



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA DA
RELAÇÃO PARASITO-HOSPEDEIRO**

FERNANDO SANTOS LIMA

***Escherichia coli*, adenovírus e enterovírus em amostras de água
consumida em áreas rurais de Goiás**

Goiânia

2020



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE PATOLOGIA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA

TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO (TECA) PARA DISPONIBILIZAR VERSÕES ELETRÔNICAS DE TESES

E DISSERTAÇÕES 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), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a [Lei 9.610/98](#), 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.

O conteúdo das Teses e Dissertações disponibilizado na BDTD/UFG é de responsabilidade exclusiva do autor. Ao encaminhar o produto final, o autor(a) e o(a) orientador(a) firmam o compromisso de que o trabalho não contém nenhuma violação de quaisquer direitos autorais ou outro direito de terceiros.

1. Identificação do material bibliográfico

☒ Dissertação ☐ Tese

2. Nome completo do autor

FERNANDO SANTOS LIMA

3. Título do trabalho

Escherichia coli, adenovírus e enterovírus em amostras de água consumida em áreas rurais de Goiás

4. Informações de acesso ao documento (este campo deve ser preenchido pelo orientador)

Concorda com a liberação total do documento ☒ SIM ☐ NÃO¹

[1] Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. Após esse período, a possível disponibilização ocorrerá apenas mediante:

a) consulta ao(à) autor(a) e ao(à) orientador(a);

b) novo Termo de Ciência e de Autorização (TECA) assinado e inserido no arquivo da tese ou dissertação.

O documento não será disponibilizado durante o período de embargo.

Casos de embargo:

- Solicitação de registro de patente;
- Submissão de artigo em revista científica;
- Publicação como capítulo de livro;
- Publicação da dissertação/tese em livro.

Obs. Este termo deverá ser assinado no SEI pelo orientador e pelo autor.



Documento assinado eletronicamente por **Lilian Carla Carneiro, Professor do Magistério Superior**, em 27/07/2020, às 11:39, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **FERNANDO SANTOS LIMA, Discente**, em 27/07/2020, às 15:31, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1412564** e o código CRC **71C86C65**.

FERNANDO SANTOS LIMA

***Escherichia coli*, adenovírus e enterovírus em amostras de água
consumida em áreas rurais de Goiás**

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Biologia da
Relação Parasito-Hospedeiro da Universidade
Federal de Goiás para obtenção do Título de
Mestre.

Orientadora: Lilian Carla Carneiro

Goiânia

2020

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFG.

Lima, Fernando Santos

Escherichia coli, adenovírus e enterovírus em amostras de água consumida em áreas rurais de Goiás [manuscrito] / Fernando Santos Lima. - 2020.

XII, 49 f.

Orientador: Profa. Dra. Lilian Carla Carneiro.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Goiás, Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública (IPTSP), Programa de Pós Graduação em Biologia da Relação Parasito-Hospedeiro, Goiânia, 2020.

Bibliografia.

Inclui siglas, mapas, abreviaturas, símbolos, gráfico, tabelas, lista de figuras, lista de tabelas.

1. Comunidades rurais. 2. Fontes de água. 3. Qualidade da água. 4. Contaminação fecal. 5. Vírus entéricos. I. Carneiro, Lilian Carla, orient. II. Título.

CDU 57



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS

INSTITUTO DE PATOLOGIA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA

ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO

ATA DA REUNIÃO DA BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE FERNANDO SANTOS LIMA - Aos vinte e três dias do mês de junho do ano de 2020 (23/06/2020), às 14:00 horas, reuniram-se os componentes da Banca Examinadora: Profs. Drs. LILIAN CARLA CARNEIRO (UFG), PAULO SÉRGIO SCALIZE (EECA/UFG) E MÔNICA DE OLIVEIRA SANTOS (FM/UFG) para, sob a presidência do primeiro, e em sessão pública realizada por WEBCONFERÊNCIA, procederem à avaliação da defesa de dissertação intitulada: "*Escherichia coli*, adenovírus e enterovírus em amostras de água consumida em áreas rurais de Goiás", em nível de **MESTRADO**, de autoria de **FERNANDO SANTOS LIMA** discente do PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA DA RELAÇÃO PARASITO-HOSPEDEIRO, da Universidade Federal de Goiás. A sessão foi aberta pela Orientadora, Profa. Dra. LILIAN CARLA CARNEIRO, que fez a apresentação formal dos membros da Banca e orientou o Candidato sobre como utilizar o tempo durante a apresentação de seu trabalho. A palavra a seguir, foi concedida ao autor da dissertação que, em 30 minutos procedeu à apresentação de seu trabalho. Terminada a apresentação, cada membro da Banca arguiu o Candidato, tendo-se adotado o sistema de diálogo sequencial. Terminada a fase de arguição, procedeu-se à avaliação da defesa. Tendo-se em vista o que consta na Resolução nº. 1492/2017 do Conselho de Ensino, Pesquisa, Extensão e Cultura (CEPEC), que regulamenta o Programa de Pós-Graduação em Biologia da Relação Parasito-Hospedeiro a Banca, em sessão secreta, expressou seu Julgamento, considerando o candidato **Aprovado** ou **Reprovado**:

Banca Examinadora

Prof. Dr. Lilian Carla Carneiro
Prof. Dr. Paulo Sérgio Scalize
Profa. Dra. Mônica de Oliveira Santos

Aprovado / Reprovado

Aprovado

Aprovado

Aprovado

Em face do resultado obtido, a Banca Examinadora considerou o candidato **Habilitado**, (**Habilitado ou não Habilitado**), cumprindo todos os requisitos para fins de obtenção do título de **MESTRE EM BIOLOGIA DA RELAÇÃO PARASITO-HOSPEDEIRO**, pela Universidade Federal de Goiás. Cumpridas as formalidades de pauta, às 16 h 06 min, a presidência da mesa encerrou esta sessão de defesa de dissertação e para constar eu, HELOÍSA DE SOUSA VIEIRA, secretária do Programa de Pós-Graduação em Biologia da Relação Parasito-Hospedeiro, lavrei a presente Ata que depois de lida e aprovada, será assinada pelos membros da Banca Examinadora.

TÍTULO SUGERIDO PELA BANCA



Documento assinado eletronicamente por **Lilian Carla Carneiro, Professor do Magistério Superior**, em 23/06/2020, às 17:46, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Paulo Sérgio Scalize, Professor do Magistério Superior**, em 23/06/2020, às 18:19, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Mônica de Oliveira Santos, Usuário Externo**, em 23/06/2020, às 18:36, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso=0, informando o código verificador **1399048** e o código CRC **6C32FDA0**.

Referência: Processo nº 23070.026216/2020-29

SEI nº 1399048

**Programa de Pós-Graduação em Biologia da Relação Parasito-Hospedeiro da
Universidade Federal de Goiás**

BANCA EXAMINADORA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Aluno (a): Fernando Santos Lima

Orientador (a): Prof^a. Dr^a. Lilian Carla Carneiro

Membros:

1. Prof^a. Dr^a. Lilian Carla Carneiro

2. Prof. Dr. Paulo Sérgio Scalize

3. Prof^a. Dr^a. Mônica de Oliveira Santos

Data: 23/06/2020

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho ao meu pai, Francisco, e a minha mãe, Dorilene, por todo o apoio e o incentivo ao longo da minha vida.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por ter me proporcionado todas as condições para a realização deste trabalho.

Ao meu pai e a minha mãe, pelo amor e pela dedicação, e aos meus irmãos, Eduardo e Renato, pela amizade e pelo companheirismo.

À Prof^a. Dr^a. Lilian Carla Carneiro, pela oportunidade, pela confiança, pela dedicação e pela orientação. Agradeço por ter me ajudado a superar as dificuldades e a desenvolver este trabalho da melhor maneira possível. Admiro a sua humildade e o seu cuidado com os alunos.

Ao Prof. Dr. Paulo Sérgio Scalize, coordenador do Projeto SanRural, por ter idealizado e apoiado este trabalho. Agradeço também pela confiança, pela oportunidade e pela permissão de uso do Laboratório de Análise de Água (LAnA-UFG) para realização de parte das análises.

Ao Prof. Dr. José Daniel Gonçalves Vieira pela permissão de uso do Laboratório de Microbiologia Ambiental e Biotecnologia (LAMAB-UFG) para realização de parte dos experimentos.

À técnica Ma. Viviane Lopes Rocha pela amizade, pelo incentivo, pela orientação e pela sua dedicação em atender as demandas dos usuários dos laboratórios sob a sua responsabilidade.

À técnica Dr^a. Ellen Flávia Moreira Gabriel, pela amizade, pela orientação, pela ajuda nos experimentos e pelo apoio na compra dos materiais e reagentes desta pesquisa.

Ao Prof. Dr. Fernando Rosado Spilki, da Universidade Feevale, e a sua aluna Ma. Meriane Demoliner, pelo fornecimento dos controles virais usados nesta pesquisa.

As companheiras do dia-a-dia laboratorial, Dr^a. Aline Rodrigues Gama e Ma. Raylane Pereira Gomes, pela amizade, pelo apoio desde o início desta pesquisa, quando eu mais precisava, e pela orientação e auxílio ao longo dos experimentos.

A todos do Laboratório de Biotecnologia de Microrganismos (LBMic), em especial à Célia Malveste, à Aline Cristine, à Thaís Reis, ao Adailton Pereira e ao Paulo Alex, pela amizade, ajuda e companheirismo.

À Fundação Nacional da Saúde (FUNASA), pelo suporte financeiro através do projeto “Saneamento e Saúde em Comunidades Rurais e Tradicionais de Goiás” (Sanrural) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa de pesquisa.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO – REVISÃO DA LITERATURA	1
1.1	SANEAMENTO BÁSICO NO MEIO RURAL.....	1
1.2	FONTES DE ÁGUA PARA O CONSUMO HUMANO.....	3
1.3	POLUIÇÃO FECAL DAS FONTES DE ÁGUA PARA CONSUMO HUMANO	4
1.4	VÍRUS ENTÉRICOS	6
1.4.1	Características gerais dos vírus entéricos	6
1.4.2	Contaminação da água por vírus entéricos	8
1.4.3	Potencial de emergência de vírus entéricos zoonóticos no meio rural	9
1.4.4	Adenovírus	10
1.4.5	Enterovírus	12
1.5	COLIFORMES E VÍRUS ENTÉRICOS COMO INDICADORES DE CONTAMINAÇÃO FECAL	13
2	JUSTIFICATIVA.....	15
3	OBJETIVOS	17
3.1	OBJETIVO GERAL	17
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
4	METODOLOGIA	18
4.1	LOCAL DO ESTUDO.....	18
4.2	COLETA E TRANSPORTE DAS AMOSTRAS.....	18
4.3	DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE <i>Escherichia coli</i>	19
4.4	CONCENTRAÇÃO DAS AMOSTRAS PARA ANÁLISE VIRAL	20
4.5	CONTROLES VIRAIS.....	20
4.6	EXTRAÇÃO DOS ÁCIDOS NUCLEICOS VIRAIS	21
4.7	SÍNTESE DE cDNA.....	21
4.8	DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DOS INDICADORES VIRAIS	22
4.8.1	Curva padrão da qPCR	23
4.8.2	qPCR para HAdV	23
4.8.3	qPCR para EV	24
4.9	ANÁLISE ESTATÍSTICA	24
5	RESULTADOS.....	25
6	DISCUSSÃO	29
7	CONCLUSÕES	36
8	REFERÊNCIAS	37

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - A) Localização do Estado de Goiás no território brasileiro. B) Localização dos municípios em que residem as comunidades rurais participantes deste estudo.....	18
Figura 2 - A) Indicativo de contaminação fecal das amostras de água de acordo com os indicadores. B) Concentrações máximas e mínimas dos indicadores e suas médias geométricas.....	26
Figura 3 – Indicativo de contaminação fecal de acordo com os tipos de fontes de água e os indicadores utilizados.....	26
Figura 4 - Contaminação fecal de acordo com os tipos de fontes de água subterrâneas.	28
Figura 5 - A) Gráfico de Venn mostrando a distribuição das amostras em relação aos indicadores analisados. B) Número de amostras contaminadas por um ou mais indicadores.....	28

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Iniciadores usados na qPCR de fragmentos genômicos de HAdV e EV.	22
Tabela 2 - Distribuição das amostras analisadas em relação ao tipo de fonte. Fonte subterrânea foi subdividida em três subtipos.....	25
Tabela 3 - Valores mínimos, máximos e médias geométricas das concentrações dos indicadores EC, HAdV e EV para as amostras positivas.	27

LISTA DE SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS

μL	Microlitro
μm	Micrômetro
χ^2	Qui-quadrado
atm	Atmosfera
cDNA	DNA complementar
CG	Cópias genômicas
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EC	<i>Escherichia coli</i>
EV	Enterovírus
g	gramas ou força g
HAdV	Adenovírus humano
HAdV-C	Adenovírus humano da espécie C
L	Litro
min	Minutos
mL	Mililitro
mm	Milímetros
mM	Milimolar
mmHg	Milímetros de mercúrio
ng	Nanogramas
NMP	Número mais provável
p	Valor-p
PCR	<i>Polymerase chain Reaction</i> (Reação em cadeia pela polimerase)
pH	Potencial hidrogeniônico
qPCR	Reação em cadeia pela polimerase quantitativa
RNA	Ácido ribonucleico
s	Segundos
UV	Ultravioleta

RESUMO

O meio rural carece de serviços de saneamento básico. Assim, frequentemente, as instalações de obtenção de água e de disposição de esgoto ficam sob iniciativa de cada morador, os quais podem não contar com o recurso financeiro e o conhecimento técnico para construí-las e mantê-las funcionando adequadamente. Dessa forma, a água para consumo humano fica sujeita à contaminação fecal e, conseqüentemente, à presença de patógenos de veiculação hídrica, como os vírus entéricos. O objetivo desse trabalho foi avaliar a contaminação fecal de amostras de água proveniente de fontes individuais utilizadas para o abastecimento domiciliar em áreas rurais do Estado de Goiás. As amostras foram coletadas de 86 residências, distribuídas em 15 comunidades, cujas fontes de água eram poços tubulares, poços escavados, nascentes, mananciais superficiais e água da chuva. Utilizou-se como indicadores de contaminação fecal a bactéria *Escherichia coli* (EC), analisada pelo método do substrato cromogênico definido, e os vírus entéricos adenovírus humano (HAdV) e enterovírus (EV), analisados por qPCR. Observou-se que 90,7% das amostras apresentaram indicativo de contaminação fecal. As taxas de detecção foram 74,4% para EC, 57% para HAdV e 9,3% para EV. As médias de concentração desses indicadores foram, respectivamente, $8,34 \times 10^1$ NMP/100mL, $8,6 \times 10^5$ CG/L e $9,75 \times 10^5$ CG/L. O indicador EC foi o mais prevalente em amostras de água subterrânea e superficial. O indicador HAdV foi significativamente mais detectado em amostras de águas subterrâneas em relação as de águas superficiais e foi mais eficiente em indicar contaminação em poços tubulares. Em amostras de cisternas, os indicadores virais foram os mais prevalentes. Não foi observada associação de frequências nem correlação de concentrações entre EC e HAdV. HAdV indicou contaminação fecal humana e teve bom desempenho como indicador complementar. Esses resultados revelam que a população analisada está vulnerável a doenças de veiculação hídrica causadas por patógenos entéricos.

PALAVRAS-CHAVE: Comunidades rurais; Fontes de água; Qualidade da água; Contaminação fecal; Vírus entéricos.

ABSTRACT

The rural environment lacks basic sanitation services. Thus, the water supply and sewage disposal facilities are often under the initiative of each resident, who may not have the financial resources and technical knowledge to build and keep them functioning properly. Thus, water for human consumption is subject to fecal contamination and, consequently, to the presence of waterborne pathogens, such as enteric viruses. The objective of this work was to evaluate the fecal contamination of water samples from individual sources used for household supply in rural areas of the State of Goiás. The samples were collected from 86 homes, distributed in 15 communities, whose water sources were tubular wells, dug wells, springs, surface waters and rainwater. *Escherichia coli* (EC) bacteria, analyzed by the defined chromogenic substrate method, and the enteric virus human adenovirus (HAdV) and enterovirus (EV), analyzed by qPCR, were used as fecal contamination indicators. It was observed that 90.7% of the samples showed indications of fecal contamination. Detection rates were 74.4% for EC, 57% for HAdV and 9.3% for EV. The concentration averages of these indicators were, respectively, 8.34×10^1 NMP / 100mL, 8.6×10^5 CG / L and 9.75×10^5 CG / L. The EC indicator was the most prevalent in ground and surface water samples. The HAdV indicator was significantly more detected in groundwater samples than in surface water and was more efficient in indicating contamination in tubular wells. In cistern samples, viral indicators were the most prevalent. There was no association of frequencies or correlation of concentrations between EC and HAdV. HAdV indicated human fecal contamination and performed well as a complementary indicator. These results reveal that the analyzed population is vulnerable to waterborne diseases caused by enteric pathogens.

Keywords: Rural communities; Water sources; Water quality; Fecal contamination; Enteric viruses.

1 INTRODUÇÃO – REVISÃO DA LITERATURA

1.1 SANEAMENTO BÁSICO NO MEIO RURAL

A água é importante para a manutenção da vida, apesar de não ser um nutriente orgânico que forneça calorias. Ela ainda apresenta uma variedade de usos para os seres humanos, como os domésticos, agropecuários, industriais, energéticos e recreacionais (Khatri e Tyagi 2015). Devido à utilidade da água nas mais variadas atividades humanas, ela está diretamente relacionada ao desenvolvimento econômico, bem-estar social, saúde e qualidade ambiental (Dantas et al. 2018).

Apesar de a disponibilidade da água em qualidade e quantidade adequada ser fundamental à saúde, grande parte dos países em desenvolvimento, especialmente em áreas rurais, sofre com abastecimento inseguro ou insuficiente (Usman, Gerber e Braun 2019). As diferentes fontes de água podem ser contaminadas por patógenos de veiculação hídrica, o que constitui a maior preocupação relacionada à qualidade da água em todo o mundo. Os contaminantes são vírus, bactérias, protozoários e helmintos que, após se multiplicarem no intestino de humanos e de outros animais infectados, são excretados juntamente com suas fezes (WHO 2018).

