul 20 1956.

ENRIQUEZ, C. E. Adenoviruses. In: BITTON, G. (Ed.). **Encyclopedia of environmental microbiology**. New York, NY: John Wiley & Sons, Inc., v.1, 2002. p.92-100.

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

FIELDS, B. N.; KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M. **Fields Virology**. 5ª ed. Philadelphia: Lippicort-Williams & Wilkins, 2007.

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, n. 2, p. 357-71, Jun 2005.

FONG, T. T. et al. Quantitative detection of human adenoviruses in wastewater and combined sewer overflows influencing a Michigan river. **Appl Environ Microbiol,** v. 76, n. 3, p. 715-23, Feb 2010.

FONGARO, G. et al. Evaluation and molecular characterization of human adenovirus in drinking water supplies: viral integrity and viability assays. **Virol J,** v. 10, p. 166, 2013.

FORMIGA-CRUZ, M. et al. Nested multiplex PCR assay for detection of human enteric viruses in shellfish and sewage. **J Virol Methods,** v. 125, n. 2, p. 111-8, May 2005.

GANTZER, C.; QUIGNON, F.; SCHWARTZBROD, L. Poliovirus-1 adsorption onto and desorption from montmorillonite in seawater. Survival of the adsorbed virus. **Environmental technology,** v. 15, n. 3, p. 271-278, 1994.

GARCIA, L. A. et al. Surveillance of human and swine adenovirus, human norovirus and swine circovirus in water samples in Santa Catarina, Brazil. **J Water Health,** v. 10, n. 3, p. 445-52, Sep 2012.

GERBA, C. P.; GRAMOS, D. M.; NWACHUKU, N. Comparative inactivation of enteroviruses and adenovirus 2 by UV light. **Appl Environ Microbiol,** v. 68, n. 10, p. 5167-9, Oct 2002.

GIBSON, K. E. et al. Measuring and mitigating inhibition during quantitative real time PCR analysis of viral nucleic acid extracts from large-volume environmental water samples. **Water Res,** v. 46, n. 13, p. 4281-91, Sep 1 2012.

GREENING, G. E.; HEWITT, J.; LEWIS, G. D. Evaluation of integrated cell culture-PCR (C-PCR) for virological analysis of environmental samples. **Journal of applied microbiology,** v. 93, n. 5, p. 745-750, 2002.

GREENING, G. E.; WOODFIELD, L.; LEWIS, G. D. RT-PCR and chemiluminescent ELISA for detection of enteroviruses. **J Virol Methods,** v. 82, n. 2, p. 157-66, Oct 1999.

GRIFFIN, D. W. 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, n. 9, p. 4118-25, Sep 1999.

HALL, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucleic acids symposium series, 1999. p.95-98.

HAMZA, I. A. et al. Detection of human viruses in rivers of a densly-populated area in Germany using a virus adsorption elution method optimized for PCR analyses. **Water Res,** v. 43, n. 10, p. 2657-68, Jun 2009.

HARAMOTO, E. et al. Development of sample storage methods for detecting enteric viruses in environmental water. **J Virol Methods,** v. 151, n. 1, p. 1-6, Jul 2008.

HARAMOTO, E. et al. Real-time PCR detection of adenoviruses, polyomaviruses, and torque teno viruses in river water in Japan. **Water Res,** v. 44, n. 6, p. 1747-52, Mar 2010.

HE, J. W.; JIANG, S. Quantification of enterococci and human adenoviruses in environmental samples by real-time PCR. **Appl Environ Microbiol,** v. 71, n. 5, p. 2250-5, May 2005.

HEALTH CANADA. **Guidelines for Canadian Drinking Water Quality: Guideline Technical Document — Enteric Viruses. Water, Air and Climate Change Bureau, Healthy Environments and Consumer Safety Branch.** Ottawa, Ontario: Health Canada, 2011.

HERNROTH, B. E. et al. Environmental factors influencing human viral pathogens and their potential indicator organisms in the blue mussel, Mytilus edulis: the first Scandinavian report. **Appl Environ Microbiol,** v. 68, n. 9, p. 4523-33, Sep 2002.

HIJNEN, W. A.; BEERENDONK, E. F.; MEDEMA, G. J. Inactivation credit of UV radiation for viruses, bacteria and protozoan (oo)cysts in water: a review. **Water Res,** v. 40, n. 1, p. 3-22, Jan 2006.

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

HORWITZ, M. S. Adenovirus immunoregulatory genes and their cellular targets. **Virology,** v. 279, n. 1, p. 1-8, Jan 5 2001.

HUANG, Y. T. et al. CV-1 and MRC-5 mixed cells for simultaneous detection of herpes simplex viruses and varicella zoster virus in skin lesions. **J Clin Virol,** v. 24, n. 1-2, p. 37-43, Feb 2002.

HURST, C. J. Presence of enteric viruses in freshwater and their removal by the conventional drinking water treatment process. **Bull World Health Organ,** v. 69, n. 1, p. 113-9, 1991.

ICTV. International Committee on Taxonomy of Viruses. Virus Taxonomy: 2012 Release. 2013. Disponível em: < http://www.ictvonline.org/virusTaxonomy.asp >. Acesso em: 10 agosto de 2013.

JIANG, S.; DEZFULIAN, H.; CHU, W. Real-time quantitative PCR for enteric adenovirus serotype 40 in environmental waters. **Can J Microbiol,** v. 51, n. 5, p. 393-8, May 2005.

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

JIANG, S. C.; CHU, W.; HE, J. W. Seasonal detection of human viruses and coliphage in Newport Bay, California. **Appl Environ Microbiol,** v. 73, n. 20, p. 6468-74, Oct 2007.

JIANG, X.; WANG, J.; ESTES, M. K. Characterization of SRSVs using RT-PCR and a new antigen ELISA. **Arch Virol,** v. 140, n. 2, p. 363-74, 1995.

JUKES, T. H.; CANTOR, C. R. {Evolution of protein molecules}. 1969.

KATAYAMA, H. et al. One-year monthly quantitative survey of noroviruses, enteroviruses, and adenoviruses in wastewater collected from six plants in Japan. **Water Res,** v. 42, n. 6-7, p. 1441-8, Mar 2008.

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, n. 3, p. 1033-9, Mar 2002.

KESWICK, B. H. et al. Inactivation of Norwalk virus in drinking water by chlorine. **Appl Environ Microbiol,** v. 50, n. 2, p. 261-4, Aug 1985.

KING, A. M. Q. et al. **Virus taxonomy: IXth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses**. San Diego, CA: Access Online via Elsevier, 2011. ISBN 0123846846.

KOOPMANS, M. et al. Foodborne viruses. **FEMS Microbiol Rev,** v. 26, n. 2, p. 187-205, Jun 2002.

LECHEVALLIER, M. W.; AU, K.-K. **World Health Organization and IWA. Water treatment and pathogen control: Process efficiency in achieving safe drinking-water**. Geneva: IWA Publishing, 2004. ISBN 1843390698.

LI, D. et al. Evaluation of the infectivity, gene and antigenicity persistence of rotaviruses by free chlorine disinfection. **J Environ Sci (China),** v. 23, n. 10, p. 1691-8, 2011.

LINDEN, K. G. et al. Enhanced UV inactivation of adenoviruses under polychromatic UV lamps. **Appl Environ Microbiol,** v. 73, n. 23, p. 7571-4, Dec 2007.

LOPMAN, B. A. et al. Viral gastroenteritis outbreaks in Europe, 1995-2000. **Emerg Infect Dis,** v. 9, n. 1, p. 90-6, Jan 2003.

MAMANE-GRAVETZ, H.; LINDEN, K. G. UV disinfection of indigenous aerobic spores: implications for UV reactor validation in unfiltered waters. **Water Res,** v. 38, n. 12, p. 2898-906, Jul 2004.

MEHNERT, D. U.; STEWIEN, K. E. Detection and distribution of rotavirus in raw sewage and creeks in Sao Paulo, Brazil. **Appl Environ Microbiol,** v. 59, n. 1, p. 140-3, Jan 1993.

MELNICK, J. L. Poliomyelitis virus in urban sewage in epidemic and in nonepidemic times. **Am J Hyg,** v. 45, n. 2, p. 240-53, Mar 1947.

MELNICK, J. L. A water-borne urban epidemic of hepatitis. In: LOGRIPPO, G. A.;HARTMAN, F. W.;MATEER, J. G.*, et al* (Ed.). **Hepatitis Frontiers**. Boston: Little, Brown, 1957.

MENA, K. D.; GERBA, C. P. Waterborne adenovirus. In: (Ed.). **Reviews of environmental contamination and toxicology**: Springer, 2009. p.133-167. ISBN 0387096469.

METCALF, T. G.; MELNICK, J. L.; ESTES, M. K. Environmental virology: from detection of virus in sewage and water by isolation to identification by molecular biology--a trip of over 50 years. **Annu Rev Microbiol,** v. 49, p. 461-87, 1995.

MORRIS, C. A. et al. Epidemic viral enteritis in a long-stay children's ward. **Lancet,** v. 1, n. 7897, p. 4-5, Jan 4 1975.

MURRAY, T. Y.; MANS, J.; TAYLOR, M. B. First detection of human sapoviruses in river water in South Africa. **Water Sci Technol,** v. 67, n. 12, p. 2776-83, 2013.

NEI, M.; LI, W. H. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. **Proc Natl Acad Sci U S A,** v. 76, n. 10, p. 5269-73, Oct 1979.

NRMMC. Natural Resource Management Ministerial Council. Australian Water Association. **Guidelines for Sewrage Systems Biosolids Management. National Water Qualoty Mangement Strategy.** . Australian: Artarmon, 2004. ISBN 0-9581875-3-3.

OGORZALY, L. et al. Occurrence, survival, and persistence of human adenoviruses and F-specific RNA phages in raw groundwater. **Appl Environ Microbiol,** v. 76, n. 24, p. 8019-25, Dec 2010.

OGORZALY, L. et al. Development of a quantitative immunocapture real-time PCR assay for detecting structurally intact adenoviral particles in water. **J Virol Methods**, Jul 11 2013.

PINA, S. et al. Viral pollution in the environment and in shellfish: human adenovirus detection by PCR as an index of human viruses. **Appl Environ Microbiol,** v. 64, n. 9, p. 3376-82, Sep 1998.

PODDAR, S. K. Detection of adenovirus using PCR and molecular beacon. **J Virol Methods,** v. 82, n. 1, p. 19-26, Sep 1999.

PUIG, M. et al. Detection of adenoviruses and enteroviruses in polluted waters by nested PCR amplification. **Appl Environ Microbiol,** v. 60, n. 8, p. 2963-70, Aug 1994.

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

RAJAL, V. B. et al. Molecular quantitative analysis of human viruses in California stormwater. **Water Res,** v. 41, n. 19, p. 4287-98, Nov 2007.

RESENDE, M. et al. **Mineralogia de solos brasileiros: Interpretação e aplicações**. UFLA, 2005. ISBN 8587692259.

RIGOTTO, C. et al. Survival of adenovirus types 2 and 41 in surface and ground waters measured by a plaque assay. **Environ Sci Technol,** v. 45, n. 9, p. 4145-50, May 1 2011.

RIGOTTO, C. et al. Evaluation of HA negatively charged membranes in the recovery of human adenoviruses and hepatitis A virus in different water matrices. **Mem Inst Oswaldo Cruz,** v. 104, n. 7, p. 970-4, Nov 2009.

RIGOTTO, C. et al. Assessment of adenovirus, hepatitis A virus and rotavirus presence in environmental samples in Florianopolis, South Brazil. **J Appl Microbiol,** v. 109, n. 6, p. 1979-87, Dec 2010.

RUSSELL, W. C. Adenoviruses: update on structure and function. **J Gen Virol,** v. 90, n. Pt 1, p. 1-20, Jan 2009.

SABESP. Nova portaria de Potabilidade de água: Busca de consenso para viabilizar a melhoria da qualidade de água potável distribuída no Brasil. **Revista DAE**, v. 189, maio-agosto 2012.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. W. **Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring HarborLaboratory** 3ª. New York, NY: Press Section, 2001.

SANTANA JR, C. A. S. **Estudo molecular dos microrganismos emergentes Helicobacter pylori, Campylobacter jejuni e Campylobacter coli nas águas fluviais do município de Goiânia, Goiás**. 2005. 75

Dissertação de mestrado (Mestrado). Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás, Goiânia.

SANTOS, S. F. O. **Estudo dos parasitos oportunistas em águas fluviais de uso humano no município de Goiânia-Goiás, Brasil**. 2008. 117 Dissertação de Mestrado (Mestrado). Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde, Universidade Federal de Goiás, Goiânia.

SCHMIDT, M. et al. Application of heat-labile uracil-DNA-glycosylase in improved carryover prevention technique. **Biochemica,** v. 2, p. 13-15, 1996.

SCHVOERER, E. et al. Qualitative and quantitative molecular detection of enteroviruses in water from bathing areas and from a sewage treatment plant. **Res Microbiol,** v. 152, n. 2, p. 179-86, Mar 2001.

SHIN, G.-A.; LINDEN, K. G.; SOBSEY, M. D. Low pressure ultraviolet inactivation of pathogenic enteric viruses and bacteriophages. **Journal of environmental engineering and science,** v. 4, n. S1, p. S7-S11, 2005.

SILVA, H. D. **Detecção molecular e monitoramento sazonal de adenovírus em águas fluviais no município de Goiânia, Goiás-Brasil: correlação com parâmetros físico-químicos, bacteriológicose Metanálise avaliativa de metodologias.** 2009. 180 Dissertação de mestrado (Mestrado). Pós-graduação em Ciências da Saúde, Universidade Federal de Goiás, Goiânia.

SILVA, H. D. et al. Análise virológica da qualidade da água: uma revisão das metodologias de concentração e detecção viral. **Revista Brasileira de Biociências,** v. 9, n. 3, p. 405, 2011.

SILVA, H. D.; GARCÍA-ZAPATA, M. T. A.; ANUNCIAÇÃO, C. E. Why the use of adenoviruses as water quality virologic marker? **Food and Environmental Virology,** v. 3, n. 3-4, p. 138-140, 2011.

