



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

HUGO DELLEON DA SILVA

Detecção molecular e monitoramento sazonal de adenovírus em águas fluviais no município de Goiânia, Goiás-Brasil: correlação com parâmetros físico-químicos, bacteriológicos e Metanálise avaliativa de metodologias

Goiânia

2009

HUGO DELLEON DA SILVA

Detecção molecular e monitoramento sazonal de adenovírus em águas fluviais no município de Goiânia, Goiás-Brasil: correlação com parâmetros físico-químicos, bacteriológicos e Metanálise avaliativa de metodologias

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Goiás para obtenção do Título de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Marco Tulio Antonio García-Zapata

Co-orientador: Prof. Dr. Carlos Eduardo Anunciação

Goiânia

2009

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

Silva, Hugo Delleon da.
S586d Detecção molecular e monitoramento sazonal de adenovírus em águas fluviais no município de Goiânia, Goiás-Brasil [manuscrito]: correlação com parâmetros físico-químicos, bacteriológicos e metanálise avaliativa de metodologias / Hugo Delleon da Silva. – 2009.
163 f. : il., figs., tabs.

Orientadora: Prof. Dr. Marco Túlio Antonio García-Zapata; Co-Orientador: Prof. Dr. Carlos Eduardo Anunciação.

Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Goiás, 2009.

Bibliografia.

Inclui lista de figuras, tabelas, siglas e abreviaturas.

Anexos.

1. Adenovírus 2. Águas Fluviais – Goiânia 3. Metanálise Avaliativa I. García-Zapata, Marco Túlio Antonio II. Anunciação, Carlos Eduardo III. Universidade Federal de Goiás. **Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde** IV. Título.

CDU: 578.823:556.53(817.3)

BANCA EXAMINADORA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Aluno: HUGO DELLEON DA SILVA

Orientador: Dr. MARCO TULIO ANTONIO GARCÍA-ZAPATA

Co-Orientador: Dr. CARLOS EDUARDO ANUNCIÇÃO

Membros:

1. Dr. MARCO TULIO ANTONIO GARCÍA-ZAPATA

2. Dr. ELISÂNGELA DE PAULA SILVEIRA LACERDA

3. Dr. EDSON SIDIÃO DE SOUZA JÚNIOR

OU

4. Dra. TALISSA DE MORAES TAVARES MIRANDA

5. Dr. JOSÉ DANIEL GONÇALVES VIEIRA

Data: 27/05/2009

Dedico este trabalho...

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

Ao meu pai, homem de fibra, exemplo de hombridade e dedicação, obrigado pelo apoio, não foi fácil, mas sempre que precisei o senhor estava ao meu lado.

Aos meus irmãos Douglas e Maycon, pelo incentivo, cooperação e apoio.

Em especial, à minha avó Maria Rosa que sempre me incentivou.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus por mais esta etapa de aprendizagem em minha vida, mas acima de tudo, agradeço por sempre ter-me colocado no caminho certo, por nunca me deixar esmorecer em meio às adversidades.

Ao meu Orientador Prof. Dr. Marco Túlio Antonio García-Zapata, exemplo de pesquisador a ser seguido, a quem dedico admiração e respeito. Com poucas, mas sábias palavras me ensinou grandes lições sobre a conduta profissional e pessoal.

Ao meu Co-Orientador Prof. Dr. Carlos Eduardo, a quem tenho profunda admiração, respeito e grande carinho. Muito do que sou, devo ao senhor, obrigado por estar sempre presente, e o mais importante, obrigado por acreditar!

À Profa Dra. Elisângela Lacerda, por ceder as dependências do LGMC oferecendo subsídios para a realização desta pesquisa. Obrigado pelo apoio e incentivo!

Aos Professores Dr. Carlos Estrela e Dr. Cláudio Leles pelo auxílio na elaboração da Metanálise, e em especial ao Msc. Daniel Decurcio.

À Profa. Dra. Célia Barardi do Laboratório de Virologia Aplicada da Universidade Federal de Santa Catarina, que gentilmente nos cedeu amostras de células infectadas com adenovírus.

A toda equipe do Laboratório de Genética Molecular e Citogenética, em especial ao César, Aliny, Alessandra e Flávia, obrigado pela confiança, auxílio durante o Mestrado e acima de tudo, pela amizade.

Aos estagiários e colegas Murilo, Camila e Dayane, que me auxiliaram em partes da pesquisa.

Aos funcionários da Universidade: Valdecina Quirino, secretária da Pós-graduação em Ciências da Saúde; Márcia Calil, bibliotecária da sessão de periódicos da BC e em especial à Ruth Batista do EAD em Biologia.

A toda equipe do EAD pela compreensão durante as etapas finais do Mestrado, em especial: Sandra, Walniscléia, Fernanda e Luciano, meu muito obrigado!

Às Instituições parceiras da pesquisa: equipe técnica da SEMARH, em especial ao Eurivan e ao Rodrigo; equipe técnica da SANEAGO, em especial a Mara e equipe técnica da AMMA, em especial a Bióloga Georgia Sant'ana.

À Inara, que sempre me aturou, como eu também a ela! Obrigado pelo auxílio, incentivo, momentos de desabafos e muitos outros, te adoro sua maluquinha!

À Sônia, que sempre esteve comigo durante toda essa caminhada, obrigado pelas dicas, pela confiança e apoio constante, minha grande amiga!

Aos meus amigos do curso de Biologia, em especial a Georgia Lay-Ang, minha irmãzinha do coração e a Ellen Serrão, que mesmo longe, está sempre presente!

Aos meus avôs: Petrolina, José, Maria e João. Não há pedaço de papel suficiente para expressar o meu carinho e gratidão.

A toda a minha família pelo incentivo.

*"O único lugar onde **sucesso** vem antes de **trabalho** é no dicionário."
(Albert Einstein)*

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA.....	iv
AGRADECIMENTOS	v
LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE TABELAS	x
LISTA DE ANEXOS	xi
SIGLAS E ABREVIATURAS	xii
RESUMO.....	xiv
ABSTRACT	xv
1 INTRODUÇÃO	1
2 OBJETIVOS	8
2.1 OBJETIVO GERAL	8
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	8
3 MÉTODOS	9
3.1 LOCAL E INSTALAÇÕES	9
3.2 PARTE EXPERIMENTAL.....	13
3.2.1. Pontos de Coleta.....	13
3.2.2 Coleta e Processamento das Amostras de Água.....	16
3.2.3 Coleta da Ictiofauna	18
3.2.4 Análise físico-química e Bacteriológica.....	19
3.2.5 Extração do DNA	20
3.2.6 Diagnóstico Molecular	21
3.2.7 Obtenção do Controle Positivo para adenovírus.....	22
3.2.8 Análise Estatística.....	23
3.3 METANÁLISE	23
3.3.1 Definições	24
3.3.2 Hipóteses	24
3.3.3 Pesquisa em Bases de Dados	25
3.3.4 Coleta e análise dos dados.....	25
4 PUBLICAÇÕES.....	28
Artigo 01.....	29
Artigo 02.....	52
Artigo 03.....	63

5 CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS	82
5.1 CONCLUSÕES	82
5.2 CONSIDERAÇÕES FINAIS / RECOMENDAÇÕES	82
6. REFERÊNCIAS.....	85
ANEXOS	93

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Localização da cidade de Goiânia e do Estado de Goiás no contexto mundial.....	10
Figura 2 - Fluxograma abordando instituições parceiras e as metodologias empregadas durante a realização do monitoramento de adenovírus, como também da Metanálise.....	12
Figura 3 - Imagem satélite obtida através do software Google Earth/2007 da área do Parque Vaca Brava	14
Figura 4 - Imagem satélite obtida através do software Google Earth/2007 mostrando os dois lagos principais, a vegetação e o perímetro urbano circundante ao Bosque dos Buritis.....	15
Figura 5 - Imagem satélite obtida através do software Google Earth/2009 mostrando o Rio João Leite na captação pela empresa SANEAGO (ETA Jaime Câmara)	16
Figura 6 - Imagem satélite obtida através do software Google Earth/2009 mostrando os pontos MP1 e MP2	17
Figura 7 - Imagem satélite obtida através do software Google Earth/2009 mostrando a Estação de Tratamento de Água Jaime Câmara.....	18
Figura 8 - Fluxograma esquemático do delineamento da metanálise	26

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Quantidade de ícteos coletados em cada ponto de coleta, durante o período de dezembro/2007 a julho/2008.....	19
Tabela 2 - Testes Físico-químicos e bacteriológico realizados durante o estudo juntamente com indicação do volume máximo aceitável por Legislação específica. 21	
Tabela 3 - Iniciadores utilizados na PCR e semi-Nested PCR.....	22

LISTA DE ANEXOS

Anexo A – Parecer do Comitê de Ética	93
Anexo B – Autorização Sisbio/IBAMA	94
Anexo C – Autorização SEMMA (09/03/2007)	97
Anexo D - Autorização AMMA (18/10/2007).....	98
Anexo E – Parecer técnico AMMA (05/03/2008).....	100
Anexo F - Declaração de Apoio à Pesquisa pela Saneago/Go	102
Anexo G – Normas para Publicação na Revista de Patologia Tropical.....	103
Anexo H - Normas para Publicação Food and Environmental Virology	105
Anexo I - Normas para Publicação Journal of Applied Microbiology	111
Anexo J – Lago do Parque Vaca Brava	121
Anexo K – Lago do Bosque dos Buritis	122
Anexo L – Bacia Hidrográfica do Ribeirão João Leite (com indicação do local de coleta (capitação da água pela SANEAGO).....	123
Anexo M – Bacia do Ribeirão João Leite focalizando atividade agrícola	124
Anexo N – Despejo de esgoto clandestino no Rio Meia Ponte	125
Anexo O – Coleta de água em Lago	126
Anexo P – Metodologia de pré-filtração (A) e filtração à vácuo em membrana Hybond (B) – (ver setas).....	127
Anexo Q – Fotografia de Gel agarose corado com brometo de etídeo mostrando fragmento amplificado pela PCR (A) e Nested-PCR(B)	128
Anexo R – Coleta e transporte de Ícteos.....	129
Anexo S – Laudos físico-químicos e bacteriológica da água tratada pela Saneago/Go	130
Anexo T – Laudos físico-químicos e bacteriológicos de Rios e Lagos emitidos pela SEMARH/GO	138
Anexo U – Formulário do Teste de Relevância I.....	143
Anexo V – Formulário do Teste de Relevância II	144
Anexo W – Formulário de coleta dos dados da Revisão Sistemática	145
Anexo X – Resolução Conama 357, de 17 de Março de 2005.....	147
Anexo Y – Laudos Meteorologicos/Escola de Agronomia – UFG	156

SIGLAS E ABREVIATURAS

Ad5	Adenovírus Humano 5
Advs	Adenovírus
AMBAR	Milibar(es) Unidade de Pressão
AMMA	Agência Municipal de Meio Ambiente
BB	Bosque dos Buritis
CEPMHA	Comitê de Ética em Pesquisas Humanas e Animais
dATP	Desoxiadenosina 5'-trifosfato
DBO	Demanda Bioquímica de Oxigênio
dCTP	Desoxicitidina 5'-trifosfato
dGTP	Desoxiguanosina 5'-trifosfato
dTTP	Desoxitimidina 5'-trifosfato
DQO	Demanda Química de Oxigênio
DNA	Ácido desoxirribonucléico
dNTP	Desoxiribonucleotídeo
ETA	Estação de Tratamento de Água
ETE	Estação de Tratamento de Esgoto
EUA	Estados Unidos da América
HC	Hospital das Clínicas
Hep-2	Células Epiteliais Humanas de Orofaringe
ICB	Instituto de Ciências Biológicas
IBAMA	Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis
IPTSP	Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública
JL	Rio João Leite
LDGM	Laboratório de Diagnósticos Genético e Molecular
LGMC	Laboratório de Genética Molecular e Citogenética
mM	Milimolar
MP1	Ponto de coleta no Rio Meia Ponte à montante da ETE/Goiânia, após despejo de esgoto tratado no município de Goiânia
OD	Oxigênio Dissolvido
NUPEREME	Núcleo de Pesquisas em Agentes Emergentes e Re-emergentes
PCR	Reação em Cadeia de Polimerase
Pt/L	Miligramas de platina por Litro
qPCR	PCR quantitativa (Real time PCR)
rpm	Rotações por minuto
SEMARH	Secretaria do Meio Ambiente e dos Recursos Hídricos do Estado de Goiás
SEMMA	Secretaria Municipal do Meio Ambiente-Goiânia
SANEAGO	Saneamento de Goiás/SA

Sisbio	Sistema de Autorização em Informações em Biodiversidade
TE	Tris-EDTA (Ethylenediamine Tetraacetic Acid; buffered solution)
UFC	Unidade formadora de colônia
UFG	Universidade Federal de Goiás
UNT	Unidade Nefelométrica de Turbidez
USA	United States of America
UV	Ultra Violeta
VB	Vaca Brava
WHO	World Health Organization
%	Porcentagem

RESUMO

Embora a água seja de vital importância para os seres vivos, em decorrência da ação antrópica torna-se meio de disseminação de inúmeros microrganismos, que chegam aos ambientes aquáticos por meio das fezes do homem e de outros animais, podendo desencadear diversas doenças, sobretudo em indivíduos imunocomprometidos. Em rotina de monitoramento ambiental, normalmente são utilizadas bactérias do grupo dos coliformes fecais como parâmetro microbiológico de qualidade das águas, o que não evidencia sua contaminação por vírus. Alguns pesquisadores têm proposto a detecção de adenovírus (AdVs) por PCR como indexação no monitoramento de outros vírus entéricos. AdVs estão entre os mais persistentes e ubíquos vírus entéricos presentes em águas e associados com uma variedade de manifestações clínicas. Objetivou-se avaliar a qualidade da água de rios e lagos da cidade de Goiânia em relação à ocorrência de AdVs. Amostras de água foram coletadas mensalmente, entre dezembro de 2007 e novembro de 2008, em cinco diferentes pontos de Goiânia (lagos do Bosque dos Buritis e parque Vaca Brava e rios João Leite e Meia Ponte a jusante e montante da estação de tratamento de esgoto municipal). As análises laboratoriais foram realizadas pelo Laboratório de Diagnóstico Genético e Molecular e Laboratório de Genética Molecular e Citogenética, Universidade Federal de Goiás. Inicialmente, as amostras foram filtradas em membrana de nylon carregada positivamente e, em seguida, submetidas a detecção molecular por PCR e semi-nested PCR. Também foram realizados testes físico-químicos e bacteriológicos para correlacionar estes resultados com a ocorrência de AdVs. Concomitantemente, o Núcleo de Pesquisas em Agentes Emergentes e Re-emergentes conduziu uma metanálise avaliativa de três metodologias de concentração de AdVs acopladas à detecção molecular em amostras de águas não tratadas. Das 54 amostras coletadas, 29 foram positivas para AdVs (39,2%), sugerindo o uso da metodologia proposta neste estudo para detectar estes patógenos em água. Foi observada diferença estatisticamente significativa entre nitritos, fosfatos, resíduos fixos, resíduos totais e a ocorrência de AdVs, mas não foi observada correlação entre coliformes fecais e AdVs. Além disso, a ocorrência de AdVs no estado de Goiás exibiu tendência à sazonalidade. Na metanálise, a partir dos 33 artigos selecionados foi possível fazer as seguintes interpretações: para detectar AdVs em amostras de rios ou lagos, o método mais eficiente foi a ultracentrifugação em combinação com nested-PCR; para a detecção de AdVs em amostras de esgoto tratado e não tratado é aconselhável utilizar uma combinação de microfiltração em membrana e ultrafiltração com subsequente diagnóstico por qPCR. Este foi o primeiro estudo a detectar e monitorar AdVs em cursos de água na Região Centro-Oeste do Brasil e os presentes resultados podem ser úteis para propor o perfil eco-epidemiológico dos AdVs ou até mesmo das rotas de algumas doenças que são negligenciadas, o que demonstra a necessidade de definir um indicador viral.

Palavras-chave: adenovirus; água não tratada; Nested-PCR; Metanálise.

ABSTRACT

Although water is of vital importance for living beings, due to antropic action it becomes a way of dissemination of several microorganisms, which reach aquatic environments through the faeces of man and other animals and can cause several illnesses, especially for immunocompromised individuals. During routine environmental monitoring, coliform bacteria are normally used as a microbiological parameter of water quality, which does not evidence its contamination by viruses. Several researchers have proposed the detection of adenovirus (AdVs) by PCR as a molecular index to monitor other enteric viruses. AdVs are among the most persistent and ubiquitous enteric viruses present in water and associated with a variety of clinical manifestations. This study aimed to evaluate the quality of water collected from lakes and rivers in Goiânia as to the occurrence of AdVs. Water samples were collected monthly, from December 2007 to November 2008, at five different points in Goiânia (lakes of Bosque dos Buritis and Vaca Brava park, João Leite and Meia Ponte rivers downstream and upstream the municipal sewage treatment plant). The analyses were carried out at the Laboratório de Diagnóstico Genético e Molecular and Laboratório de Genética Molecular e Citogenética, Universidade Federal de Goiás. All the samples were filtered in a positively-charged nylon membrane followed by molecular detection using PCR and semi-nested PCR. Also, we performed physical-chemical and bacteriological tests to correlate these results with the occurrence of AdVs. Simultaneously, the Núcleo de Pesquisas em Agentes Emergentes e Re-emergentes carried out a meta-analysis to evaluate three methods of concentration of AdVs coupled to molecular detection in samples of untreated water. Since 29 out of the 54 water samples collected were positive for AdVs (39.2%), our results suggest the use of the methodology proposed in the present study for the detection of these pathogens in water. We observed statistically significant difference between nitrites, phosphates, fixed residues, total residues and the occurrence of AdVs, whereas no correlation was observed between fecal coliforms and AdVs. Furthermore, the occurrence of AdVs in the state of Goiás shows a seasonal trend. Based on the 33 studies selected for the meta-analysis, it was possible to get to the following interpretations: the most effective method to detect AdVs in samples from rivers or lakes was ultracentrifugation combined with nested-PCR; it is advisable to use a combination of microfiltration membrane and ultrafugation with the subsequent diagnosis using qPCR to detect AdVs in samples of treated and untreated sewage. This has been the first study carried out for the detection and monitoring of AdVs in water bodies in the Midwestern Region of Brazil and the present results may be useful to propose the eco-epidemiological profile of AdVs or even the routes of some neglected diseases, which points out the need to define a virus indicator.

Keywords: adenovirus; untreated water; PCR; meta-analysis.

1 INTRODUÇÃO

A água é um bem indispensável para o desenvolvimento dos seres vivos. É a substância mais abundante das células, responsável por quase 70% do peso celular, sendo que, a maioria das reações intracelulares ocorre em um meio aquoso (ALBERTS et al., 1997, p. 41). Apesar desta importância vital, infelizmente o que se tem observado é uma considerável depreciação na qualidade da água pelo mundo. Fato justificável pelo aumento da população urbana no final do século passado, acarretando um expressivo acréscimo no número de fontes poluidoras, e evidentemente, da população de microrganismos entéricos patogênicos.