Quando ingeridos, esses microrganismos têm o potencial de infectar um novo hospedeiro, ou seja, apresentam transmissão fecal-oral. A infecção por eles pode causar uma série de sintomas, tais como náusea, dor abdominal, febre, vômito e diarreia (Pandey et al. 2014; WHO 2018). A diarreia permanece uma grande preocupação de saúde pública, pois é uma importante causa de morte em crianças, especialmente em países de baixa renda. Em 2015, a diarreia matou 1,3 milhão de pessoas em todo mundo, das quais cerca de 38% eram crianças com idade inferior a cinco anos de idade (Troeger et al. 2017; GBD 2016).

O saneamento básico é um fator de alto impacto na saúde humana e está intimamente ligado à qualidade microbiológica da água. Ele é uma barreira primária à transmissão de patógenos de veiculação hídrica, pois tem como objetivo principal evitar o contato das pessoas com excretas (Ercumen et al. 2017; WHO 2018). Contudo, permanece um desafio em países subdesenvolvidos, onde a população rural é desassistida e as cidades têm dificuldade em atender a demanda crescente devido à urbanização desorganizada (WHO 2018).

Em todo o mundo, a falta de acesso a um adequado abastecimento de água atinge 844 milhões de pessoas, as quais se utilizam de poços escavados, nascentes desprotegidas, águas superficiais ou ainda gastam mais de 30 minutos para obter água de fontes apropriadas. Além disso, 2,3 bilhões de pessoas da população mundial não têm acesso a um adequado manejo de excretas, dentre as quais grande parte defeca à céu aberto ou o faz utilizando instalações inadequadas. Nas áreas urbanas, 63% da população está conectada à rede de esgoto, enquanto na zona rural essa proporção é de apenas 9% (WHO e UNICEF 2017).

De acordo com a legislação brasileira, o saneamento básico é definido como o conjunto de serviços, infraestruturas e instalações operacionais de abastecimento de água, esgotamento sanitário, limpeza urbana, manejo de resíduos sólidos e, ainda, drenagem e manejo das águas pluviais (Brasil 2007). No Brasil, existe um grande contraste na oferta de saneamento entre áreas urbanas e rurais. O abastecimento de água por rede de distribuição atende cerca 94% dos domicílios urbanos, enquanto nos rurais atende aproximadamente 32%. Esse quadro é ainda mais extremo quando se trata do esgotamento sanitário: cerca de 72% dos domicílios urbanos estão conectados à rede coletora, enquanto nos rurais apenas 8% (PNAD 2013).

As comunidades rurais, assim como outras de periferias urbanas e de áreas periurbanas que não são atendidas pelo saneamento básico, constituem as chamadas “comunidades isoladas”. Fatores de ordem técnica, econômica e política são os responsáveis por esse isolamento. Entre eles destacam-se: difícil acesso, baixa densidade populacional, grande distância entre os domicílios ou entre estes e a sede do município e ainda, situação de irregularidade fundiária (Tonetti et al. 2018).

As comunidades isoladas, por não ter acesso à serviços públicos de fornecimento de água e coleta de esgoto, recorrem a meios alternativos de obtenção de água, como poços escavados, e manejo local de excretas, como sistemas sépticos e latrinas, para suprir suas necessidades. Essas instalações frequentemente são construídas pelos próprios habitantes, sem o acompanhamento das instituições governamentais de saúde pública. Assim, a população pode se expor a doenças de veiculação hídrica, já que fontes de água mal administradas podem ser facilmente contaminadas por patógenos (Suhogusoff, Hirata e Ferrari 2013).

1.2 FONTES DE ÁGUA PARA O CONSUMO HUMANO

A água para o consumo humano é obtida principalmente de duas fontes ou mananciais. Um deles é a água superficial, que está sobre o solo e forma rios, córregos e lagos. O outro, a água subterrânea, que está no interior da crosta. Esta é formada pela água que precipita e se infiltra no solo e nas rochas, onde se move lentamente e forma estruturas saturadas, as quais podem dar origem aos aquíferos freáticos e aos aquíferos confinados (Brasil 2006; Liu et al. 2011).

Os aquíferos freáticos são pouco profundos e contém água sob pressão atmosférica, a qual se comunica com a superfície pela porosidade do solo. Já os confinados são mais profundos e contém água sob maior pressão, a qual está isolada entre formações geológicas pouco permeáveis. Estas limitam o seu movimento vertical e a protegem da infiltração de contaminantes originários da superfície (Smith et al. 2012; Bradbury et al. 2013).

A disponibilidade de água subterrânea pode ser menos sujeita a variações sazonais e isso a torna interessante em regiões áridas e semiáridas, onde muitos córregos são intermitentes, ou ainda onde há grandes desvios de água superficial para irrigação ou hidroelétricas. A proteção da água subterrânea por filtração natural tem sido a principal motivação da sua escolha em países em desenvolvimento. Contudo, também está sujeita a contaminação, que é pouco aparente e de difícil reversão (Johnston et al. 2011).

Nas áreas urbanas de países industrializados, a forma mais comum de acesso à água é o sistema público de distribuição. Já nas áreas rurais, há uma grande heterogeneidade de formas (Baird, Summers e Plummer 2013). Na falta de uma rede pública de distribuição de água a partir das fontes de captação, sua obtenção no meio rural é feita individualmente a partir de lagos, rios, nascentes, poços rasos, poços profundos, água da chuva etc. (Leite et al. 2018; Peres et al. 2020).

As fontes de água subterrânea têm sido preferencialmente usadas para o consumo humano devido a sua qualidade microbiológica em estado natural ser geralmente melhor quando comparada às fontes de água superficiais (Schijven, Hassanizadeh e Husman 2010). Dentre as fontes subterrâneas, poços verticais rasos e nascentes são comumente usadas no meio rural devido ao baixo custo de instalação e a fácil extração em aquíferos livres. Além disso, nascentes podem não necessitar de infraestrutura (Leite et al. 2018). O uso da água da chuva também tem sido uma opção interessante em regiões onde outras fontes apresentam variação de disponibilidade sazonal devido ao regime de chuvas com

longos períodos de seca. Esse uso geralmente envolve a construção de cisternas de armazenamento, as quais podem utilizar tecnologia simples e barata (Palla et al. 2012).

1.3 POLUIÇÃO FECAL DAS FONTES DE ÁGUA PARA CONSUMO HUMANO

A qualidade das fontes superficiais e subterrâneas é influenciada por fatores naturais e antropogênicos, tanto no meio rural como no urbano. Os fatores humanos causam maior impacto sobre a vida e diferem nessas localizações de acordo com as atividades praticadas em cada uma delas. No meio rural, a qualidade da água é afetada principalmente pela agricultura, pecuária e atividades domésticas. No urbano, onde a influência humana geralmente é maior, destacam-se as atividades industriais, as domésticas e mudanças no uso e cobertura do solo. As atividades humanas geram uma diversidade de poluentes na água, tais como sedimentos, nutrientes, patógenos, pesticidas, fertilizantes, metais potencialmente tóxicos e sais (Khatri e Tyagi 2015).

Apesar da influência humana sobre a qualidade dos recursos hídricos ser mais profunda no ambiente urbano, o risco de contaminação fecal da água de consumo em países de baixa e média renda é significativamente maior no meio rural, provavelmente devido ao saneamento inadequado (Bain et al. 2014). Águas residuais domésticas são uma importante fonte de patógenos fecais que podem contaminar corpos de água e aumentar os riscos de doenças de veiculação hídrica (Akunna, Keeffe e Allan 2017). Em muitas áreas rurais e periferias urbanas, onde há carência de serviços de saneamento básico, o esgoto é disposto diretamente no solo ou em cursos de água com ou sem tratamento (Alrumman, El-kott e Keshk 2016; Al-Atawneh et al 2016).

Instalações de disposição local de excretas incluem latrinas, fossas negras e tanques sépticos. Latrinas são plataformas contendo uma abertura através da qual as fezes passam e atingem uma escavação do solo abaixo, onde ficam armazenadas (Graham, Matthew e Polizzotto 2013). Fossas negras, assim como latrinas, são escavações sem revestimento ou fundo vedado, onde o esgoto bruto é lançado por via hídrica para se infiltrar no subsolo, o que diminui os custos do esvaziamento frequente. As escavações geralmente retiram as camadas do solo mais ativas na atenuação de poluentes e podem alcançar o lençol freático (Suhogusoff, Hirata e Ferrari 2013; FUNASA 2015; Al-Atawneh et al. 2016).

Tanques sépticos são compartimentos isolados constituídos de concreto, fibra de vidro ou plástico. As águas residuais que chegam ao tanque, sofrem um processo de

decantação, em que os componentes mais densos se sedimentam e os menos densos flutuam. O sedimento é potencialmente degradado sob condições anaeróbicas (Hu et al. 2016). Os tanques sépticos são amplamente usados ao redor do mundo para o tratamento do esgoto doméstico individual ou de pequenos grupos de habitações em regiões carentes de uma rede coletora principal (Withers et al. 2014). Contudo, o uso de tanques sépticos isoladamente, sem um tratamento secundário de seu efluente, tem baixo potencial de remoção de patógenos (Akunna, Keefe e Allan 2017; Boguniewicz-Zablocka e Capodaglio 2017).

Há uma grande preocupação quando domicílios com disposição local de esgoto dependem do suprimento de água subterrânea, pois pode existir uma via de conexão entre essas fontes poluidoras e as de água (Quamar et al. 2017). O solo pode eliminar contaminantes por meio de processos físicos, químicos e biológicos com potencial para diminuir ou impedir o acesso de contaminantes à água subterrânea. A água pode ser purificada em termos microbiológicos pela sua passagem através das camadas do solo, as quais podem remover ou reter patógenos por tempo suficiente para sua inativação (Oliveira et al. 2016; Kauppinen, Pitkanen e Miettinen 2018). Contudo, esse potencial de reciclagem da água poluída depende de uma série de características do local e do tratamento prévio antes do seu lançamento e dispersão no solo (Oliveira et al 2016).

Soluções locais de disposição de excretas, tais como latrinas e fossas negras, concentram altas quantidades de excretas que lixiviam a partir de um único ponto. Isso gera o risco de contaminação das águas subterrâneas próximas em consequência do transporte de patógenos, em especial quando essas instalações não obedecem às distâncias seguras do aquífero freático e do poço de captação de água (Sorensen et al. 2016). Condições geológicas podem favorecer a migração dos patógenos no solo e a situação pode ser agravada em regiões onde o lençol freático é raso (Quamar et al. 2019).

Nas regiões urbanas, onde o saneamento básico é mais presente, as águas residuais domésticas são coletadas e transportadas pela rede de esgoto e lançadas em cursos de água. O lançamento pode ser direto ou incluir algum tratamento prévio (Alrumman, El-kott e Keshk 2016). A contaminação dos cursos de água por esgoto não fica restrita ao local de lançamento, já que contaminantes fecais podem ser transportados pelo fluxo da água até áreas adjacentes a jusante (Lee et al. 2014; Cantor et al. 2017). Dessa forma, cursos de água em áreas rurais podem apresentar contaminação fecal humana originada em regiões urbanas próximas a montante.

O lançamento de esgoto sem o tratamento adequado em águas superficiais é uma importante fonte de contaminação por patógenos fecais, os quais representam um fator de risco associado ao uso desses recursos para fins recreativos e de consumo. Nesses ambientes aquáticos, o sedimento e o biofilme constituem reservatórios de patógenos, os quais são lançados na coluna d'água após os distúrbios gerados pelo aumento do fluxo ou inundações após tempestades (Mackowiak et al. 2018).

Há situações onde os mesmos rios usados para o despejo de esgoto também são usados para captação de água para abastecimento. A justificativa para o descarte de dejetos humanos em cursos de água parte dos pressupostos de que a diluição soluciona o problema da poluição, de que o tratamento da água a torna potável e de que o monitoramento da sua qualidade a partir de indicadores bacteriológicos é efetivo. Contudo, o padrão de potabilidade baseado apenas nesses indicadores é limitado para avaliar a qualidade microbiológica da água (Spilki 2015).

1.4 VÍRUS ENTÉRICOS

1.4.1 Características gerais dos vírus entéricos

Os vírus entéricos compõem um grupo heterogêneo. Eles pertencem a diferentes gêneros e famílias (Prado e Miagostovich 2014; Staggemeier et al. 2015). Esse grupo inclui tanto vírus com genoma de DNA como também de RNA. Exemplos dos primeiros são as famílias *Adenoviridae* (que inclui os adenovírus) e *Parvoviridae* (que inclui os parvovírus). Exemplos do segundo são as famílias *Caliciviridae* (que inclui norovírus e sapovírus), *Picornaviridae* (que inclui os vírus da hepatite A e os enterovírus), *Reoviridae* (que inclui os rotavírus) e *Astroviridae* (que inclui os astrovírus) (Yezli e Otter 2011).

Há mais de 150 tipos de vírus entéricos, os quais são encontrados com frequência em amostras ambientais (Wong et al. 2012). Embora diferentes em alguns aspectos, tais como conteúdo genômico e proteínas do capsídeo, esses vírus apresentam algumas características comuns, que estão relacionadas com a alta capacidade de disseminação ambiental e infecção de novos hospedeiros: baixa dose infectante, capacidade de mutação, ineficácia a tratamentos por antibióticos, resistência a processos de desinfecção, facilidade de serem transportados devido ao pequeno tamanho e alta resistência a condições ambientais (O'Brien et al. 2017).

A transmissão dos vírus entéricos ocorre pela rota fecal-oral, através da ingestão de água e alimentos contaminados e do contato com pessoas infectadas (Pang et al. 2019).

As mãos podem desempenhar um papel de veículo de transmissão desses vírus de forma direta ou indireta (Kotwal e Cannon 2014). O contato das mãos com a boca, após o contato delas com água contaminada ou fômites, constitui uma rota de transmissão (Pitol et al. 2018).

A contaminação de alimentos cultivados pode acontecer em vários estágios, antes e após a sua colheita. O primeiro caso inclui aqueles irrigados com água fecalmente contaminada ou ainda cultivados em terras fertilizadas com esterco. O segundo caso está associado à falta de higiene no manuseio de alimentos e a sua lavagem com água contaminada. Esses alimentos oferecem risco principalmente quando consumidos crus ou levemente cozidos (Kokkinos et al 2015; Bosch, Pintó e Guix 2016; Prez et al. 2018; Purpari et al. 2019). A infecção por vírus entéricos também pode ocorrer por inalação de água contaminada ou do contato dela com a pele ou mucosas quando usada para higiene pessoal ou para natação (Gall et al. 2015). A via parenteral também é uma possibilidade de transmissão para alguns vírus entéricos como os vírus da hepatite A e E (Bosch, Pintó e Guix 2016).

As infecções por vírus entéricos podem ser assintomáticas e sintomáticas em humanos e outros animais (Staggemeier et al. 2015). As doenças causadas por eles estão associadas a diferentes quadros clínicos (Prado e Miagostovich 2014). As manifestações de doença dependem tanto de fatores do vírus quanto do hospedeiro. Fatores virais incluem a dose infectante, a variante genética da cepa viral e a endemicidade. Entre os fatores do hospedeiro, destacam-se a idade, o estado nutricional e imunológico, bem como a disponibilidade de cuidados de saúde (Masachessi et al. 2017).

Em hospedeiros saudáveis, as infecções por vírus tendem a ser resolvidas naturalmente. Contudo, elas são importante causa de morbidade em crianças com idades inferior a cinco anos, em idosos, em mulheres grávidas e em indivíduos imunocomprometidos (Gall et al. 2015). Muitos desses vírus produzem infecções subclínicas e os sintomas aparecem com baixa frequência na população. Já outros vírus, podem desencadear condições graves de saúde, tais como hepatites em adultos e gastroenterites severas em crianças e idosos (Masachessi et al. 2017).

Em comparação com outros microrganismos, como bactérias e protozoários, os vírus são a maior causa de gastroenterites (Pang et al. 2019). Embora a maioria das infecções causadas por vírus entéricos sejam gastroenterites autolimitadas, eles também estão associados à outras manifestações: infecções respiratórias, conjuntivites, hepatites, meningite asséptica, encefalite e paralisia (Iaconelli et al. 2016).

1.4.2 Contaminação da água por vírus entéricos

Grandes quantidades de vírus entéricos são eliminadas a partir das fezes e do vômito de pessoas infectadas, os quais se espalham pelo ambiente via esgoto tratado ou não tratado. Alguns deles ainda podem ser excretados durante a infecção através da urina (Bosch et al. 2008; Pang et al. 2019). Em indivíduos infectados, os vírus podem atingir concentrações de até 10^{12} vírus por gramas de fezes (Drexler et al. 2011). A excreção de vírus nas fezes pode se estender por longos períodos após a resolução dos sintomas ou acontecer até mesmo em infecções assintomáticas (Kirby et al. 2014; Ye et al. 2016).

Indivíduos com infecção assintomática funcionam como amplificadores, reservatórios e disseminadores virais e constituem uma fonte de transmissão aos indivíduos suscetíveis (Yezli e Otter 2011). Uma vez lançados no ambiente, esses vírus podem contaminar a água usada para fins de consumo e atividades recreacionais, tornando-as potenciais fontes de infecção (Masachessi et al. 2018). Embora esses vírus se diluam na água e possam apresentar concentração relativamente baixa, poucas partículas virais são necessárias para que uma rápida infecção se instale no hospedeiro, já que a dose infectante dos vírus entéricos varia de 10 a 100 partículas (La Rosa et al 2012; Prevost et al. 2016). Dentre os vírus entéricos, os mais relatados em água contaminada por fezes são os adenovírus, os enterovírus, os rotavírus, os norovírus, os vírus das hepatites e os poliomavírus (Wong et al. 2012).

Vírus entéricos têm sido encontrados em fontes de água superficiais e subterrâneas em todo o mundo (La Rosa et al 2012). A principal fonte de vírus entéricos em águas superficiais é a matéria fecal, que pode ser proveniente dos seres humanos, dos animais da pecuária e dos animais selvagens. Esses vírus podem atingir os cursos d'água através do escoamento superficial ou ainda pelo despejo de esgoto tratado e não tratado (Pang et al. 2019; Fratini, Di Bonito e La Rosa 2014).