SILVA, H. D. et al. Molecular detection of adenoviruses in lakes and rivers of Goiânia, Goiás, Brazil. **Food and Environmental Virology,** v. 2, n. 1, p. 35-40, 2010.

SOULE, H. et al. Ultrafiltration and reverse transcription-polymerase chain reaction: an efficient process for poliovirus, rotavirus and hepatitis A virus detection in water. **Water Research,** v. 34, n. 3, p. 1063-1067, 2000.

TAMURA, K. et al. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. **Molecular biology and evolution,** v. 28, n. 10, p. 2731-2739, 2011.

THOMPSON, J. D. et al. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. **Nucleic Acids Res,** v. 25, n. 24, p. 4876-82, Dec 15 1997.

TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. São Paulo: Câmara Brasileira do Livro, 2008. 615

TSAI, Y.-L. et al. Simple method of concentrating enteroviruses and hepatitis A virus from sewage and ocean water for rapid detection by reverse transcriptase-polymerase chain reaction. **Applied and Environmental Microbiology,** v. 59, n. 10, p. 3488-3491, 1993.

USEPA. United States Environmental Protection Agency. **2011 Edition of the Drinking Water Standards and Health Advisories. EPA 820-R-11-002**. Washington, DC: Office of Water, 2011.

_____. Water: Contaminant Candidate List. CCL and Regulatory Determinations Home. 2012. Disponível em: < http://water.epa.gov/scitech/drinkingwater/dws/ccl/ >. Acesso em: 09 - may - 2013.

VAN HEERDEN, J.; EHLERS, M. M.; GRABOW, W. O. Detection and risk assessment of adenoviruses in swimming pool water. **J Appl Microbiol,** v. 99, n. 5, p. 1256-64, 2005.

WARD, R. L.; AKIN, E. W.; D'ALESSIO, D. J. Minimum infective dose of animal viruses. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology,** v. 14, n. 4, p. 297-310, 1984.

WENDT, J. W. Evaluation of the Mehlich 3 soil extractant for upland Malawi soils. **Communications in Soil Science & Plant Analysis,** v. 26, n. 5-6, p. 687-702, 1995.

WHITTIG, L. D.; ALLARDICE, W. R. X-ray diffraction techniques. In: KUTE, A. (Ed.). **Methods of Soil Analysis**. Madison, Winscousin: American Society of Agronomy, 1986. p.331-62. (Agronomy (ASA)).

WHO. **World Health Organization. Regional Office for Europe. Twenty steps for developing**
a Healthy Cities project. 3rd. Copenhagen: WHO, 1997.

WONG, K.; ONAN, B. M.; XAGORARAKI, I. Quantification of enteric viruses, pathogen indicators, and Salmonella bacteria in class B anaerobically digested biosolids by culture and molecular methods. **Appl Environ Microbiol,** v. 76, n. 19, p. 6441-8, Oct 2010.

WONG, M. et al. Evaluation of public health risks at recreational beaches in Lake Michigan via detection of enteric viruses and a human-specific bacteriological marker. **Water Res,** v. 43, n. 4, p. 1137-49, Mar 2009.

WU, J. et al. A simple and novel method for recovering adenovirus 41 in small volumes of source water. **J Appl Microbiol,** v. 110, n. 5, p. 1332-40, May 2011.

WYER, M. D. et al. Relationships between human adenoviruses and faecal indicator organisms in European recreational waters. **Water Res,** v. 46, n. 13, p. 4130-41, Sep 1 2012.

WYN-JONES, A. P. et al. Surveillance of adenoviruses and noroviruses in European recreational waters. **Water Res,** v. 45, n. 3, p. 1025-38, Jan 2011.

WYN-JONES, A.P.; SELLWOOD, J. Enteric viruses in the aquatic environment. **J Appl Microbiol**, v. 91, n. 6, p. 945-962, Dez 2001.

ZHAO, B. et al. Virus adsorption and inactivation in soil as influenced by autochthonous microorganisms and water content. **Soil Biology and Biochemistry,** v. 40, n. 3, p. 649-659, 2008.

7 - ANEXOS

Anexo – 1 - instructions to authors for environmental science and technology

Anexo 2 - instructions for authors food and environmental virology

ANEXO 1

7.1 INSTRUCTIONS FOR AUTHORS FOOD AND ENVIRONMENTAL VIROLOGY

Types of Papers

The journal publishes Original Articles, Reviews, Short Communications. Brief communications should be no more than 1000 words and Abstracts of no more than 50 words.

Authors may consult suitability of a proposed submission directly with the Editor-in-Chief:

Dr. Nigel Cook
Senior Microbiologist
Food and Environmental Microbiology
Central Science Laboratory
Sand Hutton
Y041 1LZ York
United Kingdom
n.cook@csl.gov.uk
tel. +44 (0)1904 462623

Use and definition of controls in nucleic acid-based diagnostic methods

All submitted manuscripts that include detection methods based on nucleic acid amplification assays (e.g. PCR, NASBA) should ideally include the appropriate controls necessary to assess the performance of the sample treatment and amplification assay steps. These controls are defined in various international standards, e.g. ISO 22174:2005 Microbiology of food and animal feeding stuffs -- Polymerase chain reaction (PCR) for the detection of food-borne pathogens -- General requirements and definitions. When one or more of the conventional controls is not included in a submitted method, definitive evidence of effective quality assurance within the method must be included, and discussed in the text.

Conflict of interest and Ethical standards

Conflict of interest

When an author or the institution of the author has a relationship, financial or otherwise, with individuals or organizations that could influence the author's work inappropriately, a conflict of interest may exist. Examples of potential conflicts of interest may include but are not limited to academic, personal, or political relationships; employment; consultancies or honoraria; and finical connections such as stock ownership and funding. Although an author may not feel that there are conflicts, disclosure of relationships and interests that could be viewed by others as conflicts of interest affords a more transparent and prudent process. All authors for Chemosensory Perception must disclose any actual or potential conflict of interest. The Journal may publish such disclosures if judged to be important to readers.

Ethical Standards – Informed consent

Manuscripts containing the results of experimental studies on human participants must disclose in the Methods section whether informed consent was obtained from patients in the study after the nature of the procedure had been fully explained to them. If informed consent was waived by the institutional review board (IRB) for a study, that should be so stated. In addition, a statement affirming approval of the IRB should be included, if approved. The patient's right to privacy should not be infringed. Information that would identify patients should not be published.

Ethical Standards – Animal rights

Authors are advised to comply with the guidelines for the care and use of laboratory animals as described by the U.S. National Institutes of Health and to acknowledge their compliance with these guidelines in the Methods section of the manuscript.

Manuscript submission

Manuscript Submission

Submission of a manuscript implies: that the work described has not been published before; that it is not under consideration for publication anywhere else; that its publication has been approved by all co-authors, if any, as well as by the responsible authorities – tacitly or explicitly – at the institute where the work has been carried out. The publisher will not be held legally responsible should there be any claims for compensation.

Permissions

Authors wishing to include figures, tables, or text passages that have already been published elsewhere are required to obtain permission from the copyright owner(s) for both the print and online format and to include evidence that such permission has been granted when submitting their papers. Any material received without such evidence will be assumed to originate from the authors.

Online Submission

Authors should submit their manuscripts online. Electronic submission substantially reduces the editorial processing and reviewing times and shortens overall publication times. Please follow the hyperlink "Submit online" on the right and upload all of your manuscript files following the instructions given on the screen.

Title page

Title Page

The title page should include:

The name(s) of the author(s)

A concise and informative title

The affiliation(s) and address(es) of the author(s)

The e-mail address, telephone and fax numbers of the corresponding author

Abstract

Please provide an abstract of 150 to 250 words. The abstract should not contain any undefined abbreviations or unspecified references.

Keywords

Please provide 4 to 6 keywords which can be used for indexing purposes.

Text

Text Formatting

Manuscripts should be submitted in Word.

Use a normal, plain font (e.g., 10-point Times Roman) for text.

Use italics for emphasis.

Use the automatic page numbering function to number the pages.

Do not use field functions.

Use tab stops or other commands for indents, not the space bar.

Use the table function, not spreadsheets, to make tables.

Use the equation editor or MathType for equations.

Save your file in docx format (Word 2007 or higher) or doc format (older Word versions).

Manuscripts with mathematical content can also be submitted in LaTeX.

LaTeX macro package (zip, 182 kB)

Headings

Please use no more than three levels of displayed headings.

Abbreviations

Abbreviations should be defined at first mention and used consistently thereafter.

Footnotes

Footnotes can be used to give additional information, which may include the citation of a reference included in the reference list. They should not consist solely of a reference citation, and they should never include the bibliographic details of a reference. They should also not contain any figures or tables.

Footnotes to the text are numbered consecutively; those to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data). Footnotes to the title or the authors of the article are not given reference symbols.

Always use footnotes instead of endnotes.

Acknowledgments

Acknowledgments of people, grants, funds, etc. should be placed in a separate section before the reference list. The names of funding organizations should be written in full.

References

Citation

Cite references in the text by name and year in parentheses. Some examples:

Negotiation research spans many disciplines (Thompson 1990).

This result was later contradicted by Becker and Seligman (1996).

This effect has been widely studied (Abbott 1991; Barakat et al. 1995; Kelso and Smith 1998; Medvec et al. 1999).

Reference list

The list of references should only include works that are cited in the text and that have been published or accepted for publication. Personal communications and unpublished works should only be mentioned in the text. Do not use footnotes or endnotes as a substitute for a reference list.

Reference list entries should be alphabetized by the last names of the first author of each work.

Journal article

Harris, M., Karper, E., Stacks, G., Hoffman, D., DeNiro, R., Cruz, P., et al. (2001). Writing labs and the Hollywood connection. Journal of Film Writing, 44(3), 213–245.

Article by DOI

Slifka, M. K., & Whitton, J. L. (2000) Clinical implications of dysregulated cytokine production. Journal of Molecular Medicine, doi:10.1007/s001090000086

Book

Calfee, R. C., & Valencia, R. R. (1991). APA guide to preparing manuscripts for journal publication. Washington, DC: American Psychological Association.

Book chapter

O'Neil, J. M., & Egan, J. (1992). Men's and women's gender role journeys: Metaphor for healing, transition, and transformation. In B. R. Wainrib (Ed.), Gender issues across the life cycle (pp. 107–123). New York: Springer.

Online document

Abou-Allaban, Y., Dell, M. L., Greenberg, W., Lomax, J., Peteet, J., Torres, M., & Cowell, V. (2006). Religious/spiritual commitments and psychiatric practice. Resource document. American Psychiatric Association. http://www.psych.org/edu/other_res/lib_archives/archives/200604.pdf. Accessed 25 June 2007.

Journal names and book titles should be italicized.

For authors using EndNote, Springer provides an output style that supports the formatting of in-text citations and reference list.

EndNote style (zip, 3 kB)

Tables

All tables are to be numbered using Arabic numerals.

Tables should always be cited in text in consecutive numerical order.

For each table, please supply a table caption (title) explaining the components of the table.

Identify any previously published material by giving the original source in the form of a reference at the end of the table caption.

Footnotes to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data) and included beneath the table body.

Artwork and Illustrations Guidelines

For the best quality final product, it is highly recommended that you submit all of your artwork – photographs, line drawings, etc. – in an electronic format. Your art will then be produced to the highest standards with the greatest accuracy to detail. The published work will directly reflect the quality of the artwork provided.

Electronic Figure Submission

Supply all figures electronically.

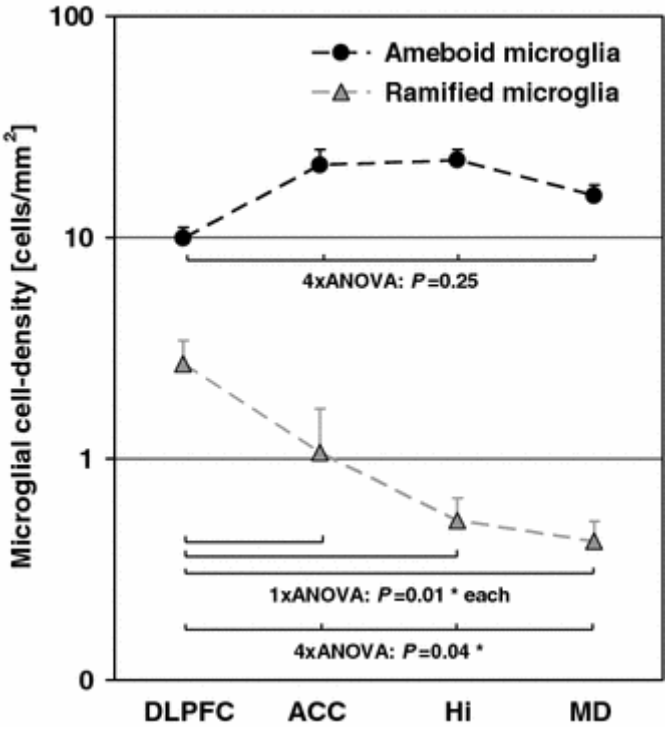
Indicate what graphics program was used to create the artwork.

For vector graphics, the preferred format is EPS; for halftones, please use TIFF format. MS Office files are also acceptable.

Vector graphics containing fonts must have the fonts embedded in the files.

Name your figure files with "Fig" and the figure number, e.g., Fig1.eps.

Line Art



Definition: Black and white graphic with no shading.

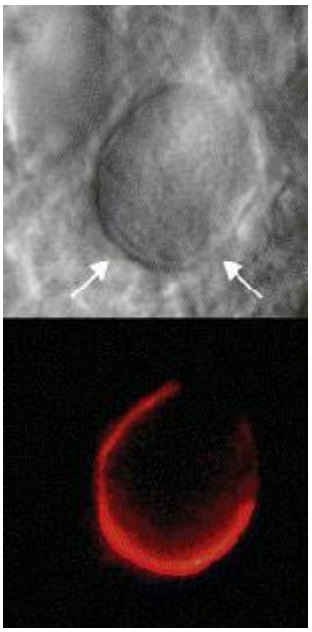
Do not use faint lines and/or lettering and check that all lines and lettering within the figures are legible at final size.

All lines should be at least 0.1 mm (0.3 pt) wide.

Scanned line drawings and line drawings in bitmap format should have a minimum resolution of 1200 dpi.