Dentre estes microrganismos, uma atenção especial deve ser dada aos vírus entéricos. Estes são importantes patógenos que geralmente são disseminados ao meio ambiente através da rota fecal-oral (CHAPRON et al., 2000; JIANG et al., 2001). Nos países industrializados estes patógenos virais são os principais causadores das gastroenterites (LOPMAN et al., 2003).

Até o momento, foram identificados mais de 140 tipos diferentes de vírus no trato gastrointestinal de humanos infectados, e que podem ser encontrados em águas (HURST, 1991, p. 113). A presença destes vírus em águas é um sério problema de saúde pública em muitos países (CHEN et al., 2006). A ingestão de partículas, mesmo em baixas concentrações pode acarretar diversos agravos à saúde (WARD; AKIN, 1984). A ingestão de partículas, mesmo em baixas concentrações, representa riscos potenciais à saúde humana, pois uma a dez unidades são suficientes para desencadear infecção (TAVARES et al., 2005).

Outro aspecto preocupante é que os métodos tradicionais de tratamento de água não são totalmente eficientes para eliminar vírus, como afirma Koopmans (2002). Isto acontece pelo reduzido tamanho e estrutura do capsídeo viral, que confere a passagem destes patógenos pelos sistemas de filtros de areia utilizados nas estações de tratamento de água e pela resistência à cloração. Assim como os microsporídios, protozoários esporuláveis de difícil remoção por filtração, sua remoção e/ou inativação requer o uso de luz ultravioleta no reator, metodologia onerosa, que é disponível apenas em alguns países desenvolvidos, e nem sempre tem ação efetiva sob todos os agentes virais, já que muitos são altamente resistentes ao tratamento com UV. (MAMANE-GRAVETZ; LINDEN, 2004).

Indicadores empregados para avaliar a qualidade da água têm sido itens de controvérsia a mais de 50 anos (ROSE, et al., 2006). As bactérias geralmente são utilizadas como microrganismos indicadores no monitoramento microbiológico da água (HSU, et al., 2007), para tal, normalmente se utilizam às bactérias heterotróficas e coliformes (LEE; KIM, 2002). Todavia, Os métodos tradicionais de detecção de coliformes fecais e *Escherichia coli* tem um valor preditivo limitado para avaliar a ocorrência por vírus entéricos (GUYADER et al. 2000 *apud* RIGOTTO et al., 2005), de forma que se pode apenas subestimar em relação à presença de vírus e demais microrganismos patogênicos.

Alguns estudos indicam que não há associação entre a presença de certos vírus encontrados no meio ambiente e indicadores bacterianos (GRABOW et al., 2001; ROSE, et al., 2006; HSU et al., 2007). As diferenças nas propriedades físicas e químicas entre vírus e bactérias podem explicar a menor sobrevivência de coliformes termotolerantes em águas onde os vírus ainda persistem (FATTAL et al., 1983). Entretanto, em outros estudos já foram encontradas correlações qualitativas significativas entre coliformes fecais, incluindo *E. coli* e outros vírus entéricos (KITIGUL et al., 2001).

Considerando que são recentes os estudos de vírus em amostras ambientais, mais investigações são necessárias para correlacionar com segurança esses patógenos com demais microrganismos indicadores e mesmo com os atuais parâmetros físico-químicos de análise da qualidade das águas, analisando as possíveis implicações destas correlações e, procurando mecanismos adequados para monitorar, controlar e mesmo sanar apropriadamente os corpos d'águas poluídos.

Várias metodologias têm sido descritas para a análise viral em água, que de forma sistematizada é fundamentada duas etapas: (1) concentração e (2) detecção viral.

O método de concentração objetiva recuperar o maior número possível de partículas virais ou mesmo reter material genético em suspensão. Como o número de partículas virais em água geralmente é escasso (SOULE et al., 2000; CHEN et al., 2006), torna-se necessário a utilização de amostras volumosas para concentrar satisfatoriamente estes patógenos. Desta forma, a concentração é uma etapa crítica, trabalhosa e onerosa (TAVARES et al., 2005).

Muitas técnicas têm sido utilizadas para concentrar vírus em ambientes aquáticos. Como exemplos têm sido utilizados a ultrafiltração (SOULE et al., 2000;

RAJAL et al., 2007), separação imunomagnética (MYRMEL et al., 2000), floculação (KOPECKA et al., 1993), precipitação com polietilenoglicol (ROHAYEM et al., 2006); ultracentrifugação (FORMIGA-CRUZ et al., 2005), e mais comumente a filtração através de micromembranas (microfiltração) polarizadas ou não (KARAMOTO et al., 2005; CHEONGHOON and KIM, 2008). Não há método padrão e, em muitas ocasiões mais de uma dessas metodologias podem ser utilizadas em associação para concentrar vírus em água. Na literatura, têm sido observados bons resultados de concentração viral utilizando tanto membranas carregadas positivamente quanto negativamente (HSU, et al., 2007; GASSILLOUD et al., 2007), contudo, há diferenças relevantes quanto à utilização das membranas.

Membranas eletronegativas normalmente requerem tratamento prévio da água para facilitar a interação entre os vírus e a superfície negativa do material (LUKASIK et al., 2000). Tratamentos prévios podem incluir adição de sais catiônicos, como o cloreto de magnésio. A adição de sais catiônicos faz com que a carga das partículas virais, naturalmente negativa, se torne positiva, criando complexos (vírus/sal) que maximizam a interação eletrostática entre os vírus e as membranas polarizadas negativamente (CHEN et al., 2006).

Em membranas carregadas positivamente, normalmente não há necessidade deste prévio tratamento, todavia, o pH deve ser controlado, pois pode interferir na interação entre vírus e membrana eletropositiva, usualmente utiliza-se pH entre 7,0 a 7,5 (XAGORARAKI et al., 2007).

Na técnica de ultrafiltração as membranas retêm macromoléculas e partículas, pois os diâmetros variam entre 10 e 200 Å, incluindo os vírus em suspensão.

Posterior a filtração, um novo procedimento é necessário para liberar os vírus da membrana filtrante, usualmente a membrana é eluída com uma solução de pH controlado contendo algum detergente em sua constituição.

Normalmente, dois métodos são utilizados para identificar vírus a partir do concentrado (material retido na membrana): cultura celular e/ou diagnóstico molecular.

As culturas celulares são metodologias de rotina empregadas no isolamento viral. Contudo, esta metodologia apresenta a desvantagem de ser trabalhosa (HOT et al., 2003; FORMIGA-CRUZ, et al., 2005), onerosa (FORMIGA-CRUZ, et al., 2005), e de baixa especificidade (HOT et al., 2003). Além disso, alguns grupos virais são fastidiosos (incluindo os sorotipos 40 e 41 de adenovírus), não produzindo claro e

consistente efeito citopático (KO et al., 2005). Em amostras ambientais, devido ao alto nível de poluição, é praticamente impossível evitar que substâncias do meio interfiram nos meios de crescimento da cultura celular, produzindo falsos resultados em relação aos efeitos citopáticos. Ademais, é necessária a utilização de uma segunda metodologia acoplada à cultura celular para realizar identificação viral específica. Dentre estas se destacam os métodos imunológicos, como imunofluorescência e imunoperoxidase (MEHNERT et al., 1999), quimioluminescência, e métodos moleculares como a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) (GREENING et al., 2002).

Com o advento da biologia molecular a partir da década de 90, e a incorporação de novas metodologias que agregam maior especificidade e sensibilidade, como a PCR, vem sendo crescente o aumento no número de investigações na área da virologia aquática (TSAI et al., 1994; CASTINGNOLLES et al., 1998; SOULE et al., 1999; LEE, S-H; KIM, J-S, 2002; FOUT et al., 2003; FORMIGA-CRUZ et al., 2005; KARAMOKO et al., 2005; ROSE, et al., 2006).

Técnicas moleculares como a PCR fornecem maior especificidade, sensibilidade e rápida detecção de patógenos virais em amostras ambientais (RIGOTTO et al., 2005). Porém, em rotina laboratorial, o seu uso em amostras aquáticas pode ser limitado, devido à presença de inibidores da polimerase, derivados sobretudo de fezes humanas ou de outros animais, como hemoglobinas fecais ou compostos fenólicos dispersos no meio-ambiente. Alguns métodos têm sido desenvolvidos para sobrepor estes obstáculos, dentre eles, Nested-PCR (utilização de um segundo par de iniciadores flanqueando uma região previamente amplificada pela primeira PCR) tem sido proposta para assegurar detecção específica, eliminar falso-negativo, e para incrementar a reação (RIGOTTO et al., 2005). Nested-PCR possui maior nível de sensibilidade, permitindo a detecção de um menor número de partículas virais nas amostras (PUIG et al., 1994), além de ter a vantagem de concentrar menor quantidade de inibidores da PCR (RIGOTTO et al., 2005).

Recentemente, vem sendo utilizado a metodologia do Real time PCR ou reação em cadeia da polimerase quantitativa em cadeia em tempo real (Q-PCR/qPCR) em estudos de virologia aquática (BOFILL-MAS et al., 2006; XAGORARAKI, et al., 2007; HARAMOTO et al., 2007). A qPCR é uma variação da PCR pela utilização de fluoróforos, em que simultaneamente amplifica, quantifica e mesmo analisa a expressão gênica.

Dentre os vírus entéricos, os enterovírus e adenovírus, são conhecidos por serem prevalentes em esgotos e águas poluídas (VANTARAKIS; PAPAPETROPOULOU, 1998), sendo sugeridos por muitos autores como indicadores de contaminação viral (PINA et al., 1998).

O presente estudo é focado na detecção e no monitoramento de adenovírus, sendo escolhido este vírus devido a sua importância epidemiológica e por ser constituído de DNA fita dupla. Esta constituição do genoma permite que se empregue uma PCR convencional na detecção dos vírus, diminuindo etapas e custos com a utilização de enzimas, já que outros vírus entéricos de importância médico-sanitária possuem RNA como material genético, sendo necessária a utilização de enzimas que convertam RNA em DNA para a visualização do material genético amplificado. Amparados pela constituição genética, esses vírus são prevalentes em diversos ambientes e resistentes a diversos tratamentos de desinfecção, como o cloro e radiação UV (GERBA et al., 2002).

Os adenovírus são responsáveis por uma série de enfermidades, desde resfriados comuns, faringites, gastroenterites, amidalites e encefalites, podendo ser letais as infecções ocasionadas em pacientes de alto risco, como imunossuprimidos e crianças (PODDAR, 1999).

Os adenovírus são vírus não envelopados, de simetria icosaédrica, medindo cerca de 70 nm. Classificados na família *Adenoviridae*, que contém quatro gêneros: *Mastadenovirus*, que inclui os vírus de mamíferos; *Aviadenovirus*, de vírus de aves; *Atadenovirus*, que inclui alguns adenovírus de bovinos, ovinos, marsupiais e patos; e *Siadenovirus*, que inclui Adenovírus de peru e sapo (TRABULSI; ALTERTHUM, 2004, p. 587).

O gênero *Mastadenovirus* é formado por mais de 90 sorotipos, entre os quais 51 sorotipos humanos classificados em seis espécies (anteriormente denominados gênero) de A a F (BENKÖ; HARRACH; RUSSELL, 1999). Os Adenovírus sorotipos 40 e 41 (espécie F) são os principais sorotipos associados à gastroenterite infantil (UHNOO et al., 1984; BRANDT et al., 1985; DE JONG et al., 1993), sendo os que representam maior importância médico-sanitária para esta doença.

Excretados através de fezes humanas ou urina, os adenovírus são os vírus mais abundantes em esgotos (METCALF, et al., 1995). Em pessoas contaminadas o número de partículas virais excretas pelas fezes pode chegar a 10^{11} partículas por grama de fezes (CHAMPSAUR, H. 1989 *apud* CASTIGNOLLES et al., 1998, p.135).

Muitos trabalhos já confirmaram a presença de adenovírus em água tratada (LEE and KIM, 2002; KARAMOKO et al., 2005) e não tratada (FORMIGA-CRUZ et al., 2005; KAYAYAMA et al., 2008). Contudo, há poucos estudos que incluem a detecção e o monitoramento sazonal destes patógenos em água.

Alguns pesquisadores têm também utilizado técnicas moleculares para a detecção de vírus entéricos em moluscos (RIGOTTO, et al., 2005; FORMIGA-CRUZ, et al., 2005; ROSE, et al., 2006, HERNROTH; ALLARD, 2007). Os moluscos aquáticos são geralmente organismos filtradores, que podem acumular/concentrar os vírus que estão presentes no meio em seus tecidos, além disso, alguns moluscos são tidos como bioindicadores. Através destes estudos prévios, é de se esperar que os adenovírus também possam ser encontrados em peixes filtradores, embora não haja trabalhos na literatura que busquem a presença destes patógenos na ictiofauna fluvial.

Possivelmente, nos países pobres e em desenvolvimento, onde é notória a precariedade das condições de saneamento básico, é muito provável que os índices de infestações por vírus entéricos sejam maiores do que os índices estabelecidos por países desenvolvidos, já que em países desenvolvidos, as pesquisas de detecção de vírus em águas encontram-se bem adiantadas. Indicando microrganismos como os adenovírus como bons indicadores de contaminação ambiental (PINA, et al., 1998; CASTINGNOLLES et al., 1998).

No Brasil, pesquisas na área de virologia ambiental ainda são inexpressivas, e concentram-se principalmente nas regiões Sul e Sudeste. Todavia, vem sendo crescente a formação de grupos de pesquisas preocupados com a qualidade virológica da água em outras áreas do país.

Em Goiânia, capital do estado de Goiás, foi realizado levantamento microbiológico das águas dos principais rios e lagos do município entre os anos de 2004-2007 (dados não publicados), onde foi constatado um elevado índice de infestação por *Helicobacter pylori* (SANTANA, JÚNIOR, Carlos Alberto Soares, 2005) e larvas de vida livre e protozoários como *Cryptosporidium* sp e *Giardia* sp (SANTOS, SÔNIA DE FÁTIMA OLIVEIRA, 2008). Isto indica a possibilidade da presença de outros microrganismos patogênicos de relevância nas águas fluviais, principalmente das utilizadas como captação para uso humano. Dessa forma, há a necessidade de se fazer um levantamento microbiológico ambiental de outros microrganismos de relevância em saúde pública, dentre estes de adenovírus.

Considerando que o adenovirus é um dos mais importantes patógenos de origem humana presentes em águas poluídas (FONG et al., 2005), devido a sua alta prevalência em água, o monitoramento destes pode ser útil para mensurar contaminação fecal humana e atestar a qualidade microbiológica da água (LEE; C.; Kim, S-G., 2008).

O monitoramento destes patógenos vai ao encontro às propostas inspiradas em movimentos internacionais, como o modelo das cidades saudáveis da WHO (1987). Esse modelo apresenta como ponto de convergência a abordagem de doenças e agravos pautada na epidemiologia social, ou seja, voltado para o completo bem estar-populacional.

Assim, a detecção destes vírus em águas goianas permitirá uma melhor definição das políticas de saúde e de saneamento público, uma vez que outras doenças virais, também potencialmente veiculadas por água e até as de rotas desconhecidas poderão ser identificadas e estudadas adequadamente. Ademais, a metodologia proposta poderá ser utilizada pelas estações de tratamento de esgoto (ETEs) e de água de Goiás (ETA-SANEAGO), ou por outras empresas de saneamento no Brasil e, até mesmo em outros países para realizar o monitoramento virológico de águas destinadas ao abastecimento público.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

- ✓ Avaliar a qualidade das águas dos principais rios e lagos da cidade de Goiânia-Goiás em relação à ocorrência de adenovírus.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Utilizar técnicas moleculares para detectar adenovírus em águas recreacionais e de abastecimento público da cidade de Goiânia;
- ✓ Monitorar sazonalmente a ocorrência de adenovírus em rios e lagos recreacionais e de abastecimento público da cidade de Goiânia;
- ✓ Correlacionar a ocorrência de adenovírus com tradicionais metodologias de análise físico-química e bacteriológica utilizados para atestar a qualidade das águas;
- ✓ Avaliar via metanálise a efetividade da utilização de metodologias de concentração viral em associação com metodologias de detecção molecular para diagnosticar adenovírus em águas não tratadas.

3 MÉTODOS

O presente estudo contou com a aprovação do Comitê de Ética em Pesquisas Humanas e Animais do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Goiás, sendo realizado de Dezembro de 2007 a Novembro de 2008. Além da autorização federal Sisbio/IBAMA nº12694-1 para coleta e transporte de ícteos durante a vigência do estudo e autorização a nível municipal concedida pela Agência Municipal do Meio Ambiental para a coleta dos ícteos nos lagos monitorados.

O estudo conta com dois eixos temáticos distintos: a parte experimental (1), em que foi realizado a detecção e o monitoramento sazonal de adenovírus em águas destinadas ao uso e consumo humano na cidade de Goiânia (Figura 1), e a parte essencialmente teórica, através de Metanálise (2), em que foi realizado um estudo quantitativo para avaliar a efetividade de metodologias empregadas para concentrar adenovírus em amostras de águas ambientais.

3.1 LOCAL E INSTALAÇÕES

Núcleo de Pesquisas em Agentes Emergentes e Re-Emergentes/UFG (NUPEREME/UFG): está a cargo da coordenação geral do Projeto, sendo incumbido da liberação e divulgação dos dados perante a comunidade científica, autoridades sanitárias e comunidade em geral. Com este propósito o NUPEREME se compromete a publicar os dados em revistas e jornais especializados, assim como fornecer apoio técnico-científico em estudos relacionados com doenças emergentes e re-emergentes de interesse médico-sanitário. No presente estudo, a equipe pesquisadora do Núcleo desenvolveu uma Metanálise comparando a efetividade das principais técnicas de concentrações virais usualmente empregadas na detecção molecular de adenovírus em águas não tratadas.

Laboratório de Diagnóstico Genético e Molecular/UFG (LDGM/UFG): no laboratório foram realizados os procedimentos de concentração viral e eutanásia de ícteos.