As águas subterrâneas podem ser contaminadas a partir do vazamento em redes de esgoto danificadas e da infiltração do efluente de sistemas sépticos que é lançado no solo. Ao atingir a água subterrânea, os vírus entéricos podem ser inativados, podem retornar à superfície juntamente com a água retirada de poços ou ainda ser transportados lateralmente no lençol freático até cursos de águas superficiais (Corsi et al. 2014). Esses vírus apresentam um maior potencial de transporte no meio subterrâneo quando comparado a outros patógenos de veiculação hídrica, como bactérias e protozoários, pois conseguem passar mais rapidamente através do meio poroso do sedimento. A adsorção

dos vírus aos grânulos constitui um mecanismo de retenção, mas as forças envolvidas nessa interação dependem das características químicas da água e do sedimento (Borchard et al. 2007).

Os vírus entéricos podem contaminar inclusive aquíferos confinados, os quais são geralmente considerados mais protegidos dos poluentes originados da superfície. Possíveis explicações para o transporte desses vírus até essas fontes de água profundas incluem problemas de ordem técnica dos poços e o fluxo dos vírus através dos poros do aquitarde, do meio poroso de suas bordas ou brechas e, ainda, de suas fraturas (Bradbury et al 2013).

1.4.3 Potencial de emergência de vírus entéricos zoonóticos no meio rural

Embora os vírus entéricos que infectam humanos sejam, em sua maioria, específicos, a transmissão zoonótica também é possível (Hamza e Bibby 2019). A constatação da capacidade de transmissão direta de vírus entéricos de animais à humanos, bem como de reagrupamento de seguimentos genéticos (*reassortment*) desses vírus em infecções mistas, tem colocado em evidência o potencial dessa via de transmissão (Verma et al 2018).

A zona rural é um ambiente favorável à emergência de vírus zoonóticos devido à proximidade entre humanos e animais. O risco é aumentado quando há pecuária de criação mista e quando esta não é realizada sob confinamento, o que permite maior interação dos animais da criação entre si e destes com os selvagens (Huang et al. 2016). O acesso dos animais da pecuária a fontes de águas superficiais que também são destinadas ao uso humano possibilita a veiculação hídrica de patógenos zoonóticos, incluído os vírus entéricos (Phan et al 2016).

Grande parte das zoonoses são originárias de animais domésticos e da pecuária, contudo, devido a alterações no meio ambiente e mudanças comportamentais e habitacionais da humanidade, há uma maior tendência de as zoonoses emergirem a partir da vida selvagem. A ampliação das áreas destinadas à pecuária e à agricultura favorece o contato entre espécies domésticas e selvagens, o que facilita a transferência de patógenos entre elas (Wang e Grameri 2014).

Algumas cepas do vírus da hepatite E são capazes de infectar humanos e outros animais. Os genótipos 3 e 4, por exemplo, infectam tanto humanos como suínos, mas a transmissão deles entre pessoas tem pouca evidência (Tedder et al. 2017; Hanza e Bibby

2019). Essas cepas estão presentes nos músculos desses animais infectados e a transmissão tem sido associada ao consumo de sua carne malcozida. Além disso, a transmissão desses vírus também está associada à água contaminada pelos dejetos desses animais, quando ingerida diretamente ou quando usada na irrigação de alimentos cultivados (Van der Poel 2014; Bosch, Pintó e Guix 2016; Park et al. 2016).

Outros vírus entéricos com potencial de transmissão zoonótica são os rotavírus (Phan et al. 2016; Rojas et al 2019), os norovírus (Summa, Henttonen e Maunula 2018) e os astrovírus (Jahpet et al. 2019). Para os seres humanos, o risco de zoonoses virais inclui não apenas a rota de transmissão alimentar e hídrica, mas também a exposição cutânea a fluidos corporais e excretas, em especial para trabalhadores que lidam diretamente com animais, como abatedores e veterinários (Iturriza-Gomara e O'Brien 2016).

A emergência de zoonoses é dependente das interações entre o patógeno e o seu hospedeiro e deste com outras espécies (Wang e Grameri 2014). A interação dos vírus com seus hospedeiros está relacionada a presença de receptores de superfície, resposta imune inata, anticorpos com reação cruzada à vírus relacionados e fatores epidemiológicos que afetam o contato com o vírus. Infecções virais normalmente são assintomáticas em hospedeiros reservatórios e patogênicas em uma nova espécie. Quando um vírus ultrapassa a barreira entre duas espécies, ele provavelmente apresenta pouca adaptação e se replica com baixa intensidade. Contudo, devido a sua alta mutabilidade, apresenta potencial adaptativo para aumentar sua carga viral, sua patogenicidade e sua transmissibilidade entre as espécies envolvidas (Delwar 2012).

1.4.4 Adenovírus

Os adenovírus humanos (HAdV) pertencem à família *Adenoviridae* e ao gênero *Mastadenovirus*, dentro do qual são agrupados em sete espécies ou subgrupos, que são identificadas por letras, de A à G. No interior de cada uma dessas espécies, os HAdV são ainda classificados em sorotipos ou tipos com base na ausência de neutralização cruzada, totalizando mais de 70 tipos. As espécies de adenovírus apresentam variação quanto ao receptor celular usado, tropismo tecidual, sintomatologia e tendência ao estado de latência (Hoeben e Uil 2013; Arnold e MacMahon 2017).

Os adenovírus podem ser transmitidos pelo contato pessoal direto ou próximo, envolvendo a rota fecal-oral e aérea, ou pela exposição ambiental devido ao contato com água ou superfícies contaminadas (Ponterio e Gnessi 2015; Mennechet et al. 2019). Essas

rotas de transmissão decorrem da possibilidade de liberação dos vírus nas secreções respiratórias, lágrimas e fezes de indivíduos infectados (Matthes-Martin, Boztug e Lion 2013).

A partícula viral dos HAdV é não-envelopada, de simetria icosaédrica, com 20 faces triangulares e 12 vértices, e diâmetro que varia de 70 a 100 nanômetros. O capsídeo viral é composto por três proteínas maiores e várias outras menores. As maiores são os hexons, as bases dos pentons e as fibras. No total há 252 capsômeros, dos quais 240 são hexons e 12 são pentons. Internamente ao capsídeo há uma core formado por quatro proteínas que interagem com o DNA. No interior do vírion maduro encontra-se o genoma e cópias da protease adenoviral (Robinson et al. 2011; Lion 2014).

Os hexons são as maiores proteínas, apresentam composição trimérica e formam as faces em agrupamentos de 12 unidades. Os pentons são compostos por uma base pentamérica (cinco bases dos pentons), que forma cada vértice do icosaedro, e uma fibra proteica trimérica, que é ancorada no capsídeo por esta base e se projeta a partir de cada vértice. A porção terminal dessa fibra é responsável pela ligação inicial da partícula viral ao receptor da célula hospedeira, a qual precede a endocitose do vírus. (Lion 2014; Reddy e Nemerow 2014; Gall, Shisler e Maiñas 2015).

O genoma dos diferentes tipos de HAdV compartilha muita semelhança. Ele é formado por um DNA linear de dupla fita com cerca de 36000 pares de bases que apresenta uma proteína terminal (TP) ligada à ambas as extremidades 5'. As duas extremidades ainda apresentam repetições terminais invertidas (RTI) de cerca de 100 pares de bases, onde se localizam origens de replicação idênticas (Giberson, Davidson e Parks 2012; Hoeben e Uil 2013;).

O genoma dos HAdV pode ser dividido de acordo com o padrão temporal de transcrição durante o ciclo de replicação. Assim, apresentam as regiões precoces, intermediárias e tardias. As regiões precoces são compostas de quatro unidades transcricionais, nomeadas E1 à E4, com função relacionada ao estabelecimento da infecção viral. As proteínas codificadas por E1a, E1b, E3 e E4 estão relacionadas à transativação de outras regiões do DNA viral e a mudanças no ambiente da célula hospedeira e na resposta imune (Robinson et al. 2011).

As proteínas codificadas por E2 tem função direta na replicação do genoma. As regiões tardias, compostas de cinco unidades transcricionais, nomeadas L1 à L5, codificam principalmente proteínas estruturais e estão relacionadas à formação de vírions maduros. Essas unidades apresentam um promotor comum, que gera um único transcrito

primário, o qual sofre *splicing* alternativo para gerar os respectivos transcritos. O genoma também transcreve VA-RNA I e II, que bloqueiam diretamente a ativação da resposta ao interferon (Giberson, Davidson e Parks 2012).

Diferentes síndromes estão associadas as infecções por HAdV, dentre as quais se destacam gastroenterites, doenças respiratórias, conjuntivites, cistite hemorrágica e exantema (Sanaei Dashti et al. 2016). As infecções por esse vírus geralmente são assintomáticas ou produzem doenças de baixa gravidade e autolimitadas em hospedeiros saudáveis. Contudo, em pessoas imunossuprimidas, a infecção pode progredir para quadros mais graves devido à infecção disseminada (Radke e Cook 2018).

Em geral, infecções da conjuntiva estão associadas às espécies B, D e E, das vias aéreas superiores e inferiores às espécies B, C e E e do trato gastrintestinal às espécies F e G (Radke e Cook 2018). Dentre os sorotipos entéricos, os HAdV 40 e 41 são os mais associados a gastroenterites (Sanaei Dashti et al. 2016). Esses sorotipos são facilmente transmitidos pela rota fecal-oral e constituem uma importante causa de gastroenterites em crianças (Rodríguez-Lázaro 2012).

1.4.5 Enterovírus

Os enterovírus (EV) humanos somam mais de 100 sorotipos, os quais são classificados na ordem *Picornavirales*, na família *Picornaviridae* e no gênero *Enterovirus* (Tian et al. 2017). Dentro deste gênero, esses vírus são reunidos em quatro espécies de EV, os EV de A à D, e três espécies de rinovírus, os rinovírus A, B e C (Joffret et al. 2018). Além desses vírus que infectam humanos, esse gênero ainda contém cinco espécies que infectam outros animais, os EV de E à J. A transmissão, que depende do tipo viral envolvido, pode ocorrer pela rota fecal-oral ou pela via respiratória. Alguns exemplos desse vírus são: Coxsakievírus A e B, Echovírus, Poliovírus e Rinovírus (van der Linden, Wolthers e van Kuppeveld 2015).

Os vírus da família *Picornaviridae* são não-envelopados e pequenos, os quais apresentam suas partículas virais com diâmetro variando entre 27 e 30 nm. O capsídeo apresenta simetria icosaédrica e é composto por quatro peptídeos, VP1 à VP4, cada um em número de 60 cópias. Ele encerra um genoma de RNA de fita simples, não-segmentado e de sentido positivo, com aproximadamente 7500 nucleotídeos (Jiang et al 2014).

O genoma dos EV apresenta um grande quadro de leitura aberta que contém em suas extremidades 3' e 5' regiões não traduzíveis. Esse quadro codifica uma poliproteína que, após clivagem, origina as proteínas P1, P2 e P3, que são precursoras das proteínas estruturais e não estruturais do vírus. As proteínas do capsídeo (VP1 à VP4) são produzidas a partir de P1, enquanto as proteínas relacionadas ao ciclo replicativo do vírus são geradas a partir de P2 e P3 (Joffret et al. 2018).

O ciclo replicativo dos EV ocorre primariamente no trato gastrintestinal ou no respiratório. A partir desses locais, os vírus podem se espalhar por via sanguínea a outros tecidos pelos quais apresentam tropismo, onde a infecção tem potencial de causar a morte (Linden, Wolthers e van Kuppeveld 2015). Devido à grande diversidade genética dos EV é esperado que eles tenham uma grande diversidade fenotípica. Assim, a sua infecção produz quadros clínicos variáveis, mesmo quando causada por sorotipos da mesma espécie. As doenças causadas pelos EV incluem: gastroenterite, doenças do trato respiratório superior e inferior, encefalite, paralisia, meningite, conjuntivite, miopericardite, pancreatite e hepatite (Tapparel et al. 2013).

1.5 COLIFORMES E VÍRUS ENTÉRICOS COMO INDICADORES DE CONTAMINAÇÃO FECAL

A qualidade microbiológica da água de consumo humano é avaliada em muitos países por meio de indicadores bacteriológicos (Gamazo et al. 2018). Eles são usados para indicar contaminação fecal e incluem os coliformes totais e a espécie *Escherichia coli* (EC) (Kaliakatsos et al. 2019). No Brasil, a legislação estabelece que a água com essa finalidade não deve conter coliformes totais e *E. coli* quando analisada amostras de 100 mL. A análise de vírus entéricos é apenas uma recomendação para águas superficiais, nos pontos onde há captação para abastecimento (Brasil 2017).

Os coliformes totais são bacilos gram-negativos, não formadores de esporos, aeróbios ou anaeróbios facultativos, capazes de se multiplicar sob altas concentrações de sais biliares e de fermentar a lactose com produção de gás ou aldeído à temperatura entre 35 e 37°C em período de 24 horas. Os coliformes termotolerantes são as bactérias desse grupo que conseguem fermentar a lactose em temperaturas mais elevadas, entre 44 e 45°C, e tem como um de seus representantes a espécie *E. coli* (WHO 2011).

Os coliformes totais incluem bactérias que podem sobreviver e crescer em água. Embora isso comprometa o seu uso como indicador de contaminação fecal, eles podem

ser usados para avaliar a limpeza e integridade do sistema de distribuição e também a possibilidade de formação de biofilmes. A bactéria *E. coli* está presente em elevada concentração nas fezes de humanos e animais. Sua baixa capacidade de sobrevivência e crescimento em condições ambientais torna a sua presença rara em ambientes livres de contaminação fecal. Já as outras espécies de coliformes termotolerantes podem ter origem ambiental (WHO 2011).

O uso dos coliformes termotolerantes e *E. coli* como indicadores de contaminação fecal é baseado na sua excreção generalizada nas fezes de animais homeotérmicos e na inviabilidade da pesquisa de todos os patógenos individualmente (Pachepsky et al. 2016). Além disso, a metodologia de detecção desses microrganismos é simples, rápida e barata em relação a detecção direta de patógenos de veiculação hídrica (Ferguson et al 2012; Kaliakatsos et al. 2019). Contudo, esses microrganismos indicadores apresentam algumas deficiências. A detecção deles na água fornece apenas uma suspeita da presença de patógenos e o seu uso pode produzir resultados falso-positivos, quando o indicador está presente e o patógeno ausente, e falso-negativos, quando o indicador está ausente e o patógeno presente (Pachepsky et al. 2016). Além disso, ainda que de forma restrita, *E. coli* pode se reproduzir fora do intestino animal quando há condições de temperatura adequadas e não há competidores mais adaptados (García-Aljaro et al. 2018).

Os vírus entéricos apresentam algumas características que os tornam atrativos como indicadores complementares aos tradicionais indicadores bacterianos. Esses vírus apresentam grande estabilidade ambiental, a qual é conferida pela ausência do envelope lipídico que torna muitos vírus sujeitos a ação de agentes ambientais. Eles ainda são mais resistentes à inativação por processos de tratamento da água e por luz solar quando comparados às bactérias indicadoras. Além disso, os vírus entéricos, ao contrário desses indicadores, geralmente apresentam especificidade de hospedeiro, o que permite utilizá-los como ferramenta de rastreamento da fonte de microbiana. Utilizando-se disso, é possível determinar se a fonte de contaminação é humana ou animal (Bofill-Mas et al. 2013; Barrios et al. 2018). Essa informação é importante pois permite que medidas mais efetivas de eliminação da fonte poluidora sejam tomadas (Mattioli et al. 2016).

2 JUSTIFICATIVA

A disponibilidade de água em boa qualidade e quantidade é fundamental à saúde e ao bem-estar dos seres humanos (Mena-Rivera e Quiróz-Vega 2018; Hove et al. 2019). O consumo de água contaminada é responsável por uma grande carga de doenças em países de média e baixa renda e está intimamente relacionada à deficiência em saneamento (Uejio et al. 2016; Ravindra, Mor e Pinnaka 2019). Em áreas rurais brasileiras ainda há uma alta proporção de pessoas sem acesso aos serviços de saneamento básico (Ribeiro, Abreu e Laporta 2018).

Nesse contexto, os habitantes de áreas rurais são obrigados a buscarem fontes alternativas de obtenção de água e soluções locais de disposição de excretas. Essas iniciativas muitas vezes são realizadas sem o conhecimento técnico necessário e sem o acompanhamento de instituições ligadas à promoção de saúde (Suhogusoff, Hirata e Ferrari 2013). No meio rural, a criação de animais gera elevada quantidade de excretas, as quais frequentemente não tem um destino adequado (Mena-Rivera e Quiróz-Vega 2018). Além disso, é frequente o consumo de água sem qualquer tratamento prévio nesses locais (Leite et al. 2018). Devido a essas condições, a população rural está em situação de vulnerabilidade a patógenos de veiculação hídrica devido à contaminação fecal de suas fontes de água.

O monitoramento da água de consumo para contaminantes fecais constitui uma importante medida de prevenção a doenças que afetam a saúde pública (Humphrey Jr, Sanderford e Iverson 2018). Adenovírus e enterovírus são importantes patógenos de veiculação hídrica que podem ser usados como indicadores desse tipo de contaminante. Eles têm sido detectados em águas residuais domésticas e diversos tipos de fontes de água para consumo em todo mundo e fazem parte da Lista 4 de Contaminantes Candidatos da Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos, que reúne contaminantes que não estão regulamentados como parâmetro de análise, mas que apresentam grande prevalência em águas fecalmente contaminadas (La Rosa et al. 2012).

Os tradicionais indicadores bacterianos de contaminação fecal, tal como *E. coli*, nem sempre estão correlacionados à presença de vírus entéricos e estes apresentam características que os tornam atrativos como indicadores complementares: permanecem viáveis por longos períodos, são mais facilmente transportados no solo e permitem o rastreamento da fonte de contaminação fecal (Bofill-Mas et al. 2013). Além disso, há

poucas informações sobre a prevalência desses vírus em fontes de água no Estado de Goiás, em especial no meio rural.