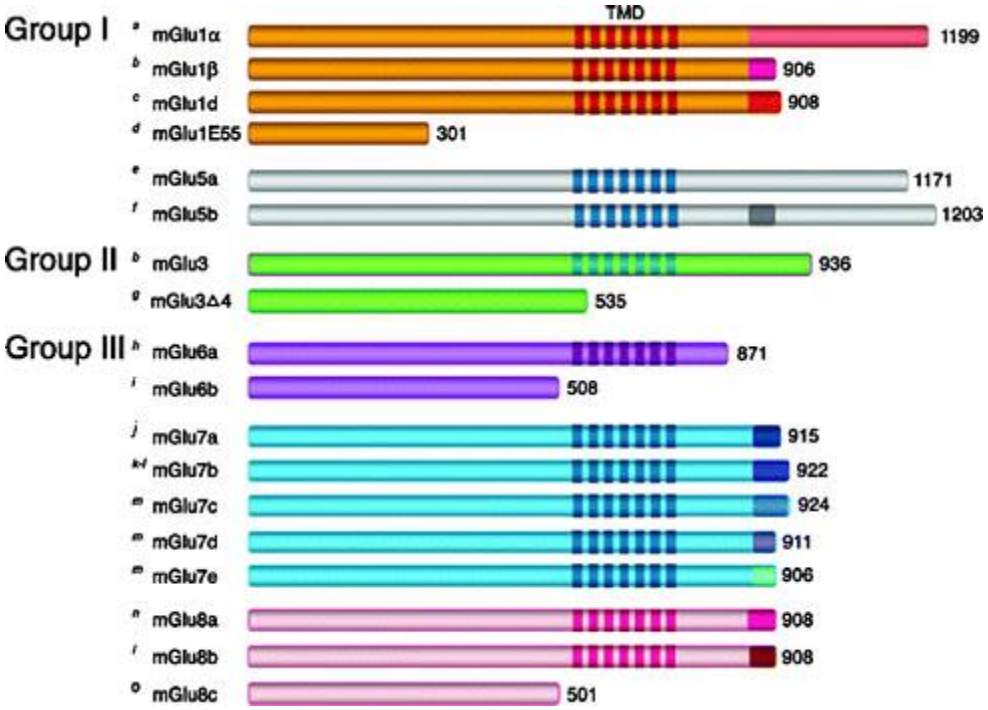
Vector graphics containing fonts must have the fonts embedded in the files.

Halftone Art



Definition: Photographs, drawings, or paintings with fine shading, etc.
If any magnification is used in the photographs, indicate this by using scale bars within the figures themselves.
Halftones should have a minimum resolution of 300 dpi.

Combination Art



Definition: a combination of halftone and line art, e.g., halftones containing line drawing, extensive lettering, color diagrams, etc.
Combination artwork should have a minimum resolution of 600 dpi.

Color Art

Color art is free of charge for online publication.
If black and white will be shown in the print version, make sure that the main information will still be visible. Many colors are not distinguishable from one another when converted to black and white. A simple way to check

this is to make a xerographic copy to see if the necessary distinctions between the different colors are still apparent.
If the figures will be printed in black and white, do not refer to color in the captions.
Color illustrations should be submitted as RGB (8 bits per channel).

Figure Lettering

To add lettering, it is best to use Helvetica or Arial (sans serif fonts).

Keep lettering consistently sized throughout your final-sized artwork, usually about 2–3 mm (8–12 pt).

Variance of type size within an illustration should be minimal, e.g., do not use 8-pt type on an axis and 20-pt type for the axis label.

Avoid effects such as shading, outline letters, etc.

Do not include titles or captions within your illustrations.

Figure Numbering

All figures are to be numbered using Arabic numerals.
Figures should always be cited in text in consecutive numerical order.
Figure parts should be denoted by lowercase letters (a, b, c, etc.).
If an appendix appears in your article and it contains one or more figures, continue the consecutive numbering of the main text. Do not number the appendix figures, "A1, A2, A3, etc." Figures in online appendices (Electronic Supplementary Material) should, however, be numbered separately.

Figure Captions

Each figure should have a concise caption describing accurately what the figure depicts. Include the captions in the text file of the manuscript, not in the figure file.

Figure captions begin with the term Fig. in bold type, followed by the figure number, also in bold type.

No punctuation is to be included after the number, nor is any punctuation to be placed at the end of the caption.

Identify all elements found in the figure in the figure caption; and use boxes, circles, etc., as coordinate points in graphs.

Identify previously published material by giving the original source in the form of a reference citation at the end of the figure caption.

Figure Placement and Size

When preparing your figures, size figures to fit in the column width.
For most journals the figures should be 39 mm, 84 mm, 129 mm, or 174 mm wide and not higher than 234 mm.
For books and book-sized journals, the figures should be 80 mm or 122 mm wide and not higher than 198 mm.

Permissions

If you include figures that have already been published elsewhere, you must obtain permission from the copyright owner(s) for both the print and online format. Please be aware that some publishers do not grant electronic rights for free and that Springer will not be able to refund any costs that may have occurred to receive these permissions. In such cases, material from other sources should be used.

Accessibility

In order to give people of all abilities and disabilities access to the content of your figures, please make sure that
All figures have descriptive captions (blind users could then use a text-to-speech software or a text-to-Braille hardware)
Patterns are used instead of or in addition to colors for conveying information (color-blind users would then be able to distinguish the visual elements)
Any figure lettering has a contrast ratio of at least 4.5:1

Electronic Supplementary Material

Springer accepts electronic multimedia files (animations, movies, audio, etc.) and other supplementary files to be published online along with an article or a book chapter. This feature can add dimension to the author's article, as certain information cannot be printed or is more convenient in electronic form.

Submission

Supply all supplementary material in standard file formats.
Please include in each file the following information: article title, journal name, author names; affiliation and e-mail address of the corresponding author.
To accommodate user downloads, please keep in mind that larger-sized files may require very long download times and that some users may experience other problems during downloading.

Audio, Video, and Animations

Always use MPEG-1 (.mpg) format.

Text and Presentations

Submit your material in PDF format; .doc or .ppt files are not suitable for long-term viability.
A collection of figures may also be combined in a PDF file.

Spreadsheets

Spreadsheets should be converted to PDF if no interaction with the data is intended.
If the readers should be encouraged to make their own calculations, spreadsheets should be submitted as .xls files (MS Excel).

Specialized Formats

Specialized format such as .pdb (chemical), .wrl (VRML), .nb (Mathematica notebook), and .tex can also be supplied.

Collecting Multiple Files

It is possible to collect multiple files in a .zip or .gz file.

Numbering

If supplying any supplementary material, the text must make specific mention of the material as a citation, similar to that of figures and tables.
Refer to the supplementary files as “Online Resource”, e.g., "... as shown in the animation (Online Resource 3)", “... additional data are given in Online Resource 4”.
Name the files consecutively, e.g. “ESM_3.mpg”, “ESM_4.pdf”.

Captions

For each supplementary material, please supply a concise caption describing the content of the file.

Processing of supplementary files

Electronic supplementary material will be published as received from the author without any conversion, editing, or reformatting.

Accessibility

In order to give people of all abilities and disabilities access to the content of your supplementary files, please make sure that

The manuscript contains a descriptive caption for each supplementary material
Video files do not contain anything that flashes more than three times per second (so that users prone to seizures caused by such effects are not put at risk)

Does Springer provide English language support?

Manuscripts that are accepted for publication will be checked by our copyeditors for spelling and formal style. This may not be sufficient if English is not your native language and substantial editing would be required. In that case, you may want to have your manuscript edited by a native speaker prior to submission. A clear and concise language will help editors and reviewers concentrate on the scientific content of your paper and thus smooth the peer review process.

The following editing service provides language editing for scientific articles in all areas Springer publishes in.

Use of an editing service is neither a requirement nor a guarantee of acceptance for publication.

Please contact the editing service directly to make arrangements for editing and payment.

For Authors from China

文章在投稿前进行专业的语言润色将对作者的投稿进程有所帮助。作者可自愿选择使用Springer推荐的编辑服务，使用与否并不作为判断文章是否被录用的依据。提高文章的语言质量将有助于审稿人理解文章的内容，通过对学术内容的判断来决定文章的取舍，而不会因为语言问题导致直接退稿。作者需自行联系Springer推荐的编辑服务公司，协商编辑事宜。

理文编辑

For Authors from Japan

ジャーナルに論文を投稿する前に、ネイティブ・スピーカーによる英文校閲を希望されている方には、Edanz社をご紹介しています。サービス内容、料金および申込方法など、日本語による詳しい説明はエダンズグループジャパン株式会社の下記サイトをご覧ください。

エダンズ グループ ジャパン

For Authors from Korea

영어 논문 투고에 앞서 원어민에게 영문 교정을 받고자 하시는 분들께 Edanz 회사를 소개해 드립니다. 서비스 내용, 가격 및

신청 방법 등에 대한 자세한 사항은 저희 Edanz Editing Global 웹사이트를 참조해 주시면 감사하겠습니다.

Edanz Editing Global

After acceptance

Upon acceptance of your article you will receive a link to the special Author Query Application at Springer's web page where you can sign the Copyright Transfer Statement online and indicate whether you wish to order OpenChoice, offprints, or printing of figures in color.

Once the Author Query Application has been completed, your article will be processed and you will receive the proofs.

Open Choice

In addition to the normal publication process (whereby an article is submitted to the journal and access to that article is granted to customers who have purchased a subscription), Springer provides an alternative publishing option: Springer Open Choice. A Springer Open Choice article receives all the benefits of a regular subscription-based article, but in addition is made available publicly through Springer's online platform SpringerLink.

Springer Open Choice

Copyright transfer

Authors will be asked to transfer copyright of the article to the Publisher (or grant the Publisher exclusive publication and dissemination rights). This will ensure the widest possible protection and dissemination of information under copyright laws.

Open Choice articles do not require transfer of copyright as the copyright remains with the author. In opting for open access, the author(s) agree to publish the article under the Creative Commons Attribution License.

Offprints

Offprints can be ordered by the corresponding author.

Color illustrations

Online publication of color illustrations is free of charge. For color in the print version, authors will be expected to make a contribution towards the extra costs.

Proof reading

The purpose of the proof is to check for typesetting or conversion errors and the completeness and accuracy of the text, tables and figures. Substantial changes in content, e.g., new results, corrected values, title and authorship, are not allowed without the approval of the Editor.

After online publication, further changes can only be made in the form of an Erratum, which will be hyperlinked to the article.

Online First

The article will be published online after receipt of the corrected proofs. This is the official first publication citable with the DOI. After release of the printed version, the paper can also be cited by issue and page numbers.

ANEXO 2

7.2 INSTRUCTIONS TO AUTHORS FOR ENVIRONMENTAL SCIENCE AND TECHNOLOGY

ACS Publications

Environmental Science & Technology

Instructions to authors for *Environmental Science & Technology*

Updated August 2013

Contents (click on the topic)

Ethics | **Conflict of interest** | **Author List** | **Prior publication** – Plagiarism – Self-plagiarism – Proceedings of conferences and symposia – Websites

Contact Information

Summary of manuscript types – Word Limits – TOC/Abstract Art

Special Issues: Focus and Tribute

Preparation and Word Processing Instructions – Currently acceptable word-processing packages – Special instructions for specific word processors

Manuscript submission guidelines – Cover Letter and rationale – Submission – Journal Publishing Agreement – Reviewer list – Review of features – Resubmission – *Just Accepted* Manuscripts

Post-acceptance process – Contact post-acceptance – Proofs – ASAP publication – E-prints and reprints

Manuscript Format and Expectations – Features – Viewpoints – Letters to the Editor – Research Article – Policy Analysis – Critical Review –Correspondence – Additions and Corrections

Elements of a manuscript – Authorship – Abstract – Text – Introduction – Experimental section – Results and discussion – Tables – Graphics and web-enhanced objects – Nomenclature – Formulas and equations – Safety – Acknowledgments – References – Supporting Information –Database Deposition

Submission Summary and Checklist by Manuscript Type – Features – Viewpoints – Letters to the Editor – Research Article – Policy Analysis – Critical Review – Correspondence – Additions and Corrections

Ethics Form – **Template for Special Issue Proposals**

Environmental Science & Technology (*ES&T*) is an authoritative source of information for professionals in a wide range of environmental disciplines. The journal combines magazine and research sections and is published both online and in print. The electronic version of *ES&T* includes all of the material found in the print version plus Supporting Information.

Copyright of articles published in *ES&T* is transferred to the American Chemical Society (ACS) by the author(s). A signed Journal Publishing Agreement (JPA) must be submitted prior to acceptance. The journal imposes no page charges, nor is there any charge for color figures.

Documents accepted for publication in ACS journals will be posted on the web as soon as publishable (ASAP), that is, when galley proofs are corrected and all of the authors' concerns are resolved. The date on which the document is posted on the web is the official date of publication and is recorded in a separate line at the bottom of the first page in the printed issue.

Ethics

Scientific ethics are taken very seriously by *ES&T* and ACS. All authors should read and adhere to ACS's Ethical Guidelines to Publication of Chemical Research, which are available on the web at http://pubs.acs.org/page/policy/ethics/index.html.

For all manuscripts, the contact author is required to read, sign, and submit an *ES&T*-specific Ethics form on behalf of all authors. The signed Ethics form can scanned and emailed or faxed to the relevant editorial office.

Conflict of Interest Disclosure

A statement describing any financial conflicts of interest or lack thereof is published with each manuscript. During the submission process, the corresponding author must provide this statement on behalf of all authors of the manuscript. The statement should describe all potential sources of bias, including affiliations, funding sources, and financial or management relationships, that may constitute conflicts of interest (please see the ACS Ethical Guidelines at http://pubs.acs.org/ethics). The statement will be published in the final article. If no conflict of interest is declared, the following statement will be published in the article: "The authors declare no competing financial interest."

Author List

During manuscript submission, the submitting author must provide contact information (full name, email address, institutional affiliation and mailing address) for all of the co-authors. Because all of the author names are automatically imported into the electronic Journal Publishing Agreement, the names must be entered into ACS Paragon Plus in the same sequence as they appear on the first page of the manuscript. (Note that co-authors are not required to register in ACS Paragon Plus.) The author who submits the manuscript for publication accepts the responsibility of notifying all co-authors that the manuscript is being submitted. Deletion of an author after the manuscript has been submitted requires a confirming letter to the Editor-in-Chief from the author whose name is being deleted. For more information on ethical responsibilities of authors, see the Ethical Guidelines to Publication of Chemical Research.