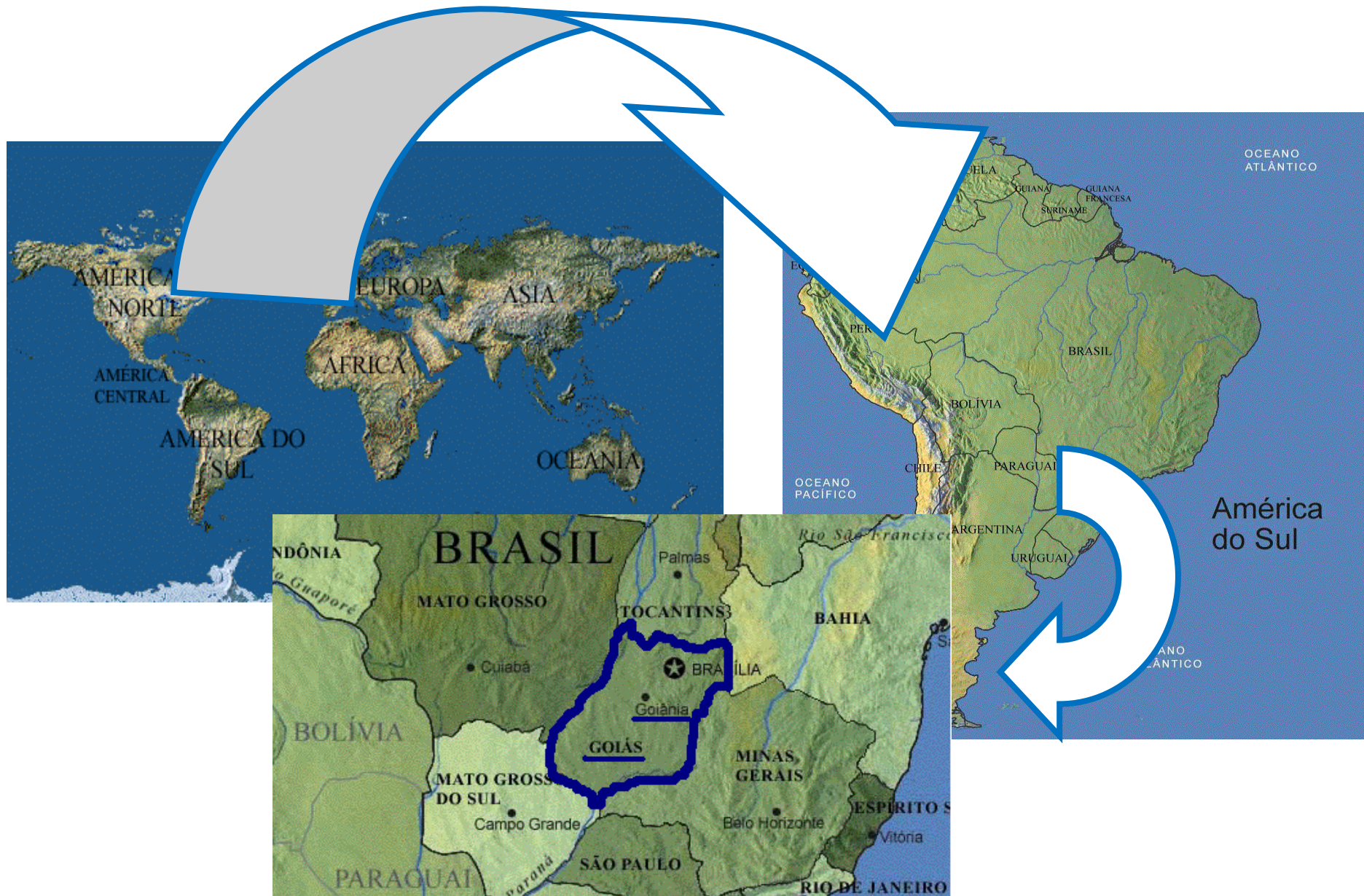


Figura 1 - Localização da cidade de Goiânia e do Estado de Goiás no contexto mundial.

Laboratório de Genética Molecular e Citogenética/UFG (LGMC/UFG): o laboratório possui infra-estrutura adequada e toda a aparelhagem necessária para trabalhar com a parte molecular da pesquisa, tais como: câmara de fluxo laminar, estufa com CO₂, termociclador, cubas eletroforéticas, freezers, geladeiras, dentre outros equipamentos. No LGMC foram realizadas as extrações e ampliações de DNA em amostras de águas e peixes.

Laboratório de Água da SANEAGO (Saneamento de Goiás S.A): empresa responsável pelo tratamento e abastecimento público de água no Estado de Goiás. Nas dependências do Laboratório foram realizados os exames físico-químicos e bacteriológicos das amostras de água tratada.

Laboratório de Monitoramento da Secretaria Estadual do Meio Ambiente e Recursos Hídricos (SEMARH): a equipe técnica da Secretaria participou da coleta e processamento da análise físico-química e bacteriológica de amostras de águas não tratadas.

Agência Municipal do Meio Ambiente: contribuiu diretamente no apoio a coleta dos ícteos dos lagos monitorados.

Na Figura 2 é mostrado fluxograma abordando instituições parceiras e as metodologias empregadas durante a realização do monitoramento de adenovírus, como também da Metanálise.

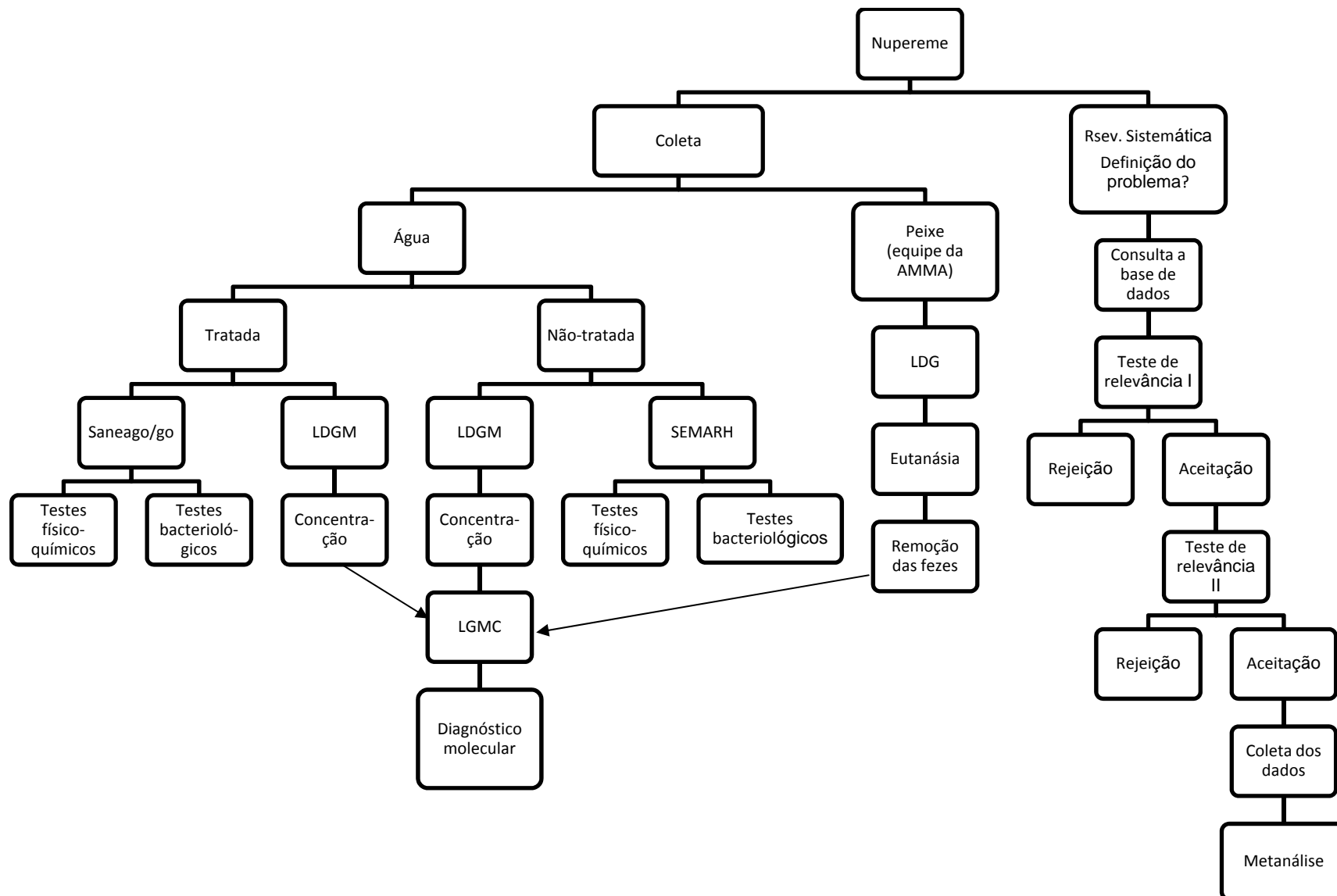


Figura 2 - Fluxograma abordando instituições parceiras e as metodologias empregadas durante a realização do monitoramento de adenovírus, como também da Metanálise.

3.2 PARTE EXPERIMENTAL

O critério para a escolha dos pontos de coleta utilizados se deve a importância estratégica dos mesmos para o município de Goiânia. Os rios selecionados são responsáveis por todo o abastecimento público da cidade, e os lagos estudados são densamente freqüentados pela população e turistas que visitam a região. Ademais, deste o ano de 2005 pesquisadores da UFG utilizam estes mesmo pontos para monitorar outros patógenos de interesse em saúde pública (SANTANA, JÚNIOR, Carlos Alberto Soares, 2005 and SANTOS, SÔNIA DE FÁTIMA OLIVEIRA, 2008).

3.2.1. Pontos de Coleta

Lago do Parque Vaca Brava (VB): localizado na avenida T-10 no setor Bueno, bairro de classe média alta. O Parque abrange área de aproximadamente 72,7 mil m² contendo estações de ginástica, pista de *cooper* e um lago que é situado à margem esquerda do parque, em frente ao Goiânia Shopping (Figura 3). O fluxo de pessoas ao redor do lago é intenso e a grande atração do parque é o sistema de propulsão d'água presente no lago, além dos diversos patos e peixes nativos e exóticos presentes no mesmo.

Lago do Bosque dos Butiris (BB): situado na Alameda dos Buritis, Avenida Assis Chateaubriand com rua 1, Setor Oeste. O bosque é o mais antigo patrimônio paisagístico de Goiânia, ocupa área de aproximadamente 125 mil m². Possui estação de ginástica, pista de *Cooper*, e possui três lagos artificiais abastecidos pelo Córrego Buriti, dos quais o de escolha para o monitoramento foi o lago localizado em nível inferior aos demais, na vazão das águas do bosque (Figura 4).



Figura 3 - Imagem satélite obtida através do software Google Earth/2007 da área do Parque Vaca Brava, localizado na parte nobre de Goiânia, Setor - Bueno. Observar (seta) a presença de um sistema de propulsão d'água presente no lago, que pode acarretar a veiculação de microrganismos patogênicos através de aerossóis, dentre eles, especialmente os vírus. O Parque é todo envolto por casas, prédios, bares e lojas. Próximo ao lago encontra-se o Goiânia Shopping (estrela), contribuindo para o aumento no fluxo de pessoas. O ponto de coleta tem as seguintes coordenadas: Latitude $16^{\circ}42'31.18''S$ e Longitude de $49^{\circ}16'15.67''W$.

Rio João Leite (JL): nasce na Serra do Sapato Arcado, Município de Ouro Verde. É um dos componentes da bacia hidrográfica do Rio Paranaíba, abrangendo os municípios de Goiânia, Anápolis, Ouro Verde, Nerópolis e Goianápolis, com uma área de $751,51 \text{ km}^2$ e extensão aproximada de 130 km. No município de Goiânia é um dos afluentes da margem esquerda do rio Meia Ponte. Serve à captação de água para o abastecimento público de cerca de 60% da população goianiense. No trabalho, a coleta foi realizada diretamente da captação pela Estação de Tratamento de Água Jaime Câmara (ETA/SANEAGO) (Figura 5).



Figura 4 - Imagem satélite obtida através do software Google Earth/2007 mostrando os dois lagos principais (setas), a vegetação e o perímetro urbano circundante ao Bosque dos Buritis. Desde a ocupação da cidade até os dias atuais, a área vem experimentando muitas interferências que desfiguram as características originais do Parque. A vegetação nativa foi em parte substituída por plantas exóticas, restando somente 10% da mata original. Os lagos passaram por reformas recentes, todavia, não é raro a exalação de mau cheiro, principalmente em épocas de seca. Latitude de 16°40'58.51"S e Longitude de 49°15'38.35"W.

Rio Meia Ponte: nasce na serra dos Brandões, no município goiano de Itauçu, região predominantemente de pecuária leiteira e pequenas lavouras. O rio tem extensão de aproximadamente 432 km, desembocando no rio Paranaíba com vazão média de 12 m³/s. É um dos principais mananciais de abastecimento de Goiânia, suprimindo cerca de 50% do abastecimento da capital, sendo o maior receptor de parte do esgoto sanitário ali gerado. Foram utilizados dois pontos de coleta, um 1 km a montante da Estação de Tratamento de Esgoto de Goiânia-ETE (MP1) e outro 1 km a jusante do despejo de esgoto tratado pela ETE (MP2). Imagem satélite juntamente com as coordenadas geográficas é mostrada na Figura 6.



Figura 5 - Imagem satélite obtida através do software Google Earth/2009 mostrando o Rio João Leite na captação pela empresa SANEAGO (ETA Jaime Câmara). Seta indicando o local exato da coleta, Latitude: 16°38'32.80"S e Longitude 49°14'57.49"W

ETA Jaim Câmara: primeira estação de tratamento da capital, inaugurada em 1953, supriu as necessidades da população até 1988, quanto foi inaugurada a ETA Meia Ponte. O principal reservatório é o Rio João Leite, cuja água bruta é captada com uma vazão d'aproximadamente 95000 m³ (SANEAGO, 2006). Neste ponto foi coletada uma amostra de água tratada diretamente das torneiras da estação (Figura 7).

3.2.2 Coleta e Processamento das Amostras de Água

As amostras foram coletadas mensalmente de dezembro de 2007 a novembro de 2008 em galões limpos de polietileno com capacidade para 10 litros e preferencialmente entre 9:00 e 12:00 da manhã (DE PAULA et al., 2007), a fim de minimizar os efeitos de variações diurnas refletidas por condições ambientais como temperatura da água, percentual de irradiação por luz UV, precipitação e alterações conseqüentes da ocupação e atividade humana (GRIFFIN et al., 1999 apud TAVARES; CARDOSO; BRITO, 2005, p. 95).



Figura 6 - Imagem satélite obtida através do software Google Earth/2009 mostrando os pontos MP1, estrela (Latitude 16°37'40.95"S Longitude 49°16'13.10"W) e MP2, seta (Latitude 16°38'31.61"S e Longitude 49°15'24.35"W).

Nos lagos, as coletas foram realizadas na vazão dos mesmos, e na parte mais central dos rios, a uma profundidade aproximada de 20 cm abaixo do espelho d'água (exceção da amostra de água trata pela ETA Jaime Câmara) e rapidamente (prazo máximo de 2 horas) encaminhadas ao Laboratório de Diagnóstico Genético e Molecular – LDGM/UFG para processamento.

As amostras foram submetidas a uma pré-filtração, também chamada de clarificação, que visa a utilização de filtração à vácuo com papel filtro qualitativo para remover o excesso de matéria orgânica, como restos de algas, vegetais, dentre outros organismos.

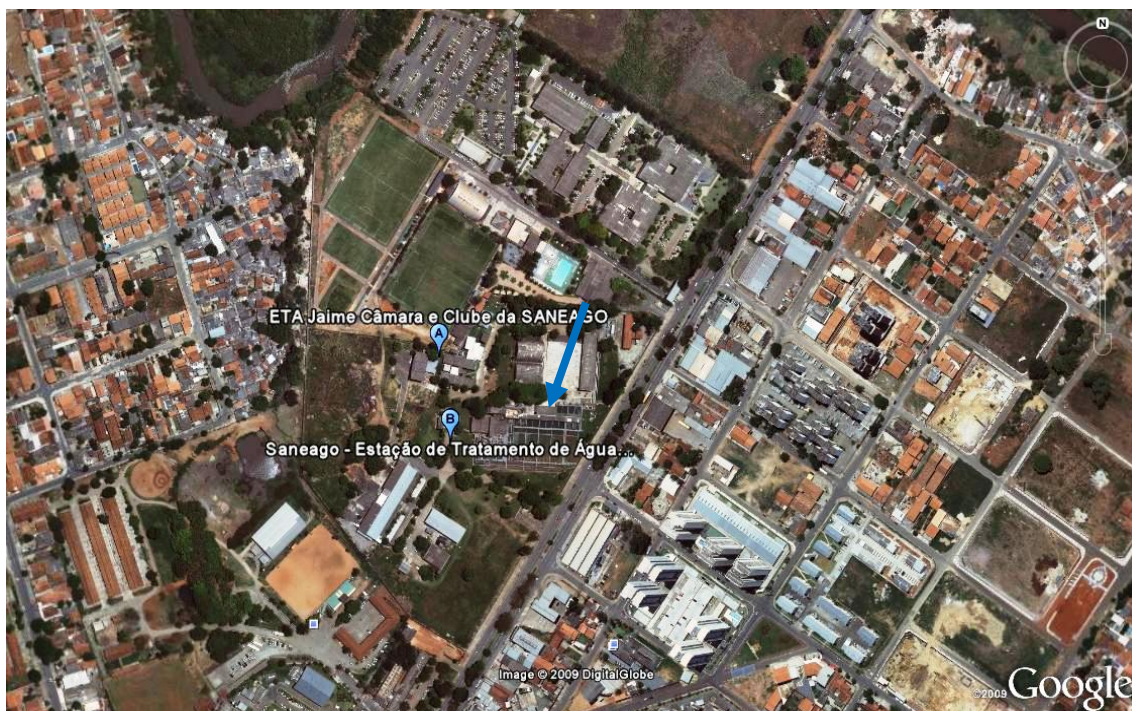


Figura 7 - Imagem satélite obtida através do software Google Earth/2009 mostrando a Estação de Tratamento de Água Jaime Câmara (Latitude 16°39'6.86"S e Longitude 49°14'45.08"W).

A partir da clarificação as amostras foram filtradas com membrana nylon de 0,45 μm de porosidade e 47 mm de diâmetro, sendo carregada positivamente (HybondTM-N+, Amersham Pharmacia). O filtrado foi eluído em 5 mL de tampão TE pH 8.0 (10 mM Tris-HCl, pH 8.0; 1 mM EDTA) com 0,02% de Tween 20, e estocado a -20°C. Uma parte deste concentrado foi aliqüotado e encaminhada ao Laboratório de Genética Molecular e Citogenética (LGMC/UFG) para realizar a detecção molecular.

3.2.3 Coleta da Ictiofauna

Os lagos da cidade de Goiânia possuem alta densidade de peixes exóticos. Assim, com a autorização e apoio técnico da Agência Municipal de Meio Ambiente (AMMA), foram coletados alguns exemplares de *Tilapia* sp para proceder a verificação da presença de adenovírus no sistema digestivo destes e, desta maneira, indicar possível contaminação fecal de origem humana nos lagos estudados. Foram escolhidas as tilápias por serem peixes exóticos, que naturalmente contribuem negativamente para a manutenção da fauna local.

As coletas foram realizadas com um puçá (RIBEIRO; ZUANON, 2006) e varas de pescaria. Após a coleta, os peixes eram acondicionados em galões com água do próprio lago e imediatamente encaminhados ao LDGM/ICB. A anestesia foi processada segundo Santos et al. (2003, p. 6). Assim, o animal foi imerso em solução de benzocaína a 80 ppm e monitorado quanto à manifestação de sinais comportamentais característicos da ação anestésica. Estes sinais consistem basicamente em: incordenação ao nadar, perda da capacidade de manter a posição normal em relação ao eixo horizontal e vertical, redução e posterior parada dos movimentos operculares. A partir desta última observação, o animal era retirado da solução e sofria secção medular (WINKALER et al., 2001; SANTOS et al., 2003) seguida de decapitado. O conteúdo intestinal (fezes) foi retirado e acondicionado a - 20 °C para posterior extração do DNA viral.

De dezembro de 2007 a julho de 2008 foram coletados 27 ícteos (Tabela 1), todavia, devido problemas burocráticos, em maio, junho e julho não foram realizadas coletas no ponto VB, ocorrendo o mesmo com o mês de janeiro para o ponto BB.