O presente trabalho pode contribuir com informações sobre a prevalência de adenovírus e enterovírus na água de consumo humano de propriedades rurais do Estado de Goiás, bem como sobre suas condições de saneamento. As informações obtidas poderão orientar ações que melhorem essas condições e, conseqüentemente, a saúde e a qualidade de vida das pessoas que habitam nesses locais.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

- Analisar a contaminação fecal de diferentes fontes de água individuais para o consumo humano em comunidades rurais do Estado de Goiás utilizando microrganismos indicadores.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Pesquisar e quantificar EC nas amostras de água.
- Pesquisar e quantificar HAdV e EV nas amostras de água.
- Avaliar a associação e a correlação entre EC e HAdV nas amostras de água.
- Comparar a contaminação bacteriana e viral entre os diferentes tipos de fontes de água.

4 METODOLOGIA

4.1 LOCAL DO ESTUDO

Os locais de estudo foram comunidades rurais localizadas em diversos municípios do Estado de Goiás (Figura 1). Essas comunidades, que incluem quilombolas e assentamentos, e seus respectivos municípios foram: São Sebastião da Garganta (Silvânia), Lageado (São Miguel do Araguaia), Magalhães (Nova Roma), José de Coletto (Colinas do Sul), Pelotas (Monte Alegre de Goiás), Cedro (Mineiros), São Domingos (Cavalcante), Canabrava (Flores de Goiás), Extrema (Iaciara), Sumidouro (Padre Bernardo), Mesquita (Cidade Ocidental), Forte (São João da Aliança), Castelo/Retiro/Três Rios (Simolândia), Queixo Dantas (Mimoso de Goiás) e Rafael Machado (Niquelândia).

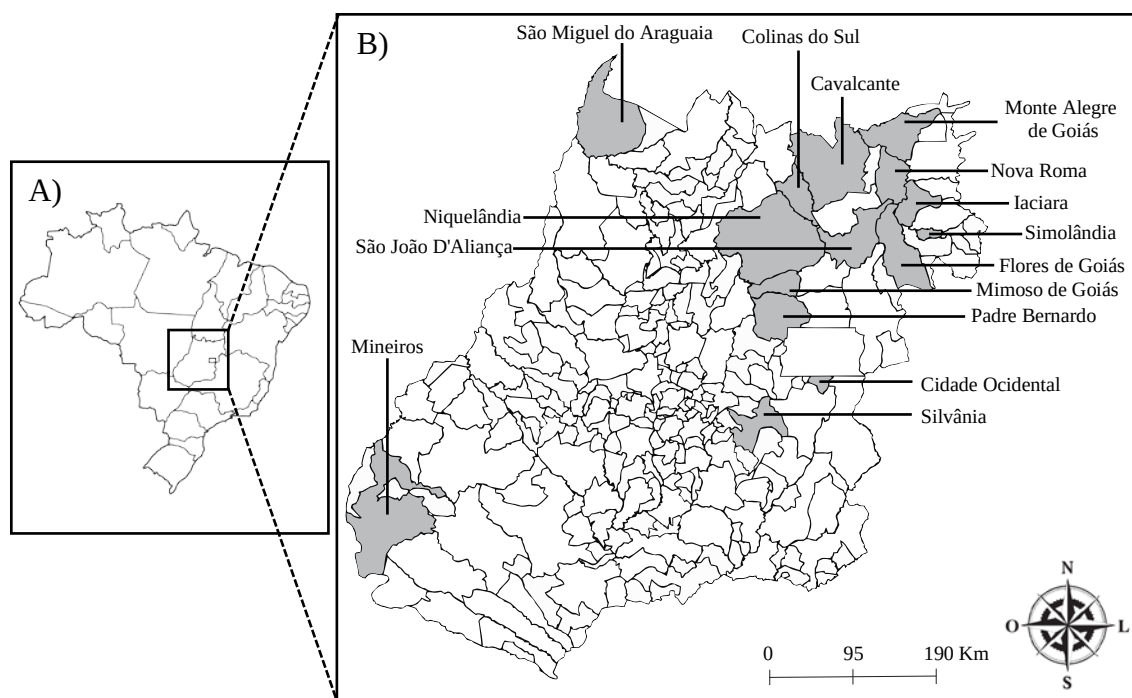


Figura 1 - A) Localização do Estado de Goiás no território brasileiro. B) Localização dos municípios em que residem as comunidades rurais participantes deste estudo.

4.2 COLETA E TRANSPORTE DAS AMOSTRAS

As coletas foram realizadas entre os meses de abril e outubro do ano de 2019. O volume de água usado na análise de *E. coli* foi de 100 mL e, na análise viral, de 500 mL. Em ambos os casos, as coletas foram realizadas em frascos esterilizados de volume

compatível. As coletas de amostras para análise de *E. coli* foram realizadas em frascos do kit *Colilert*[®]. Para análise viral, frascos de polipropileno de 500 mL foram lavados com água e detergente, enxaguados adicionalmente com água destilada e autoclavados a 121 °C e 1 atm por 15 min.

A amostragem foi realizada em 86 propriedades, cujas fontes de água eram poços tubulares, poços escavados, nascentes, mananciais superficiais e água da chuva armazenada em cisternas. Em cada propriedade, uma amostra para cada tipo de análise (viral e bacteriológica) foi coletada da água de abastecimento das residências, preferencialmente antes do reservatório domiciliar. Após a coleta, as amostras foram mantidas em caixa térmica contendo gelo e transportadas ao Laboratório de Análise de Águas (LAnA) da Escola de Engenharia Civil e Ambiental, onde foram realizadas as análises de coliformes, e ao Laboratório de Biotecnologia de Microrganismos (LBMic), onde foram realizadas as análises virais, ambos na Universidade Federal de Goiás, em Goiânia. No laboratório, as amostras foram mantidas sob refrigeração à 4°C até as análises.

4.3 DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE *Escherichia coli*

A análise de *E. coli* foi realizada pelo Método do Substrato Definido utilizando-se o kit *Colilert*[®] (IDEXX) associado ao *Sistema Quanti-Tray/2000*[®] (IDEXX) de acordo com as instruções do fabricante. Para se ampliar o limite máximo de quantificação do kit, esse método foi aplicado tanto em amostras não diluídas quanto em amostras sob diluição 10⁻¹ em água ultrapura.

Cada sachê do kit contém dois substratos, o orto-nitrofenil-β-D-galactopiranosídeo (ONPG) e o 4-metilumbeliferil-β-D-glucoronídeo (MUG), os quais são metabolizados de forma específica, respectivamente, por bactérias do grupo dos coliformes totais e por *E. coli*, gerando uma alteração de cor que permite identificar esses indicadores. Os substratos foram adicionados em 100 mL de amostra (não diluída e sob diluição 10⁻¹) e, após homogeneização, esse volume foi transferido para a cartela contendo 97 poços do kit, a qual foi então selada e mantida em estufa à 35°C por 24 horas. Depois desse período, a detecção de *E. coli* foi realizada pela observação de poços onde a amostra assumia cor amarela ao olho nu e emitia fluorescência de cor azul sob luz ultravioleta (UV) a 365 nm. De acordo com o número de poços que apresentaram tais características, a quantificação desse indicador foi obtida consultando a tabela de número

mais provável (NMP) fornecida pelo fabricante. Os resultados foram expressos em NMP/100 mL.

4.4 CONCENTRAÇÃO DAS AMOSTRAS PARA ANÁLISE VIRAL

Para concentração das amostras de água foi usada a metodologia de adsorção-eluição descrita por Katayama et al. (2002) com modificações, de forma semelhantes ao realizado por Vecchia et al. (2012). Inicialmente, foi misturado 0,6 g de $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ à amostra de água e, em seguida, o seu pH foi ajustado a $5 \pm 0,5$ usando solução de HCl 10% e de NaOH 1 M. Na sequência, a amostra foi filtrada à vácuo através de uma membrana de 47mm de diâmetro e poro de 0,22 μm composta de ésteres mistos de celulose (Millipore GSWP04700), que confere à membrana carga elétrica negativa. Logo após, foi passado 87,5 mL de solução de H_2SO_4 0,5 mM (pH 3) pela membrana, utilizando-se o mesmo sistema de filtração, para liberação dos cátions adsorvidos.

Em seguida, a membrana foi transferida para um tubo de centrifugação estéril de 5 mL (tipo Eppendorf) contendo 2,5 mL de NaOH 1 mM (pH 10,5), o qual foi submetido à agitador vortex por 5 minutos para eluição das partículas virais potencialmente adsorvidas na membrana. Ao final, a membrana foi retirada do tubo e a mistura restante foi neutralizada com 12,5 μL de H_2SO_4 50 mM e 12,5 μL de tampão Tris-EDTA (TE) 100x concentrado. As amostras concentradas foram congeladas a -20°C até a etapa de extração dos ácidos nucleicos. Não foram realizados testes para se avaliar a taxa de recuperação deste método.

Na filtração foram usados sistemas de filtração reutilizáveis para membrana de 47 mm confeccionados em polissulfona (Millipore/Nalgene) conectados a bombas de vácuo, ajustadas em 550 mmHg. A reutilização do sistema era sempre antecedida por esterilização. Assim, após lavagem com água e detergente, o sistema era enxaguado, sucessivamente, com hipoclorito de sódio 2,5%, água destilada e álcool 70%. Logo após, o sistema era deixado por 15 min em cabine de segurança biológica sob luz UV para secagem e esterilização.

4.5 CONTROLES VIRAIS

Os controles-padrão de HAdV e de EV foram gentilmente cedidos pelo professor Dr. Fernando Rosado Spilki da Universidade FEEVALE, Novo Hamburgo, Rio Grande

do Sul. Tais controles consistiam, respectivamente, em DNA de HAdV sorotipo 5 e em RNA de poliovírus 1.

4.6 EXTRAÇÃO DOS ÁCIDOS NUCLEICOS VIRAIS

Os ácidos nucleicos virais foram extraídos com o uso do kit de extração *Quick-DNA/RNATM Viral Kit* (ZYMO RESEARCH) seguindo as instruções do fabricante. Inicialmente, a amostra concentrada foi descongelada e homogeneizada em agitador vortex. A um tubo de centrifugação, foram adicionados 400 µL da amostra, a qual foi misturada sequencialmente a 400 µL de *DNA/RNA ShieldTM* e a 800 µL *Viral DNA/RNA BufferTM*. A mistura resultante foi incubada a temperatura ambiente por 15 minutos. Logo depois, ela foi transferida à coluna do kit (*Zymo-SpinTM IIC-XL Column*) acoplada no interior de um tubo de coleta e centrifugada a 14000 g por 2 minutos. Esse processo foi realizado em duas etapas, cada uma usando um volume de 800 µL da mistura, recarregando-se a coluna.

Em seguida, a coluna foi lavada duas vezes pela adição de 500 µL de Viral Wash Buffer e centrifugação a 14000 g por 30 segundos. Uma lavagem final foi realizada pela adição de 500 µL de álcool etílico absoluto e centrifugação a 14000 g por 1 minuto. Por fim, a coluna foi acoplada no interior de um tubo de centrifugação e os ácidos nucleicos a ela adsorvidos foram eluídos pela adição de 50 µL de água livre de DNase/RNase e centrifugação a 12000 g por 30 segundos. O eluato contendo DNA e RNA extraídos foi armazenado a - 80°C até a etapa seguinte da análise. A concentração de DNA e RNA nas amostras após extração foi quantificada usando espectrofotômetro NanoVueTM Plus (GE Healthcare Life Sciences).

4.7 SÍNTESE DE cDNA

No caso da análise de EV, que apresenta genoma de RNA, um passo adicional de síntese da primeira cadeia de DNA complementar (cDNA) foi realizado após a extração dos ácidos nucleicos. Para isso foi usado o kit *Platus Transcriber RNase H- cDNA First Strand* (Sinapse Inc.) seguindo as instruções do fabricante. Para maximizar a detecção, cDNA foi sintetizado a partir das amostras extraídas não diluídas e sob diluição 10⁻¹.

Em microtubos de PCR de 200 µL, foram adicionados 6 µL de água livre de nucleases, 1 µL de iniciadores hexaméricos randômicos e 5 µL de amostra extraída. Essa

mistura foi incubada a 65 °C. Em seguida, foram adicionados 4 µL do tampão de reação 5X, 1 µL de inibidores de RNase (20 U/µL), 2 µL de dNTPs 10 mM e 1 µL H Minus Transcriptase Reversa (200U/µL). A mistura final, com volume de 20 µL, foi incubada de acordo com a sequência: 25 °C por 5 minutos, 45 °C por 60 minutos e 70 °C por 5 min. Todas as etapas de incubação foram realizadas em termociclador PTC-100 (MJ Research Inc.). Como controle positivo dessa reação, foi utilizada uma diluição 10⁻¹ do controle-padrão de EV. O produto da síntese foi congelado a -80 °C até a realização da reação em cadeia da polimerase em tempo real quantitativa (qPCR).

4.8 DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DOS INDICADORES VIRAIS

A detecção e quantificação de HAdV e EV foram realizadas por meio da reação em cadeia da polimerase em tempo real quantitativa (qPCR) usando o intercalante de DNA de fita dupla EvaGreen® como fluoróforo. As reações foram realizadas em placas de qPCR de 96 poços utilizando-se o equipamento iQ5™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad Laboratories Inc) com o *software* iQ5™ Optical System na versão 2.1. As condições das reações foram previamente otimizadas e padronizadas utilizando-se os controles virais. Em cada rodada de reações foram utilizados controle sem molde (NTC - *no template control*), curva-padrão em duplicata para a quantificação absoluta das partículas virais e, no caso da qPCR para EV, o controle positivo da transcrição reversa. Após as reações, um ciclo de desnaturação entre 65 e 95 °C, com acréscimos de 0,5 °C a cada 30 s, foi realizado para se obter a curva de dissociação e se verificar a especificidade do produto em caso de amplificação. Os resultados da qPCR foram dados em cópias genômicas por litro (CG/L). Os iniciadores usados estão descritos na Tabela 1.

Tabela 1 - Iniciadores usados na qPCR de fragmentos genômicos de HAdV e EV.

Vírus	Gene alvo	Iniciadores				Ta* usada nesta pesquisa	Amplicon
		Nome	Sequência	Polaridade	Posição		
HAdV	Hexon	VTB2-HAdVCf	5'-GAGACGTACTTCAGCCTGAAT-3'	Senso	106-126 ^a	62°C	101 pb
		VTB2-HAdVCr	5'-GATGAACCGCAGCGTCAA-3'	Reverso	190-207 ^a		
EV	5'UTR	ENT-F1	5'-CCTCCGGCCCCCTGAATG-3'	Senso	443-459 ^b	64°C	116 pb
		ENT-R2	5'-ACACGGACACCCAAAGTAG-3'	Reverso	541-559 ^c		

^aSequência de primers descrita por Wolf et al. (2010).

^bSequência de primer descrita por Tsai et al. (1993).

^cSequência de primers descrita por Vecchia et al. (2012).

*Ta: temperatura de anelamento.

4.8.1 Curva padrão da qPCR

Para a quantificação absoluta das partículas virais nas amostras, curvas-padrão de cinco pontos em duplicata foram obtidas em cada rodada de qPCR. Elas foram geradas a partir da amplificação do controle-padrão de HAdV e do cDNA sintetizado a partir do controle-padrão de EV em diluições seriadas de fator 10.

O número de cópias genômicas virais do controle-padrão de HAdV foi obtido a partir de sua massa de DNA e, do controle-padrão de EV, a partir de sua massa de RNA, ambas quantificadas em 1 µL de cada controle por meio do espectrofotômetro NanoVue™ Plus (GE Healthcare Life Sciences). Posteriormente, essas massas foram convertidas em número de moléculas de DNA genômico para HAdV (N_{HAdV}) e de RNA genômico para EV (N_{EV}). Para esses cálculos, foi assumido que o genoma do HAdV sorotipo 5 contém 35938 pares de bases e que o genoma do poliovírus 1 contém 7441 bases. Para o controle de EV, também foi considerado que todo o RNA genômico foi convertido em cDNA. A conversão das massas de DNA e RNA genômicos em número de moléculas de DNA e RNA genômicos foram realizadas utilizando-se as equações seguintes:

$$N_{HAdV} = [\text{massa DNA}_{fd} / (\text{tamanho DNA}_{fd} \times 617,96) + 36,04] \times 6,022 \times 10^{23}$$

$$N_{EV} = [\text{massa RNA}_{fs} / (\text{tamanho RNA}_{fs} \times 321,47) + 18,02] \times 6,022 \times 10^{23}$$

As curvas-padrão foram validadas em observação aos parâmetros de coeficiente de correlação ($\geq 0,98$), eficiência da reação (entre 90 e 110%) e *slope* (entre -3,49 e -3,24).

4.8.2 qPCR para HAdV

O volume de reação de 20 µL foi composto por 4 µL do kit 5x *HOT FIREPol*® *EvaGreen*® *qPCR Supermix* (Solis BioDyne), 0,4 µL de cada iniciador (10 pmol/µL), 10,2 µL de água ultrapura livre de DNase/RNase (LGC Biotecnologia) e 5 µL de amostra extraída sob diluição de 10^{-1} . Essa diluição visou diminuir a influência de inibidores da reação potencialmente presentes em amostras ambientais. A qPCR foi composta por 1 ciclo a 95 °C por 12 min para ativação da polimerase, 45 ciclos compostos por um passo de desnaturação a 95 °C por 15 s, um passo de anelamento a 62 °C por 30 s

e um passo de extensão a 72 °C por 30 s. Para geração da curva-padrão foram usadas diluições seriadas de fator 10 do controle-padrão de adenovírus em duplicata, da diluição 10^{-1} até a 10^{-5} , partindo-se de $2,12 \times 10^8$ cópias genômicas por reação.

4.8.3 qPCR para EV

A qPCR para EV foi realizada de duas maneiras: uma a partir do cDNA sintetizado a partir das amostras não diluídas e outra a partir do cDNA sintetizado a partir das amostras com diluição 10^{-1} . Na primeira, 5 µL de cDNA sob diluição 10^{-1} foi usado na qPCR enquanto que, na segunda, 2 µL de cDNA não diluído foi usado. Em ambos os casos, o volume de reação foi de 20 µL, sendo composto por 4 µL do kit 5x *HOT FIREPol® EvaGreen® qPCR Supermix* (Solis BioDyne), 0,4 µL de cada iniciador (10 pmol/µL) e água ultrapura livre de DNase/RNase (LGC Biotecnologia) para completar o volume. A qPCR foi composta por 1 ciclo a 95 °C por 12 min para ativação da polimerase, 45 ciclos compostos por um passo de desnaturação a 95 °C por 15 s, um passo de anelamento a 64 °C por 30 s e um passo de extensão a 72 °C por 30 s. Para geração da curva-padrão foram usadas diluições seriadas de fator 10 do controle-padrão de EV em duplicata, da diluição 10^{-1} até a 10^{-5} , partindo-se de $4,38 \times 10^8$ cópias genômicas por reação quando se usou 5 µL do controle e $1,75 \times 10^8$ quando se usou 2 µL.