Prior publication

Contributions submitted to *ES&T* must be original works of the author(s) that have not been previously published or simultaneously submitted to another publication. Prior publication or parallel submission of the same paper to another journal eliminates the

paper from consideration by *ES&T*. You must attest in your cover letter that the manuscript has not been previously published, in whole or in part, and that it is not under consideration by any other journal. Additionally, you must affirm that all authors are aware of, and accept responsibility for, the manuscript.

Duplication of already published data eliminates the paper from consideration unless the paper contains significant further analysis and interpretation. If you have any questions or concerns, please contact the Editor-in-Chief's office (est@uiowa.edu). If a directly related paper is in press or has been submitted to another journal, upload a copy upon submission to Paragon Plus (designated "Supporting Information for Review Only"). Indicate the status of the related paper in the cover letter.

Plagiarism. Material, including text, graphics, and tables, from other publications may not be used without permission and attribution. In addition, any and all text used from another source must be enclosed in quotation marks. The permission form is available at http://pubs.acs.org/copyright/permissions.html.

Self-plagiarism: papers published in or submitted to other journals, etc. It is unethical to republish the same paper or a substantial portion of the same data. If you wish to reuse a figure or table, you must cite the original publication and, if required, obtain explicit permission from the publisher. Minor modification of a figure or table solely to avoid self-plagiarism is unacceptable. Authors publishing duplicative text, data, graphics, or tables will be banned from submitting to *ES&T*.

Professional Ethics. In publishing only original research, ACS is committed to deterring plagiarism, including self-plagiarism. ACS Publications uses CrossCheck's iThenticate software to screen submitted manuscripts for similarity to published material. Note that your manuscript may be screened during the submission process. Further information about plagiarism can be found in Part B of the Ethical Guidelines to Publication of Chemical Research.

Proceedings of conferences and symposia. You cannot publish your presentation in proceedings (paper or electronic) that are copyrighted (except by ACS) and then submit it to *ES&T*; that is prior publication. If the proceedings are not copyrighted, publishing a short abstract without figures or tables is permissible. However, if a manuscript with essentially the same data in graphics/tables, or an extended abstract is published in the proceedings, it cannot be considered for publication by *ES&T*. It is the responsibility of authors to notify us of any abstracts that have been published in any form.

Websites. *ES&T* will consider for publication a paper that has been posted on an electronic site available to the general public, provided that the site is the personal site of the author and is not connected to a commercial site. Authors must notify us at the time of submission if the material has been available on the Internet or equivalent electronic media and must remove the paper from the site at the time of submission. When the paper is published, authors may provide an electronic link from that site to the *ES&T* homepage. If the website is a commercial site not owned by ACS, the authors are advised that consideration of the paper may be endangered.

Contact Information

For queries and information prior to submission, please contact the appropriate office below:

Editorial Office (Iowa):
Email: est@uiowa.edu

ES&T Manuscript Office
4501 Seamans Center
Dept. of Civil & Environmental Engineering, University of Iowa
Iowa City, IA 52242-1527
Phone: (319) 335-5047
Fax: (202) 354-5479
Contact: Barbara Booth (319) 335-5040

Note: the Editor-in-Chief is not available to prescreen potential submissions.

DC Office (for Features, Viewpoints, Letters to the Editor):
Email: est@acs.org
Managing Editor
Environmental Science & Technology
American Chemical Society
1155 16th St. NW
Washington, DC 20036
Phone: (202) 872-8061
Fax: (202) 872-4403

Summary of Manuscript Types and General Formatting

ES&T publishes several different types of manuscripts; these guidelines contain detailed information as to scope, specific formatting styles, length limits and other requirements for the various manuscript types. There is a summary and submission checklist at the end of this document. For additional advice, please refer to *The ACS Style Guide* (3rd ed., 2006; ISBN 0-8412-3999-1), available from Oxford University Press, Order Department, 201 Evans Rd., Cary, NC 27513 (http://pubs.acs.org/books/styleguide). General instructions as to all aspects of preparing and submitting a manuscript for ACS journals may be found at http://pubs.acs.org/page/4authors/submission/index.html.

Word Limits. Regarding the word counts: unless explicitly stated otherwise (Viewpoints and Letters to the Editor), *word counts INCLUDE tables, figures, and schemes, but not references*.

Count all text except the title page, references, and figure and table captions (captions are considered part of the figure or table). This includes the Abstract, the body of the manuscript, the Acknowledgments, and the description of Supporting Information. (Do not count the Supporting Information itself.)

To the text count add the count for figures, schemes and tables. Small figures, schemes, and tables usually count as 300 word equivalents; large figures, schemes, and tables count as 600 or more word equivalents. Table of Contents (TOC) and Abstract art (required for Feature, Article, Policy Analysis, Critical Review) is not included in the word count. For example, a

research article with 6000 words, excluding references, and containing 4 small figures is considered a 7200 word article.

Manuscripts that exceed the word limit will be unsubmitted (returned to draft) with a request to shorten or immediately rejected. We note that manuscript text can often be shortened by 10% with no loss of context. Place tables and figures that augment the article but are otherwise unessential to the major themes in Supporting Information (which is freely accessible on the web). Authors who believe that exceeding the word limit is essential *must include a compelling argument in their cover letter*. Please note that this does not guarantee a decision in the author's favor – ultimately, the decision lies with the Editor.

TOC/Abstract Art. Table of Contents (TOC) and Abstract Art appears next to the abstract in the online version of the paper, in the electronic TOC for the given issue, and in the print issue.

Creating a Representative Graphic

The graphic submitted for use on the table of contents is also used for multiple purposes, including the document abstract and other situations where a representative graphic is required. For the greatest impact, authors must create an image that represents the work while adhering to size constraints. Keeping in mind that various devices may be involved, some of the best images are simple, relatively free of text and technical characters, and make use of color for visual impact. It is best to stay away from complex structure schemes and small-sized details.

TOC/Abstract graphic image are the same image and sized the same.

TOC/ABS Sizes	
Width	Depth
240 points	135 points
3.33 inches	1.875 inches
8.47 cm	4.76 cm

Submission of **Table of Contents (TOC) and Abstract Art** is **required for Research Articles, Policy Analysis papers, Critical Reviews, and Features.** TOC/Abstract art should be submitted with the original paper and will go through peer review. *TOC/Abstract Art will not be considered in the calculation of the word equivalents.* Do not submit TOC/Abstract Art for Viewpoints, Correspondence, Letters to the Editor, or Corrections.

TOC/Abstract art should be submitted in the same manner as other graphics: within the manuscript file unambiguously identified as TOC/Abstract art, or as a clearly labeled graphic under the file designation "graphic for manuscript." Do not submit TOC/Abstract art in your cover letter.

Good TOC/Abstract art should illustrate the article, akin to a "visual abstract." It should capture the readers' attention and, in conjunction with the manuscript title, give readers a

visual impression of the essence of the paper without providing specific results. Imagery can range from a single in-context photograph of a field site to that of a "cartoon" schematic explaining the central method or findings of the paper.

Specific Advice Regarding TOC/Abstract Art

a. Authors must clearly designate their TOC Art figure in the original manuscript submission. Failure to do so may delay the production schedule for accepted manuscripts.

b. **TOC/Abstract Art cannot have a caption** (legend) minimalist text may be used as labels in the imagery

c. Figures and other material created by the author(s) may be used. A single impactful image makes for the best cover art. On occasion, simple collages containing only material created by the author(s) are suitable. Complex, "busy" graphics make poor TOC art.

d. Only images created by the author(s) will be accepted as TOC/Abstract art (copyright for the TOC/Abstract art is transferred to ACS via the ACS Journal Publishing Agreement). Material created by U.S. Government employees may be used because that material is in the public domain. Material found on Web sites cannot be used as TOC/Abstract art even if the Web site (such as Wikipedia) states that the material is in the public domain.

i. The burden of proving public domain status lies with the authors. Include the name of the U.S. Department/agency and the URL or reference citation.

ii. Do not use imagery that requires third party permissions, such as images published in non-ACS journals or images from ACS journals for which credit is given to another source.

iii. Photographs taken by the author(s) may be used; however, if people appear in the photos, model releases must be signed by the individuals in the photos. The parents/guardians of individuals under 18 years of age must sign model releases because minors cannot legally sign their own model releases.

Examples from papers that appeared in 2010:

http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/es101888j - visual schematic style

http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/es1007577 - illustration of potential facility

http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/es101864b - quantitative illustration

http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/es1018256 - photograph of field work

http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/es1016735 - photograph of environment studied

Special Issues: Focus and Tribute

Up to 4 times a year, *ES&T* publishes a special issue. Focus issues consist of a Feature article and a group of peer-reviewed research papers in an area of current environmental importance. One of the special issues may be a Tribute issue that commemorates the

career of a distinguished environmental researcher. The Tribute issue may contain a related Feature article and/or a staff-written "Perspective." The research section contains a group of peer-reviewed scientific papers, usually in the research area(s) of the honoree.

There is a great demand for special issues. They are scheduled 1 or more years in advance of publication. If you wish to suggest a special issue to *ES&T*, please email the Editor-in-Chief's office at est@uiowa.edu and copy (*cc*) the Managing Editor at est@acs.org. Special issues will not be scheduled until the Editor-in-Chief's office approves, in writing, a detailed proposal, that includes how manuscripts will be invited, a list of potential contributors, and a timeline.

Manuscripts submitted for special issues are usually invited submissions. If you would like to have a manuscript considered for a particular special issue, please email est@uiowa.edu prior to submission.

Word processing details

Manuscripts prepared with the software packages listed below will be used for production if these guidelines are followed. Documents prepared with other word-processing packages will be handled on an experimental basis with the understanding that the use of these files in production cannot be guaranteed. Failure to adhere to the following instructions may prevent the use of all or part of the material supplied. Details concerning the layout of the manuscript may be found in these Instructions under Elements of a Manuscript.

Currently acceptable word-processing packages. Macintosh: WordPerfect 3.5, Microsoft Word '98 and higher. IBM and compatibles: WordPerfect up to version 9.0, and Microsoft Word '97 and higher (refer to http://pubs.acs.org/page/4authors/submission/index.html).

Special instructions for specific word processors. Whenever possible, Microsoft Word Greek letters and special symbols should be created by applying Symbol font to ASCII characters typed into the file. If characters are selected from the symbol palette and pasted in, they may be lost when the file is converted. The "ALLCAPS" option in the character format box should not be used. The SEO field should not be used. For WordPerfect, use the normal SUP and SUB codes, not AdvUp and AdvDn, to create superscript and subscript characters.

To enable proper conversion of web manuscripts to PDF files, please use only fonts supported by Adobe. The 14 standard fonts (as determined by Adobe, Inc.) are Courier, Courier-Bold, Courier-Bold Oblique, Courier-Oblique, Helvetica, Helvetica-Bold, Helvetica-Bold Oblique, Helvetica-Oblique, Symbol, Times-Bold, Times-Bold-Italic, Times-Italic, Times-Roman, and ZapfDingbats.

Manuscript preparation and submission

Preparation. Because *ES&T* enforces length limits, please plan your paper before you begin to write. Think about what needs to be in the manuscript and what material can be placed in Supporting Information. For all submissions, check the final copy carefully for consistent notation and correct spelling.

Authors should receive an automatic email acknowledgment shortly after submission. If an editorial assignment or other informational email is not received within 2 weeks,

please email the *ES&T* manuscript office at est@uiowa.edu.

Assistance for non-native English speakers/writers. All submissions to *ES&T* must be in English. If this is not your primary language and you need assistance to ensure the clarity and accuracy of your manuscript, a list of service providers may be found at http://pubs.acs.org/page/4authors/tools/language_editing.html. Please note that use of such a service does not guarantee manuscript acceptance.

Contact/Corresponding and Post Publication Corresponding Authors. At submission one author must be designated as the contact/corresponding author in the Paragon Plus system. During the review process and prior to publication, all email notifications will be sent to the contact author. Only one author may be designated as the contact author; this author receives and may sign the eJPA.

After publication, the author marked on the manuscript with an asterisk (*) is designated as the Corresponding Author, the person whom readers contact after publication of the paper. The contact and Corresponding Author may be, but are not required to be, the same person. We require complete, current contact information for this author on the title page. Please note that you may mark two designated Corresponding Authors on the manuscript.

Submission. All submissions must be uploaded to Paragon Plus. Revised manuscripts must also be submitted via Paragon Plus. Complete instructions and an overview of the online submission process are available through the secure ACS Paragon Plus website at https://acs.manuscriptcentral.com/acs. You can link to this site from the Submission and Review portion of the *ES&T* website at http://pubs.acs.org/page/esthag/submission/index.html.

An author must register on Paragon Plus before submitting a manuscript. This one-time registration will suffice for future web manuscript submissions to all ACS journals – provided you use the same email address. Assistance can be acquired from the ACS Publications Support Center through http://pubshelp.acs.org/ics/support/default.asp?deptID=9131, via email at support@services.acs.org, or by phone at 800-227-9919 (U.S. & Canada) or +1-202-872-4357 (outside U.S. & Canada).

Journal Publishing Agreement. A properly completed and signed Journal Publishing Agreement must be submitted for each manuscript. ACS Paragon Plus provides an electronic version of the Agreement that will be available on the **My Authoring Activity** tab of the contact author's home page once the manuscript has been assigned to an Editor. A PDF version of the Agreement is also available, but **authors are strongly encouraged to use the electronic Journal Publishing Agreement.** If the PDF version is used, **all pages of the signed PDF Agreement must be submitted.** If the contact author cannot or should not complete either the electronic or PDF version for any reason, another author should complete and sign the PDF version of the form. Forms and complete instructions are available at http://pubs.acs.org/page/copyright/journals/index.html.

Cover letter. A cover letter must accompany every submission and include a **rationale** for consideration by *ES&T* (see below). The cover letter should list the authors and their

affiliations, give the manuscript title, and provide contact information for all authors: please provide a mailing address, email address, and phone and fax numbers where available.