Após decapitação, as carcaças eram condicionadas em freezer e posteriormente encaminhadas para incineração na Escola de Veterinária/UFG.

3.2.4 Análise físico-química e Bacteriológica

As análises físico-químicas e bacteriológicas dos rios e lagos foram realizadas em associação com a Secretaria do Meio Ambiente e Recursos Hídricos do Estado de Goiás (SEMARH/Goiás).

Tabela 1 - Quantidade de ícteos coletados em cada ponto de coleta, durante o período de dezembro/2007 a julho/2008.

Pontos de coleta	Período de Coleta								Total
	Dez 2007	Jan 2008	Fev 2008	Mar 2008	Abr 2008	Mai 2008	Jun 2008	Jul 2008	
VB*	1	3	3	3	3	-	-	-	13
BB**	1	2	-	3	3	3	-	2	14
Total	2	5	3	6	6	3	-	2	27

*Ponto de coleta no parque Vaca Brava

**Ponto de coleta no parque Bosque dos Buritis

Os laudos das análises físico-químicas e bacteriológicas das amostras de águas tratadas foram realizados e emitidos pela SANEAGO.

Todos os testes laboratoriais foram realizados em conformidade com o “*Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*” da American Public Health/AWWA (CLESCERI et al., 2005) e foram realizadas unicamente nas amostras coletadas de dezembro de 2007 a julho de 2008.

A Tabela 2 mostra os parâmetros físico-químicos e bacteriológicos realizados pela SEMARH. Diferentemente, na SANEAGO foram realizados apenas os seguintes testes: cloro residual, flúor, turbidez, cor aparente, pH, contagem de bactérias heterotróficas, índice de coliforme total, índice de coliforme termotolerante e índice de *Escherichia coli*.

3.2.5 Extração do DNA

A extração de DNA foi realizada de acordo com o protocolo de Sambrook and Russell (2001) com menores modificações. Assim, 500 µL do material eluído foi transferido para um microtubo de 1,5 ml, ao qual foi acrescentado 500 µL de fenol-clorofórmio-álcool isoamílico (25:24:1, pH 7.3 ± 0,3), misturado por inversão e centrifugado a 6000 rpm por 10 min. Após este procedimento, o sobrenadante foi transferido para outro microtubo de 1,5 mL, ao qual foi acrescentado cerca de 400 µL de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1), misturado por inversão e centrifugado a 10000 rpm por 5 minutos. A fase aquosa foi removida para outro microtubo no qual foi acrescentado NaCl 4M em quantidade igual a 1/10 do volume já existente juntamente com 1 volume de isopropanol, misturado por inversão e centrifugado a 10000 rpm por 10 min, obtendo-se o *pellet* de DNA. O *pellet* obtido foi lavado com etanol 70% (-20 °C) e centrifugado novamente a 10000 rpm por 5 min. Após centrifugação, o etanol foi descartado, e o microtubo deixando a temperatura ambiente para completa evaporação do álcool. O DNA foi ressuspensão em 40 µL de tampão TE pH 8,0 e conservado a -20 °C até o processamento da técnica da PCR e semi-nested PCR.

As extrações de DNA em fezes também foram realizadas pelo método de Sambrook and Russell (2001) com pequenas modificações, utilizado um volume fixo de 50 µL de fezes por microtubo.

Tabela 2 - Testes Físico-químicos e bacteriológico realizados durante o estudo juntamente com indicação do volume máximo aceitável por Legislação específica.

Testes	VMP
Alcalinidade total	20 – 40 mg/L
Aspecto	Límpido/Turvo
Cloretos	Menor que 250 mg/L
Condutividade Elétrica	40 – 60 mg/L
Cor*	75 mg Pt/L
DBO*	5 mg/L O ₂
DQO	----
Dureza	Menor que 200 mg/L
Fosfatos	----
Pressão Osmótica H ₂ O	MBAR
Nitrito*	1,0 mg/L
Nitrogênio Amoniacal*	3,7mg/L N, para pH 7,5 2,0 mg/L N, para 7,5 < pH 8,0 1,0 mg/L N, para 8,0 < pH 8,5 0,5 mg/L N, para pH > 8,5
O ₂ Saturado%	%
OD*	não inferior a 5 mg/L O ₂ ;
Odor	Não objetável
pH	Não inferior a 5,0 – não superior a 9,0
Resíduos Fixos	----
Resíduos Sedimentáveis	Virtualmente. Ausente
Resíduos Totais	----
Resíduos Voláteis	----
Sol. Dissolvidos (TDS) *	500 mg/L
Temperatura Ambiente	18 – 37 °C
Temperatura da Amostra	25°C
Turbidez*	100 UNT

VMP = Valor Máximo Permitido; * Padrões estabelecido pela Resolução CONAMA 357 de 17/03/2005 para Águas de Classe 2; VMP dos demais parâmetros foram sugeridos pela SEMARH; Os valores de temperatura variam de acordo com horário e mês de coleta, normalmente 25°C. Todos os parâmetros foram realizados em conformidade com o Standard methods for the examination of water and Wastewater da AWWA 21 th Edition.

3.2.6 Diagnóstico Molecular

A seqüência (Tabela 3), sensibilidade e especificidade dos iniciadores (MWG Oligo Synthesis Report, USA) foram relatados em estudos prévios (PINA et al., 1998; RIGOTTO et al., 2005).

Para a reação com o par de iniciadores hexAA 1885/hexAA 1913 foi utilizado 28 µL de DNA extraído, 5 µL de Tampão 10X (20 mM Tris-Cl pH 8.4, 50 mM KCl), 0.2 mM de cada dNTP (dATP, dCTP, dTTP e dGTP), 1,5 mM de MgCl₂, 85 pmoles de cada iniciador e 5U de Taq DNA Polimerase, para um volume final de 50 µL. O programa de amplificação consistiu de desnaturação inicial a 94 °C por 7 min seguido de 40 ciclos de 94 °C para desnaturação durante 1 min, 56 °C para

anelamento por 1 min e 72 °C para extensão de 45 seg, e extensão final de 72 °C durante 7 min (RIGOTTO et al., 2005) (todos os reagentes provenientes de Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). O tamanho do fragmento amplificado (*amplicon*) foi de 301 pb.

A segunda PCR é uma semi-nested PCR, assim, 14 µL da primeira PCR foi adicionado em reação mix com volume final de 25 µL contendo 85 pmoles de cada iniciador (nehexAA 1893 e hexAA 1913), 20 mM de Tris-HCl (pH 8.4), 50 mM KCl, 0.2 mM de cada dATP, dCTP, dTTP e dGTP, 1,5 mM MgCl₂, and 5U de Taq DNA Polymerase. O programa de amplificação consistiu de desnaturação inicial por 7 min seguido de 30 ciclos de 94 °C para desnaturação durante 1 min, 57 °C para anelamento por 45 seg, e 72°C para extensão por 1 min, a extensão final foi de 72 °C durante 5 min (RIGOTTO et al., 2005). O fragmento esperado foi de 222 pb.

Tabela 3 - Iniciadores utilizados na PCR e semi-Nested PCR

Primer	Seqüência	Tamanho
hexAA 1885 – Sense	5'-GCCGCAGTGGTCTTACATGCACATC-3'	301 bp
hexAA 1913 – Antisense	5'-CAGCACGCCGCGGATGTCAAAGT-3'	
nehexAA 1893 – Sense	5'-GCCACCGAGACGTA CTT CAGCCTG-3'	222 bp

Os controles positivo (DNA de Ad5) e negativo (água ultrapura, sistema Mill-Q, Millipore) foram utilizados em todas as reações.

Os produtos amplificados foram separados por eletroforese em gel agarose 1,5% (UltraPure™ Agarose, Invitrogen) durante 1h30 min a 100 V e 70 mA. Os *amplicons* foram visualizados sob radiação UV e fotografados. Os amplicons foram comparados com peso molecular comercialmente disponível (λ Hind III ou 100 bp DNA ladder, Invitrogen, Brazil).

3.2.7 Obtenção do Controle Positivo para adenovírus

O controle positivo das reações de PCR foi obtido a partir de um *pool* de células da linhagem HEp-2, uma linhagem de carcinoma de orofaringe infectada com adenovírus humano (genogrupo C, sorotipo 5), gentilmente doado pela Profa. Dra. Celia Regina Monte Barardi do Laboratório de Virologia Aplicada da Universidade Federal de Santa Catarina.

No LGMC/UFG estas células foram cultivadas em Meio de crescimento específico (MEM) suplementado com 10% (v/v) de soro fetal bovino. As células foram cultivadas em estufa de CO₂ 5% a 37°C até a visualização ao microscópio invertido de completo efeito citopático. As células foram congeladas e descongeladas três vezes, debris foram removidos por centrifugação a 4°C por 5 min a 5000 rpm. O pellet foi descartado e alíquotas do sobrenadante foram separadas para a realização de extrações de DNA pelo método de Sambrook and Russell (2001). Foi utilizado 5 µL das extrações de DNA para realizar a PCR e 3 µL da primeira PCR na realização da semi-nested PCR do controle positivo. A concentração dos reagentes e os programas de amplificação foram idênticos aos utilizados para as amostras concentradas por filtração.

3.2.8 Análise Estatística

Os dados obtidos de detecção e monitoramento ambiental de AdVs foram analisados no programa *Statistical Package for the Social Science* (SPSS). Foi realizada uma Análise de Regressão Logística univariada (nível de significância de 5%).

3.3 METANÁLISE

A Revisão Sistemática é uma revisão planejada para responder a uma pergunta específica e que utiliza métodos explícitos para identificar, selecionar e avaliar criticamente os estudos. Quando os dados são analisados através de tratamento estatístico a revisão sistemática é chamada de Metanálise. A metanálise é uma técnica que combina os resultados de diversos estudos voltados a um conjunto de hipóteses específicas (MARTINEZ, 2007). Villar et al. (2001) caracterizam a metanálise como o uso de técnicas estatísticas que combinam em uma medida resumo os resultados de estudos autônomos voltados a uma única questão.

Neste contexto, foram realizadas buscas sistematizadas de artigos em bases de dados indexadas no intuito de responder ao seguinte questionamento: “(1) *Qual a efetividade da utilização dos métodos de concentração por MF, UC, UF e associações de MF+UC e MF+UF acoplados à detecção molecular e AdVs em amostras de águas não tratadas?*”

3.3.1 Definições

As seguintes definições são pertinentes e fazem parte dos critérios de inclusão e exclusão dos artigos selecionados: **Microfiltração (MF)**: utilização de membrana filtrante plana ou sob a forma de cartucho, com porosidade de 0,2 a 0,45 µm de diâmetro, podendo ou não ser polarizada, e constituída de nylon, nitrocelulose, ou qualquer outro material; **Ultrafiltração (UF)**: utilização de membrana filtrante de variação composicional, retendo moléculas com peso molecular entre 10, 000 KDa e 150, 000 KDa; **Ultracentrifugação (UC)**: centrifugação a velocidade superior a 100, 000 x g por tempo mínimo de 30 min; **Adenovírus**: qualquer sorotipo dentre as 6 famílias (A a F); **Deteccção molecular**: técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) ou variações desta, como Nested-PCR ou Real time PCR (qPCR); **Águas não tratadas**: qualquer tipo de água fluvial que não recebeu prévio tratamento para consumo humano, incluindo águas sanitárias (esgotos) tratadas e não tratadas de qualquer natureza.

3.3.2 Hipóteses

As seguintes hipóteses concernentes ao problema foram testadas: a) na realização de diagnóstico molecular de adenovírus em águas não tratadas a metodologia de concentração viral por MF é mais efetiva do que UC ou UF ou mesmo associações de MF+UF ou MF+UC; b) na realização de diagnóstico molecular de adenovírus em águas não tratadas a metodologia de concentração viral por UC é mais efetiva do que MF ou UF ou mesmo associações de MF+UF ou MF+UC; c) na realização de diagnóstico molecular de adenovírus em águas não tratadas a metodologia de concentração viral por UF é mais efetiva do que UC ou MF ou mesmo associações de MF+UF ou MF+UC; d) na realização de diagnóstico molecular de adenovírus em águas não tratadas a metodologia de concentração viral por MF em associação com UF é mais efetiva do que UC, UF, MF ou mesmo associações de MF+UC; e) na realização de diagnóstico molecular de adenovírus em águas não tratadas a metodologia de concentração viral por MF em associação com UC é mais efetiva do que UC, UF, MF ou mesmo associações de MF+UF. PCR é mais efetiva na realização do diagnóstico de adenovírus em águas não tratadas do que Nested-PCR e Real time PCR; Nested-PCR é mais efetiva na realização do

diagnóstico de adenovírus em águas não tratadas do que PCR e Real time PCR; Real time PCR é mais efetiva na realização do diagnóstico de adenovírus em águas não tratadas do que PCR e Nested-PCR.

A real efetividade metodológica foi realizada através da associação dos métodos de concentração e detecção molecular, comparando os dados de diversos estudos afins previamente selecionados.

3.3.3 Pesquisa em Bases de Dados

Foram selecionados estudos nas seguintes bases de dados: *LILACS*; *PubMed Central (PMC)*; *Scielo*, *REPIDISCA* e *Biblioteca Cochrane BVS*, *SCOPUS* e *CSA Illumina*. No decorrer do estudo, comunicação pessoal com os autores via e-mail e fax foram realizados para sanar dúvidas em relação aos dados ou metodologias utilizadas. O período de busca foi de 1990 até data de busca, sem restrições concernentes a idiomas, e utilizado os unitermos: adenovir* AND (water OR wastewater OR effluent OR sewage) AND (pcr OR detection OR diagnostic OR molecular techniques). Com exceção do PubMed, que permite buscas com associações de vários unitermos, nas demais bases os unitermos foram associados de três em três até esgotar todas as combinações possíveis.

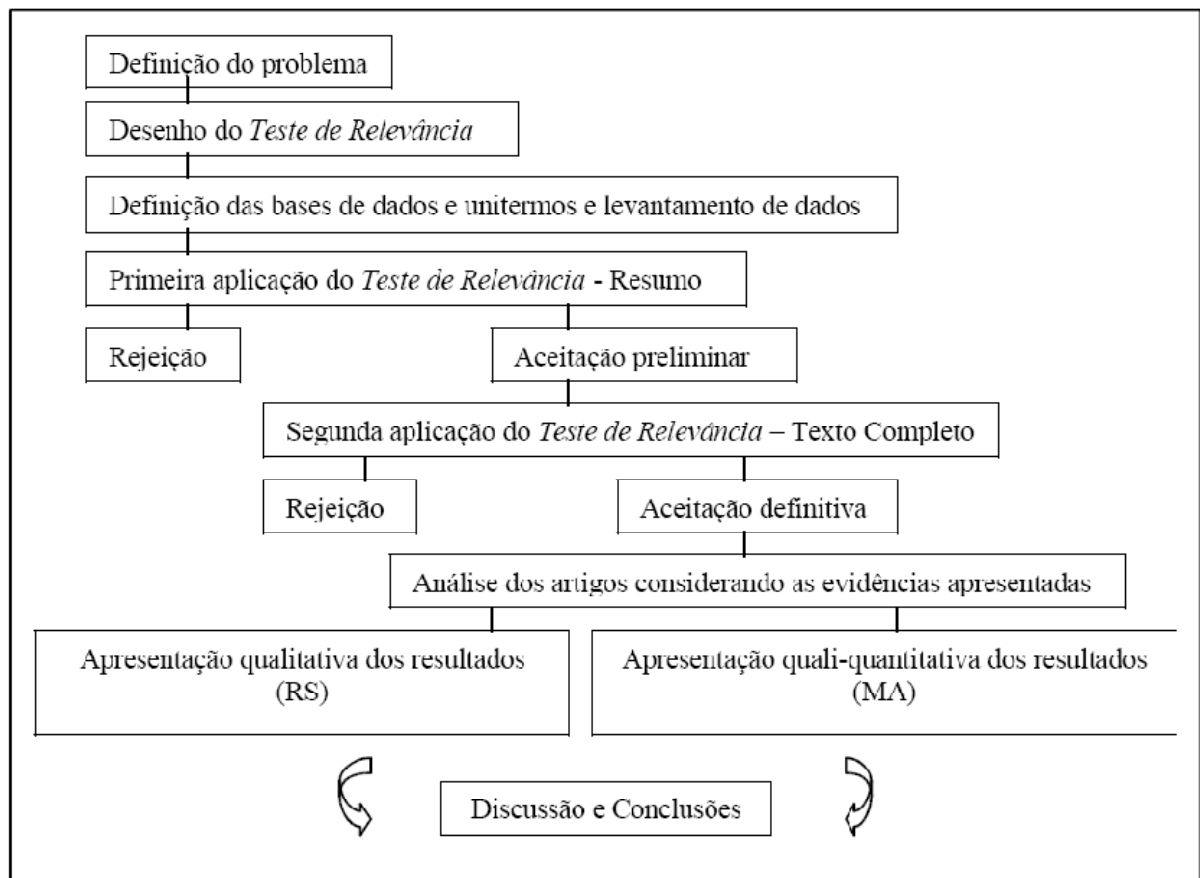
3.3.4 Coleta e análise dos dados

Os estudos selecionados foram avaliados por dupla entrada, de forma independente, com utilização de formulários padronizados, obedecendo a critérios previamente estipulados de inclusão e exclusão contidos no Teste de Relevância I, que foi aplicado apenas aos resumos dos artigos, e ao Teste de Relevância II, que foi aplicado ao artigo na íntegra a partir dos estudos previamente selecionados pelo Teste de Relevância I. Discordâncias foram resolvidas por consenso, em casos de divergências um terceiro revisor era consultado.

Os estudos selecionados de forma independente pelos dois pesquisadores a partir do Teste de Relevância II foram analisados quanto ao índice de concordância (IC) (POLIT et al., 2004). Conhecido como triangulação de pesquisadores, tem como função aumentar a probabilidade de que os resultados de uma pesquisa sejam entendidos como passíveis de credibilidade. Considera-se aceitável $IC \geq 80\%$ Os

dados dos estudos consensualmente selecionados através do Teste de Relevância I foram coletados em formulário específico. Na Figura 8 é mostrado fluxograma com o desenho do estudo. Os formulários do Teste de Relevância I e II assim com formulário de alocação dos dados são mostrados em anexos.

Durante a seleção dos estudos, amostras de águas contaminadas por esgoto foram consideradas viáveis, e não viáveis as amostras de água do mar ou de águas salobras (salinidade acima de 5%), ou qualquer outro tipo de amostra que não obedecia às definições de água não tratada. Assim, estudos em que as coletas foram realizadas na vazão de rios com águas do mar ou em proximidades destas, foram excluídos pelos revisores para evitar vieses de amostragem, o mesmo ocorreu com artigos que apresentaram dados insuficientes para análise ou que não respeitassem alguns dos critérios de inclusão definidos nos Testes de Relevâncias. Para evitar vieses de amostragem a metodologia de concentração por MF foi subdividida em MFc (microfiltração por cartuchos) e MFm (microfiltração por membrana simples).



(Muñoz et al., 2002)

Figura 8 - Fluxograma esquemático do delineamento da metanálise.

Amostras de águas tratadas foram subdivididas em águas de rios e lagos, esgoto (não tratado), esgoto tratado, e águas de enxurradas. Os cálculos estatísticos foram feitos em cima dessa subdivisão e também considerando todas estas amostras com um único tipo de água. Foram incluídas amostras de esgotos tratados de qualquer natureza.