4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A associação entre o indicador bacteriano EC e o indicador viral HAdV, bem como deste e o tipo de fonte (subterrânea ou superficial) foi avaliada através do teste qui-quadrado com correção de continuidade. A associação entre esses indicadores e os subtipos de fontes subterrâneas (poço perfurado, poço escavado ou nascente) foi avaliada através do teste do qui-quadrado de Pearson. A correlação entre as concentrações desses indicadores foi avaliada através do teste de correlação de Spearman. Valores de $p \leq 0,05$ foram considerados significantes. Em todos os casos, as análises foram realizadas usando o programa estatístico *IBM SPSS* versão 20.

5 RESULTADOS

No total, 86 amostras de água provenientes de fontes individuais foram obtidas em propriedades rurais e analisadas quanto a contaminação fecal por meio do indicador bacteriano EC e dois indicadores virais, HAdV e EV. A tabela 2 fornece a distribuição das amostras de acordo com o tipo e o subtipo de fonte de água.

Tipo de fonte	Subtipo da fonte	Quantidade	
Subterrânea	Poço tubular	10	60
	Poço escavado	31	
	Nascente	19	
Superficial	Rios, ribeirão e córregos		18
Chuva	Cisterna		8
Total		86	

Tabela 2 - Distribuição das amostras analisadas em relação ao tipo de fonte. Fonte subterrânea foi subdividida em três subtipos.

Indicativo de contaminação fecal foi encontrado em 90,7% (78/86) das amostras, as quais apresentaram pelo menos um dos indicadores utilizados. O indicador mais frequentemente encontrado foi EC, detectado em 74,4% (64/86) das amostras, seguido por HAdV (49/86), detectado em 57% das amostras, e por EV, detectado em 9,3% (8/86) das amostras (Figura 2A).

Considerando as amostras positivas, a média geométrica da concentração de EC foi $8,34 \times 10^1$ NMP/100mL, a sua concentração mínima foi 2 e a sua concentração máxima foi $1,55 \times 10^4$ NMP/100mL, a qual foi encontrada em amostra de água cuja fonte era um manancial superficial. Para HAdV, a média geométrica de sua concentração foi $8,6 \times 10^5$ CG/L, a sua concentração mínima foi $3,28 \times 10^4$ e a sua concentração máxima foi $1,0 \times 10^8$ CG/L, a qual foi encontrada em amostra de água cuja fonte era uma cisterna de água da chuva. Já para EV, a média geométrica da sua concentração foi $9,75 \times 10^5$ CG/L, a sua concentração mínima foi $1,11 \times 10^5$ e a sua concentração máxima foi $1,73 \times 10^7$ CG/L, a qual foi detectada em amostra de água cuja fonte era uma nascente (Figura 2B).

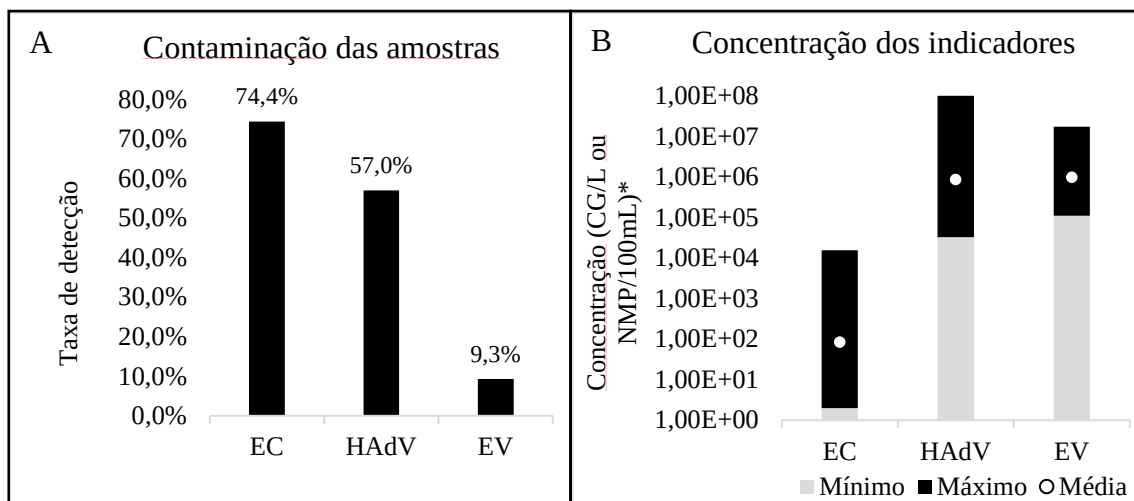


Figura 2 - A) Indicativo de contaminação fecal das amostras de água de acordo com os indicadores. B) Concentrações máximas e mínimas dos indicadores e suas médias geométricas (considerando as amostras positivas). *As concentrações virais foram expressas em cópias genômicas por litro (CG/L) e, a concentração de EC, em número mais provável por 100 mililitros (NMP/100mL).

Tanto em amostras de fontes subterrâneas como de fontes superficiais, EC foi o marcador mais prevalente, alcançando taxas de detecção de 73% (44/60) e de 100% (18/18) respectivamente. Em amostras de cisternas, EC foi o menos prevalente, com taxa de detecção de 25% (2/8). HAdV foi o segundo mais prevalente em amostras de fontes subterrâneas e de fontes superficiais, onde as taxas de detecção foram de 60% (36/60) e de 28% (5/18) respectivamente. Todas as amostras de cisternas apresentaram contaminação por HAdV. EV foi o indicador menos prevalente tanto em amostras de fontes subterrâneas como de fontes superficiais, nas quais as taxas de detecção foram de 5% (3/60) e de 6% (1/17) respectivamente. Contudo, em amostras de cisternas, a detecção de EV superou a de EC, alcançando a taxa de 50% (4/8) (Figura 3).

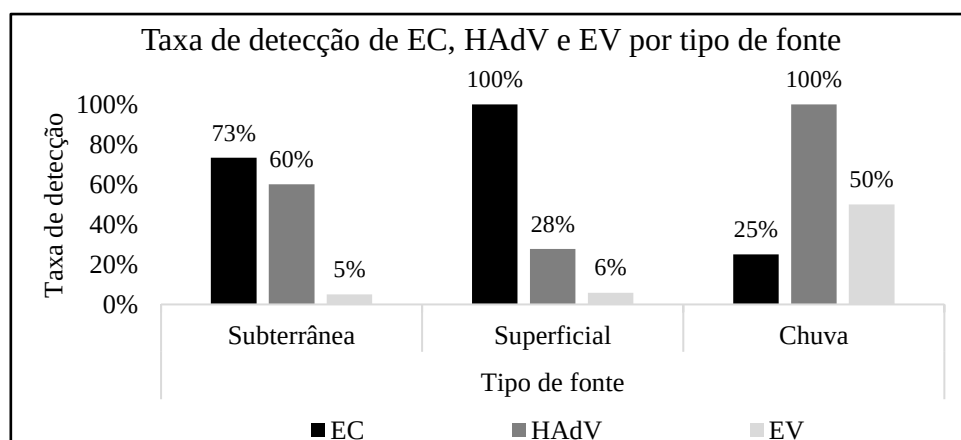


Figura 3 – Indicativo de contaminação fecal de acordo com os tipos de fontes de água e os indicadores utilizados.

Amostras de fontes superficiais apresentaram média geométrica da concentração de EC superior à de amostras de fontes subterrâneas, as quais foram iguais a $2,85 \times 10^2$ e a $5,45 \times 10^1$ NMP/100mL respectivamente. O maior valor da concentração desse indicador também foi encontrado em uma amostra proveniente de fonte superficial, cujo valor foi $1,55 \times 10^4$, enquanto em amostras de água subterrâneas o maior valor foi de $2,91 \times 10^3$ NMP/100mL. Entre as amostras de cisternas, apenas duas apresentaram contaminação por EC, cujas concentrações foram de $1,22 \times 10^1$ e de $1,73 \times 10^1$ NMP/100mL.

As amostras de cisternas apresentaram a maior média geométrica da concentração de HAdV ($1,72 \times 10^6$ CG/L) e, em uma delas, foi encontrado o maior valor da concentração de HAdV dentre todas as amostras analisadas ($1,00 \times 10^8$ CG/L). Amostras de água subterrâneas apresentaram média geométrica da concentração de HAdV superior a de amostras de fontes superficiais, as quais foram iguais a $9,45 \times 10^5$ e a $1,43 \times 10^5$ CG/L respectivamente. Em apenas uma amostra de água superficial foi detectado EV, na qual a concentração desse indicador foi de $1,71 \times 10^7$ CG/L. Em amostras de água subterrânea a média geométrica da concentração de EV foi de $9,11 \times 10^5$ CG/L e, o valor máximo, foi de $1,73 \times 10^7$ CG/L. Já em amostras de cisternas, esses valores foram, respectivamente, $5,02 \times 10^5$ e $2,38 \times 10^6$ CG/L (Tabela 3).

Indicadores	Tipos de fontes de água								
	Subterrânea			Superficial			Chuva		
	EC	HAdV	EV	EC	HAdV	EV	EC	HAdV	EV
Mínima	2,00E+00	3,28E+04	1,11E+05	5,20E+00	3,76E+04	*	1,22E+01	1,38E+05	2,58E+05
Máxima	2,91E+03	6,53E+07	1,73E+07	1,55E+04	5,95E+05	*	1,73E+01	1,00E+08	2,38E+06
Média	5,45E+01	9,45E+05	9,11E+05	2,85E+02	1,43E+05	*	1,45E+01	1,72E+06	5,02E+05

Tabela 3 - Valores mínimos, máximos e médias geométricas das concentrações dos indicadores EC, HAdV e EV para as amostras positivas. Concentrações de EC em NMP/100mL. Concentrações de HAdV e EV em CG/L. *EV foi detectado em apenas uma amostra de água superficial ($1,71 \times 10^7$ CG/L).

Comparando os subtipos de fontes subterrâneas, EC foi o indicador mais frequentemente encontrado em poços escavados e nascente, onde as taxas de detecção foram de 84% (26/31) e 79% (15/19) respectivamente, seguido por HAdV, com taxas de 65% (20/31) e 53% (10/19), e por EV, com taxas de 6% (2/31) e 5% (1/19). Em poços tubulares, HAdV foi o indicador mais prevalente, onde alcançou a taxa de 60% (6/10), seguida por EC com taxa de 30% (3/10). EV não foi detectado em poços tubulares (Figura 4).

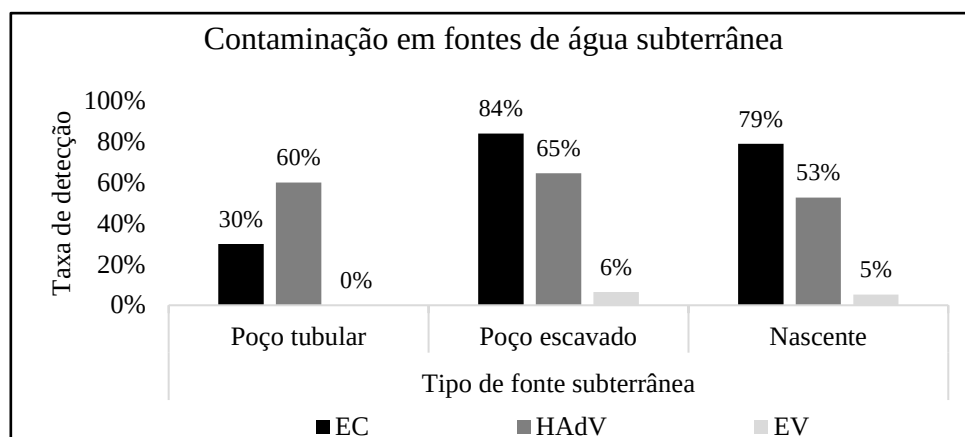


Figura 4 - Contaminação fecal de acordo com os subtipos de fonte de água subterrânea.

Do total de amostras com indicativo de contaminação fecal, em três houve a detecção de todos os indicadores analisados, 37 apresentaram dois dos indicadores e 38 apresentaram apenas um dos indicadores. Em 28 amostras, houve detecção exclusiva de EC e, em 10, houve detecção exclusiva de HAdV. EV não foi detectado de forma isolada e foi detectado na ausência de HAdV em apenas uma situação (Figura 5).

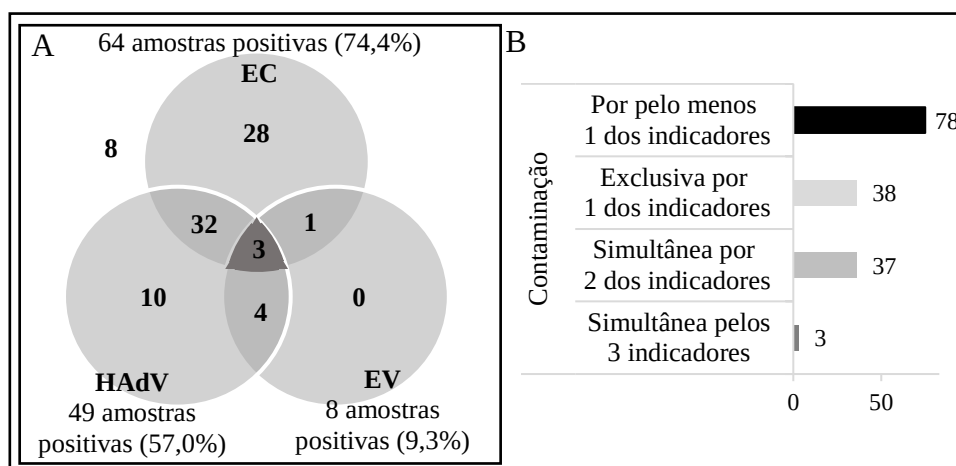


Figura 5 - A) Gráfico de Venn mostrando a distribuição das amostras em relação aos indicadores analisados. B) Número de amostras contaminadas por um ou mais indicadores.

Não houve associação entre a frequência de detecção de EC e a de HAdV ($\chi^2 = 0,232$; $p = 0,630$) nem correlação entre suas concentrações ($p = 0,123$). A frequência de contaminação das fontes de água subterrâneas por HAdV foi significativamente maior quando comparada às fontes de água superficiais ($\chi^2 = 4,546$; $p = 0,033$). Contudo, a frequência de contaminação por esse indicador não foi diferente entre poços perfurados, poços escavados e nascentes ($\chi^2 = 0,693$; $p = 0,707$). Já para EC, essa diferença foi significativa, sendo maior em poços escavados e nascentes quando comparada a poços perfurados ($\chi^2 = 4,546$; $p = 0,033$).

6 DISCUSSÃO

A análise das amostras de diversas fontes individuais de água usadas para o consumo humano em áreas rurais do Estado de Goiás mostrou uma ampla contaminação fecal, detectada tanto pelo tradicional indicador bacteriano EC, como também pelos indicadores virais alternativos HAdV e EV. Com o uso dos três indicadores, 90,7% das amostras apresentaram contaminação fecal. Isso demonstra a vulnerabilidade da população rural analisada, a qual está exposta a patógenos de veiculação hídrica e suas doenças associadas.

O indicador viral HAdV permitiu rastrear a contaminação fecal de origem humana. HAdV funcionou como um indicador de contaminação fecal complementar, já que esteve presente em muitas situações em que EC estava ausente e não houve associação nem correlação significativa entre este marcador viral e o bacteriano. Além de serem marcadores de contaminação fecal, HAdV e EV são patógenos humanos e a sua presença em água de consumo revela um risco à saúde. HAdV foi mais efetivo em detectar contaminação fecal em poços tubulares. O ambiente analisado mostrou condições precárias de obtenção de água e disposição de excretas e a necessidade urgente de maior apoio de políticas públicas de saneamento e saúde em áreas rurais.

No Estado de Goiás, poucos estudos sobre a prevalência de vírus entéricos em matrizes de água têm sido realizados e, em áreas rurais, nenhum estudo foi encontrado. Na capital do Estado, Goiânia, estudos anteriores encontraram HAdV com frequência de 51,3% em amostras de águas de rios usados para o abastecimento público e de 29,4% em amostras de lagos de parques recreativos (Silva et al. 2010). Na água tratada dessa cidade, HAdV foi encontrado em 52% das amostras, nas quais a quantificação variou de 10^3 a 10^{12} CG/L (Silva et al 2015). No presente estudo, foram pesquisados HAdV e EV em águas que abastecem residências rurais a partir de fontes individuais. Esses vírus apresentaram taxas de detecção de 57 e 9,3% respectivamente e suas concentrações chegaram a superar as encontradas em esgoto bruto de cidades de outros países (Hmaïed et al. 2016; Iaconelli et al. 2017).

Estudos sobre a prevalência de vírus entéricos em fontes de água rurais têm sido feitos principalmente na região sul do Brasil e incluíram, além da água de consumo humano, também a destinada a outras finalidades. De Oliveira et al. (2012) encontrou prevalência de HAdV de 19,2%, menor que a do presente estudo. Spilki et al. (2013) e Staggemeier et al. (2015) encontraram prevalências maiores que a do presente estudo, as

quais foram, respectivamente, de 66,7 e de 87,3%. No estudo de Staggemeier et al. (2015), a média geométrica das concentrações desse indicador foi menor do que a do presente estudo, embora a quantificação máxima encontrada pelo autor tenha alcançado um valor superior, de $2,08 \times 10^8$ CG/L. De forma semelhante, esses autores encontraram EV com baixa frequência, inferiores a 10%.

Essa baixa frequência de EV contrasta com estudos realizados em outros países e no Brasil, onde a frequência desse vírus foi relativamente alta em águas residuais e águas superficiais impactadas pelo lançamento de esgoto (Vecchia et al. 2012; Hachich et al. 2013; Delogu et al. 2018; Miao et al. 2018; Aguirre et al. 2019). A prevalência de vírus entéricos em matrizes ambientais reflete a sua prevalência na população local (Apostol et al. 2012; Tiwari e Dhole 2018). No presente trabalho, a baixa frequência de EV pode ser devido à baixa circulação desse vírus na população analisada. Aliada ao fato de que EV não foi encontrado de forma isolada, na ausência de HAdV e EC, essa baixa frequência demonstra que esse agente viral não é um indicador de contaminação fecal interessante para a maioria das áreas analisadas.