Rationale. *We require that you include a rationale for ES&T publication in the cover letter.* Please read the "Manuscript format and expectations" section of these instructions (below) and address the issues discussed therein. You must tell us why you think your manuscript is appropriate for publication in *ES&T*, particularly with respect to its originality, scientific merit, and environmental importance. *Features that are unsolicited should be preceded by a query email to the Managing Editor*: est@acs.org.

Reviewer list. Authors are required to provide names and contact information (affiliation and email address) of at least four experts in the field as possible reviewers for the manuscript. You may also include the names of people you do not want to review the paper. The Associate Editors try to use at least one reviewer from your list and to comply with your special requests. However, this cannot be ensured; for example, specific reviewers may not be available. Do not suggest as potential reviewers anyone who may have a conflict of interest in reviewing your manuscript, such as former advisers, students, recent collaborators, or persons based at your institution. Please note that it is not helpful to suggest as reviewers the most well-known researchers in the field because they are already known to the Editors.

Editor Preference. Although it is not required, you may specify one or more preferred editors during the Paragon Plus submission process. Do not suggest as potential editors anyone who may have a conflict of interest in handling your manuscript, such as former advisers, students, current or recent collaborators, an editor based at your institution, or at the institution of any of your coauthors. There is no guarantee that your manuscript will be assigned to your preferred editor.

You may also specify one or more non-preferred editors. It is helpful to editorial staff if you mark editors who are current or recent collaborators as non-preferred. Do not mark an editor non-preferred who previously handled an earlier version of your manuscript. With rare exceptions, resubmissions of rejected manuscripts will be assigned to the original handling editor, even if the manuscript has been substantially revised.

After a manuscript has been assigned to an Associate Editor, all correspondence should go to that Editor. The editor's contact information will be provided on the assignment email.

Review process and editorial decision. Most manuscripts will be sent to two to four experts in the field for review. However, a significant fraction of manuscripts are rejected without peer review. Common reasons for rejection without review include: insufficient novelty and/or originality; lack of sufficient environmental relevance; failure to place the rationale for the study or the results in the context of existing literature; data that describe a case study or offer only an incremental advance in the scientific topic; insufficient quality of the data; and problems with manuscript presentation (for example, adherence to length limits, inadequate English, figure quality, etc.).

Resubmission of rejected manuscript. If your manuscript is declined (rejected), read the reviews carefully. Manuscripts are often rejected because the subject matter is not

appropriate for *ES&T* for any number of reasons. In such cases you should consider another journal. **If you wish to submit a revised manuscript to *ES&T*, we require that you contact the editor who handled your submission and request his or her permission to resubmit.** If that editor is unavailable, please contact the office of the Editor-in-Chief. After you receive permission to resubmit, you must indicate in your cover letter that it is a revision of a previous manuscript and provide the old manuscript number. State how the manuscript has been changed compared with the original. If the manuscript was reviewed, submit a detailed list of your responses to each of the comments of the reviewers or provide convincing reasons for declining to do so. If you believe strongly that the paper was not judged fairly, make your case in your cover letter. The manuscript should be submitted on Paragon Plus, where it will receive a new manuscript number. During the submission process, please mark "Yes" when asked if the manuscript has been previously submitted "in whole or in part." Manuscripts that editors judge to be essentially resubmissions of previously submitted manuscripts that do not comply with these rules will not be considered for publication.

***Just Accepted* Manuscripts.** *Just Accepted* manuscripts are peer-reviewed, accepted manuscripts that are posted on the ACS Publications website prior to technical editing, formatting for publication, and author proofing—usually within 30 minutes to 24 hours of acceptance by the editorial office. During the manuscript submission process, authors can choose to have their manuscript posted online as a *Just Accepted* manuscript. To ensure rapid delivery of the accepted manuscript to the Web, authors must adhere carefully to all requirements in the journal's Author Guidelines. For further information, please refer to the *Just Accepted* FAQ, accessible from http://help.acs.org. Note that publishing a manuscript as *Just Accepted* is not a means by which to comply with the NIH Public Access Mandate.

Post-acceptance process

Patent Activities and Intellectual Property Issues. Authors are responsible for ensuring that all patent activities and intellectual property issues are satisfactorily resolved prior to first publication (*Just Accepted*, ASAP, or in issue). Acceptance and publication will not be delayed for pending or unresolved issues of this nature.

Contact post-acceptance. After a manuscript has been accepted for publication, all correspondence should go to: American Chemical Society, Journal Publications, 2540 Olentangy River Rd., Box 3330, Columbus, OH 43210; 614-447-3665; fax 614-447-3745; support@services.acs.org.

Proofs. The contact/corresponding author of an accepted manuscript will receive e-mail notification and complete instructions when page proofs are available for review via a secure Web site. The PDF proof made available for review is of publication quality so that authors may see a true representation of both the text and the graphics prior to publication. Feature, Viewpoint, and Letter to the Editor proofs may be handled through the Managing Editor.

Page proofs should be checked carefully against the manuscript (in particular, all tables, graphics, captions, equations, and formulas), as this is not done by the Journal Publications office, and the corrections should be returned as soon as possible. No paper is released for ASAP publication until the author's changes have been made or the

author's approval has been received. All corrections, revisions, and additions must be listed with their location clearly identified.

Routine rephrasing of sentences or additions are not permitted at the page proof stage: Authors are expected to finalize word choice in the review stage. At the page proof stage alterations are restricted to minor typographical or grammatical corrections, such as fixing editorial mistakes, spelling mistakes, and so on. Substantive changes in interpretation or corrections of data, or other important changes, including changes to the title or the list of authors, are subject to editorial review and may delay or cancel publication.

ASAP publication. Accepted manuscripts will be published on the "Articles ASAP" page on the Journal Web site as soon as page proofs are corrected and all author concerns are resolved. Publication on the Web usually occurs within 1-4 days of receipt of page proof corrections, and this can be well in advance of the cover date of the printed issue. ACS considers publication to the web as the article of record, as it is completely citable using the DOI 10.1021/esXXXXXXX.

E-prints and reprints. Under the ACS Articles on Request policy, the Society will provide (free of charge) to all contributing authors a unique URL within the ACS Web site that they may e-mail to colleagues or post on external Websites. These author-directed links are designed to facilitate distribution of an author's published work to interested colleagues in lieu of direct distribution of the PDF file by the author. The ACS Articles on Request policy allows 50 downloads within the first year after web publication and unlimited access via the same author-directed links 12 months after web publication.

The ACS AuthorChoice option establishes a fee-based mechanism for authors or their research funding agencies to sponsor the open availability of their articles on the Web at the time of online publication. Under this policy, the ACS as copyright holder will enable unrestricted Web access to a contributing author's publication from the Society's Web site in exchange for a fixed payment from the sponsoring author. ACS AuthorChoice will also enable participating authors to post electronic copies of published articles on their own personal Web sites and institutional repositories for noncommercial scholarly purposes and allow immediate open access to an article as soon as it is published on the ACS Web site. For more details on ACS AuthorChoice, please visit http://pubs.acs.org/4authors/authorchoice/index.html.

When authors are sent the proof of their paper, they will receive a link to a website where they may order author reprints. They may also call Cierant Corporation, 866-305-0111 from 9 am to 5 pm EST. Reprints will be shipped within 2 weeks after the issue publication date. Neither the editors nor the Washington ACS Office keeps a supply a reprints.

Manuscript Format and Expectations

ES&T divides its manuscripts between two sections of the journal: research and front matter. The research section includes research Articles, Policy Analysis, Critical Reviews, Correspondence/Rebuttal, and Additions and Corrections. Manuscripts are initially reviewed by the assigned editor and, if appropriate, by other scientists who assess the significance, originality, and validity of the work. The Editor-in-Chief and

Associate Editors, listed in the masthead, are responsible for all research material published in *ES&T*.

The front matter consists of Features, Viewpoints, and Letters to the Editor, along with staff-written Comments, annual informational content, and occasional Perspectives for special issues. The Managing Editor handles all front matter.

This section of the Instructions addresses the content expected of each manuscript type. Detailed instructions as to format and style then follow, ending with a summary and checklist by manuscript type. Authors are reminded to heed the word limits noted above.

Research Articles. These manuscripts, with a 7000 word-equivalent limit, are reviewed papers concerning the scientific understanding of natural environments and engineered environmental systems and technologies. ES&T focuses particularly on the chemistry of processes in the environment, including those affected by human activities. This includes biological and physical phenomena as well as mathematical and computational methods that are specifically relevant to the understanding and management of the environment. *ES&T* also publishes papers that describe significant scientific advances or novel technologies for remediation, control, and pollution prevention. Research articles are assigned to one of the following sections: characterization of natural and affected environments, environmental processes, environmental modeling, environmental measurements methods, remediation and control technologies, sustainability engineering and green chemistry, energy and the environment, and ecotoxicology and human environmental health.

ES&T strives to publish only original work of broad scientific significance and environmental importance. Originality is defined as new experimental data, new interpretations of existing data, or new theoretical analyses of environmental phenomena. Significance will be judged with respect to the breadth of impact of the reported findings. *Manuscripts that report data of a routine nature will not be accepted*. For example, papers that report only values of molecular parameters without employing them in or demonstrating their relevance to a model will be declined. The scope of the reported data in ambient monitoring studies must yield conclusions applicable to more than the particular site or time when the data were taken. Studies that only describe the outcomes of standard laboratory or field tests are not appropriate for publication in *ES&T*.

Articles published in *ES&T* must be relevant to the study of natural systems and/or engineered environmental systems and technologies. You must make this connection apparent – papers that fail to demonstrate their environmental relevance will be rejected, usually without external review. For example, it is not sufficient that the paper describe work on a compound that may occur in the environment if the study does not provide information that is clearly related to that compound's fate, transport, transformation or effects in the environment. Manuscripts that emphasize analytical chemistry research must provide a meaningful yet concise argument that the method represents an advance that is needed in the environmental field. Manuscripts that do not include results from the application of the method either to real environmental samples or to samples that simulate environmental samples in a meaningful manner will be declined. Authors should show that a new analytical method has been thoroughly developed and its quality ensured.

Research articles that describe advances in environmental technologies may include works on remediation and control processes and on new processes for sustainability. These manuscripts should include evaluations performed under environmentally-realistic conditions. Articles that describe laboratory-scale studies should make meaningful and unbiased comparisons to existing approaches but should not make claims about the economics or relative advantages of the technology without pilot- or full-scale validation studies or properly validated models. Papers describing advances in treatment technologies for remediation of contaminated environments or control of emissions should go beyond kinetics and treatability studies by exploring the mechanisms of the technology, or develop process models to describe the technique.

Papers in the area of ecotoxicology and human environmental health should provide novel information on effects of chemicals or lead to new insights into the mechanisms and processes behind effects of chemicals and other stressors. Specific attention should be given to exposure characterization in effect studies: effect concentrations should be based on measured exposure concentrations whenever possible.

Policy Analysis. These manuscripts present original research in environmental management and policy, especially where science and engineering interface with public policy. Topics include risk assessment, evaluation and design of environmental regulations, pollution prevention and life-cycle analysis, and international environmental trends. These contributions are peer-reviewed. The format of these manuscripts follows the general style of research papers, with an abstract, introduction, body, discussion, and references. However, unique section headings may be used as needed. Please limit to 7000 word-equivalents.

Criteria for ES&T Policy Analysis Policy Analysis papers can be characterized by the three elements below. An ideal Policy Analysis paper will include all three of these elements, integrated in a rigorous and innovative way to provide valuable policy insight for understanding and managing human-environmental systems. However, if done well, two out of three are acceptable.

1. Explicit Policy Relevance: providing decision support or related valuable information for near- or medium-term decisions, faced by regulatory agencies, intergovernmental programs, industry, consumers, and/or research funders

2. Fundamental Science and/or Engineering Content: the extent to which scientific and engineering methods are applied and extended to derive new knowledge

3. Fundamental Social Science Content: the extent to which social science methods from law, political science, economics, psychology, and related human behavioral studies are applied and extended to derive new knowledge.

Critical Reviews. Critical Reviews are thoroughly documented assessments of selected areas of the environmental science and technology research literature. These are limited to 10,000 word-equivalents. Critical Reviews generally include more than 100 references. Critical Reviews should increase readers' knowledge through discriminating comparisons and insightful organization of the material. Criteria for acceptability include current importance of the field under review, thoroughness of the literature coverage, clarity, and clear identification of research needs.

Correspondence. Readers are encouraged to provide scholarly comment on papers appearing in the research section. Both comments and responses are termed "Correspondence"; both are limited to 1000 word equivalents. Comments must raise scientific or technical questions about an article; correspondence that is mainly opinion will not be accepted. Correspondence should be submitted within 6 months of the date of publication of the original article. The author(s) of the original article will be allowed to respond. Correspondence on previously published correspondence will not be considered. Personal invective will not be tolerated. Correspondence is peer-reviewed at the option of the Editor. Financial interests and funding sources that might detract from an author's objectivity should be disclosed in the cover letter. The editors will determine whether the material disclosed to them should be published as part of the paper.

Additions and Corrections (Errata). When a correction to published material must be made, it should be done quickly. *ES&T* is willing to publish corrections to long-published work if the author provides a convincing argument; the decision rests with the Editor. Additions are a form of Errata; they are not a mechanism for publishing updates. Errata must be uploaded on Paragon Plus under the manuscript type Additions and Corrections. This submission must include the authors and title of the original manuscript. It should also include either a citation, DOI number, or the original manuscript number.