Após codificação apropriada das variáveis de cada estudo utilizando validação por dupla digitação, os dados foram exportados e analisados no programa *Statistical Package for the Social Science* (SPSS). Alguns estudos tiveram mais de uma entrada nos formulários de tratamento estatístico. Isso ocorreu nas seguintes circunstâncias: detecção de adenovírus em diferentes amostras de águas, comparação de distintas metodologias de concentração e detecção molecular de adenovírus nas amostras analisadas, considerando cada um desses casos como estudos independentes dentro de um mesmo artigo.

Durante a seleção dos artigos os revisores reservaram o direito de realizarem exclusões de dados que não estavam de acordo com os critérios estabelecidos durante a seleção dos estudos. Assim, em artigos que analisam diversas amostras, só foram alocados os dados de amostras consideradas dentro dos critérios de seleção definidos previamente pelos revisores.

4 PUBLICAÇÕES

Artigo 1 – *Avaliação de métodos de concentração e detecção molecular de Adenovírus em águas não tratadas - uma metanálise*

Autores: Hugo Delleon Silva, Murilo Rodrigues Melo, Carlos Eduardo Anunciação, Marco Tulio Antonio Garcíazapata

Revista de Patologia Tropical (Submetio)

Artigo 2 – *Molecular detection of adenoviruses in lakes and rivers of Goiânia, Goiás, Brazil*

Autores: Hugo D. Silva, Ludimila A. C. Wosnjuk, Sônia F. O. Santos, Cesar A. S. T. Vilanova-Costa, Flávia C. Pereira, Elisângela P. S. Lacerda, Marco T. A. Garcíazapata, Carlos E. Anunciação

Food and Environmental Virology (Submetio)

Artigo 3 – *Adenovirus seasonal monitoring and correlation with physical-chemical and bacteriological water quality parameters*

Autores: H. D. Silva, Carlos Eduardo Anunciação, Cesar Augusto Sam Tiago Vilanova-Costa, Flávia de Castro Pereira, Aliny Pereira de Lima, Elisângela de Paula Silveira-Lacerda, Marco Tulio Antonio Garcíazapata *

Journal of Applied Microbiology (submetido)

Avaliação de métodos de concentração e detecção molecular de adenovírus em águas não tratadas - uma metanálise

Hugo Delleon Silva^{1,2}, Murilo Rodrigues Melo¹, Carlos Eduardo Anunciação², Marco Tulio Antonio García-Zapata^{1*}

¹Núcleo de Pesquisas em Agentes Emergentes e Re-emergentes, Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, Universidade Federal de Goiás

²Laboratório de Diagnóstico Genético e Molecular, Instituto de Ciências Biológicas II, Universidade Federal de Goiás

*Correspondência: Caixa Postal 12911 – Setor Leste Vila Nova, 74643-970, Goiânia-Go-Brasil. Email: zapata@iptsp.ufg.br; Telefax: +55 62 3521-1839

RESUMO

Metodologias moleculares baseadas em PCR têm sido utilizadas para detectar adenovírus (AdVs) em amostras ambientais. É consenso entre os pesquisadores que estas metodologias oferecem vantagens sobre os métodos tradicionais de isolamento viral por cultura celular, sendo mais sensíveis e específicas e propiciando menor tempo de diagnóstico; contudo, há divergências em relação ao método de concentração viral a ser utilizado em amostras ambientais. Assim sendo, realizou-se uma metanálise com o intuito de responder aos questionamentos concernentes à eficácia do uso de três metodologias de concentração viral associadas à detecção molecular de AdVs em amostras de águas não tratadas, para a qual foram selecionados 33 estudos. Concluiu-se que: a) PCR não deve ser o método de escolha para detectar AdVs em amostras ambientais, devendo-se priorizar qPCR ou Nested-PCR; b) para detectar AdVs em amostras de rios ou lagos, a metodologia de escolha deve ser a associação entre ultracentrifugação e Nested-PCR; c) é aconselhável utilizar associação entre microfiltração em membrana, ultrafiltração e qPCR para detectar AdVs em amostras de esgotos tratados e não tratados. Estudos adicionais são necessários para avaliar os métodos que foram empregados em um único estudo e/ou com número inexpressivo de amostras.

DESCRITORES: adenovírus, águas não tratadas, concentração, metanálise, PCR.

INTRODUÇÃO

De forma sistematizada o diagnóstico de vírus em ambientes aquáticos ocorre em duas etapas: a concentração e a detecção viral.

Métodos moleculares têm sido utilizados para a detecção viral devido às vantagens de alta sensibilidade, especificidade e velocidade diagnóstica (1). Assim, são escassos os trabalhos de virologia ambiental que não utilizam algum método biomolecular, sumariamente PCR (2,3), Nested-PCR (4,5) ou Real time PCR (6,7),

sendo que, cada método agrega especificidade quanto ao uso, e a utilização de um a outro é controversa.

Em relação aos métodos de concentração viral, deve-se dar maior importância, pois existe uma ampla gama de metodologias, e não há consenso sobre qual método utilizar em estudos de virologia ambiental.

Metodologias diversas têm sido utilizadas para a concentração de vírus em ambientes aquáticos. Como exemplos, a ultrafiltração (8,9), separação imunomagnética (10), ultracentrifugação (11, 12,13), adsorção viral utilizando partículas de sílica amino-fractionalizadas (14), floculação orgânica (15), precipitação com sais multivalentes, também chamada de floculação inorgânica (16,2), precipitação com polietilenoglicol (17), e utilização de membranas de microfiltração simples ou em cartuchos, sendo polarizadas negativamente ou positivamente, e neste caso, há diferenças significativas quanto à utilização destas. Membranas eletronegativas requerem tratamentos prévios da água para propiciar a interação entre a membrana e o vírus carregado negativamente (18). Estes tratamentos podem incluir acidificação da água, maximizando a interação dos vírus com membranas carregadas positivamente ou a adição de sais catiônicos, que acarreta uma inversão na carga das partículas virais promovendo interações eletrostáticas entre o vírus e a superfície eletronegativa das membranas (14).

Recentemente, alguns pesquisadores têm proposto a detecção de adenovírus (AdVs) através de técnicas moleculares para monitorar a presença de vírus entéricos em ambientes aquáticos (19,20,21). Os AdVs são altamente prevalentes no meio ambiente (22) e resistentes à tratamentos de desinfecção por cloração e UV (23,24), sendo bons indicadores de contaminação humana (25), entretanto são fastidiosos (especial os sorotipos 40 e 41) (1).

A concentração é uma etapa crítica no diagnóstico viral, pois o número de partículas vírais em águas é geralmente muito baixo (8,14), necessitando-se de um grande volume para a concentração destes. Assim, a utilização de um bom método diagnóstico é crucial para a identificação molecular destes patógenos.

Dentre os métodos de concentração, os mais amplamente utilizados são: adsorção-eluição em membrana de microfiltração (MF), Ultrafiltração (UF) e Ultracentrifugação (UC), ocorrendo combinações entre estes e demais métodos considerados secundários, usualmente métodos de precipitação, destacando-se a floculação orgânica com extrato de carne (1,15), precipitação com polietilenoglicol (26,5,27) ou precipitação com sais multivalentes (28).

Como ainda não há consenso entre os pesquisadores na utilização das metodologias de concentração, e mesmo na escolha do método de detecção molecular, se faz pertinente a realização de uma Revisão Sistemática com metanálise sobre o assunto.

A metanálise é um estudo de elevado respaldo acadêmico, tradicionalmente utilizado em Ciências Sociais e Médicas. Segundo Egger & Smith (28) uma metanálise bem conduzida permite uma avaliação mais objetiva sobre a utilidade de um tratamento, podendo antecipar a introdução de um eficiente tratamento clínico.

Em suma, a metanálise é uma metodologia robusta que permite através de tratamento estatístico responder a perguntas previamente elaboradas utilizando os dados de vários estudos primários afins criteriosamente selecionados em bancos de dados.

Dessa forma, foi objetivo deste estudo avaliar a efetividade da utilização de metodologias de concentração viral em associação com metodologias de detecção molecular para diagnosticar adenovírus em águas não tratadas.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram realizadas buscas sistematizadas de artigos em bases de dados indexadas no intuito de responder ao seguinte questionamento: “*Qual a efetividade da utilização dos métodos de concentração por MF, UC, UF e associações de MF+UC e MF+UF acoplados à detecção molecular de AdVs em amostras de águas não tratadas?*”

Definições

As seguintes definições são pertinentes e fazem parte dos critérios de inclusão e exclusão dos artigos selecionados: **Microfiltração (MF)**: utilização de membrana filtrante plana (simples) ou sob a forma de cartucho, com porosidade de 0,2 a 0,45 µm de diâmetro, podendo ou não ser polarizada, e constituída de nylon, nitrocelulose, ou qualquer outro material; **Ultrafiltração (UF)**: utilização de membrana filtrante de variação composicional, retendo moléculas com peso molecular entre 10,000 a 150,000 KDa; **Ultracentrifugação (UC)**: centrifugação a velocidade superior a 100,000 x g por tempo mínimo de 30 min; **Adenovírus**: qualquer sorotipo dentre as 6 famílias (A a F); **Detecção molecular**: técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) ou variações desta, como Nested-PCR ou Real time PCR (qPCR); **Águas não tratadas**: qualquer tipo de água fluvial que não recebeu prévio tratamento para consumo humano, incluindo águas sanitárias (esgotos) tratadas e não tratadas.

Pesquisa em Bases de Dados

Foram selecionados estudos nas seguintes bases de dados: *LILACS*; *PubMed Central* (PMC); *Scielo*, *REPIDISCA*, *Biblioteca Cochrane BVS*, *SCOPUS* e *CSA Illumina*. No decorrer do estudo, comunicações pessoais com os autores via e-mail e fax foram realizadas para sanar dúvidas pertinentes. O período de busca foi de 1990 até data

de busca, sem restrições concernente a idiomas, e utilizado os unitermos: adenovir* AND (water OR wastewater OR effluent OR sewage) AND (pcr OR detection OR diagnostic OR molecular techniques). Com exceção do PubMed, que permite buscas com associações de vários unitermos, nas demais bases os unitermos foram associados de três em três até esgotar todas as combinações possíveis.

Coleta e análise dos Dados

Os estudos selecionados foram avaliados por dupla entrada, de forma independente, com utilização de formulários padronizados, obedecendo a critérios previamente estipulados de inclusão e exclusão contidos no Teste de Relevância I, que foi aplicado apenas aos resumos dos artigos, e ao Teste de Relevância II, aplicado ao artigo na íntegra a partir dos estudos previamente selecionados pelo Teste de Relevância I. Discordâncias foram resolvidas por consenso, em casos de divergências um terceiro revisor era consultado.

Os estudos selecionados de forma independente pelos dois revisores a partir do Teste de Relevância II foram analisados quanto ao índice de concordância (IC) (29). Os dados dos estudos consensualmente selecionados através do Teste de Relevância II foram coletados em formulário específico (não mostrado). Os formulários do Teste de Relevância I e II são mostrados na Figura 1. Na Figura 2 é mostrado fluxograma com o desenho do estudo.

Durante a seleção dos estudos, amostras de águas contaminadas por esgoto foram consideradas viáveis, e não viáveis as amostras de água do mar ou de águas salobras (salinidade superior a 5%), ou qualquer outro tipo de amostra que não obedecia às definições de água não tratada. Assim, estudos em que as coletas foram realizadas na vazão de rios com águas do mar ou em proximidades destas, foram excluídos pelos

revisores para evitar vieses de amostragem, o mesmo ocorreu com artigos que apresentaram dados insuficientes para análise ou que não respeitassem alguns dos critérios de inclusão definidos nos Testes de Relevâncias.

Para evitar vieses de amostragem a metodologia de concentração por MF foi subdividida em MFc (microfiltração por cartuchos) e MFm (microfiltração por membrana simples).

Amostras de águas não tratadas foram subdivididas em águas de rios ou lagos, esgoto bruto (não tratado), esgoto tratado, e águas de enxurradas.

Foram incluídas amostras de esgotos tratados de qualquer natureza, este critério é respaldado pelo estudo de He & Jiang (12), em que não foram obtidas diferenças entre efluentes primários e secundários em relação à detecção de AdVs por qPCR.

Depois de apropriada coleta das variáveis de cada estudo utilizando validação por dupla digitação em formulário específico (não mostrado), os dados foram digitalizados em planilhas do programa *Microsoft Office Excel 2007*. Alguns estudos tiveram mais de uma entrada nos formulários de tratamento estatístico. Isso ocorreu nas seguintes circunstâncias: detecção de adenovírus em diferentes amostras de águas, comparação de distintas metodologias de concentração e/ou detecção molecular de adenovírus nas amostras analisadas, considerando cada um desses casos como estudos independentes dentro de um mesmo artigo.

Durante a seleção dos artigos os revisores reservaram-se no direito de realizar exclusões de dados que não estavam em concordância com os critérios estabelecidos durante a seleção dos estudos (Figura 1).

RESULTADOS

Não foram encontrados estudos nas Bases de Dados Cochrane BVS e Scielo, a Tabela 1 mostra o número de estudos delimitados pelos Testes de Relevância I e II nas demais bases de dados. Dos 59 estudos selecionados no Teste de Relevância II, 23 artigos foram excluídos, pois se repetiam entre as Bases, e já na fase de coleta dos dados, foram excluídos 3 artigos. O índice de concordância entre os revisores foi de 90,1%.

A Tabela 2 mostra os 33 artigos selecionados com a combinação dos respectivos métodos de concentração e detecção molecular assim com os resultados de amostras positivas. Como um artigo pode ter mais de uma entrada, ao todo foram 54 estudos analisados.

Foram selecionados 18 estudos que diagnosticaram AdVs em águas de rios e lagos, sendo encontradas 9 combinações diferentes de diagnóstico de AdVs nestas águas. Dentre os estudos selecionados, a metodologia que obteve maior positividade foi UC + Nested-PCR com 83,31% de positividade, seguida de MFc + UC + Nested-PCR com 78,3% de positividade. A método menos expressivo para diagnosticar AdVs em rios ou lagos foi UF + qPCR com nenhuma amostra positiva (0/39).

Em relação às amostras de esgoto bruto, foram selecionados 23 estudos, destes, as seguintes combinações metodológicas apresentaram 100% de eficácia diagnóstica: UF +Nested-PCR, UF + qPCR e UC + qPCR. A metodologia menos expressiva foi MFm + PCR com 20% (15/3) de amostras positivas

Em amostras de esgotos tratados, dos 9 estudos selecionados, foram realizadas 6 combinações diagnósticas, as que apresentaram 100% de positividade foram: MFc + Nested-PCR, MFc + qPCR e UF + Nested-PCR. A metodologia com menor positividade foi UF + Nested-PCR (25%).

Em amostras de enxurradas, foram selecionados 3 estudos, cada um utilizando um método diagnóstico diferente, e em nenhum estudo foi encontrado expressivo número de amostras positivas (Tabela 2).

DISCUSSÃO

Considera-se aceitável $IC \geq 80\%$, no presente estudo o índice foi de 90,1%, este número aumenta a probabilidade de que os resultados da pesquisa sejam entendidos como passíveis de credibilidade.

Foram excluídas todas as amostras de águas salgadas ou salobras porque o uso de microfiltração nessas amostras é diferenciado, podendo acarretar vieses de amostragem. Membranas eletronegativas normalmente requerem tratamento de acidificação da água (18), porque muitos vírus são carregados negativamente no meio ambiente (30), sem este passo, o vírus não se ligará à membrana, todavia esta etapa não é realizada em águas salgadas devido a alta concentração salina da água (6). Outro motivo para exclusão é que a alcalinidade da água pode promover baixa adsorção viral (18). Assim, todos os estudos com água salgada ou suspeitos de água salobra foram excluídos. Quando o estudo oferecia dados em relação à porcentagem de sal, eram inclusos somente as amostras que não ultrapassavam a porcentagem de 5%, isso aconteceu na seleção do estudo de Jiang et al. (31), em que três amostras de rio foram excluídas pois tinham alta salinidade.

O mesmo aconteceu com estudos que utilizaram cultura celular em algum passo da metodologia de detecção. Os AdVs, sobretudo os sorotipos 40 e 41 são vírus fastidiosos, de difícil visualização do efeito citopático (1). Além disso, a cultura celular tem a desvantagem de ser trabalhosa e onerosa (21).

O AdVs possivelmente venha a se tornar o indicador virológico de escolha para a realização de monitoramentos ambientais de rotina. Obviamente, o emprego de cultura celular não é o método de escolha para implementação de análises virológicas em ambientes aquáticos. Por isso, essa metodologia foi excluída. Ademais, a inclusão de cultura poderia mascarar a eficácia das metodologias de concentração aqui pesquisadas. Estudos recentes demonstram a eficácia de se utilizar a cultura celular para incrementar a detecção de AdVs (1,32), todavia, o próprio Xagorarakis et al. (1) enfatizam que este tipo de método é de difícil aplicação na análise simultânea de grande número de amostras.

O método de escolha para detecção de vírus em meio ambiente é a detecção molecular, como a PCR que inclui alta sensibilidade, especificidade, baixo custo e curto prazo de realização (33).

As metodologias de concentração estudadas, não raro, podem ser associadas com outras metodologias, tidas como secundárias, as mais amplamente empregadas nos estudos selecionados foram floculação orgânica (15), floculação inorgânica (28) e precipitação com polietilenoglicol (26,27) (dados não mostrados). A utilização destas metodologias está estritamente relacionada ao tipo de vírus, as soluções de eluição utilizadas assim como o tipo de amostra e o volume utilizado. Não há dúvidas que estas metodologias podem interferir no resultado final do diagnóstico, todavia, analisar todas estas variáveis seria dispendioso para um único estudo, de forma que estes dados foram coletados e serão analisados adequadamente em um segundo momento.

Acreditamos que todas as amostras ambientais analisadas são contaminadas por AdVs. O que vai influenciar o diagnóstico destes patógenos são as metodologias de detecção moleculares utilizadas e, sobretudo as metodologias de concentração, já que a concentração pode variar de amostra para amostra.

Dos os estudos selecionados que pesquisaram AdVs em amostras de rios ou lagos, de acordo com os resultados de positividade, a metodologia mais eficaz seria UC + Nested-PCR seguido de MFc + UC + Nested-PCR. Ultrafiltração em associação com qPCR não deve ser o método de escolha para isolar AdVs em amostras de rios ou lagos, pois das 39 amostras estudadas nenhuma foi positiva para AdVs.

Dentre os métodos empregados para detectar AdVs em esgoto bruto deve-se destacar o método de MFm + UF + qPCR que demonstrou positividade de 100% (89/89) das amostras. Métodos que utilizaram como detecção molecular a PCR em amostras de esgoto apresentaram baixa positividade, destacando-se a MFm + PCR, em que a positividade foi de apenas 20% (3/15). Os métodos de UF + Nested-PCR e UF + qPCR, UC + qPCR e UC + Nested-PCR demonstraram alta positividade para amostras de esgoto (100%), todavia esses dados devem ser questionados, pois o número de amostras analisadas foi muito pequeno e dentro de um mesmo estudo. Novos estudos sobre a utilização desses métodos definirão melhor a eficácia metodológica. O mesmo raciocínio é válido para os métodos de MFc + Nested-PCR, MFc + qPCR e UF + Nested-PCR para amostras de esgotos tratados, estes métodos tiveram eficácia de 100% de positividade, todavia, cada método estudado advém de um único estudo, o qual o número de amostras foi inexpressivo. O método de UC + PCR não deve ser utilizado para amostras de esgotos tratados, pois das 52 amostras nenhuma foi positiva para AdVs.