HAdV teve um bom desempenho como indicador complementar de contaminação fecal, pois em 12,8% das amostras contaminadas houve detecção exclusiva desse indicador. No presente estudo, foram usados um par de primers específicos para detecção de HAdV da espécie C (HAdV-C), capaz de detectar os sorotipos 1, 2, 5 e 6 (Wolf, Hewitt e Greening 2010). Essa espécie de adenovírus tem sido detectada com elevada frequência em esgoto (Bibby e Peccia 2013), em águas usadas para recreação e prática esportiva (Staggemeier et al. 2017) e em água tratada (Silva et al. 2015).

HAdV-C é excretado nas fezes de pessoas com infecção assintomática (Vetter et al. 2015) e com sintomas de gastroenterites (La Rosa et al. 2015). Essa espécie é principalmente associada a infecção respiratória aguda em crianças (Esposito et al. 2016; Wu et al. 2018), mas o seu papel na gastroenterite não pode ser descartado (La Rosa et al. 2015). A infecção do trato respiratório superior por adenovírus resulta em sua excreção nas fezes (Roy et al. 2011). Além disso, HAdV-C pode estabelecer infecção persistente no trato gastrointestinal de pessoas imunocompetentes (Kosulin et al. 2016). Nesse tipo de infecção, a disseminação viral é favorecida, pois a progênie viral a longo prazo, mesmo que em baixos níveis de produção, pode superar aquela de uma infecção aguda (King, Zhang e Mymryk 2016).

EC foi o indicador de contaminação fecal mais frequentemente detectado em amostras de fontes superficiais e subterrâneas. A sua prevalência em amostras de fontes

superficiais foi maior do que naquelas de fontes subterrâneas, assim como suas concentrações máxima e média. Situações semelhantes foram encontradas em outros estudos em áreas rurais (Gibson et al. 2011; Amenu, Markemann e Zárate 2013; Gambero et al. 2018) e corroboram com a ideia de que fontes superficiais podem estar mais sujeitas a contaminação fecal nesse tipo de ambiente. A alta concentração de bactérias indicadoras de contaminação fecal em cursos de águas pode estar associada ao escoamento superficial a partir de terras usadas para a pecuária (Liang et al. 2013; Wang et al. 2017) e à elevada frequência de atividades humanas e animais nas proximidades, destacadamente o acesso direto de animais para a dessedentação (Amenu, Markemann e Zárate 2013).

Gibson et al. (2011) ainda encontraram disparidade relativamente alta entre a detecção de EC e de vírus entéricos humanos em amostras de água superficial e apontaram a baixa recuperação viral, a grande diluição dos vírus na água e a presença de inibidores da PCR como possíveis causas para tal fato. No presente estudo, também foi encontrada essa disparidade. Mas essa situação também pode ser um indicativo de que a contaminação desse tipo de fonte nas áreas rurais analisadas tenha uma maior contribuição de excretas animais.

EC foi mais frequente do que HAdV também em fontes de água subterrânea, mas a diferença foi bem menos acentuada do que em águas superficiais. Além disso, quando esses indicadores foram comparados de acordo com os subtipos dessa fonte, verificou-se uma maior prevalência de HAdV em poços tubulares. A frequência de HAdV nas amostras não foi significativamente diferente entre esses subtipos, ou seja, esse vírus foi igualmente capaz de contaminar todas elas. Tal fato não ocorreu com EC, que foi significativamente menos encontrado em poços tubulares quando comparado com poços escavados e nascentes.

Haramoto (2018) encontrou EC com maior frequência e ainda concentração significativamente maior em poços rasos escavados quando comparado a poços rasos tubulares e esse resultado que foi atribuído à estrutura mais vulnerável dos poços escavados. O autor ainda encontrou HAdV em proporções semelhantes ao comparar esses dois tipos de poços. Esses resultados evidenciam que poços escavados estão mais sujeitos a serem contaminados por EC do que os tubulares, mas que essa diferença pode não existir em relação aos vírus entéricos.

Em aquíferos não confinados de granulação média e fina, a contaminação de poços tubulares por bactérias indicadoras transportadas no meio poroso do solo a partir da infiltração de excretas dispostas localmente é relativamente limitada e pode ser

alternativamente explicada pela rota rápida do fluxo descendente de água contaminada da superfície ou das camadas superficiais do solo na estação chuvosa quando o espaço anular do poço não é selado (Knappett et al. 2012a, 2012b).

No presente estudo, as coletas foram realizadas predominantemente no período de seca e, portanto, a contaminação de poços tubulares por EC deve ter tido pouca influência do espaço anular não selado. A contaminação significativamente menor de poços tubulares por EC em relação aos escavados pode ser devido a limitada capacidade de transporte desse indicador a partir de fossas negras aliada a maior proteção dos poços tubulares.

HAdV pareceu ter maior capacidade de contaminação de poços tubulares, os quais são mais protegidos que os escavados. Vírus entéricos são mais facilmente transportados no meio poroso do solo devido ao seu menor tamanho e a sua maior estabilidade ambiental quando comparado às bactérias (Borchard et al. 2007). Verheyen et al. (2009) encontraram uma associação significativa entre a contaminação de poços por vírus entéricos e a presença de latrinas dentro de um raio de 50m deles. Além disso, não houve diferença sazonal de contaminação entre estação chuvosa e seca.

Sidhu et al. (2015) demonstraram que a taxa de decaimento de bactérias na água subterrânea é mais rápida que a de vírus entéricos e que adenovírus mostrou menor decaimento comparado a rotavírus e coxsackievírus. Charles et al. (2009) verificou que, em água subterrânea, adenovírus pode permanecer infeccioso por 364 dias e o seu DNA pode ser detectado por PCR em até 672 dias. Esses fatos podem explicar a ampla disseminação de HAdV pelos diferentes subtipos de fontes de água subterrânea em contraste com EC.

Poços escavados foram mais frequentemente contaminados pelos três indicadores analisados em comparação aos tubulares, indicando maior vulnerabilidade. Poços tubulares apresentam algumas características os tornam menos sujeitos a contaminação, tais como maior profundidade, menor diâmetro de abertura e paredes geralmente de plástico PVC, que garante isolamento e durabilidade. Contudo, esses fatores de proteção sozinhos não foram suficientes para garantir água livre de contaminação, em especial por HAdV.

Shrestha et al. (2015) encontraram maior frequência e maiores concentrações de EC e de enteropatógenos em poços escavados, além de um maior risco estimado de diarreia por *Cryptosporidium* e *Giardia*. Contudo, em ambos os tipos de poços, o risco de diarreia foi maior que os aceitáveis tanto para o consumo como para o banho. Lutterodt

et al. (2018), por sua vez, detectou EC em todos os poços tubulares e escavados analisados e não encontrou diferença significativa entre os dois tipos em relação a contagem desse indicador.

No estudo de Lutterodt et al. (2018), foram encontrados vários fatores de risco contribuindo para a ampla contaminação verificada. Entre esses fatores, os mais encontrados em poços escavados foram: latrinas ou infiltração do efluente de fossas sépticas em locais mais altos que os poços e com distâncias entre 10 e 30m; outras fontes de contaminação a uma distância de até 10m; altura da parede do poço inferior a 1m e falta de cobertura de proteção superior; pouca profundidade e revestimento interno precário. Em relação aos poços tubulares, os mais encontrados foram: latrinas sem encanamento próximas do poço, onde as excretas percolam no solo local; outras fontes de contaminação a uma distância de até 10m; problemas com a vedação da bomba do poço. Embora a Organização Mundial de Saúde considere que os poços tubulares sejam instalações aprimoradas de obtenção de água (WHO 2017), verifica-se que a sua efetividade em fornecer água de baixo risco a saúde depende também de uma adequada disposição de excretas, manutenção e proteção contra fontes poluidoras em geral.

Dentre os três subtipos de fontes de água subterrâneas, as amostras de nascentes tiveram a segunda maior taxa de detecção de EC e as menores taxas de detecção de HAdV e EV, embora HAdV ainda tenha sido detectado em mais da metade das amostras. Uma pesquisa realizada em áreas rurais da Etiópia ao longo de dez anos analisou 198 poços escavados e 128 nascentes, das quais EC foi detectada com taxas de 52 e 43% respectivamente. As prováveis causas para essa contaminação foram atribuídas a pouca profundidade dos poços e precária proteção tanto dos poços quanto das nascentes (Abera, Bezabih e Hailu 2017).

Nascentes localizadas em regiões baixas podem estar mais sujeitas a contaminação fecal que aquelas em regiões mais altas. Outros fatores relacionados a esse tipo de contaminação em nascentes são a densidade humana e a intensidade da atividade de pecuária (Aqso, Özkul e Karakaya 2014). No presente estudo, é possível que o padrão de localização de poços e nascentes tenha influenciado a maior contaminação de poços por EC e HAdV em relação às nascentes. Foi verificado que poços geralmente se localizavam nas proximidades das residências, onde também estavam localizadas as fossas, enquanto as nascentes geralmente estavam localizadas mais distantes. Dessa forma, os poços poderiam estar mais sujeitos a influência de fossas. Contudo, tanto nascentes e quanto poços rasos têm potencial de contaminação por excretas humanas que

se infiltram no solo e atingem lençõs freáticos pouco profundos (Martínez-Santos et al. 2017).

Em relação as cisternas de armazenamento de água das chuvas, HAdV foi detectado em todas as amostras, EV em metade delas e EC em 25%. Em um estudo realizado em área periurbana da África do Sul, a taxa de detecção geral de adenovírus humano e não humano foi de 42,5% e a maior concentração de HAdV foi de $3,16 \times 10^5$ CG/L. (Waso et al. 2016). Em outro estudo, também nesse mesmo local, HAdV foi detectado em 100% e EC em 95% das amostras. As quantificações médias de HAdV e EC foram de $5,64 \times 10^7$ CG/L e de $2,8 \times 10^2$ CFU /100 mL respectivamente, ambas superiores a do presente estudo (Waso, Khan e Khan 2018).

Os detritos presentes nas calhas de captação da água podem ser uma fonte de adenovírus detectados na água das cisternas. Outras fontes de contaminação fecal incluem pássaros que defecam nas superfícies de captação e animais domésticos que defecam nas proximidades das cisternas. Estudos que pesquisem adenovírus diretamente na água da chuva devem ser realizados para se verificar a possibilidade dessa contaminação ocorrer na atmosfera por meio de bioaerossóis (Waso et al. 2016).

Dada a existência de estações bem definidas de chuva e seca na região do presente estudo, a água passa um longo período sem ser renovada, mantendo-se contaminada. HAdV e EV podem permanecer infecciosos por mais de 70 dias em água a temperatura de 20°C (Prevost et al. 2016) e o genoma de HAdV pode ser detectado por mais de 400 dias através de PCR nessas mesmas condições (Ogorzaly et al. 2010). Os vírus entéricos presentes na água das cisternas podem se adsorver aos sedimentos levados pelo fluxo de água no telhado e nas calhas. As partículas virais adsorvidas aos sedimentos podem se tornar mais protegidas aos processos de inativação e aumentar o seu período de viabilidade (Staggemeier et al. 2015; Bae et al. 2019). Esses fatos ajudam a explicar as altas taxas de detecção de HAdV e EV nas cisternas analisadas no presente estudo. Contudo, a identificação das vias de contaminação fecal humana nesse tipo de fonte deve ser investigada por pesquisas futuras.

Não houve associação entre a detecção de EC e de HAdV e nem correlação entre as concentrações desses indicadores. De forma semelhante, estudos anteriores reportaram ausência de associação entre a detecção de bactérias indicadoras de contaminação fecal e a de vírus entéricos em amostras de águas subterrâneas no Uruguai (Gamazo et al. 2018) e ausência de correlação entre as suas concentrações em águas superficiais na Coreia (Lee

et al. 2013) e no Brasil (Vecchia et al. 2015) e em efluentes de estações de tratamento de águas residuais na África do Sul (Adefisoye et al. 2016).

Por outro lado, estudo recente realizado por Girard et al. (2019) encontrou correlação significativa e direta da concentração de EC e de coliformes totais em relação à concentração de adenovírus da espécie F em águas superficiais do sul do Brasil, mas, como no presente estudo, tal correlação foi ausente em relação à HAdV-C. Já Miao et al. (2018) encontrou correlação significativa e positiva entre as concentrações de coliformes totais e EV, mas esse indicador bacteriano falhou em prever a contaminação por vários outros vírus, incluindo HAdV. A falta de associação e de correlação entre EC e HAdV no presente estudo demonstra que a avaliação da qualidade da água de consumo usando apenas EC como indicador de contaminação fecal é falha e pode resultar em falso-negativo para patógenos virais.

A detecção viral foi realizada por qPCR usando corante fluorogênico intercalante de DNA de fita dupla combinada à análise do ponto de *melting* para se avaliar a especificidade dos produtos amplificados. Essa análise, além de ser barata e rápida, não exige processamentos ou equipamentos adicionais e pode ser utilizada para avaliar a heterogeneidade de sorotipos de adenovírus em amostras de água contaminada por esgoto (Hartmann et al. 2013).

Comparadas de forma isolada, a técnica de PCR para detecção de vírus no meio ambiente é mais rápida, sensível e específica em relação à técnica de cultura celular. Apesar dessas vantagens, a PCR pode detectar ácidos nucleicos não-infecciosos, enquanto a cultura celular detecta apenas vírus infecciosos (Hamza e Bibby 2019). No presente trabalho, com uso de uma técnica de concentração baseada na estrutura da partícula viral, é esperado que a detecção de ácidos nucleicos livres seja reduzida (Hamza et al. 2009), mas a integridade da partícula viral não significa, necessariamente, que ela seja infecciosa (Fongaro et al. 2013). Portanto, a detecção do genoma viral pode não indicar risco à saúde humana decorrente da infecção pelo respectivo vírus, mas indica contaminação fecal e os riscos associados a ela (La Rosa et al. 2017).

7 CONCLUSÕES

- 74,4% das amostras estavam fora do padrão estabelecido pelo Ministério da Saúde para a água de consumo humano (Brasil 2017), pois apresentaram EC em amostras de 100 mL de água. EC teve alta prevalência tanto em amostras de água subterrânea (73%) como de águas superficiais (100%).
- HAdV apresentou elevada prevalência nas amostras de água (57%), em especial de fontes de subterrâneas (60%) e de cisternas de armazenamento de água da chuva (100%). Sua presença indicou contaminação fecal de origem humana.
- EV apresentou baixa prevalência nas amostras de água (9,3%). Contudo, em amostras de cisternas, sua taxa de detecção foi de 50%, superando a prevalência de EC.
- As concentrações máxima e média de EC foram maiores em amostras de água superficial em relação às de água subterrânea. Entretanto, para HAdV, observou-se o oposto, ou seja, suas concentrações máxima e média foram maiores em amostras de água subterrânea em relação às de água superficial. A frequência, concentração média e concentração máxima de HAdV nas amostras de cisternas foram as maiores entre os três tipos de fonte.
- A frequência de detecção de HAdV foi significativamente maior em amostras de água subterrânea em relação às de água superficial. Dentre os subtipos de fontes de água subterrânea, a contaminação por HAdV não foi significativamente diferente, enquanto a contaminação por EC foi significativamente maior entre poços escavados e nascentes em relação aos poços tubulares. Isso indica que HAdV foi mais eficiente na detecção de contaminação fecal em poços tubulares.
- HAdV foi um bom indicador complementar de contaminação fecal devido à sua alta prevalência e à ausência de associação e correlação com EC.
- Usando-se os três indicadores, 90,7% das amostras apresentaram indicativo de contaminação fecal. A elevada taxa de contaminação revela a necessidade de melhorias das condições de saneamento em áreas rurais para se reduzir a vulnerabilidade dos moradores à patógenos entéricos de veiculação hídrica.

8 REFERÊNCIAS

- Abera, B., Bezabih, B., Hailu, D. Microbial quality of community drinking water supplies: A ten year (2004–2014) analyses in west Amhara, Ethiopia. *Sustainability of Water Quality and Ecology* 9: 22-26, 2017.
- Adefisoye, M. A., Nwodo, U. U., Green, E., & Okoh, A. I. Quantitative PCR detection and characterisation of human adenovirus, rotavirus and hepatitis A virus in discharged effluents of two wastewater treatment facilities in the Eastern Cape, South Africa. *Food and environmental virology* 8(4): 262-274, 2016.
- Aguirre, B. P., Masachessi, G., Ferreyra, L. J., Biganzoli, P., Grumelli, Y., Panero, M. D., ... Ré, V. Searching variables to assess recreational water quality: the presence of infectious human enterovirus and its correlation with the main variables of water pollution by multivariate statistical approach in Córdoba, Argentina. *Environmental Science and Pollution Research* 26(7): 6586-6601, 2019.
- Akunna, J. C., O'Keeffe, J., Allan, R. Reviewing factors affecting the effectiveness of decentralised domestic wastewater treatment systems for phosphorus and pathogen removal. *Desalination and Water Treatment Journal* 91(1): 40-47, 2017.
- Alrumman, S., Keshk, S., El Kott, A. Water pollution: source & treatment. *American Journal of Environmental Engineering*: 88-98, 2016.
- Al-Atawneh, N., Mahmoud, N., van der Steen, P., Lens, P. N. Characterisation of septage in partially sealed cesspit. *Journal of Water, Sanitation and Hygiene for Development* 6(4): 631-639, 2016.
- Amenu, K., Markemann, A., Zárate, A. V. Water for human and livestock consumption in rural settings of Ethiopia: assessments of quality and health aspects. *Environmental monitoring and assessment* 185(11): 9571-9586, 2013.
- Apostol, L. N. G., Imagawa, T., Suzuki, A., Masago, Y., Lupisan, S., Olveda, R., ... Oshitani, H. Genetic diversity and molecular characterization of enteroviruses from sewage-polluted urban and rural rivers in the Philippines. *Virus genes* 45(2): 207-217, 2012.
- Aqso, A., Ozkul, K., Karakaya, H. An investigation on the bacterial contents of natural springs in a rural area of the middle Black Sea region in Turkey. *Applied Ecology and Environmental Sciences* 2(5): 123-9, 2014.
- Arnold, A., MacMahon, E. Adenovirus infections. *Medicine* 45(12): 777-780, 2017.
- Bae, S., Maestre, J. P., Kinney, K. A., Kirsits, M. J. An examination of the microbial community and occurrence of potential human pathogens in rainwater harvested from different roofing materials. *Water research* 159, 406-413, 2019.
- Bain, R., Cronk, R., Wright, J., Yang, H., Slaymaker, T., Bartram, J. Fecal contamination of drinking-water in low-and middle-income countries: a systematic review and meta-analysis. *PLoS medicine* 11(5), 2014.