Front Matter

Features. These 5000 word equivalent maximum manuscripts provide a balanced examination of significant developments and issues affecting the environmental community. **Features cannot have Supporting Information.** Probing timely topics from multiple perspectives—scientific, regulatory, technical—provides readers with an authoritative and up-to-date understanding of the subject. Features are written in a magazine or journalistic style rather than as a scientific article. **Authors can assume that the average news and features reader has had 1 year of university-level chemistry, physics, and environmental science/engineering**. **Authors must include a 3-5 sentence synopsis titled "Abstract," written at a level comprehensible to the scientifically literate general public.**

Structure your Feature like a good lecture: begin with first principles then develop the main theme. The introductory paragraph should speak to the content of the article, but not in the manner of a research abstract. We suggest you read previous Features to get a feel for this manuscript type: http://pubs.acs.org/toc/esthag/current. Note that review of Features differs somewhat from the review of research manuscripts. Note also that the magazine style of a Feature permits more liberal citation to stable websites, though authors must ensure that the content accuracy of their Feature is also supported by relevant citable literature. **If upon drafting a Feature, authors find it difficult to exclude research data, please consider submitting a Research Article or Policy Analysis instead. If the topic cannot be easily confined to 5000 words and/or there is an extensive list of references, a Critical Review would be a better option. Short manuscripts with a commentary style should be revised into a Viewpoint.**

Viewpoints. These short "op-ed" style manuscripts provide authors with a venue to comment on an issue of pressing importance to the *ES&T* readership community. **Viewpoints are not peer-reviewed but are subject to editorial approval.** A limit of 1000 words + author affiliations + 5 references + 1 single frame figure with 50 word

caption OR a 350 word Table will be strictly enforced – submissions exceeding this maximum will not be considered.

Letters to the Editor. Readers are encouraged to comment on articles published in the front matter: Features, Viewpoints, Comments, and Perspectives. Contributions are limited to 500 words + 250 words of references + author affiliations. They should be uploaded within 2 months of the print publication date of the original material. The author(s) of the original material will be allowed to reply to letters, provided they do so rapidly. If you wish to comment on research content, please submit a Correspondence for the research section.

Elements of a manuscript

The remarks that follow are most relevant to research articles, but should be read by all auithors. The submission checklists by manuscript type that follow should be followed by all authors to ensure that their manuscript meets the expectations in form. Language assistance for non-native English speakers can be obtained from http://pubs.acs.org/page/4authors/tools/language_editing.html.

Title. Use specific and informative titles. Titles should briefly convey the subject of the paper: a 20-word title is too long. If trade names are used, give generic names in parentheses. Key words in titles assist in effective literature retrieval.

Authorship. List the first name, middle initial(s), and last name of each author. Omit professional and official titles. An author's affiliation should be based on where they were when the work was performed. When the present address of an author is different, include the new information in a footnote. In a paper with more than one author, the name of the corresponding author, to whom post-publication inquiries should be addressed, carries an asterisk (*). Provide an email address for the corresponding author; include telephone and fax numbers, if possible.

Abstract. A 150-200-word abstract must accompany Article, Policy Analysis, or Critical Review manuscripts. Describe the purpose, methods or procedures, significant new results, and conclusions. Do not break the abstract into sections. Define any abbreviations used in the abstract. Write for literature searchers as well as journal readers. Include major quantitative data if they can be stated briefly, but do not include background material. Do not include reference numbers in the abstract. For Features, include a 3-5 sentence synopsis titled "Abstract", written at a level comprehensible to the scientifically literate general public.

TOC/Abstract Art. As noted above, TOC/Abstract art appears next to the abstract and is mandatory for Articles, Policy Analyses, Critical Reviews, and Features. TOC/Abstract Art presents a "visual abstract" of the research and must accompany the manuscript at submission. The graphic can be illustrative or photographic.

Text. Consult a current issue for general style. Assume your readers to be professionals who are not necessarily expert in your particular field; spell out all acronyms on first use, even if this was done in the abstract. *ES&T* does not allow footnotes, with the exception of an author information footnote on the title page.

When you prepare a manuscript, use the document mode or its equivalent in the word-processing program; that is, do not save files in "Text Only" (ASCII) mode. Do not include any page-layout instructions such as placement information for graphics in the file. Use hard returns only to end headings and paragraphs, not to break lines of text. Do not insert spaces before punctuation. References must conform to the format printed in the journal and must include titles. Ensure that all characters are correctly represented throughout the manuscript: for example, 1 (one) and l (ell), 0 (zero) and O (oh), x (ex) and × (multiplication sign). Please ensure that "Track Changes" or other editing content is disabled upon submission.

Write concisely. Heed the word limits; a request to exceed them will result in very critical editorial review. Do not repeat information, graphics, or tables that have appeared elsewhere. Use illustrative data rather than complete data where appropriate. Shorten manuscript text by designating appropriate material as Supporting Information (see below).

Divide the article into sections, three are often sufficient: Introduction, Experimental, and Results and Discussion (see below). Do not use footnotes; include the information in the text. Number all pages of the manuscript.

Introduction. Clearly state the purpose and significance of the research and put it into the context of earlier work in the area. Do not attempt a complete survey of the literature. If a recent article has summarized work on the subject, cite that article only, and not the sources it cites. In general, the introduction should be no more than 2 double-spaced pages without figures or tables and should include fewer than 20 references.

Experimental (Materials and Methods). In this section, describe pertinent and critical factors involved in the experimental work but avoid excessive description. In many cases, details not essential for understanding the paper can be placed in Supporting Information. Do not submit drawings of standard apparatus that can be succinctly described in the text. List and describe preparation of special reagents only. Omit details of procedures that are common knowledge to those in the field or that you have published previously. A brief mention of published procedures may be included; leave details to the literature cited.

Results and discussion. Here you can discuss your findings, postulate explanations for data, elucidate models, and compare your results with those of others. Be complete but concise. Avoid irrelevant comparisons or contrasts, speculations unsupported by the new information presented in the paper, and verbose discussion. Results and discussion may be combined or separated.

Do not include a Conclusions or Summary section in research Articles. Include major conclusions in the body of the Results and Discussion sections.

Tables. Tables should be furnished with appropriate titles of one phrase or sentence; details or definitions should be placed at the bottom. Tables should be numbered consecutively with Arabic numbers (i.e., 1, 2, . . .). Double-space them with wide margins, and prepare tables in a consistent format. Tables may be created using a word processor's text mode or table format feature. The latter is preferred. Ensure that each data entry is in its own table cell. If the text mode is used, separate columns with a single tab and use a hard return at the end of each row.

Graphics and web-enhanced objects. To facilitate the publication process, please submit manuscript graphics using the following guidelines:

1. The preferred submission procedure is to embed graphic files in a Word document. It may help to print the manuscript on a laser printer to ensure all artwork is clear and legible.

2. Additional acceptable file formats are: TIFF, PDF, EPS (vector artwork) or CDX (ChemDraw file). If submitting individual graphic files in addition to them being embedded in a Word document, ensure the files are named based on graphic function (i.e. Scheme 1, Figure 2, Chart 3), not the scientific name. Labeling of all figure parts should be present and the parts should be assembled into a single graphic.

• EPS files: Ensure that all fonts are converted to outlines or embedded in the graphic file. The document settings should be in RGB mode. NOTE: While EPS files are accepted, the vector-based graphics will be rasterized for production. Please see below for TIFF file production resolutions.

3. TIFF files (either embedded in a Word doc or submitted as individual files) should have the following resolution requirements:

- Black & White line art: 1200 dpi
- Grayscale art (a monochromatic image containing shades of gray): 600 dpi
- Color art (RGB color mode): 300 dpi

• The RGB and resolution requirements are essential for producing high-quality graphics within the published manuscript. Graphics submitted in CMYK or at lower resolutions may be used, however, the colors may not be consistent and graphics of poor quality may not be able to be improved.

• Most graphic programs provide an option for changing the resolution when you are saving the image. Best practice is to save the graphic file at the final resolution and size using the program used to create the graphic.

4. Graphics should be sized at the final production size when possible. Single column graphics are preferred and can be sized up to 240 points wide (3.33 in.). Double column graphics must be sized between 300 and 504 points (4.167 in. and 7 in.). All graphics have a maximum depth of 660 points (9.167 in.) including the caption (please allow 12 pts for each line of caption text).

• Consistently sizing letters and labels in graphics throughout your manuscript will help ensure consistent graphic presentation for publication.

5. A graphic should be submitted for use as in the Table of Contents and Abstract. This graphic should give the reader a quick visual representation of the essence of the paper without providing specific details. The best images for these uses are simple, relatively free of text and technical characters, and make use of color for visual impact.

6. For more information, please visit http://pubs.acs.org/page/4authors/submission/index.html.

Our online environment provides for the inclusion of "Web Enhanced Objects" such as video and 3D images. Information regarding these multimedia may be found at http://pubs.acs.org/page/4authors/submission/weo.html.

Nomenclature. Nomenclature should conform to current American usage. When possible, authors should use systematic names similar to those used by Chemical Abstracts Service (CAS) or IUPAC. Chemical Abstracts (CA) nomenclature rules are contained in Appendix IV of the current Chemical Abstracts Index Guide. The ACS website has links to nomenclature recommendations at www.acs.org. IUPAC recommended nomenclature is available at www.chemgmw.ac.uk/iupac.html. For CA nomenclature advice, contact answers@cas.org. Use SI units as much as possible – if you must use Imperial or U.S. units, place the SI equivalent in parentheses after the first use. For specialized nomenclature, include a nomenclature section at the end of the paper, giving definitions and dimensions for all terms. We suggest that you provide the CAS numbers of less familiar compounds. If subscripts and superscripts are necessary, place them accurately. Avoid trivial names. Trade names should be defined at the point of first use (registered trade names should begin with a capital letter).

Formulas and equations. Chemical formulas should correspond to the *ACS Style Guide*. Chemical equations should be balanced and numbered consecutively along with mathematical equations. Mathematical arguments should be as brief as possible.

Safety. Please call special attention, both in your manuscript and in your correspondence with the Editors, to safety considerations such as explosive tendencies, precautionary handling procedures, and toxicity.

Acknowledgments. Include essential credits in an Acknowledgment section at the end of the text. Meeting presentation data or other information regarding the work reported are included here. Sources of financial support must be acknowledged. We remind you that all authors must read and adhere to ACS's Ethical Guidelines to Publication of Chemical Research. If any possibility of a conflict of interest exists, financial, personal or scientific, real or perceived, describe it here. If it is complex, refer to it here and describe it in detail in the Supporting Information.

References. Literature references must be numbered with Arabic numerals in the order of their first citation in the text, and the corresponding numbers must be inserted at the appropriate locations in the text. The corresponding text numbers must be presented as superscript, closed up to the last character, and outside any punctuation marks. Provide for review copies of any references that are in obscure publications or are unpublished. Avoid references to works that have not been peer-reviewed. Give complete information, using abbreviations for titles of periodicals as in the CAS Source Index (CASSI) or *The ACS Style Guide*, 3rd ed., 2006. Periodical references should contain authors' surnames followed by initials, title, journal abbreviation, year, volume number, and page range.

Reference styles. Research manuscripts, Features, and Viewpoints use the same reference style. Authors are encouraged to use peer-reviewed works and books. This list is meant as a style guideline/template, but for clarification, please refer to *The ACS Style Guide*, 3rd ed., 2006.

Journal article

Travis, E. R.; Hannink, N. K.; van der Gast, C. J.; Thompson, I. P.; Rosser, S. J.; Bruce, N. C. Impact of transgenic tobacco on trinitrotoluene (TNT) contaminated

soil community. *Environ. Sci. Technol.* **2007**, *41* (16), 5854–5861; DOI 10.1021/es070507a.

Book with author

Criss, R. E. *Principles of Stable Isotope Distribution*; Oxford University Press: Oxford, U.K., 1999.

Book with editors

Coghill, A. M., Garson, L. R., Eds. *The ACS Style Guide*, 3rd, ed.; Oxford University Press: New York, 2006.

Chapter in edited book

Snape, I.; et al. Contamination, regulation, and remediation: an introduction to bioremediation of petroleum hydrocarbons in cold regions. In *Bioremediation of Petroleum Hydrocarbons in Cold Regions*; Filler, D. M., Snape, I., Barnes, D. L., Eds.; Cambridge University Press: New York 2008; pp 1 □37.

Thesis

Masson, J.-F. Surface plasmon resonance sensors for biochemical and chemical monitoring. Ph.D. Dissertation, Arizona State University, Tempe, AZ, 2005.

Institutional report (e.g. U.S. or international government; private institution)

Biofuels: DOE lacks a strategic approach to coordinate increasing production with infrastructure development and special needs; Highlights of GAO-07-713; United States Government Accountability Office: Washington, DC, 2007; www.gao.gov/new.items/d07713.pdf.

Law

Energy independence and security act of 2007. Public Law 110-140, 2007; http://frwebgate.access.gpo.gov/cgi-bin/getdoc.cgi?dbname □110_cong_pu

Legal decision

State of New Jersey v. EPA, No. 05-1097 (D.C. Cir. Feb 8, 2008).

Website □*homepage*

Environmental Science & Technology Website; http://pubs.acs.org/journals/esthag/index.html.

Webpage within a large site

Tracking the millennium goals □map; www.mdgmonitor.org/map.cfm?goal □6&indicator□□0&cd□

For references to journal articles, an issue number after volume number is helpful but not mandatory. DOI numbers are also helpful but not mandatory unless that is the only identifying information for an article in press or published online (e.g., ASAP).

Citing by DOI

For work published online (ASAP) and work submitted for publication (e.g., submitted; in press), the DOI should be furnished in addition to the standard bibliographic information. Authors are given instruction for citing work by DOI in an email communication when manuscript proofs are made available. A DOI is assigned to each

manuscript and should be in the form http://dx.doi.org/10.1021/om000000a. DOI is an accepted form of citation before and after the article appears in an issue.

The accuracy of the references is the responsibility of the author(s). Reference accuracy is critical because readers have the ability to link to the original literature. References to personal correspondence or to unarchived material obtained from the web are discouraged. "Anonymous" is not acceptable as an author; if the author is unknown, list the reference by company, agency, or journal source. Do not list references as "in press" unless they have been formally accepted for publication – in that case determine if a DOI has been assigned and include it with the reference. The Associate Editor should be informed whether a paper on a related topic is in press from the same group as the paper submitted to *ES&T*. In citing *submitted* manuscripts, it is inappropriate to specify the name of the publication considering the manuscript.

Supporting Information. Authors are encouraged to shorten the text of research manuscripts by using the Supporting Information (SI) to present ancillary information and material of interest mainly to specialists. In particular, the Experimental Section should provide the detail needed for the reader to determine whether the interpretations are supported by the data, but experimental details, including schematics of apparatus and maps of study sites, should be reported in SI. Detailed calculations, derivations, databases, and ancillary spectra should appear in SI. Authors are strongly encouraged to provide detailed data (as graphics and/or tables) in SI to support data presented in summary form or parameters extracted from the data that appear in the main text. However, please do not indiscriminately place large amounts of extraneous data and other materials in Supporting Information.