Em relação as amostras de enxurradas, constata-se que nenhum dos métodos utilizados foi eficaz para diagnóstica AdVs nestas águas. É proposto uma reavaliação destes métodos e mesmo a incorporação de novas metodologias, sobretudo as de concentração secundária para maximizar a detecção de AdVs nestas águas.

Através dos dados obtidos, pode-se constatar que a utilização da PCR não é indicada para detecção de AdVs em amostras ambientais, pois o desempenho é muito baixo em relação aos demais métodos (Tabela 2). Este fato pode ser observado nos estudos de Puig et al. (34) em que onze amostras ambientais foram negativas por PCR e todas positivas após processamento da segunda PCR, outro estudo que corrobora estes dados é o de Vantarakis and Papapetropoulou (15), em que nove amostras também foram negativas na PCR e todas positivas durante a realização de uma segunda amplificação.

A utilização de duas fases de amplificação prover alta especificidade e sensibilidade na detecção de adenovírus em amostras ambientais (20). Estudos de Puig et al. (34) e Noble et al. (25) já confirmavam que Nested-PCR é mais sensível do que qPCR para diagnosticar AdVs em amostras ambientais. Contraditoriamente, Jiang et al. (31) sugere que qPCR seja mais sensível do que Nested-PCR em amostras de esgotos. Real time PCR é uma metodologia robusta que oferece menor tempo de diagnóstico e tem a vantagem de realizar a quantificação da carga viral. Para estudos de monitoramento ambiental, em que deve-se estipular um limite máximo de certos patógenos nas águas monitoradas, qPCR pode ser a solução para estes problemas.

Concluindo, para amostras ambientais, PCR não deve ser o método de escolha para detectar AdVs em meio ambiente, deve-se priorizar qPCR ou Nested-PCR. Para detectar AdVs em amostras de rios ou lagos a metodologia de escolha deve ser UC + Nested-PCR. Em razão de um maior número de dados, é aconselhável utilizar MFm + UF + qPCR para detectar AdVs em amostras de esgotos tratados e não tratados (Tabela 2). Estudos adicionais são necessários para avaliar os métodos que foram empregados em um único estudo e/ou com número inexpressivo de amostras.

ABSTRACT

Assessment of methods for the concentration and molecular detection of adenovirus in untreated water: a meta-analysis

Molecular methodologies based on PCR have been used for the detection of adenovirus (AdVs) in environmental samples. It is a consensus among researchers that these methodologies offer some advantages compared with traditional methods for the isolation of virus by cell culture, since they are more sensitive and specific and also require less processing time; however, the method to be used for virus concentration in environmental samples is still controversial. Consequently, we carried out a meta-analysis, aiming at responding the questions concerning the efficacy of three methods for virus concentration associated to the molecular detection of AdVs in untreated water samples, by selecting 33 studies. We concluded that: a) PCR should not be the method of choice for the detection of AdVs in environmental samples, and instead the use of qPCR or Nested-PCR should be prioritized; b) for the detection of AdVs in water samples collected in rivers or lakes, the method of choice should be an association of ultracentrifugation and Nested-PCR; c) it is advisable to use an association of microfiltration membrane, ultrafiltration, and qPCR for the detection of AdVs in treated and untreated sewage samples. Further studies are needed to evaluate the methods that have been used in only one study and/or with an inexpressive number of samples.

Key words: adenovirus, untreated water, concentration, meta-analysis, PCR.

REFERÊNCIAS

1. Xagorarakis I, Kuo DH-W, Wong K, Wong M, Rose JB. Occurrence of Human Adenoviruses at Two Recreational Beaches of the Great Lakes. *Appl Environ Microbiol* 73: 6874-7881, 2007.
2. Karamoko Y, Ibenyassine K, Aitmhad R, Idaomar M, Ennaji MM. Adenovirus detection in shellfish and urban sewage in Morocco (Casablanca region) by the polymerase chain reaction. *J Virol Methods* 126: 135-137, 2005.
3. Miagostovich MP, Ferreira FFM, Guimarães FR, Fumian TM, Diniz-Mendes L, Luz SLB, Silva LA, Leite JPG. Molecular Detection and Characterization of Gastroenteritis Viruses Occuring Naturally in the Stream Waters of Manaus, Central Amazônia, Brazil. *Appl Environ Microbiol* 74: 375-382, 2008.
4. Loge FJ, Thompson DE, Call DR. PCR Detection of Specific Pathogens in Water; A Risk-Based Analysis. *Environ Sci Technol* 36: 2754-2759, 2002.
5. Rohayem J, Dumke R, Jaeger K, Schröter-Bobsin U, Mogel M, Kruse A, Jacobs A, Rethwilm A. Assessing the Risk of transmission of Viral Diseases in Flooded Areas: Viral Load of the River Elbe in Dresden during the Flood of August 2002. *Intervirology* 49: 370-376, 2006.
6. Haramoto E, Katayama H, Oguma K, Ohgaki S. Quantitative analysis of human enteric adenoviruses in aquatic environments. *J Appl Microbiol* 103: 2153-2159, 2007.
7. Katayama H, Haramoto E, Oguma K, Yamashita H, Tajima A, Nakajima H, Ohgaki S. One-year monthly quantitative survey of noroviruses, enteroviruses, and adenoviruses in wastewater collected from six plants in Japan. *Water Res* 42: 1441-1448, 2008.
8. Soule H, Genoulz O, Gratacap-Cavallier B, Chevallier P, Liu J-X. Ultrafiltration and reverse transcription-polymerase chain reaction: an efficient process

- for poliovirus, rotavirus and hepatitis A virus detection in water. *Water Res* 34: 1063-1067, 2000.
9. Rajal VB, McSwain BS, Thompson DE, Leutenegger CM, Wuertz S. Molecular quantitative analysis of human viruses in California stormwater. *Water Res* 41: 4287-4298, 2007.
10. Myrmel M, Berg EMM, Grinde B, Rimstad E. Immunomagnetic separation of a Norwalk-like virus (genogroup I) in artificially contaminated environmental water samples. *Int J Food Microbiol* 62: 17-26, 2006.
11. Formiga-Cruz M, Hundesa A, Clemente-Casares P, Albiñana-Gimenez N, Allard A, Girones R. Nested multiplex PCR assay for detection of human enteric viruses in shellfish and sewage. *J Virol Methods* 124: 111-118, 2005.
12. He J-W, Jiang S. Quantification of Enterococci and Human Adenoviruses in Environmental Samples by Real-Time PCR. *Appl Environ Microbiol* 71: 2250-2255, 2005.
13. Albinana-Gimenez N, Clemente-Casares P, Bofill-Mass S, Hundesa A, Ribas F, Girones R. *Environ Sci Technol* 40: 7416-7422, 2006.
14. Chen Z, Hsu F-H, Battigelli D, Chang H-C. Capture and release of viruses using amino-functionalized silica particles. *Anal Chim Acta* 569: 76-82, 2006.
15. Vantarakis A, Papapetropoulou M. Detection of Enteroviruses, Adenoviruses and Hepatitis A Viruses in Raw Sewage and Treated Effluents by Nested-PCR. *Wat, Air, and Soil Pollution*. 114: 85-93, 1999.
16. Farrah SR, Bitton G. Low molecular weight substitutes for beef extracts as eluants for poliovirus adsorbed to membrane filters. *Can J Microbiol* 25: 1045-1051, 1979.

17. Lewis GD, Metcalf TG. Polyethylene Glycol Precipitation for Recovery of Pathogenic Viruses, Including Hepatitis A Virus and Human Rotavirus, from Oyster, Water, and Sediment Samples. *Appl Environ Microbiol* 54: 1983-1988, 1988.
18. Lukasik L, Scott TM, Andryshak D, Farrah SR. Influence of Salts on Virus Adsorption to Microporous Filters. *Appl Environ Microbiol* 66: 2914-2920, 2000.
19. Pina S, Puig M, Lucena F, Jofre J, Girones R. Viral Pollution in the Environment and in Shellfish: Human Adenovirus Detection by PCR as an Index of Human Viruses. *Appl Environ Microbiol* 64: 3376-3382, 1998.
20. Castingnolles N, Peti F, Mendel I, Simon L, Cattolico L, Buffet-Janvresse C. Detection of Adenovirus in the waters of the Seine River estuary by Nested-PCR. *Mol Cel Probes* 12: 175-180, 1998.
21. Formiga-Cruz M, Allard AK, Condin-Hansson AC, Henshilwood K, Hernroth BE, Jofre J, Lees DN, Lucena F, Papapetropoulou M, Rangdale RE, Tsibouxi A, Vantarakis A, Girones R. Evaluation of Potential Indicators of Viral Contamination in Shellfish with Applicability to Diverse Geographical Areas. *Appl Environ Microbiol* 69: 1556-1563, 2003.
22. Lee C, Kim S-J. Molecular Detection of Human Enteric Viruses in Urban Rivers in Korea. *J Microbiol Biotechnol* 18: 1156-1163, 2008.
23. Gerba CP, Gramos DM, Nwachuku N. Comparative inactivation of enteroviruses and adenovirus 2 by UV light. *Appl Environ Microbiol* 68: 5167-5169, 2002.
24. Thompson SS, Jackson JL, Suva-Castillo M, Yanko WA, El Jack Z, Kuo J, Chen CL, Williams FP, Schunurr DP. Detection of infectious human adenoviruses in tertiary-treated and ultraviolet-disinfected wastewater. *Water Environ Res* 75, 163-170, 2003.

25. Noble RT, Allen SM, Blackwood AD, Chu W, Jiang SC, Lovelace L, Sobsey MD, Stewart JR, Wait DA. Use of viral pathogens and indicators to differentiate between human and non-human fecal contamination in a microbial source tracking comparison study. *J Wat Health* 1: 195-207, 2003.
26. Greening GE, Hewit J, Lewis GD. Evaluation of integrated cell culture-PCR (C-PCR) for virological analysis of environmental samples. *J Appl Microbiol* 93: 745-750, 2002.
27. Carducci A, Verani M, Battistini R, Pizzi F, Rovini E, Andreoli E, Casini B. Epidemiological surveillance of human enteric viruses by monitoring of different environmental matrices. *Water Sci Technol* 54: 239-244, 2006.
28. Egger M, Smith GD. Meta-analysis: potentials and promise. *BMJ* 315: 1371-1374, 1997.
29. Polit DF, Beck CT, Hungler BP. Avaliação da mensuração e da qualidade dos dados. Fundamentos de Pesquisa em Enfermagem. Métodos, avaliação e utilização. Porto Alegre. Ed. Artmed, p. 285-306, 2004.
30. Lipp Ek, Lukasiki J, Rose JB. 2001. Human enteric viruses and parasites in the marine environment. *Methods Microbiol* 30: 559-588, 2001.
31. Jiang SC, Chu W. PCR detection of pathogenic viruses in southern California urban rivers. *J Appl Microbiol* 97: 17-28, 2004.
32. Chapron CD, Ballester NA, Fontaine JH, Frades CN, Margolin A. Detection of Astroviruses, Enteroviruses, and Adenoviruses Types 40 and 41 in Surface Waters Collected and Evaluated by the Information Collection Rule and an Integrated Cell Culture-Nested PCR Procedure. *Appl Environ Microbiol* 66: 2520-2525, 2000.

33. Jiang S, Noble R, Chu W. Human adenoviruses and coliphages in urban runoff-impacted costal water of Southern California. *Appl Environ Microbiol* 67: 179-184, 2001.
34. Puig M, Jofre J, Lucena F, Allard A, Wadell G, Girones R. Detection of Adenoviruses and Enteroviruses in Polluted Waters by Nested PCR Amplification. *Appl Environ Microbiol* 60: 2963-2970, 1994.
35. Rodríguez-Díaz J, Querales J, Caraballo L, Vizzi E, Liprandi F, Takiff H. Gastroenteritis Viruses in Urban Sewage and Sewage-Polluted River Waters in Caracas, Venezuela. *Appl Environ Microbiol* 75: 387-394, 2009.
36. Hundesa A, de Montes CM, Bofill-Mass S, Albinana-Gimenez N, Girones R. Identification of Human and Animal Adenoviruses and Polyomaviruses for Determination of Sources of Fecal Contamination in the Environment. *Appl Environ Microbiol* 72: 7886-7893, 2006.
37. Haramoto E, Katayama H, Oguma K, Ohgaki S. Application of Coation-Coated Filter Method to Detection of Novoriruses, Enteroviruses, Adenoviruses, and Torque Teno Viruses in the Tamagawa River in Japan. *Appl Environ Microbiol* 71: 2403-2411, 2004.
38. Cho HB, Lee S-H, Cho J-C, Kim S-J. Detection of adenoviruses and enteroviruses in tap water and river water by reverse transcription multiplex PCR. *Can J Microbiol* 46: 417-424, 2000.
39. Surbeck CQ, Jiang SC, Ahn JH, Grant SB. Flow Fingerprinting Fecal Pollution and Suspended Solids in Stormwater Runoff from an Urban Coastal Watershed. *Environ Sci Technol* 40: 4435-4441, 2006.
40. Backer LC, Carmichael W, Kirkpatrick B, Williams C, Irvin M, Zhou Y, Johnson TB, Nierenberg K, Hill VR, Kieszak SM, Cheng Y-S. Recreational

Exposure to Low Concentrations of Microcystins During an Algal Bloom in a Small Lake. *Mar Drugs* 6: 389-406, 2008.

41. Jiang S, Dezfulian H, Chu W. Real-time quantitative PCR for enteric adenovirus serotype 40 in environmental waters. *Can J Microbiol* 51: 393-398, 2005.

42. Bofill-Mass S, Albinana-Gimenez N, Clemente-Casares P, Hundesa A, Rodriguez-Manzano J, Allard A, Calvo M, Girones R. Quantification and Stability of Human Adenoviruses and Polyomavirus JCPyV in Wastewater Matrices. *J Appl Microbiol* 72: 7894-7896, 2006.

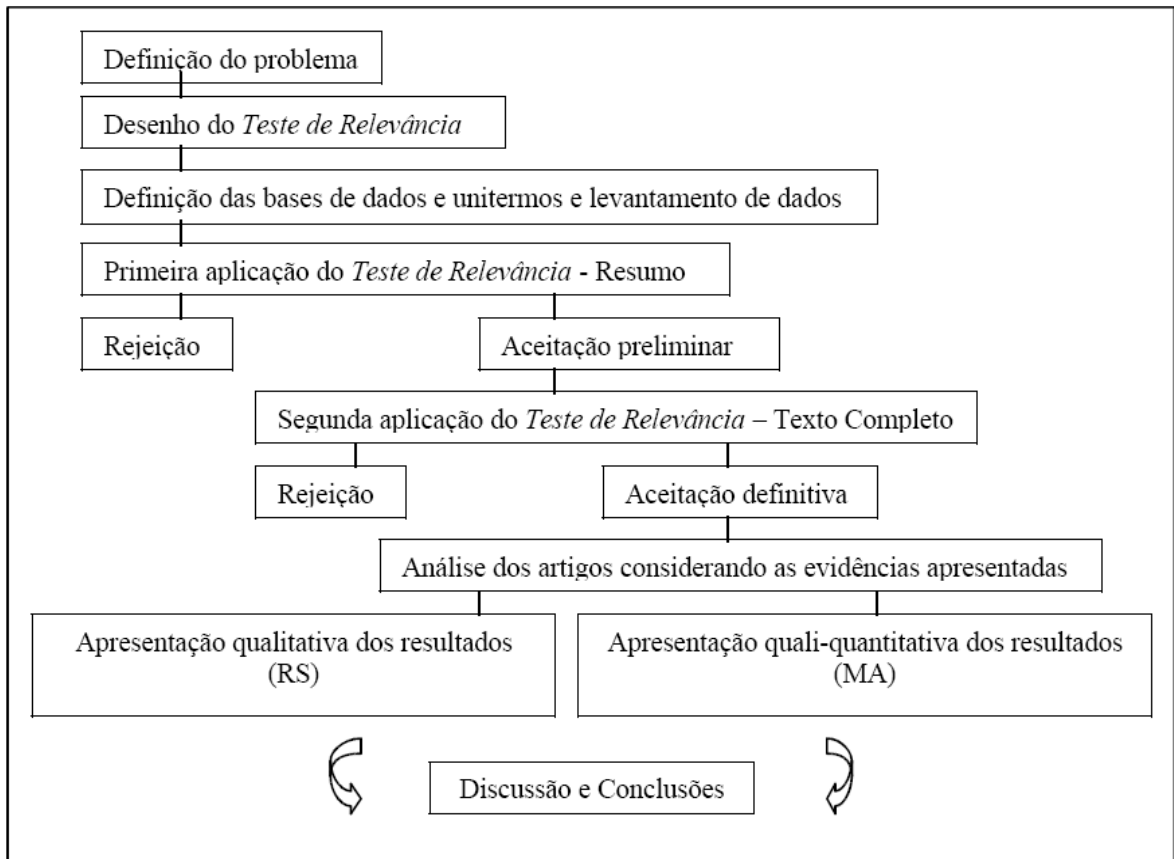
43. Komninou G, Vantarakis A, Venieri D, Papapetropoulou M. Evaluation of virological quality of sewage from four biological treatment plants by a nested-PCR technique. *Water Sci Technol* 50: 243-257, 2004.

44. de Motes CM, Clemente-Casares P, Hundesa A, Martín M. Detection of Bovine and Porcine Adenoviruses for Tracing the Source of Fecal Contamination. *Appl Environ Microbiol* 70: 1448-1454, 2004.

45. Jiang SC, Chu W, Olson BH, He J-W, Choi S, Zhang J, Le JY, Gedalanga PB. Microbial source tracking in a small southern California urban watershed indicates wild animals and growth as the source of fecal bacteria. *Appl Microbiol Biotechnol* 76: 927-934, 2007.

Formulário de aplicação do Teste de Relevância I		
Critérios de Inclusão	Sim	Não
1. O estudo trata de adenovírus diagnosticados em águas não tratadas?		
2. O diagnóstico realizado é molecular?		
Critérios de Exclusão	Sim	Não
1. É relato de caso, editorial, comunicação ou revisão?		
2. A cultura celular é utilizada em associação com o diagnóstico molecular?		
Formulário de aplicação do Teste de Relevância II		
Critérios de Inclusão	Sim	Não
1. O objetivo do estudo tem relação com a questão que os avaliadores estão estudando?		
2. É água fluvial não tratada?		
3. É utilizada ao menos uma das metodologias de concentração virial previamente selecionadas?		
4. As membranas utilizadas (MF e UF) possuem porosidade dentro do limite máximo e mínimo estipulado pelos pesquisadores?		
5. É Utilizada a PCR ou variações desta no diagnóstico?		
Critérios de Exclusão	Sim	Não
1. Dentre as metodologias de MF, UF e UC ocorrem combinações diferentes das pesquisadas na realização da Revisão Sistemática?		
2. Na concentração ou detecção são utilizadas associações com cultura celular?		
3. O estudo apresenta dados insuficientes para análise?		