Baird, J. M., Summers, R., Plummer, R. Cisterns and safe drinking water in Canada. *Canadian Water Resources Journal* 38(2), 121-134, 2013.

Barrios, M. E., Fernández, M. D. B., Cammarata, R. V., Torres, C., Mbayed, V. A. Viral tools for detection of fecal contamination and microbial source tracking in wastewater from food industries and domestic sewage. *Journal of virological methods* 262, 79-88, 2018.

Bibby, K., Peccia, J. Prevalence of respiratory adenovirus species B and C in sewage sludge. *Environmental Science: Processes & Impacts* 15(2): 336-338, 2013.

Bofill-Mas, S., Rusiñol, M., Fernandez-Cassi, X., Carratalà, A., Hundesa, A., Girones, R. Quantification of human and animal viruses to differentiate the origin of the fecal contamination present in environmental samples. *BioMed research international*, 2013, 2013.

Boguniewicz-Zabłocka, J., Capodaglio, A. G. Sustainable Wastewater Treatment Solutions for Rural Communities': Public (Centralized) or Individual (On-Site)–Case Study. *Economic and Environmental Studies* 17(44): 1103-1119, 2017.

Borchardt, M. A., Bradbury, K. R., Gotkowitz, M. B., Cherry, J. A., Parker, B. L. Human enteric viruses in groundwater from a confined bedrock aquifer. *Environmental science & technology* 41(18), 6606-6612, 2007.

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

Bosch, A., Pintó, R. M., Guix, S. Foodborne viruses. *Current opinion in food science* 8, 110-119, 2016.

Bradbury, K. R., Borchardt, M. A., Gotkowitz, M., Spencer, S. K., Zhu, J., Hunt, R. J. Source and transport of human enteric viruses in deep municipal water supply wells. *Environmental science & technology* 47(9), 4096-4103, 2013.

BRASIL. Boas práticas no abastecimento de água: procedimentos para a minimização de riscos à saúde. Ministério da Saúde, Brasília, 2006.

BRASIL. Lei nº 11.445, de 5 de janeiro de 2007. Estabelece diretrizes nacionais para o saneamento básico. Brasília, 2007. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/ato2007-2010/2007/lei/11445.htm>, Acesso em 21 janeiro 2019.

BRASIL. Anexo XX da Portaria de Consolidação Nº 5 de 03 de outubro de 2017. Do controle e da vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade. Ministério da Saúde. Brasília, 2017.

Cantor, J., Krometis, L. A., Sarver, E., Cook, N., Badgley, B. Tracking the downstream impacts of inadequate sanitation in central Appalachia. *Journal of water and health* 15(4): 580-590, 2017.

Charles, K. J., Shore, J., Sellwood, J., Laverick, M., Hart, A., Pedley, S. Assessment of the stability of human viruses and coliphage in groundwater by PCR and infectivity methods. *Journal of applied microbiology* 106(6): 1827-1837, 2009.

Corsi, S. R., Borchardt, M. A., Spencer, S. K., Hughes, P. E., Baldwin, A. K. Human and bovine viruses in the Milwaukee River watershed: hydrologically relevant representation and relations with environmental variables. *Science of the Total Environment* 490, 849-860, 2014.

Dantas, G. C. B., Farias, H. M., de Oliveira, C. R. S., da Silveira, A. M. D., Barros, S. V. A. Qualidade físico-química de águas de poços tubulares localizados no interior do Estado de Rio Grande do Norte. *Águas Subterrâneas* 32(1): 91-96, 2018.

Delogu, R., Battistone, A., Buttinelli, G., Fiore, S., Fontana, S., Amato, C., ... Pellegrinelli, L. Poliovirus and other enteroviruses from environmental surveillance in Italy, 2009–2015. *Food and environmental virology* 10(4): 333-342, 2018.

Delwart, E. Animal virus discovery: improving animal health, understanding zoonoses, and opportunities for vaccine development. *Current opinion in virology*, 2(3): 344-352, 2012.

de Oliveira, L. K., Fleck, J. D., Comerlato, J., Kluge, M., Bergamaschi, B., Fabres, R. B., ... Staggemeier, R. Enteric viruses in water samples from Brazilian dairy farms. *Agricultural water management* 111: 34-39, 2012.

Drexler, J. F., Baumgarte, S., de Souza Luna, L. K., Eschbach-Bludau, M., Lukashev, A. N., Drosten, C. Aichi virus shedding in high concentrations in patients with acute diarrhea. *Emerging infectious diseases* 17(8): 1544, 2011.

Ercumen, A., Pickering, A. J., Kwong, L. H., Arnold, B. F., Parvez, S. M., Alam, M., ... Ahmed, R. Animal feces contribute to domestic fecal contamination: evidence from *E. coli* measured in water, hands, food, flies, and soil in Bangladesh. *Environmental science & technology* 51(15): 8725-8734, 2017.

Esposito, S., Zampiero, A., Bianchini, S., Mori, A., Scala, A., Tagliabue, C., ... Principi, N. Epidemiology and clinical characteristics of respiratory infections due to adenovirus in children living in Milan, Italy, during 2013 and 2014. *PloS one* 11(4): 2016.

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 adenovirus in drinking water supplies: viral integrity and viability assays. *Virology journal*, 10(1): 166, 2013.

Fratini, M., Di Bonito, P., La Rosa, G. Oncogenic papillomavirus and polyomavirus in water environments: is there a potential for waterborne transmission?. *Food and environmental virology* 6(1): 1-12, 2014.

FUNASA. Manual de Saneamento. Ministério da Saúde. Brasília, 2015.

Ferguson, A. S., Layton, A. C., Mailloux, B. J., Culligan, P. J., Williams, D. E., Smartt, A. E., ... Alexandrova, E. Comparison of fecal indicators with pathogenic bacteria and rotavirus in groundwater. *Science of the Total Environment* 431: 314-322, 2012.

Gall, A. M., Mariñas, B. J., Lu, Y., Shisler, J. L. Waterborne viruses: a barrier to safe drinking water. *PLoS pathogens* 11(6): 2015.

Gall, A. M., Shisler, J. L., Mariñas, B. J. Analysis of the viral replication cycle of adenovirus serotype 2 after inactivation by free chlorine. *Environmental science & technology* 49(7): 4584-4590, 2015.

Gamazo, P., Victoria, M., Schijven, J. F., Alvareda, E., Tort, L. F. L., Ramos, J., ... Castells, M. Evaluation of bacterial contamination as an Indicator of viral contamination in a sedimentary aquifer in Uruguay. *Food and environmental virology* 10(3): 305-315, 2018.

Gambero, M. L., Blarasin, M., Bettera, S., Giuliano Albo, J. Tracing contamination sources through phenotypic characterization of *Escherichia coli* isolates from surface water and groundwater in an agro-ecosystem. *Hydrological Sciences Journal* 63(8): 1150-1161, 2018.

García-Aljaro, C., Blanch, A. R., Campos, C., Jofre, J., Lucena, F. Pathogens, faecal indicators and human-specific microbial source-tracking markers in sewage. *Journal of applied microbiology* 126(3): 701-717, 2019.

GBD. Mortality and Causes of Death Collaborators. Global, regional, and national life expectancy, all-cause mortality, and cause-specific mortality for 249 causes of death, 1980–2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. *The lancet* 388(10053): 1459-1544, 2016.

Giberson, A. N., Davidson, A. R., Parks, R. J. Chromatin structure of adenovirus DNA throughout infection. *Nucleic acids research* 40(6): 2369-2376, 2012.

Gibson, K. E., Opryszko, M. C., Schissler, J. T., Guo, Y., Schwab, K. J. Evaluation of human enteric viruses in surface water and drinking water resources in southern Ghana. *The American journal of tropical medicine and hygiene* 84(1): 20-29, 2011.

Girardi, V., Mena, K. D., Albino, S. M., Demoliner, M., Gularte, J. S., de Souza, F. G., ... Tarwater, P. M. Microbial risk assessment in recreational freshwaters from southern Brazil. *Science of The Total Environment* 651: 298-308, 2019.

Graham, J. P., Polizzotto, M. L. Pit latrines and their impacts on groundwater quality: a systematic review. *Environmental health perspectives* 121(5): 521-530, 2013.

Hachich, E. M., Galvani, A. T., Padula, J. A., Stoppe, N. C., Garcia, S. C., Bonanno, V. M., ... Sato, M. I. Z. Pathogenic parasites and enteroviruses in wastewater: support for a regulation on water reuse. *Water science and technology* 67(7): 1512-1518, 2013.

Hamza, I. A., Jurzik, L., Stang, A., Sure, K., Überla, K., Wilhelm, M. Detection of human viruses in rivers of a densely-populated area in Germany using a virus adsorption elution method optimized for PCR analyses. *Water Research* 43(10): 2657-2668, 2009.

Hamza, I. A., Bibby, K. Critical issues in application of molecular methods to environmental virology. *Journal of virological methods* 266: 11-24, 2019.

Haramoto, E. Detection of waterborne protozoa, viruses, and bacteria in groundwater and other water samples in the Kathmandu Valley, Nepal. In *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science* 120 (1): 2018.

Hartmann, N. M., Dartscht, M., Szewzyk, R., Selinka, H. C. Monitoring of adenovirus serotypes in environmental samples by combined PCR and melting point analyses. *Virology journal* 10(1): 190, 2013.

Hmaïed, F., Jebri, S., Saavedra, M. E. R., Yahya, M., Amri, I., Lucena, F., Hamdi, M. Comparison of two concentration methods for the molecular detection of enteroviruses in raw and treated sewage. *Current microbiology* 72(1): 12-18, 2016.

Hoeben, R. C., Uil, T. G. Adenovirus DNA replication. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 5(3): 2013.

Humphrey, C. P., Sanderford, C., Iverson, G. Concentrations and Exports of Fecal Indicator Bacteria in Watersheds with Varying Densities of Onsite Wastewater Systems. *Water, Air, & Soil Pollution* 229(8): 277, 2018.

Hove, J., D'Ambruso, L., Mabetha, D., Van Der Merwe, M., Byass, P., Kahn, K., ... Twine, R. 'Water is life': developing community participation for clean water in rural South Africa. *BMJ global health* 4(3): 2019.

Hu, M., Fan, B., Wang, H., Qu, B., Zhu, S. Constructing the ecological sanitation: a review on technology and methods. *Journal of Cleaner Production* 125: 1-21, 2016.

Huang, F., Li, Y., Yu, W., Jing, S., Wang, J., Long, F., ... Liu, C. Excretion of infectious hepatitis E virus into milk in cows imposes high risks of zoonosis. *Hepatology* 64(2): 350-359, 2016.

Iaconelli, M., Muscillo, M., Della Libera, S., Fratini, M., Meucci, L., De Ceglia, M., ... La Rosa, G. One-year surveillance of human enteric viruses in raw and treated wastewaters, downstream river waters, and drinking waters. *Food and environmental virology* 9(1): 79-88, 2017.

Iturriza-Gomara, M., O'Brien, S. J. Foodborne viral infections. *Current opinion in infectious diseases* 29(5): 495-501, 2016.

Japhet, M. O., Famurewa, O., Adesina, O. A., Opaleye, O. O., Wang, B., Höhne, M., ... Niendorf, S. Viral gastroenteritis among children of 0-5 years in Nigeria: Characterization of the first Nigerian aichivirus, recombinant noroviruses and detection of a zoonotic astrovirus. *Journal of Clinical Virology* 111: 4-11, 2019.

Jiang, P., Liu, Y., Ma, H. C., Paul, A. V., Wimmer, E. Picornavirus morphogenesis. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 78(3): 418-437, 2014.

Joffret, M. L., Polston, P. M., Razafindratsimandresy, R., Bessaud, M., Heraud, J. M., Delpeyroux, F. Whole Genome Sequencing of Enteroviruses Species A to D by High-Throughput Sequencing: Application for Viral Mixtures. *Frontiers in microbiology* 9: 2339, 2018.

Johnston, R. B., Berg, M., Johnson, C. A., Tilley, E., Hering, J. G. Water and sanitation in developing countries: Geochemical aspects of quality and treatment. *Elements* 7(3): 163-168, 2011.

Kaliakatsos, A., Kalogerakis, N., Manios, T., Venieri, D. Efficiency of two constructed wetland systems for wastewater treatment: removal of bacterial indicators and enteric viruses. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology* 94(7): 2123-2130, 2019.

Katayama, H., Shimasaki, A., Ohgaki, S. Development of a virus concentration method and its application to detection of enterovirus and Norwalk virus from coastal seawater. *Appl. Environ. Microbiol.* 68(3): 1033-1039, 2002.

Kauppinen, A., Pitkänen, T., Miettinen, I. T. Persistent norovirus contamination of groundwater supplies in two waterborne outbreaks. *Food and environmental virology* 10(1): 39-50, 2018.

Khatri, N., Tyagi, S. Influences of natural and anthropogenic factors on surface and groundwater quality in rural and urban areas. *Frontiers in Life Science* 8(1): 23-39, 2015.

King, C. R., Zhang, A., Mymryk, J. S. The persistent mystery of adenovirus persistence. *Trends in microbiology* 24(5): 323-324, 2016.

Knappett, P. S., McKay, L. D., Layton, A., Williams, D. E., Alam, M. J., Mailloux, B. J., ... Ahmed, K. M. Unsealed tubewells lead to increased fecal contamination of drinking water. *Journal of water and health* 10(4): 565-578, 2012a.

Knappett, P. S., McKay, L. D., Layton, A., Williams, D. E., Alam, M. J., Huq, M. R., ... Zhuang, J. Implications of fecal bacteria input from latrine-polluted ponds for wells in sandy aquifers. *Environmental science & technology* 46(3): 1361-1370, 2012b.

Kokkinos, P., Bouwknegt, M., Verhaelen, K., Willems, K., Moloney, R., de Roda Husman, A. M., ... Vantarakis, A. Virological fit-for-purpose risk assessment in a leafy green production enterprise. *Food control* 51: 333-339, 2015.

Kosulin, K., Geiger, E., Vecsei, A., Huber, W. D., Rauch, M., Brenner, E., ... Lawitschka, A. Persistence and reactivation of human adenoviruses in the gastrointestinal tract. *Clinical Microbiology and Infection* 22(4): 381, 2016.

Kotwal, G., Cannon, J. L. Environmental persistence and transfer of enteric viruses. *Current opinion in virology* 4: 37-43, 2014.

La Rosa, G., Fratini, M., della Libera, S., Iaconelli, M., Muscillo, M. Emerging and potentially emerging viruses in water environments. *Annali dell'Istituto superiore di sanità* 48: 397-406, 2012.

La Rosa, G., Della Libera, S., Petricca, S., Iaconelli, M., Donia, D., Saccucci, P., ... Divizia, M. Genetic diversity of human adenovirus in children with acute gastroenteritis, Albania, 2013–2015. *BioMed research international* 2015: 2015.

La Rosa, G., Sanseverino, I., Della Libera, S., Iaconelli, M., Ferrero, V. E. V., Barra Caracciolo, A., Lettieri, T. The impact of anthropogenic pressure on the virological

quality of water from the Tiber river, Italy. *Letters in applied microbiology* 65(4): 298-305, 2017.

Lee, G. C., Jheong, W. H., Kim, M. J., Choi, D. H., Baik, K. H. A 5-year survey (2007–2011) of enteric viruses in Korean aquatic environments and the use of coliforms as viral indicators. *Microbiology and immunology* 57(1): 46-53, 2013.

Lee, D. Y., Lee, H., Trevors, J. T., Weir, S. C., Thomas, J. L., Habash, M. Characterization of sources and loadings of fecal pollutants using microbial source tracking assays in urban and rural areas of the Grand River Watershed, Southwestern Ontario. *Water research* 53: 123-131, 2014.

Leite, N. K., Stolberg, J., da Cruz, S. P., Tavela, A. D. O., Safanelli, J. L., Marchini, H. R., ... Johnson, M. S. Hydrochemistry of shallow groundwater and springs used for potable supply in Southern Brazil. *Environmental earth sciences* 77(3): 80, 2018.

Liang, Z., He, Z., Zhou, X., Powell, C. A., Yang, Y., He, L. M., Stoffella, P. J. Impact of mixed land-use practices on the microbial water quality in a subtropical coastal watershed. *Science of the total environment* 449: 426-433, 2013.

Linden, L. V. D., Wolthers, K. C., Van Kuppeveld, F. J. Replication and inhibitors of enteroviruses and parechoviruses. *Viruses* 7(8): 4529-4562, 2015.

Lion, T. Adenovirus infections in immunocompetent and immunocompromised patients. *Clinical microbiology reviews* 27(3): 441-462, 2014.

Liu, J., Dorjderem, A., Fu, J., Lei, X., Macer, D. Water Ethics and Water Resource Management, 2011.

Lutterodt, G., Van de Vossenberg, J., Hoiting, Y., Kamara, A. K., Oduro-Kwarteng, S., Foppen, J. W. A. Microbial groundwater quality status of hand-dug wells and boreholes in the Dodowa area of Ghana. *International journal of environmental research and public health* 15(4): 730, 2018.

Mackowiak, M., Leifels, M., Hamza, I. A., Jurzik, L., Wingender, J. Distribution of *Escherichia coli*, coliphages and enteric viruses in water, epilithic biofilms and sediments of an urban river in Germany. *Science of the Total Environment* 626: 650-659, 2018.

Martínez-Santos, P., Martín-Loeches, M., García-Castro, N., Solera, D., Díaz-Alcaide, S., Montero, E., García-Rincón, J. A survey of domestic wells and pit latrines in rural settlements of Mali: implications of on-site sanitation on the quality of water supplies. *International journal of hygiene and environmental health* 220(7): 1179-1189, 2017.