Supporting Information is not permitted for Features, Viewpoints, Letters to the Editor, Correspondence, or Errata.

SI should be formatted with a cover sheet listing authors, manuscript title, and the number of pages, figures, and tables. SI pages must be numbered consecutively, starting with page S1. Tables and figures should be numbered Table S1–S*n*, Figure S1–S*n*. A one- or two-sentence description of the SI section should appear in the main manuscript immediately after the Acknowledgments.

This material will appear in the electronic version of the paper on the *ES&T* website, and its availability will be noted in the printed version of the journal. SI is available to everyone who accesses the *ES&T* website, and it will be archived. It is also indexed and abstracted by CAS.

A list of acceptable electronic file types for SI is given on the web submission site with a list of viewers available at http://pubs.acs.org/page/4authors/tools/viewers.html. All SI files of the same type should be submitted as a single file (rather than as a series of files containing individual images or structures). For example, all SI available as PDF files should be contained in one PDF file, if possible, and all CIFs should be submitted as a single file. Where appropriate, SI should be consolidated into a single word-processing file with graphics copied and pasted (embedded).

Directions for Data Deposition, Computer Codes and other material

A primary research report should contain sufficient detail and reference to public sources of information to permit the author's peers to repeat the work. When requested, the

authors should make a reasonable effort to provide samples of unusual materials unavailable elsewhere, including, but not limited to, clones, microorganism strains, antibodies, computer codes, etc., to other researchers, with appropriate material transfer agreements to restrict the field of use of the materials so as to protect the legitimate interests of the authors.

Sequence data. DNA sequence data must be submitted to GenBank (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/), EMBL Nucleotide Sequence Database (http://www.ebi.ac.uk/embl/) or the DNA Data Bank of Japan (http://www.ddbj.nig.ac.jp/).

Protein sequence data should be deposited with the Protein Identification Recourse at Georgetown University Medical Center, Washington (http://pir.georgetown.edu/), the European Bioinformatics Institute (EBI) (http://www.ebi.ac.uk/) or the Swiss Institute of Bioinformatics (http://www.isb-sib.ch).

Microarray Data. Manuscripts that present microarray data should follow the MIAME (Minimum Information About a Microarray Experiment) guidelines (http://www.mged.org/miame). Data must be submitted to the GEO (Gene Expression Omnibus) (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo) or ArrayExpress Archive (http://www.ebi.ac.uk/arrayexpress) databases.

For sequence data and microarray data the relevant accession numbers should be available at the time that the revision is submitted and should be listed at the end of the Experimental section in the revised version of the manuscript.

Data from proteomics experiments. Proteomic experiments must meet the standards established by the Journal of Proteome Research. More information is available in the Publication Guidelines for the Analysis and Documentation of Peptide and Protein Identifications (http://pubs.acs.org/paragonplus/submission/jprobs/jprobs_proteomics_guidelines.pdf).

Protein sequences should be handled in the same way as described above and accession number and database source should be included.

Computer codes. When computer codes are developed or used and are an essential part of a manuscript, sufficient detail must be given, either within the paper or in the Supporting Information. Types of languages that are used in the computer codes, compiler/interpreter, and operating system with a specific version must be provided or properly cited. Upon request, after appropriate material transfer agreements to restrict the use of the materials so as to protect the legitimate interests of the authors, codes, and input data must be made available for others to validate the calculations. Regardless the fact that the source code is open or closed source, it must be properly cited in the References and Footnotes.

Computational chemistry calculations. When computational chemistry calculations are performed, input data must be given either within the paper or in the Supporting Information, including force field parameters, equations defining the model (or references to where such material is available in the open literature), methods and approaches, and basis sets. If the software used for calculations is generally available, it must be properly cited in the references and footnotes. References to the methods upon which the software is based must also be provided.

Summary and Submission Checklist by Manuscript Type

Authors are encouraged to check that their manuscript includes all of the items listed below. (Any items in parentheses are optional). Text shaded in gray constitutes the indicated word equivalent limit. Details as to their formatting may be found in this document above and via the ACS Author and Reviewer Resource at http://pubs.acs.org/page/4authors/index.html.

Feature – 5000 Word Equivalents – shaded areas included in word count **Description:** Balanced examination of significant developments relevant to environmental science & technology community; written in magazine style, assuming one year of university-level physical and environmental sciences/engineering knowledge; peer-reviewed.		
Item	**Notes**	**Check**
Query Letter	**EMAIL TO MANAGING EDITOR *BEFORE SUBMISSION (AND WAIT FOR REPLY)* IF MANUSCRIPT UNINVITED; authors who have been in contact with other editors of the journal still need to email the Managing Editor with a proposal**	
Title	Magazine style – approachable and inviting to generalists	
Author(s) with affiliations	Indicate corresponding author with *	
TOC/Abstract Art	**MANDATORY UPON SUBMISSION**	
Abstract	**3-5 sentences written for a lay audience**	
Text, figures, tables, boxes.	Clearly label figures and tables **within document, not just in file name**	
(Acknowledgements)		
Author(s) biographical statement	**Institutions and titles plus any other information not to exceed 200 words**	
References		
	NO SUPPORTING INFORMATION	
Contact Office (questions & topic approval)	Managing Editor, ACS, Washington, DC	

Viewpoint – 1000 Words + Five References + One Single Frame Figure and 50 word caption OR One 350 word Table + Author Affiliations

– shaded areas included in word count **Description:** Short commentary on issue of interest to *ES&T* readership; written "op-ed" style; *not on matter published in* ES&T; **not peer-reviewed, but subject to editorial approval;** *Viewpoints not adhering to the length restrictions will not be considered.*		
Item	**Notes**	**Check**
Title	Concise and brief	
Author(s) with affiliations.	Indicate corresponding author with *	
Text	**1000 WORDS MAXIMUM**	
Figure OR Table	**ONE MAXIMUM, SINGLE FRAME – 50 word caption max OR ONE 350 WORD TABLE**	
References	**FIVE MAXIMUM**	
	NO TOC ART OR SI	
Contact Office (questions)	Managing Editor, ACS, Washington, DC	

Letter to the Editor – 500 Words + 250 Words of References + Author Affiliations – shaded areas included in word count **Description:** Brief comment on Feature, Viewpoint, or Comment previously published in *ES&T* within 6 months of previous piece's publication; subject to editorial approval		
Item	**Notes**	**Check**
Author(s) with affiliations	Indicate corresponding author with *	
Text	Include citation/DOI of Feature, Viewpoint, Comment, or News in question. **500 WORDS MAXIMUM.**	
References	**250 WORDS MAXIMUM**	
	NO TOC ART OR SI	
Contact Office (questions)	Managing Editor, ACS, Washington, DC	

Research Article – 7000 Word Equivalents – shaded areas included in word count **Description:** Completed and fully interpreted results of original and significant research relevant to environmental science and technology; peer-reviewed.		
Item	**Notes**	**Check**
Cover Letter	**INCLUDE RATIONALE AS TO WHY MANUSCRIPT IS APPROPRIATE FOR**	

	ES&T	
Title	Concisely informative	
Author(s) with affiliations	Indicate corresponding author with *	
TOC/Abstract Art	**MANDATORY UPON SUBMISSION**	
Abstract	150-200 words	
Text, figures, tables.	Clearly label figures and tables **within document, not just in file name.** **DO NOT INCLUDE SUMMARY/CONCLUSION SECTION.**	
Acknowledgements		
References		
(Supporting Information)		
Contact Office (questions)	Editor-in-Chief, *ES&T*, Iowa City, IA	

Policy Analysis – 7000 Word Equivalents – shaded areas included in word count **Description:** Original research in environmental management and policy, especially where science and engineering interface with public policy; peer-reviewed.		
Item	**Notes**	**Check**
Cover Letter	**INCLUDE RATIONALE AS TO WHY MANUSCRIPT IS APPROPRIATE FOR *ES&T***	
Title	Concisely informative	
Author(s) with affiliations	Indicate corresponding author with *	
TOC/Abstract Art	**MANDATORY UPON SUBMISSION**	
Abstract	150-200 words	
Text, figures, tables.	Clearly label figures and tables **within document, not just in file name.**	
Acknowledgements		
References		
(Supporting Information)		
Contact Office (questions)	Editor-in-Chief, *ES&T*, Iowa City, IA	

Critical Review – 10,000 Word Equivalents

– shaded areas included in word count **Description:** Thoroughly documented assessment of selected area of the environmental science research literature; typically have at least 100 references; peer-reviewed.		
Item	**Notes**	**Check**
Cover Letter	**INCLUDE RATIONALE AS TO WHY MANUSCRIPT IS APPROPRIATE FOR *ES&T***	
Title	Concisely informative	
Author(s) with affiliations	Indicate corresponding author with *	
TOC/Abstract Art	**MANDATORY UPON SUBMISSION**	
Abstract	150-200 words	
Text, figures, tables.	Clearly label figures and tables **within document, not just in file name.**	
Acknowledgements		
References	**Typically in excess of 100.**	
(Supporting Information)		
Contact Office (questions)	Editor-in-Chief, *ES&T*, Iowa City, IA	

Correspondence – 1000 Word Equivalents – shaded areas included in word count **Description:** Scholarly comment on articles appearing in the research section; authors of original article will be permitted to respond; peer review(ed) at Editor's discretion.		
Item	**Notes**	**Check**
Author(s) with affiliations	Indicate corresponding author with *	
Text, figures, tables.	Include citation/DOI of Research Article, Policy Analysis, or Critical Review in question. Clearly label figures and tables **within document, not just in file name.**	
References		
	NO TOC ART OR SI	
Contact Office (questions)	Editor-in-Chief, *ES&T*, Iowa City, IA	

Additions and Corrections **Description:** Submit in a timely manner. *ES&T* is willing to publish corrections to long-published work only if the author provides a convincing argument with respect to the original publication.

Item	**Notes**	**Check**
DOI/Citation	Manuscript being amended/fixed.	
Author(s) with affiliations	Indicate corresponding author with *	
Text, figures, tables.	Clearly label figures and tables **within document, not just in file name.**	
References		
	NO TOC ART OR SI	
Contact Office (questions)	Editor-in-Chief, *ES&T*, Iowa City, IA	

8 - APÊNDICES

Apêndice 1 – Pontos de coleta

Apêncice 2 - Bairros da cidade de Goiânia sob influência dos reservatórios Senac, Serrinha, Atlântico e Cristina

Apêndice 3 – Ensaio em placa de lise

Apêncide 4 – Ensaio citotóxico em placa de 96 poços.

Apêndice 5 - Fragmentos de pcr amplificados em gel agarose

Apêndice 6 – Gráficos mostrando curvas de amplificação por real time pcr quantitativo (qpcr).

APÊNDICE 1

Apêndice 1 – Pontos de coleta

Reservatório Cristina

Ponto Cristina

Reservatório Serrinha

Ponto Serrinha

Reservatório SENAC

Ponto SENAC

Reservatório Atlântico

Ponto Atlântico

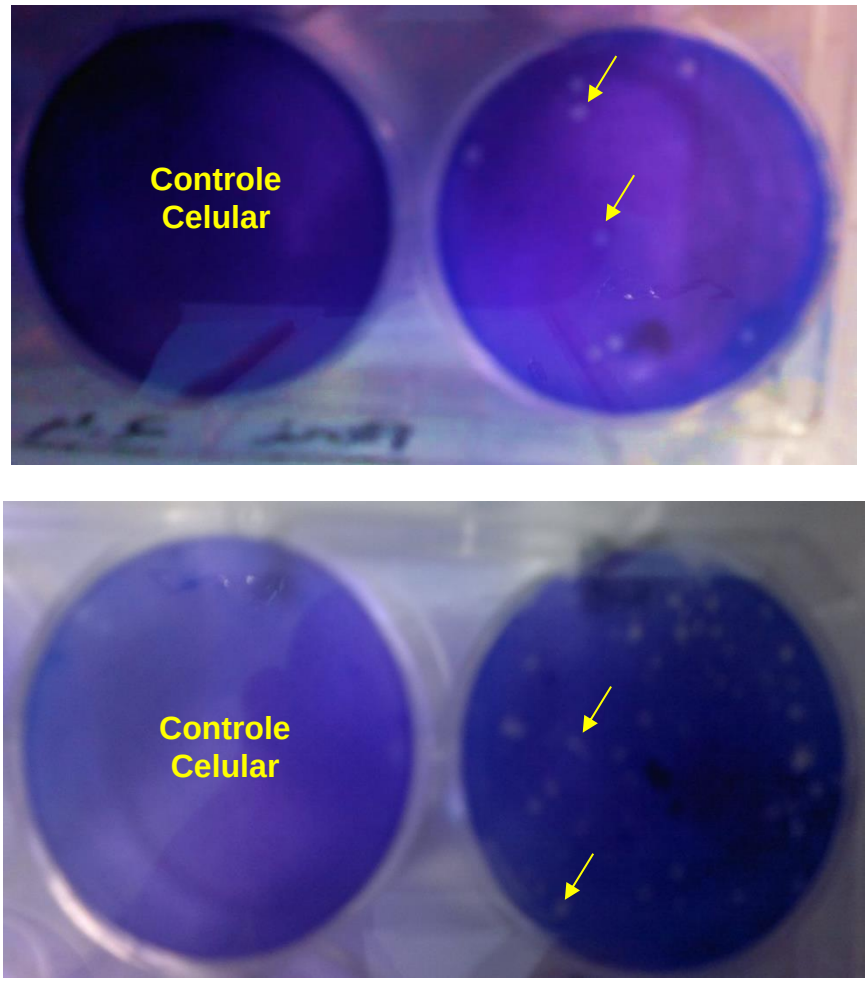
APÊNDICE 2

Apêncice 2 - Bairros da cidade de Goiânia sob influência dos reservatórios Senac, Serrinha, Atlântico e Cristina