Figura 1- Formulários de aplicação dos Testes de Relevância I e II.



(Muñoz et al., 2002)

Figura 2 – Fluxograma esquematizando o delineamento do estudo.

Tabela 1 – Bases de dados com a aplicação dos respectivos Testes de Relevância I e II (T.R.I e T.R.II).

Base de Dados		Data	Horário (Brasil)	Nº Resumos	T. R.I	T. R.II
	PubMed	20.12.08	08:11	178	48	32
	Repidisca	20.12.08	12:32	5	2	0
CSA Illumina	AsFA	30.12.08	12:50	41	27	11
	CSA Technology			48	25	14
	Res Oceanic			5	2	0
	Abstract					
	Scopus	30.12.08	16:51	16	5	2
Total				293	109	59


Tabela 2 – Artigos selecionados com seus respectivos dados sobre positividade e métodos de diagnóstico de AdVs em águas não tratadas.

Amostra	Referência	Método	n(1)	n(2)	pos%(1)	pos%(2)
Rios e lagos	35	UC + Nested-PCR	18	18	83,3	83,3
	13/36/19	MFc + UC + Nested-PCR	14/9/23	46	92,9/88,9/65,2	78,3
	5/22	MFm + Nested-PCR	36/58	94	52,8/70,7	63,8
	37/4	MFm + UF + qPCR	36/58	94	52,8/70,7	63,8
	26/38/32	MFc + Nested-PCR	6/12/29	47	66,7/83,3/10,3	36,2
	3	MFm + UF + PCR	52	42	30,8	30,8
	1	MFc + qPCR	58	58	24,1	24,1
	27/39/31	UF + Nested-PCR	12/15/17	44	0,0/6,7/52,9	22,7
	39/40	UF + qPCR	15/24	39	0,0/0,0	0,0
Esgoto	6/7	MFm + UF + qPCR	17/72	89	100,0/100,0	100,0
	41/25	UF + Nested-PCR	2/2	4	100,0/100,0	100,0
	41/25	UF + qPCR	2/2	4	100,0/100,0	100,0
	42	UC + qPCR	6	6	100,0	100,0
	35/13/38/10/21/41/43/4 4/19/34/15/44	UC + Nested-PCR	12/5/9/25/10/9/92/12/15/16/24/1 5	244	50,0/100,0/100,0/96,0/90,0/56,6/81,15/ 91,17/93,3/100,0/58,3/0,0	77,0
	27	UF + PCR	12	12	7	58,3
	34/15	UC + PCR	16/24	40	7/5	30,0
	2	MFm + PCR	15	15	3	20,0
	Esgoto tratado	26	MFc + Nested-PCR	5	5	100,0
42		MFc + qPCR	7	7	100,0	100,0
12		UF + Nested-PCR	7	7	100,0	100,0
6/7		MFm + UF + qPCR	17/143	160	82,4/99,3	97,5
10/19/15		UC + Nested-PCR	16/3/24	43	93,3/66,7/0,0	39,5
27		UF + Nested-PCR	12	12	25,0	25,0
15		UC + PCR	52	52	0,0	0,0
Águas de enxurradas	45	UC + Nested-PCR	57	57	3,5	35,0
	4	MFc + UF + Nested PCR	58	58	3,4	3,4
	9	UF + qPCR	61	61	1,6	1,6

n(1): número de amostras por estudo, n(2): número total de amostras por método, pos%(1): frequência de amostras positivas por estudo, pos%(2): frequência de amostras positivas dentro do método

Molecular detection of adenoviruses in lakes and rivers of Goiânia, Goiás, Brazil

Hugo D. Silva • Ludimila A. C. Wosnjuk • Sônia F. O. Santos • Cesar A. S. T. Vilanova-Costa • Flávia C. Pereira • Marco T. A. Garcíazapata • Elisângela P. S. Lacerda • Carlos E. Anunciação

H. D. Silva • L. A. C. Wosnjuk • C. E. Anunciação 

Laboratório de Diagnóstico Genético e Molecular, Instituto de Ciências Biológicas II, Universidade Federal de Goiás, Campus Samambaia, Caixa Postal 131, 74001-970, Goiânia–GO, Brazil

Tel.: (+55) (62) 35211494; fax (+55) (62) 35211078.

E-mail: carlose@icb.ufg.br

S. F. O. Santos • M. T. A. Garcíazapata

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

C. A. S. T. Vilanova-Costa • F. C. Pereira • E. P. S. Lacerda

Laboratório de Genética Molecular e Citogenética, Instituto de Ciências Biológicas I, Universidade Federal de Goiás, Campus Samambaia, Caixa Postal 131, 74001-970, Goiânia–GO, Brazil

Abstract Adenoviruses are a highly important public health issue, since they are among the most persistent and ubiquitous viruses present in water and associated with a variety of clinical manifestations. The goal of this study was to use molecular techniques for the detection of adenovirus in public and recreational water supplies in Goiânia, Brazil. From December 2007 to November 2008, 54 water samples were collected in five different sites in two lakes and two rivers of the city. The samples were filtered in a positively-charged nylon membrane and the DNA was extracted using the phenol-chloroform-isoamyl alcohol method. Sequence analysis of PCR products and semi-nested PCR were performed to identify the recovered viruses. Nested-PCR amplification indicated the presence of adenoviruses in 29 samples (39.2%), which suggests the use of this methodology to detect adenovirus in water. This pioneer study in the state of Goiás detected adenovirus contamination in water samples.

Keywords Adenoviruses • Untreated water • Nested-PCR • Public health

Introduction

Goiânia, the capital of the state of Goiás, located in the Midwestern Region of Brazil, has ca. 1,221,654 inhabitants and is considered a regional metropolis, among the major Brazilian cities that receive a large number of migrants (Alves and Chaveiro 2007). As a result, the city faces problems of disorderly and unsustainable urban growth with a consequent increase in superficial waste, which is a continuous source of contamination of water courses.

The current sources of public water supply for the city of Goiânia, the Meia Ponte river basin and its tributary river João Leite, are constantly submitted to degradation processes due to anthropic action, such as agriculture, intensive livestock production, and urbanization. And although all the water supplies of Goiânia come from this basin (52% from the João Leite river and 48% from the Meia Ponte river), this municipality is its largest polluter.

Among the microorganisms that contaminate the aquatic environment, special attention should be given to enteric viruses. More than 140 different viruses are shed in the gastro-intestinal tract of infected humans (Hurst 1991), and can be found in surface waters (Cho et al. 2000; Hot et al. 2003). Their presence in water courses is considered a public health problem in many countries (Chen et al. 2006) since even at low concentrations they can cause illnesses when ingested (Ward et al. 1984).

Among enteric viruses, adenoviruses have been known to be prevalent in polluted waters (Castingnolles et al. 1998). Adenoviral infections are among the leading causes of a variety of human diseases, especially respiratory illnesses (Larranaga et al. 2000), acute conjunctivitis (Takeuchi et al. 1999), and gastroenteritis (Enriquez et al. 1995), and the monitoring of these pathogens arouses great interest because they are stable in various environments and resistant to some disinfection treatments, such as UV and chlorine (Gerba et al. 2002). Also, they have a double-stranded DNA (dsDNA) genome, which facilitates molecular diagnosis, since the use of the reverse transcriptase enzyme is not required, as in RNA viruses, resulting in cost and time reduction to reach a diagnosis. Consequently,

molecular methods, such as polymerase chain reaction (PCR), are emerging as an alternative to *in vitro* traditional cell culture (Karamoko et al. 2005). PCR methods provide very specific, sensitive, and rapid detection of viral pathogens in a variety of environmental samples (Rigotto et al. 2005).

So far, in the state of Goiás no studies have indicated the occurrence of viruses in water. Therefore, the purpose of this study was to use molecular techniques for the detection of adenoviruses in public and recreational water supplies in the city of Goiânia since the presence of this type of microorganism confirms the risk of its transmission to the human population.

Material and methods

Sampling sites

From December 2007 to November 2008, 54 samples of water were collected in the city of Goiânia, Brazil, in the following bodies of water: a) Meia Ponte river – two sampling sites, one approximately 1 km upstream of the emission of wastewater treated by the municipal wastewater treatment plant of Goiânia, located at 16°37'40.94"S latitude and 49°16'13.41"W longitude (MP1), and another located 2 km downstream of the plant at 16°38'22.39"S latitude and 49°15'50.68"W longitude (MP2); b) João Leite river – a sampling site before the municipal water treatment plant, located at 49°13'24.53"S latitude and 16°19'37.52"W longitude (JL); c) Vaca Brava Park lake – a sampling site located at 16°42'31.18"S latitude and 49°16'15.67"W longitude (VB); d) Bosque dos Buritis lake – a sampling site located at 16°40'58.51"S latitude and 49°15'38.35"W longitude (BB).

Sample processing

Water samples were collected in sterilized 10-L polypropylene carboys, between 9:00 am and 12:00 am (De Paula et al. 2007), from one point in the center of the rivers, approximately 20 cm under the surface, and from the output of the lakes. All the samples were stored in a styrofoam box containing ice and transported within 4 h to the Genetics and Molecular Diagnostic Laboratory of the Federal University of Goiás to undergo the analyses.

To remove excessive organic matter, such as algae, plants, and other contaminants, a prefiltration was performed under vacuum using qualitative filter paper. The water was submitted to a new filtration using a positively-charged nylon membrane filter (discs 60-mm diameter; nominal pore size = 0.45 µm; HybondTM-N+, Amersham Pharmacia).

The material adsorbed to the membrane was eluted by vigorous manual agitation with 5 mL of TE low buffer (10 mM Tris-HCl, pH 8.0; 1 mM EDTA) and 0.02% Tween-20. Aliquots of the eluted material were collected in 1.5-mL microtubes and stored at -20°C until use.

DNA extraction was carried out using the phenol-chloroform-isoamyl alcohol method (Sambrook and Russel 2001), centrifuged at 10.000 x g for 5 min, and washed with ethanol 70%. The pellet was resuspended in 40 µL of TE low buffer (pH 8.0) and stored at -20°C before PCR analysis.

To exclude any possibility of cross contamination, all reagents were prepared in a laminar flow cabinet, all extractions were made in duplicates and processed on different days.

In order to detect the DNA from the reference adenovirus strain (Ad5, our positive control), DNA extraction was performed in a sample of Hep-2 cells contaminated with Ad5 donated by Dr. Celia Regina Monte Barardi, from the Laboratory of Applied Virology of the Federal University of Santa Catarina, using the phenol-chloroform-isoamyl alcohol method (Sambrook and Russel 2001).

Molecular detection of human adenovirus

The sequence, sensitivity and specificity of the primers (MWG Oligo Synthesis Report, USA) used were defined in previous studies (Pina et al. 1998; Rigotto et al. 2005).

For PCR amplification, 28 μL of extracted nucleic acids were added to a 50 μL reaction mix consisting of 20 mM Tris-Cl (pH 8.4), 50 mM KCl, 0.2 mM each dATP, dCTP, dTTP, and dGTP, 85 pmoles of each primer (hexAA 1885 5'-GCCGCAGTGGTCTTACATGCACATC-3' and hexAA 1913 5'-CAGCACGCCGCGGATGTCAAAGT-3'), 1.5 mM MgCl_2 , and 5U of Taq DNA polymerase (all reagents from Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA).

The amplification program on a PTC-100TM thermal cycler (MJ Research Inc., Watertown, MA, USA) consisted of a first cycle of 10 min at 94°C followed by 40 cycles of denaturation at 94°C for 1 min, annealing at 56°C for 1 min, and elongation at 72°C for 1 min (Rigotto et al. 2005). A final elongation was performed at 72°C for 7 min and the expected size of the amplicon product was 301 bp.

In the second round of amplification (semi-nested PCR), 14 μL of the first PCR product was added to 25 μL of a reaction mixture containing 20 mM Tris-HCl (pH 8.4), 50 mM KCl, 0.2 mM each dATP, dCTP, dTTP, and dGTP, 1.5 mM MgCl_2 , 85 pmoles of hexAA 1913 and nehexAA 1893 5'-GCCACCGAGACGTA CTTTCAGCCTG-3, and 5U of Taq DNA polymerase. PCR amplification was carried out for 30 cycles at 94°C for 1 min, 57°C for 1 min, 72°C for 50 sec, and a final incubation at 72°C for 5 min. The expected amplicon was about 222 bp. Positive (purified Ad5 DNA) and negative controls (Milli-Q water, Millipore) were used in all reactions. In order to carry out the semi-nested PCR for the positive control, 5 μL of DNA and 3 μL of the product were used. The concentration of reagents and programs of amplification were identical to those used in the samples concentrated by filtration.

Aliquots of 15 μL of each amplicon were mixed with 5 μL of loading buffer (Sambrook and Russel 2001) and analyzed on 1.5% agarose gel (UltraPureTM Agarose, Invitrogen). The products were visualized by ethidium bromide staining and UV transillumination. Fragment sizes were compared with a commercially available size standard (100 bp DNA ladder, Invitrogen, Brazil).

Results

Using the first pair of primers, 26/54 (47.7%) samples were positive by PCR (Table 1). Not all amplifications of the first PCR were confirmed positive when a second pair of primers was used in the second round of amplification, since 22/54 samples were positive (39.2%) (Table 1).

The largest variation on the confirmation of the result by semi-nested PCR occurred in the samples collected at BB site, for which three samples were confirmed positive for PCR while in the second PCR they were negative, the same occurring to one sample collected at MP1 site and two samples collected at JL site. The opposite occurred to one sample collected at MP1 site, with a negative result for PCR and a positive result for semi-nested PCR. The other 48 samples presented negative or positive results for PCR that were confirmed by semi-nested PCR.

The samples that showed 222-bp amplicons, in accordance with the positive control, detected by semi-nested PCR, were considered positive for human adenovirus. The sensitivity and specificity of PCR are shown in Table 1.

The results of all reactions by PCR and nested-PCR are shown in the table contained in the supplementary information (Online Resource 1).

Discussion

Prefiltration with qualitative filter paper, prior to performing filtration using the positively-charged nylon membrane filter, was crucial; otherwise the large and medium-sized particles found in the water samples would rapidly saturate the nylon membrane since its porosity is 0.45 μm .

DNA extraction by the phenol-chloroform-isoamyl alcohol method proved to be fast, efficient, and low-cost. Nevertheless, phenol-chloroform is toxic, cancerigenous, and highly corrosive, requiring the use of a laminar flow system for the procedure.

Traditionally, the methods used to isolate waterborne viruses involve cell culture (Formiga-Cruz et al. 2005). However, the number of researches on molecular methods to isolate and characterize these pathogens in environmental samples has been increasing in the last years (Castingnolles et al. 1998, De Paula et al. 2007; Fout et al. 2003; Karamoko et al. 2005; Katayama et al. 2008; Lee and Kim 2002; Rose et al. 2006; Soule et al. 2000; Tsai et al. 1994).

The PCR method offers two advantages over the conventional cell culture methods, namely rapid recovery time and high sensitivity (Papapetropoulou and Vantarakis 1998). These characteristics were evidenced in the present study, since semi-nested PCR allowed the detection of adenovirus in less than 12 h.

The use of second round PCR permits the elimination of false-negative results, as evidenced in another study showing that 9 out of 25 samples were negative using PCR, a result confirmed positively by a second PCR reaction (Papapetropoulou and Vantarakis 1998). The use of two phases of amplification provides higher specificity and sensitivity for the detection of adenovirus in environmental samples presenting high level of pollution

(Castingnolles et al. 1998). This fact was observed in our study, since one sample collected at MP1 site was negative in the PCR assay and positive using a second round of amplification, which is probably considered a false-negative case, corroborating the high sensitivity and even the capacity of this methodology to eliminate false-positive results (Girones et al. 1993). However, a higher positivity was found when just PCR was performed, inasmuch as 6 out of 54 samples were positive in the PCR assay and negative after being processed by semi-nested PCR, characterizing false-positive samples. This might have occurred due to the high volume of DNA extracted used to perform the PCR, which may induce false-positive results because of chance girdling with other microorganisms, especially bacteria, protozoa, and other viral agents. Furthermore, the high volume used can introduce a lot of inhibitors in the PCR reaction, which might result in false-negative results.

Nevertheless, with the methodology employed, it was possible to standardize the reaction only using a high volume of DNA in the implementation of PCR. We believe that this may be a consequence of the low number of viral particles concentrated by microfiltration on the nylon membrane. To overcome this obstacle, we used semi-nested PCR aiming to detect false-positive and false-negative results and increase the sensitivity and specificity of the reaction. Therefore, due to its high sensitivity and specificity to detect both false-positive and false-negative results, semi-nested PCR can be considered a reliable molecular diagnosis to detect adenovirus in water. Therefore, in this study, semi-nested PCR was considered a method for the definitive diagnosis of adenovirus in water.

The use of PCR in a single phase for the detection of adenovirus in water must be questioned, because although it proved to have good sensibility, this method showed low specificity regarding the detection of these microorganisms (Table 1).

The primers used have mismatches to members of species B1 (Allard et al. 2001), although these types are not common in environmental samples. We expected the amplification of serotypes 40 (Ad40) and 41 (Ad41) to take place, because they have been proven to be involved in gastroenteritides and are capable of reaching rivers and lakes through clandestine direct discharges of untreated human wastes. Serotype specification, which is of high epidemiologic interest, may be carried out in future studies using specific primers.

Some researchers have already isolated adenoviruses in treated water and confirmed, through visualization of cytopathic effect, the presence of active viruses in water supplies previously considered safe for human consumption (Heerden et al. 2003; Lee and Kim 2002).

In Goiânia, the risk of contamination of rivers and lakes by pathogenic agents has been enhanced due to its semi-arid weather conditions, increasing and uncontrolled process of urbanization, deforestation, and expanded livestock production.

Meia Ponte river receives part of the raw non-treated sewage of Goiânia; therefore, we already expected a certain degree of contamination in the sampled sites. Our results showed that 40% and 50% of the samples collected at sites MP1 and MP2 (Table 1), respectively, were contaminated with adenoviruses according to the results provided by semi-nested PCR, confirming the insufficient sewage treatment by the municipal wastewater treatment plant of Goiânia, since both sites are located after it, as well as the presence of clandestine direct discharges of untreated sewage before and after the treatment plant, which was observed *in loco* during this research.

VB and BB sites, where 33.4% and 25.0% of the samples were positive, respectively (Table 1) by semi-nested PCR, are located in old parts of the city that present high density population. Although these water bodies are not the final destination of raw non-treated sewage of Goiânia, the positive results aforementioned might be explained by the discharges of clandestine untreated sewage directly into them and by groundwater contamination caused by sewage system infiltration and septic systems, still used in that old part of the city. Recently, most of the sludge present in both lakes was removed and retaining walls were built. However, these lakes should be monitored in order to evaluate whether the infestation persists, since these water bodies might be working as a virus deposit.

João Leite river presented 47.6% of the samples contaminated (Table 1), explained by the clandestine direct discharges of untreated human and animal wastes produced in Goiânia and the nearby municipalities that have already been registered in that water course. This reality can be changed soon, because the state government has been putting into practice a project to build a dam on João Leite river aiming to impound the water and create an artificial pond in order to provide treated water for the increasing population of Goiânia.