Masachessi, G., Pisano, M. B., Prez, V. E., Martínez, L. C., Michelena, J. F., Martínez-Wassaf, M., ... Nates, S. V. Enteric viruses in surface waters from Argentina: molecular and viable-virus detection. *Appl. Environ. Microbiol.* 84(5): 2018.

Matthes-Martin, S., Boztug, H., Lion, T. Diagnosis and treatment of adenovirus infection in immunocompromised patients. *Expert review of anti-infective therapy* 11(10): 1017-1028, 2013.

- Mattioli, M. C., Sassoubre, L. M., Russell, T. L., Boehm, A. B. Decay of sewage-sourced microbial source tracking markers and fecal indicator bacteria in marine waters. *Water research* 108: 106-114, 2017.
- Mennechet, F. J., Paris, O., Ouoba, A. R., Salazar Arenas, S., Sirima, S. B., Takoudjou Dzomo, G. R., ... Weaver, E. A. A review of 65 years of human adenovirus seroprevalence. *Expert review of vaccines* 18(6): 597-613, 2019.
- Mena-Rivera, L., Quirós-Vega, J. Assessment of drinking water suitability in low income rural areas: A case study in Sixaola, Costa Rica. *Journal of water and health* 16(3): 403-413, 2018.
- Miao, J., Guo, X., Liu, W., Yang, D., Shen, Z., Qiu, Z., ... Yang, Z. Total coliforms as an indicator of human enterovirus presence in surface water across Tianjin city, China. *BMC infectious diseases* 18(1): 542, 2018.
- O'Brien, E., Nakyzze, J., Wu, H., Kiwanuka, N., Cunningham, W., Kaneene, J. B., Xagorarakis, I. Viral diversity and abundance in polluted waters in Kampala, Uganda. *Water research* 127: 41-49, 2017.
- Naphtali, P., Mohiuddin, M. M., Paschos, A., Schellhorn, H. E. Application of high-throughput 16S rRNA sequencing to identify fecal contamination sources and to complement the detection of fecal indicator bacteria in rural groundwater. *Journal of water and health* 17(3): 393-403, 2019.
- Ogorzaly, L., Bertrand, I., Paris, M., Maul, A., Gantzer, C. Occurrence, survival, and persistence of human adenoviruses and F-specific RNA phages in raw groundwater. *Appl. Environ. Microbiol.* 76(24): 8019-8025, 2010.
- Oliveira, J. M. D., Silva, S. H. G., Menezes, M. D. D., Kämpf, N., Curi, N. Land suitability for final waste disposal with emphasis on septic systems installation in southern Minas Gerais, Brazil. *Ciência e Agrotecnologia* 40(1): 37-45, 2016.
- Pachepsky, Y., Shelton, D., Dorner, S., Whelan, G. Can E. coli or thermotolerant coliform concentrations predict pathogen presence or prevalence in irrigation waters?. *Critical reviews in microbiology* 42(3): 384-393, 2016.
- Palla, A., Gnecco, I., Lanza, L. G., La Barbera, P. Performance analysis of domestic rainwater harvesting systems under various European climate zones. *Resources, Conservation and Recycling* 62: 71-80, 2012.
- Pandey, P. K., Kass, P. H., Soupir, M. L., Biswas, S., Singh, V. P. Contamination of water resources by pathogenic bacteria. *Amb Express* 4(1): 51, 2014.
- Pang, X., Qiu, Y., Gao, T., Zurawell, R., Neumann, N. F., Craik, S., Lee, B. E. Prevalence, levels and seasonal variations of human enteric viruses in six major rivers in Alberta, Canada. *Water research* 153: 349-356, 2019.
- Park, W. J., Park, B. J., Ahn, H. S., Lee, J. B., Park, S. Y., Song, C. S., ... Choi, I. S. Hepatitis E virus as an emerging zoonotic pathogen. *Journal of veterinary science* 17(1): 1-11, 2016.

- Peres, M. R., Ebdon, J., Purnell, S., Taylor, H. Potential microbial transmission pathways in rural communities using multiple alternative water sources in semi-arid Brazil. *International Journal of Hygiene and Environmental Health* 224: 2020.
- Phan, M. V., Anh, P. H., Cuong, N. V., Munnink, B. B. O., van der Hoek, L., My, P. T., ... Woolhouse, M. Unbiased whole-genome deep sequencing of human and porcine stool samples reveals circulation of multiple groups of rotaviruses and a putative zoonotic infection. *Virus evolution* 2(2): (2016).
- PNAD. Pesquisa nacional por amostra de domicílios 2013. IBGE. Rio de Janeiro, 2013.
- Ponterio, E., Gnessi, L. Adenovirus 36 and obesity: an overview. *Viruses* 7(7): 3719-3740, 2015.
- Prado, T., Miagostovich, M. P. Virologia ambiental e saneamento no Brasil: uma revisão narrativa. *Cadernos de Saúde Pública* 30: 1367-1378, 2014.
- Prevost, B., Goulet, M., Lucas, F. S., Joyeux, M., Moulin, L., Wurtzer, S. Viral persistence in surface and drinking water: Suitability of PCR pre-treatment with intercalating dyes. *Water research* 91: 68-76, 2016.
- Prez, V. E., Martínez, L. C., Victoria, M., Giordano, M. O., Masachessi, G., Ré, V. E., ... Nates, S. V. Tracking enteric viruses in green vegetables from central Argentina: potential association with viral contamination of irrigation waters. *Science of the Total Environment* 637: 665-671, 2018.
- Prüss-Ustün, A., Bartram, J., Clasen, T., Colford Jr, J. M., Cumming, O., Curtis, V., ... Freeman, M. C. Burden of disease from inadequate water, sanitation and hygiene in low- and middle-income settings: a retrospective analysis of data from 145 countries. *Tropical Medicine & International Health* 19(8): 894-905, 2014.
- Quamar, R., Jangam, C., Veligeti, J., Chintalapudi, P., Janipella, R. Assessment of On-site sanitation system on local groundwater regime in an alluvial aquifer. *Applied Water Science* 7(8): 4375-4386, 2017.
- Quamar, R., Janipella, R., Jangam, C., Balwant, P., Veligeti, J., Chintalapudi, P., Pujari, P. R. A case study of on-site sanitation system on the quality of groundwater in hard rock terrain of Coimbatore city. *Environment, Development and Sustainability* 21(4): 1999-2011, 2019.
- Radke, J. R., Cook, J. L. Human adenovirus infections: update and consideration of mechanisms of viral persistence. *Current opinion in infectious diseases* 31(3): 251, 2018.
- Ravindra, K., Mor, S., Pinnaka, V. L. Water uses, treatment, and sanitation practices in rural areas of Chandigarh and its relation with waterborne diseases. *Environmental Science and Pollution Research* 26(19): 19512-19522, 2019.
- Reddy, V. S., Nemerow, G. R. Structures and organization of adenovirus cement proteins provide insights into the role of capsid maturation in virus entry and infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 111(32): 11715-11720, 2014.

- Ribeiro, M. R., de Abreu, L. C., Laporta, G. Z. Drinking water and rural schools in the Western Amazon: an environmental intervention study. *PeerJ* 6: 2018.
- Robinson, C. M., Seto, D., Jones, M. S., Dyer, D. W., Chodosh, J. Molecular evolution of human species D adenoviruses. *Infection, Genetics and Evolution* 11(6): 1208-1217, 2011.
- Rodriguez-Lazaro, D., Cook, N., Ruggeri, F. M., Sellwood, J., Nasser, A., Nascimento, M. S. J., ... Bosch, A. Virus hazards from food, water and other contaminated environments. *FEMS microbiology reviews* 36(4): 786-814, 2012.
- Rojas, M., Dias, H. G., Gonçalves, J. L. S., Manchego, A., Rosadio, R., Pezo, D., Santos, N. Genetic diversity and zoonotic potential of rotavirus A strains in the southern Andean highlands, Peru. *Transboundary and emerging diseases* 66(4): 1718-1726, 2019.
- Roy, S., Calcedo, R., Medina-Jaszek, A., Keough, M., Peng, H., Wilson, J. M. Adenoviruses in lymphocytes of the human gastro-intestinal tract. *PloS one* 6(9): 2011.
- Sanaei Dashti, A., Ghahremani, P., Hashempoor, T., Karimi, A. Molecular epidemiology of enteric adenovirus gastroenteritis in under-five-year-old children in Iran. *Gastroenterology research and practice* 2016: 2016.
- Schijven, J. F., Hassanizadeh, S. M., de Roda Husman, A. M. Vulnerability of unconfined aquifers to virus contamination. *Water research* 44(4): 1170-1181, 2010.
- Shrestha, S., Haramoto, E., Malla, R., Nishida, K. Risk of diarrhoea from shallow groundwater contaminated with enteropathogens in the Kathmandu Valley, Nepal. *Journal of water and health* 13(1): 259-269, 2015.
- Sidhu, J. P. S., Toze, S., Hodggers, L., Barry, K., Page, D., Li, Y., Dillon, P. Pathogen decay during managed aquifer recharge at four sites with different geochemical characteristics and recharge water sources. *Journal of environmental quality* 44(5): 1402-1412, 2015.
- Silva, H. D., Wosnjuk, L. A., Santos, S. F., Vilanova-Costa, C. A., Pereira, F. C., Silveira-Lacerda, E. P., ... Anunciação, C. E. Molecular detection of adenoviruses in lakes and rivers of Goiânia, Goiás, Brazil. *Food and Environmental Virology* 2(1): 35-40, 2010.
- Silva, H. D., Fongaro, G., Garcíazapata, M. T., Melo, A. T., Silveira-Lacerda, E. P., de Faria, K. M., Anunciação, C. E. High species C human adenovirus genome copy numbers in the treated water supply of a neotropical area of the central-west region of Brazil. *Food and environmental virology* 7(3): 286-294, 2015.
- Smith, R. J., Jeffries, T. C., Roudnew, B., Fitch, A. J., Seymour, J. R., Delpin, M. W., ... Mitchell, J. G. Metagenomic comparison of microbial communities inhabiting confined and unconfined aquifer ecosystems. *Environmental microbiology* 14(1): 240-253, 2012.
- Spilki, F. R., Luz, R. B. D., Fabres, R. B., Soliman, M. C., Kluge, M., Fleck, J. D., ... Dasso, M. G. Detection of human adenovirus, rotavirus and enterovirus in water samples collected on dairy farms from Tenente Portela, Northwest of Rio Grande do Sul, Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology* 44(3): 953-957, 2013.

Spilki, F. R. Crise hídrica, saúde e parâmetros de qualidade microbiológica da água no Brasil. *Revista USP* (106): 71-78, 2015.

Sorensen, J. P. R., Sadhu, A., Sampath, G., Sugden, S., Gupta, S. D., Lapworth, D. J., ... Pedley, S. Are sanitation interventions a threat to drinking water supplies in rural India? An application of tryptophan-like fluorescence. *Water research* 88: 923-932, 2016.

Staggemeier, R., Bortoluzzi, M., da Silva Heck, T. M., da Luz, R. B., Fabres, R. B., Soliman, M. C., ... de Matos Almeida, S. E. Animal and human enteric viruses in water and sediment samples from dairy farms. *Agricultural Water Management* 152: 135-141, 2015.

Staggemeier, R., Heck, T. M., Demoliner, M., Ritzel, R. G., Röhnelt, N. M., Girardi, V., ... Spilki, F. R. Enteric viruses and adenovirus diversity in waters from 2016 Olympic venues. *Science of the Total Environment* 586: 304-312, 2017.

Suhogusoff, A. V., Hirata, R., Ferrari, L. C. K. Water quality and risk assessment of dug wells: a case study for a poor community in the city of São Paulo, Brazil. *Environmental earth sciences* 68(3): 899-910, 2013.

Summa, M., Henttonen, H., Maunula, L. Human noroviruses in the faeces of wild birds and rodents—new potential transmission routes. *Zoonoses and public health* 65(5): 512-518, 2018.

Tapparel, C., Siegrist, F., Petty, T. J., Kaiser, L. Picornavirus and enterovirus diversity with associated human diseases. *Infection, Genetics and Evolution* 14: 282-293, 2013.

Tedder, R. S., Ijaz, S., Kitchen, A., Ushiro-Lumb, I., Tettmar, K. I., Hewitt, P., Andrews, N. Hepatitis E risks: pigs or blood—that is the question. *Transfusion* 57(2): 267-272, 2017.

Tian, H., Zhang, Y., Shi, Y., Li, X., Sun, Q., Liu, L., ... Xu, B. Epidemiological and aetiological characteristics of hand, foot, and mouth disease in Shijiazhuang City, Hebei province, China, 2009-2012. *PloS one* 12(5): 2017.

Tiwari, S., Dhole, T. N. Assessment of enteroviruses from sewage water and clinical samples during eradication phase of polio in North India. *Virology journal* 15(1): 157, 2018.

Tonetti, A. L., Brasil, A., Madrid, F., Figueiredo, I., Schneider, J., Cruz, L., ... Magalhães, T. Tratamento de esgotos domésticos em comunidades isoladas: referencial para a escolha de soluções. *Biblioteca/Unicamp*. São Paulo, 2018.

Troeger, C., Forouzanfar, M., Rao, P. C., Khalil, I., Brown, A., Reiner Jr, R. C., ... Alemayohu, M. A. Estimates of global, regional, and national morbidity, mortality, and aetiologies of diarrhoeal diseases: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. *The Lancet Infectious Diseases* 17(9): 909-948, 2017.

Tsai, Y. L., Sobsey, M. D., Sangermano, L. R., Palmer, C. J. Simple method of concentrating enteroviruses and hepatitis A virus from sewage and ocean water for rapid detection by reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Appl. Environ. Microbiol.* 59(10): 3488-3491, 1993.

Uejio, C. K., Christenson, M., Moran, C., Gorelick, M. Drinking-water treatment, climate change, and childhood gastrointestinal illness projections for northern Wisconsin (USA) communities drinking untreated groundwater. *Hydrogeology Journal* 25(4): 969-979, 2017.

Usman, M. A., Gerber, N., von Braun, J. The impact of drinking water quality and sanitation on child health: Evidence from rural Ethiopia. *The Journal of Development Studies* 55(10): 2193-2211, 2019.

Van der Poel, W. H. Food and environmental routes of Hepatitis E virus transmission. *Current opinion in virology* 4: 91-96, 2014.

Vecchia, A. D., Fleck, J. D., Comerlato, J., Kluge, M., Bergamaschi, B., Da Silva, J. V. S., ... Zanin, J. G. First description of Adenovirus, Enterovirus, Rotavirus and Torque teno virus in water samples collected from the Arroio Dilúvio, Porto Alegre, Brazil. *Brazilian Journal of Biology* 72(2): 323-329, 2012.

Vecchia, A. D., Rigotto, C., Staggemeier, R., Soliman, M. C., De Souza, F. G., Henzel, A., ... Heinzelmann, L. S. Surface water quality in the Sinos River basin, in Southern Brazil: tracking microbiological contamination and correlation with physicochemical parameters. *Environmental Science and Pollution Research* 22(13): 9899-9911, 2015.

Verheyen, J., Timmen-Wego, M., Laudien, R., Boussaad, I., Sen, S., Koc, A., ... Pfister, H. Detection of adenoviruses and rotaviruses in drinking water sources used in rural areas of Benin, West Africa. *Appl. Environ. Microbiol* 75(9): 2798-2801, 2009.

Verma, A. K., Bhat, S., Sircar, S., Dhama, K., Malik, Y. S. Enteric viral zoonoses: counteracting through one health approach. *Journal of Experimental Biology and Agricultural Sciences* 6(1): 42-52, 2018.

Vetter, M. R., Staggemeier, R., Vecchia, A. D., Henzel, A., Rigotto, C., Spilki, F. R. Seasonal variation on the presence of adenoviruses in stools from non-diarrheic patients. *Brazilian Journal of Microbiology* 46(3): 749-752, 2015.

Waso, M., Ndlovu, T., Dobrowsky, P. H., Khan, S., Khan, W. Presence of microbial and chemical source tracking markers in roof-harvested rainwater and catchment systems for the detection of fecal contamination. *Environmental Science and Pollution Research* 23(17): 16987-17001, 2016.

Waso, M., Khan, S., Khan, W. Microbial source tracking markers associated with domestic rainwater harvesting systems: Correlation to indicator organisms. *Environmental research* 161: 446-455, 2018.

Wang, L. F., Cramer, G. Emerging zoonotic viral diseases. *Rev sci tech Off int Epiz* 33(569-81), 2014.

Wang, Y., Chen, Y., Zheng, X., Gui, C., Wei, Y. Spatio-temporal distribution of fecal indicators in three rivers of the Haihe River Basin, China. *Environmental Science and Pollution Research* 24(10): 9036-9047, 2017.

World Health Organization (WHO). Guidelines for drinking-water quality. Geneva, Switzerland, 2011.

World Health Organization (WHO); United Nations Children's Fund (UNICEF). Progress on drinking water, sanitation and hygiene: 2017 update and SDG baselines. 2017.

World Health Organization (WHO). Guidelines on sanitation and health. 2018.

Withers, P. J., Jordan, P., May, L., Jarvie, H. P., Deal, N. E. Do septic tank systems pose a hidden threat to water quality?. *Frontiers in Ecology and the Environment* 12(2): 123-130, 2014.

Wolf, S., Hewitt, J., Greening, G. E. Viral multiplex quantitative PCR assays for tracking sources of fecal contamination. *Appl. Environ. Microbiol.* 76(5): 1388-1394, 2010.

Wong, K., Fong, T. T., Bibby, K., Molina, M. Application of enteric viruses for fecal pollution source tracking in environmental waters. *Environment International* 45: 151-164, 2012.

Wu, X., Lu, X., Schneider, E., Ahmed, J. A., Njenga, M. K., Breiman, R. F., ... Erdman, D. D. Reassessment of high prevalence human adenovirus detections among residents of two refugee centers in Kenya under surveillance for acute respiratory infections. *Journal of medical virology* 91(3): 385-391, 2019.

Yezli, S., Otter, J. A. Minimum infective dose of the major human respiratory and enteric viruses transmitted through food and the environment. *Food and Environmental Virology* 3(1): 1-30, 2011.