Reservatório Senac (R1)	Reservatório Serrinha (R2)
Bairro Feliz; Bairro Santo Hilário I, II; Centro; Chácara Santa Bárbara; Chácaras Botafogo; Colônia Santa Marta; Jardim Califórnia Industrial; Jardim Dom Bosco; Jardim Moema; Jardim Novo Mundo (Parcial): Qds 121 a 123, 155 a 159, 168 a 175, 180 a 236, 216A; Parque Industrial de Goiânia; Pedroso; Setor Aeroporto (Parcial); Setor Bueno (parcial): Qds 1 a 36; Setor Coimbra; Setor Colemar Natal e Silva; Setor Elísio Campos; Setor Oeste (parcial): Qds B0 a B5, C0 a C5, D0 a D5, F0 a F5, G0 a G5, H0 a H5, J1 a J2, R1 a R32; Setor Universitário (parcial): Qds 52 A, 52 a 57, 61, 62, 66, 68, 89A, 107A, 107B, 107C; Setor Vila Nova; Setor Coronel Cosme; Vila Martins; Vila Morais; Vila Oswaldo Rosa; Vila Romana; Vila São Pedro; Vila Viana; Vila Yate.	Parque Acalanto; Parque Amazônia (parcial): Qds 1 a 138, 154 a 196; Parque Santa Cruz; Privê Atlântico; Setor Bela Vista (parcial) Qds. S1 a S12, S17 a S26, S29 a S31, S1A a S5A, S9A a S20Q; Setor Bueno (parcial) Qds 603 a 620; Setor Nova Suíça: Qds 603 a 620; Setor Pedro Ludovico (parcial): Qds 58, 59, 61, 68,69, 72 a 117, 192 a 211; Setor Serrinha; Vila Alto da Glória; Vila Legionárias; Vila Redenção (parcial): Qds 1 a 48, 71 a 86, 72A, 83A, 83B; Vila Rosa.
Reservatório Atlântico (R3)	**Reservatório Cristina (R4)**
Araguaia Parque; Bairro Anhanguera; Chácara Dona Gê; Condomínio Green-Ville; Condomínio Rio Formoso; Condomínio Vila Luciana; Conjunto Cachoeira Dourada; Conj. Res. Monte Carlo; Jardim América (parcial): Qds 310 a 316, 329 a 334, 348 a 362, 368 a 383, 389 a 404, 410 a 438; Jardim Ana Lúcia (parcial): Qds 4, 10, 14, 18, 22; Jardim Atlântico; Jardim Europa; Jardim Planalto; Jardim Presidente; Jardim Tancredo Neves; Jardim Vila Boa; Jd. Florença; Lorena Park; Luana Park; Parque Anhanguera I e II; Parque Oeste Industrial; Parque Paraiso; Parque Amazônia (parcial): Qds 197 a 227, 139 a 153, 142A, 145A, B.; Residencial Goiânia Viva; Residencial Eldorado; Residencial Granville; Setor Celina Parque; Setor Faiçalvile I, II e III; Setor Sudoeste (parcial): Qds 187, 188, 155, 156, 194 a 200, 202 a 204; Setor Ulisses Guimarães; Solange Parque I, II e III; Vila Alpes; Vila Alvorada; Vila Bela; Vila Mauá (parcial): Qds 39 a 49; Vila Novo Horizonte; Vila Rezende; Vila União.	Jd Nova Esperança (parcial): Qds 21, 22, 101 a 146, 150 a 184, 184A, 170A, 130A a 134ª; Setor Empresarial; Setor Sevene; Vila Cristina; Vila Maria Dilce; Vila São José (parcial). Qds: I, XI, 500, 502 a 507, 510 a 513, 515 a 522; Zona Ind. Pedro Abrão; Vila Finsocial (parcial) Qds: 53 a 84, 56A, 57ª, 60A, 75A, 78A; Bairro Aeroviário (parcial): Qds 562, 563, 1 a 5, 10 a 16, 18A a 18C, 25 a 28, 26A, 33; Chácara Nossa Sra. Da Piedade; Chácara Retiro; Fazenda Caveira; Granja Cruzeiro do Sul; Jardim Diamantina; Jardim dos Eucalíptos; Jardim Guanabara IV; Panorama Parque; Recanto Morada dos Sonhos; Residencial Felicidade; Residencial Malibú; Setor Bonfim; Setor Campinas (parcial): Qds 1 a 91; Setor Centro Oeste; Setor Criméia Leste; Setor Criméia Oeste; Setor dos Funcionários; Setor Gentil Meirelles; Setor Goiânia II; Setor Jaó; Setor Marechal Rondon; Setor Negrão de Lima; Setor Norte Ferroviário; Setor Vila Nova; Setor Santa Genoveva; Setor Perim; Setor Progresso; Setor Urias Magalhães; Vila Abajá; Vila Ana Maria; Vila Benjamin Gomes; Vila Clemente; Vila Fernandes; Vila Fróes; Vila Irany; Vila Izaura; Vila Jacaré; Vila Jaraguá; Vila Maria; Vila Megalle; Vila Monticelli; Vila Mutum; Vila Nossa Sra. Aparecida; Vila Ofugi; Vila Pará; Vila Paraíso; Vila Perdiz; Vila Santa Cruz; Vila Santa Helena; Vila Santana; Vila São Francisco; Vila São Paulo; Vila Vera Cruz; Vila Viandelli; Vila Xavier.

APÊNDICE 3

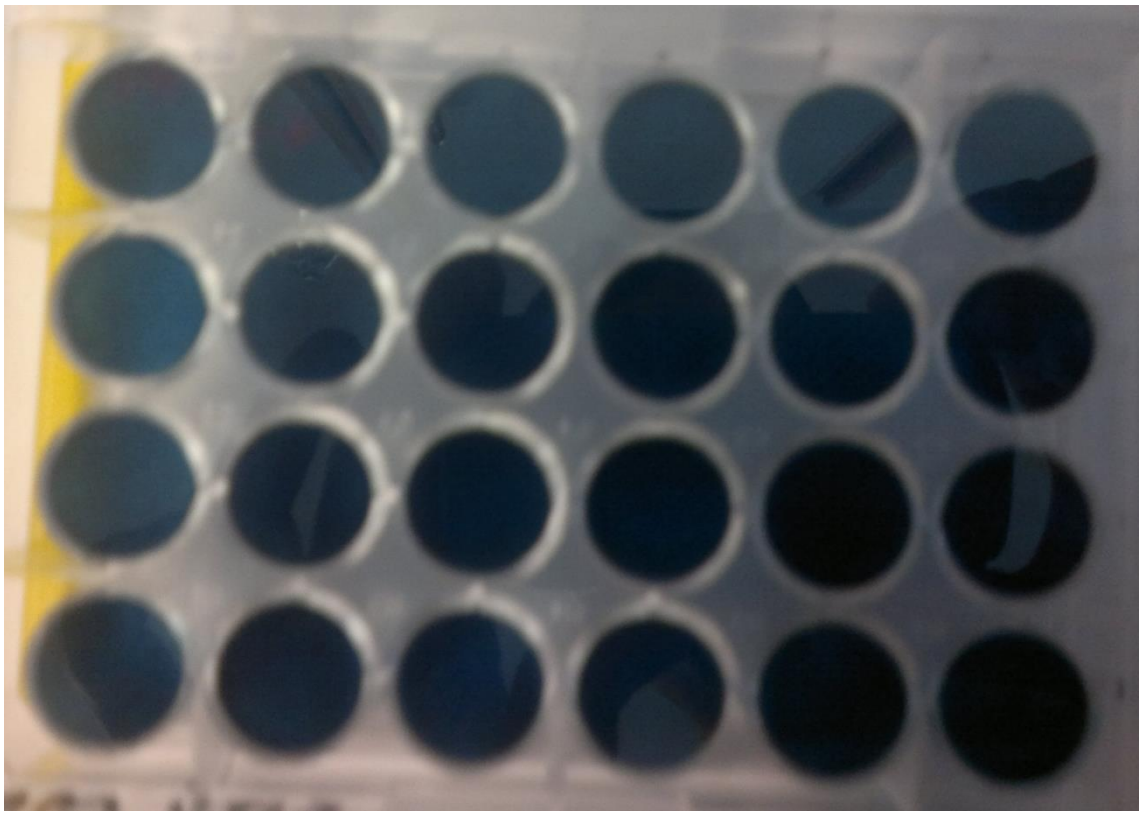
Apêndice 3 – Ensaio em placa de lise



Ensaio em Placa de Lise. Nas setas são mostras as placas formadas, que são contadas para fazer o cálculo final em PFU/mL; ao lado, ensaio exibindo o controle celular, onde não pode aparecer placas de lise celular.

APÊNDICE 4

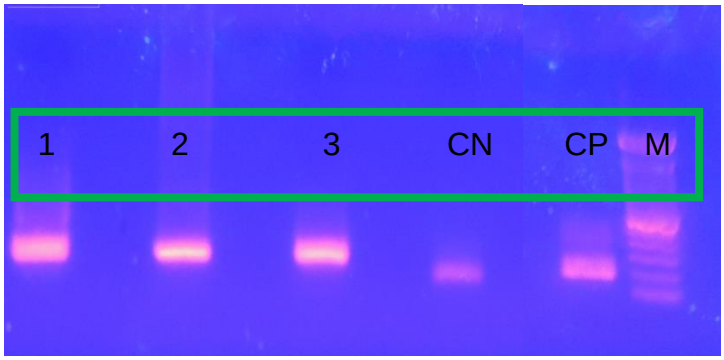
Apêncide 4 – Ensaio citotóxico em placa de 96 poços.



A diluição não-citotóxica foi de 1:6.

APÊNDICE 5

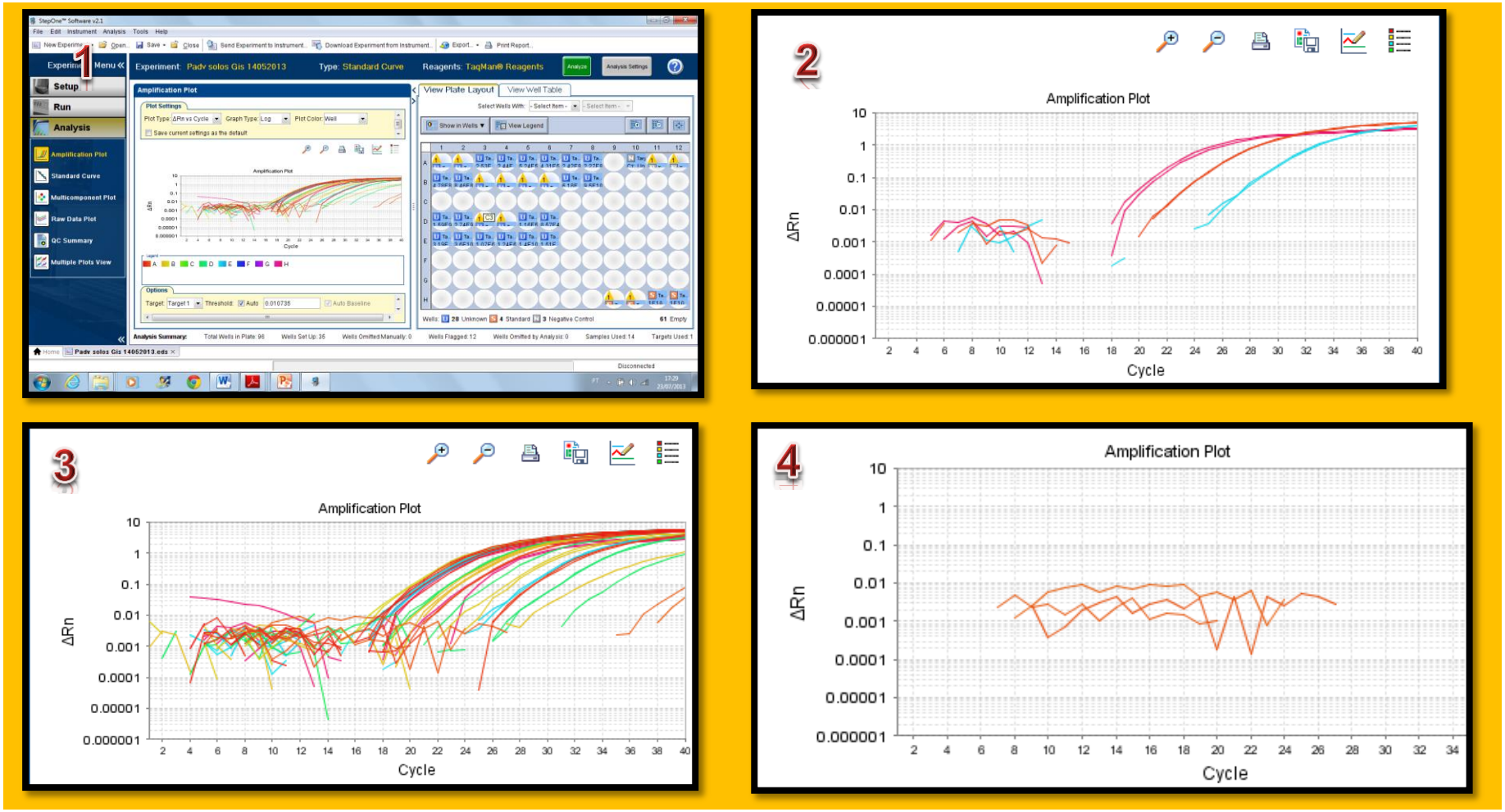
Apêndice 5 - Fragmentos de pcr amplificados em gel agarose



Fragmentos amplificados de ~171 pb dos iniciadores nehexdeg3 e nehexdeg4. Em 1, 2 e 3: fragmentos amplificados de nested-PCR; M: marcador molecular (100 pb); CN: controle negativo; CP: controle positivo. Os produtos amplificados foram separados por eletroforese em gel agarose 1,5% (UltraPureTM Agarose, Invitrogen) durante 1h a 120 V e 70 mA, corados com brometo de etídeo e visualizados sob radiação UV e fotografados.

APÊNDICE 6

Apêndice 6 – Gráficos mostrando curvas de amplificação por real time pcr quantitativo (qpcr).



Em 1: Curvas de qPCR mostradas após corrida no aparelho StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems); 2: amplificações dos padrões; 3: amplificação de todas as amostras, incluso NTC; 4: mostrando apenas os NTC em triplicata.