Adenoviruses are very resistant to the methods currently used to treat and purify water (Castingnolles et al. 1998), and they persist even in waters presenting over 5 mg of chlorine per liter. Taking this fact into account, the present study is highly relevant in terms of public health inasmuch as João Leite river is used for the abstraction of water intended to be treated for human consumption. In spite of the treatment, due to some particularities of these viruses resistance, the water used in Goiânia might have the presence of these pathogens, which may contaminate the population served by the public system.

This is the first study in state of Goiás to detect adenovirus in untreated water. The detection of these pathogens will allow better definition of health policies and public sanitation, since other viral diseases, including the ones potentially transmitted by water and even those of unknown routes, may be identified and studied properly.

Conclusion

The use of a second round of amplification (semi-nested PCR) was crucial to enhance the sensibility and specificity of the reaction (Rigotto et al. 2005). The methodology we used proved to be feasible because it is fast and low-cost.

Using semi-nested PCR, it was possible to verify that the water courses around Goiânia are contaminated by adenoviruses, which requires public administrators to take new and more efficient measures in order to treat them.

Taking into consideration that these viruses are human-borne and that there are several sources of water pollution in Goiânia, these should be determined, mainly in the lakes, where the precise origin of contamination remains unknown. Adenoviruses are responsible for a series of illnesses, including common cold, pharyngitis, gastroenteritis, amigdalitis, and encephalitis, and in patients at risk, such as immunosuppressed individuals or children, some infections caused by these pathogens can even be lethal (Poddar 1999). The presence of these pathogens in the water used for human consumption in Goiânia deserves special attention because the frequency of viral contamination in some sites was high compared with other studies, which showed adenovirus occurrence lower than 50% (Karamoko et al. 2005; Lee and Kim 2002).

References

- Allard, A., Albinsson, B., Wadell, G. (2001). Rapid typing of human adenoviruses by a general PCR combined with restriction endonuclease analysis. *Journal of Clinical Microbiology*, 39(2), 498–505.
- Alves, T. M., & Chaveiro, E. F. (2007). Metamorfose urbana: a conurbação Goiânia-Goianira e suas implicações sócio-espaciais. (Urban metamorphosis: the conurbation of Goiânia and Goianira cities and its socio-spatial implications.). *Revista Geográfica Acadêmica*, 1(1), 95–107.
- Castingnolles, N., Peti, F., Mendel, I., Simon, L., Cattolico, L., Buffet-Janvresse, C. (1998). Detection of adenovirus in the waters of the Seine River estuary by Nested-PCR. *Molecular and Cellular Probes*, 12(3), 175–180.
- Chen, Z., Hsu, F. C., Battigelli, D., Chang, H. C. (2006). Capture and release of viruses using amino-functionalized silica particles. *Analytica Chimica Acta*, 569(2), 76–82.
- Cho, H. B., Lee, S. H., Cho, J. C., Kim, S. J. (2000). Detection of adenoviruses and enteroviruses in tap water and river water by reverse transcription multiplex PCR. *Canadian Journal of Microbiology*, 46(5), 417–424.
- De Paula, V. S., Diniz-Mendes, L., Villar, L. M., Luz, S. L. B., Silva, L. A., Jesus, M. S., et al. (2007). Hepatitis A virus in environmental water samples from the Amazon Basin. *Water Research*, 41(6), 1169–1176.
- Enriquez, C. E., Hurst, C. J., Gerba, C. P. (1995). Survival of the enteric adenoviruses 40 and 41 in tap, sea, and wastewater. *Water Research*, 29(11), 2548–2553.
- Formiga-Cruz, M., Hundesa, A., Clemente-Casares, P., Albiñana-Gimenez, N., Allard, A., Girones, R. (2005). Nested Multiplex PCR assay detection of human enteric viruses in shellfish and sewage. *Journal of Virological Methods*, 125(2), 111–118.
- Fout, G. S., Martinson, B. C., Moyer, M. W. N., Dahling, D. R. (2003). A multiplex reverse transcription-PCR method for detection of human enteric viruses in groundwater. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(60), 3158–3164.
- Gerba, C. P., Gramos, D. M., Nwachuku, N. (2002). Comparative inactivation of enteroviruses and adenovirus 2 by UV light. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(10), 5167–5169.
- Girones, R., Allard, A., Wadell, G., Jofre, J. (1993). Application of PCR to the detection of adenoviruses in polluted waters. *Water Science and Technology*, 27(3-4), 235–241.
- Heerden, J. van, Ehlers, M. M., Zyl, W. B. van, Grabow, W. O. K. (2003). Incidence of adenoviruses in raw and treated water. *Water Research*, 37(15), 3704–3708.
- Hot, D., Legeay, O., Jacques, J., Gantzer, C., Caudrelier, Y., Guyard, K., et al. (2003). Detection of somatic phages, infectious enteroviruses and enterovirus genomes as indicators of human enteric viral pollution in surface water. *Water Research*, 37(19), 4703–4710.
- Hurst, C. J. (1991). Presence of enteric viruses in freshwater and their removal by the conventional drinking water treatment process. *Bulletin of the World Health Organization*, 69(1), 113–119.

- Karamoko, Y., Ibenyassine, K., Aitmhand, R., Idaomar, M., Ennaji, M. M. (2005). Adenovirus detection in shellfish and urban sewage in Morocco (Casablanca region) by the polymerase chain reaction. *Journal of Virological Methods*, 126(1-2), 135–137.
- Katayama, H., Haramoto, E., Oguma, K., Yamashita, H., Tajima, A., Nakajima, H. et al. (2008). One-year monthly quantitative survey of noroviruses, enteroviruses, and adenoviruses in wastewater collected from six plants in Japan. *Water Research*, 42(6-7), 1441–1448.
- Larrañaga C., Kajon, A.; Villagra, E.; Avendaño, L. F. (2000). Adenovirus surveillance on children hospitalized for acute lower respiratory infections in Chile (1988–1996). *Journal of Medical Virology*, 60(3), 342-346.
- Lee, S. H., & Kim, S. J. (2002). Detection of infectious enteroviruses and adenoviruses in tap water in urban areas in Korea. *Water Research*, 36(1), 248–256.
- Papapetropoulou, M., & Vantarakis, A. C. (1998). Detection of adenovirus outbreak at a municipal swimming pool by nested PCR amplification. *Journal of Infection*, 36(1), 101–103.
- Pina, S., Puig, M., Lucena, F., Jofre, J., Girones, R. (1998). Viral pollution in the environment and in shellfish: human adenovirus detection by PCR as an index of human viruses. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(9), 3376–3382.
- Poddar, S. K. (1999). Detection of adenovirus using PCR and molecular beacon. *Journal of Virological Methods*, 82(1), 19–26.
- Rigotto, C., Sincero, T. C. M., Simões, C. M. O., Barardi, C. R. M. (2005). Detection of adenoviruses in shellfish by means of conventional-PCR, Nested-PCR, and integrated cell culture PCR (ICC/PCR). *Water Research*, 39(2-3), 297–304.
- Rose, M. A., Dhar, A. K., Brooks, H. A., Zecchini, F. Gersberg, R. M. (2006). Quantitation of hepatitis A virus and enterovirus levels in the lagoon canals and Lido beach of Venice, Italy, using real-time RT-PCR. *Water Research*, 40(12), 2387–2396.
- Sambrook, J., & Russel, D. (2001). *Molecular cloning: a laboratory manual*. 3rd ed. v. 1, v. 2, v. 3. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press Section.
- Soule, H., Genoulaz, O., Gratacap-Cavallier, B., Chevallier, P., Liu, J.-X. (2000). Ultrafiltration and reverse transcription-polymerase chain reaction: an efficient process for poliovirus, rotavirus and hepatitis A virus detection in water. *Water Research*, 34(3), 1063–1067.
- Takeuchi, S., Itoh, N., Uchio, E., Aoki, K., Ohno, S. (1999). Serotyping of adenoviruses on conjunctival scrapings by PCR and sequence analysis. *Journal of Clinical Microbiology*, 37(6), 1839-1845.
- Tsai, Y. L., Tran, B., Sangermano, L. R., Palmer, C. J. (1994). Detection of poliovirus, hepatitis A virus, and rotavirus from sewage and ocean water by triplex reverse transcriptase PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, 60(7), 2400–2407.
- Ward, R. L., Akin, E. W., D'Alessio, D. J. (1984). Minimum infective dose of animal viruses. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 14(4), 297–310.

Table 1 Occurrence of adenovirus detected by PCR and semi-nested PCR

Site	Sample (n°.)	PCR				Semi-nested PCR*	
		Positive	%	Sensitivity	Specificity	Positive	%
Meia Ponte (MP1)	10	4	40.0	0.8	0.85	4	40.0
Meia Ponte (MP2)	6	3	50.0	1.0	1.0	3	50.0
João Leite (JL)	21	11	52.4	1.0	0.84	10	47.6
Vaca Brava (VB)	9	3	33.4	1.0	1.0	3	33.4
Bosque dos Buritis (BB)	8	5	62.5	1.0	0.66	2	25.0
Total	54	26	47.7	0.96	0.87	22	39.2

*our gold standard

SUPPLEMENTARY INFORMATION - Online Resource 1

S1 – Results of all molecular reactions by PCR and nested-PCR

Months	MP1		MP2		JL		VB	VB	BB	BB
	PCR	Nested-PCR	PCR	Nested-PCR	PCR	Nested-PCR	PCR	Nested-PCR	PCR	Nested-PCR
Jan	-	-	-	-	neg/neg	neg/neg	neg/neg	neg/neg	-	-
Feb	-	-	-	-	pos	pos	-	-	-	-
Mar	-	-	-	-	neg	pos	-	-	-	-
Apr	pos	pos	-	-	pos	pos	-	-	-	-
May	pos	pos	-	-	pos/pos	pos/pos	-	-	pos	pos
Jun	pos	neg	pos	pos	pos	pos	pos	pos		
Jul			pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos
Aug	pos	pos	pos	pos	pos/pos/pos/pos	pos/pos/neg / neg	pos	pos	pos	neg
Sept	neg/neg	pos/neg	-	-	pos	pos	neg	neg	pos	neg
Oct	neg	neg	neg	neg	neg/neg/neg	neg/neg/neg	neg	neg	neg	neg
Nov	neg	neg	neg	neg	neg/neg	neg/neg	neg	neg	neg	neg
Dec	neg/neg	neg/neg	neg	neg	neg/neg	neg/neg	neg	neg	neg/pos	neg/neg

neg: sample negative for AdVs; pos: sample positive for AdVs; -:contains no

Adenovirus seasonal monitoring and correlation with physical-chemical and bacteriological water quality parameters

H. D. Silva^{1,2,3}, Carlos Eduardo Anunciação¹, Cesar Augusto Sam Tiago Vilanova-Costa², Flávia de Castro Pereira², Aliny Pereira de Lima², , Elisângela de Paula Silveira-Lacerda², Marco Tulio Antonio Garcíazapata^{3*}

¹Laboratório de Diagnóstico Genético e Molecular, Instituto de Ciências Biológicas II, Universidade Federal de Goiás, Goiânia–GO, Brazil

²Laboratório de Genética Molecular e Citogenética , Instituto de Ciências Biológicas I, Universidade Federal de Goiás, Goiânia–GO, Brazil

³Núcleo de Pesquisas em Agentes Emergentes e Re-emergentes, Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, Universidade Federal de Goiás, Goiânia–GO, Brazil

Abbreviated running headline: Adenoviruses occurrence in water

*** Correspondence**

Marco Tulio Antonio Garcíazapata, Núcleo de Pesquisas em Agentes Emergentes e Re-emergentes, Departamento de Medicina Tropical e Dermatologia - Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, Universidade Federal de Goiás, Caixa Postal 12911, Setor Leste Vila Nova, 74643-970, Goiânia–GO, Brazil. Tel./fax: +55 62 3521-1481. E-mail address: zapata@iptsp.ufg.br

Abstract

Aims: To monitor the occurrence of adenovirus in rivers and lakes used for recreation and as source of public water supply in Goiânia, the capital of the state of Goiás-Brazil, using molecular detection, and correlate the presence of these pathogens with those obtained by traditional physical-chemical and bacteriological water quality analyses. **Methods and results:** We collected 54 water samples from two lakes and two rivers. The samples were concentrated using a positively-charged membrane and the DNA was extracted by the phenol-chloroform-isoamyl alcohol method followed by PCR and semi-nested PCR. The physical-chemical and bacteriological tests followed water quality monitoring standard procedures. **Conclusions:** Significant differences were observed between the occurrence of AdVs in water and the parameters nitrites, phosphates, fixed and total residues. That significant difference was not observed in relation to bacteriological tests. The occurrence of adenovirus in the state of Goiás shows a seasonal trend. **Significance and impact of the study:** This is the first study to monitor adenovirus in water courses in the Midwestern Region of Brazil and the present results may be useful to propose the eco-epidemiological profile of adenoviruses or even the routes of some neglected diseases, which points out the need to define a virus indicator.

Keywords

Adenovirus; bacteriological test; PCR; physical-chemical tests; water.

Introduction

Enteric viruses are generally disseminated to the environment via fecal-oral route (Chapron et al. 2000; Jiang et al. 2001). Among them, adenoviruses (AdVs)

have been attracting great interest, because of their high prevalence in water environments (Castignolles et al. 1998; Lee and Kim 2008), high stability in the environment, maintaining their infectivity even after exposure to treatment processes (Miagostovich et al. 2008), particularly to UV disinfection (Thompson et al. 2003), as well as due to their great importance to public health.

Therefore, several investigations have proposed the detection of AdVs by PCR as a molecular index to detect the presence of other enteric viruses (Lee and Kim 2008), since some researches indicate that there is no correlation between AdVs and fecal coliforms (Jiang and Chu 2004; Haramoto et al. 2005), traditionally employed to certify the microbiological quality of water. Nevertheless, studies correlating the occurrence of AdVs with traditional physical-chemical and bacteriological water quality analyses are still scarce.

On the other hand, a number of studies have already been carried out to evaluate AdVs seasonal distribution, indicating low variation throughout the year (Katayama et al. 2008) and a non-significant variation between their occurrence in the summer and winter (Myrmel et al. 2006; Haramoto et al. 2007).

In Brazil, there are few studies on environmental virology and in the state of Goiás, in the Midwestern Region of Brazil, they are inexistent. Since this state has two well-defined seasons, the rainy (from October to March) and the dry (from April to September) ones, different from the weather conditions prevailing in other countries where similar studies have been performed, it is necessary to assess the occurrence of AdVs in the local water courses.

This study aimed to monitor the occurrence of AdVs in rivers and lakes in the city of Goiânia, the capital of the state of Goiás, using molecular detection, and

correlate these data with results of physical-chemical and bacteriological water quality analyses.

Materials and methods

Sampling sites and processing

A total of 54 water samples were collected from December 2007 to November 2008 in the city of Goiânia, Brazil. Samples were collected in the following bodies of water: Meia Ponte river (MP), João Leite river (JL), Vaca Brava Park lake (VB), and Bosque dos Buritis lake (BB).

The water samples were prefiltered under vacuum using qualitative filter paper to remove excessive organic matter and immediately after that submitted to microfiltration using positively charged nylon membrane (discs 60-mm diameter; nominal pore size = 0.45 μm ; HybondTM-N+, Amersham Pharmacia). The material adsorbed to the membrane was eluted by vigorous manual agitation with 5 mL of TE low buffer (10 mM Tris-HCl, pH 8.0; 1 mM EDTA) and 0.02% Tween-20. Aliquots of the eluted material were collected in 1.5-mL microtubes and stored at -20°C until use.

DNA extraction was carried out using the phenol-chloroform-isoamyl alcohol method (Sambrook and Russel, 2001), centrifuged at 10.000 x *g* for 5 min, and washed with ethanol 70%. The pellet was resuspended in 40 μL of TE low buffer (pH 8.0) and stored at -20°C before PCR analysis.

Molecular detection of human adenovirus

The sequence sensitivity and specificity of the primers (MWG Oligo Synthesis Report, USA) used have been tested in previous studies (Allard et al. 1990; Girones et al. 1995; Pina et al. 1998; Rigotto et al. 2005).

For amplification, we added 28 μL of extracted viral DNA to a 50 μL reaction mix containing 85 pmoles of each primer (1885 5'-GCCGCAGTGGTCTTACATGCACATC-3' and 1913 5'-CAGCACGCCGCGGATGTCAAAGT-3'). Thermal cycling of the amplification mixture was performed in a programmable heat block (PTC-100TM Thermalcycler - MJ Research, Inc).

In a second PCR run (semi-nested PCR), we added 14 μL of the amplified PCR product to a 25 μL reaction mix containing 20 mM Tris-HCl, pH 8.4, 50 mM KCl, 0.2 mM each dATP, dCTP, dTTP and dGTP, 2.0 mM MgCl_2 , 85 pmoles of each primer 1893 5'-GCCACCGAGACGTACTTCAGCCTG-3' and 1913, as well as 5U of Taq DNA polymerase, and the expected amplicon was about 222 bp. Cycling PCR and semi-nested PCR were performed according to Rigotto et al. (2005).

Milli-Q water aliquots were included as negative control and HAdV5 (human adenovirus serotype 5) infected tissue culture fluids as positive control. Amplification products were observed in 1.5% agarose gel (UltraPureTM Agarose, Invitrogen) by electrophoresis in Tris-borate-EDTA buffer 1x (TBE), and ethidium bromide staining. Fragments were compared with a commercially available size standard (100 bp DNA ladder, Invitrogen, Brazil).

Physical-chemical and bacteriological tests

We carried out bacteriological and 21 physical-chemical tests on samples collected from December 2007 to July 2008 according to the methods and parameters recommended by Clesceri et al. (2005) (Table 1). The evaluation of the microbiological quality of water was performed in accordance with Resolução CONAMA n° 357 (Brasil, 2005).

Meteorological data

The meteorological data (rainfall, monthly temperature, and relative humidity) were collected by the Division of Rural Engineering, School of Agronomy of the Universidade Federal de Goiás.

Results

Only at JL site it was possible to carry out all the sampling collection and physical-chemical and bacteriological tests in the months corresponding to both climatic periods evaluated (dry and rainy seasons), since we had some technical problems to apply the same procedure to the other sites.

During monitoring, some sites were sampled more than once a month, mainly in the months with higher precipitation levels or in the climax of the dry period.

We found 22 out of 54 samples positive for AdVs (39.2%), as follows: 10/21 (47.61%) at JL site; 7/16 (43.7%) at MP site; 2/8 (25%) at BB site; and 3/9 (33.3%) at VB site.

Except for the samples collected in February and March at JL site, all other samples were negative for AdVs in the rainy season. Among the sites monitored during the dry season, only BB and VB presented months with samples negative for AdVs (August and September at BB site and September at VB site). Table 2 shows the results of virologic monitoring as well as the bacteriological and seasonal results obtained at the four sampling sites. Figure 1 presents the seasonal data for AdVs detection on dry and rainy season. Result showed a frequency of positivity of 7.4% (2/27) and 74% (20/27), respectively.

The results of the univariate logistic regression analyses performed among the physical-chemical and bacteriological tests for the occurrence of AdVs at each