

LEVANTAMENTO E DIAGNÓSTICO DE *Enterovirus* EM MANANCIAS QUE ABASTECEM OS PRINCIPAIS MUNICÍPIOS DO ESTADO DE S. PAULO

1 INTRODUÇÃO

A contaminação das águas superficiais e subterrâneas por vírus entéricos tem sido uma preocupação constante das autoridades sanitárias e de proteção ambiental, e tem recebido atenção especial devido ao risco que estes microrganismos representam para a saúde pública. Existem cerca de 100 tipos diferentes de vírus entéricos, todos considerados patogênicos para o homem. Sua concentração nas águas residuárias pode atingir 10.000 – 100.000/L e eles podem sobreviver por meses na água e solo, contaminando as águas captadas para consumo humano.

Desde 1989, a Legislação Americana (Surface Water Treatment Rule-SWTR) estabeleceu como meta (Maximum Contaminant Level Goal – MCLG) a ausência de vírus na água tratada. Esta regulamentação exige também que o tratamento aplicado à água captada garanta uma redução/inativação de 4 logs para vírus (USEPA 1989).

Em 1996, através da “Information Collection Rule”, a Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (USEPA) estabeleceu um programa amplo de monitoramento para protozoários patogênicos e vírus em todos os sistemas que abasteciam comunidades com mais de 100.000 habitantes, com o objetivo de levantar dados sobre a ocorrência destes microrganismos nas águas captadas para consumo humano. Neste programa, todos os sistemas que apresentassem mais de 1 partícula de vírus viável por litro e/ou mais que 10 cistos/oocistos de protozoários por litro na água bruta captada para tratamento deveriam monitorar a presença destes microrganismos na água tratada (USEPA 1996).

No Brasil, a Portaria 518, de março de 2004, que veio substituir a Portaria 1469 de 2000, recomenda o monitoramento de *Enterovirus* com objetivo de reduzir também a zero sua presença na água tratada. É portanto muito importante a avaliação da presença desses organismos nas águas captadas para consumo humano (BRASIL 2004).

Neste relatório são relatados os resultados da pesquisa de *Enterovirus* em alguns dos principais mananciais do Estado de São Paulo, que abastecem as cidades com os maiores índices populacionais. Adicionalmente ao projeto original, também foi avaliada a

ocorrência de *Adenovirus* e de *Virus da hepatite A*. Os coliformes termotolerantes também foram analisados.

2 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1-Os vírus entéricos

Os vírus associados à ocorrência de doenças de veiculação hídrica são essencialmente aqueles que infectam o trato gastro-intestinal e são excretados nas fezes dos indivíduos infectados, sendo denominados de vírus entéricos (Schwartzbrod 2000; Wyn-Jones 2001; WHO 2004). Carter (2005) inclui dentre os vírus entéricos de maior importância na transmissão através de água e alimentos os adenovírus humanos, os astrovírus, os calicivírus, o vírus da hepatite E, os parvovírus, os picornavírus (enterovírus, cobuvírus e vírus da hepatite A) e os rotavírus.

Em virtude de sua maior resistência à desinfecção, os indicadores bacterianos de contaminação fecal comumente utilizados (*Escherichia coli* ou coliformes termotolerantes) não fornecem indícios da presença ou ausência de enterovírus, adenovírus e do vírus da hepatite A em amostras de água (WHO 2004).

2.1.1- Enterovirus

Os vírus do gênero *Enterovirus* (família Picornaviridae) estão dentre os menores vírus conhecidos e seu genoma é um RNA de fita simples contido num cápside icosaédrico de 20 a 30nm de diâmetro, sem envelope. O gênero *Enterovirus* pertence à família Picornaviridae que inclui mais outros 11 gêneros. Dentre as dez espécies deste gênero destacam-se *Enterovirus humanos A, B, C* (espécie tipo) e *D* (ICTV 2009), com vários sorotipos, dentre os quais poliovírus e os vírus coxsackie. Segundo ICTV (2009) *Parecovirus* é outro gênero da família Picornaviridae com a espécie tipo *Parecovirus humano*. Os ecovírus (atual *Parecovirus*) e os vírus coxsackie constam da “Contaminant Candidate List 2” da Agência Ambiental Americana (USEPA 2005).

Os enterovírus são os agentes etiológicos mais comuns de infecção em humanos causando doenças de pouca gravidade (gastroenterite com febre baixa) mas também afecções extremamente graves, como miocardite, meningoencefalite e poliomielite, dentre outras. Estima-se que esses microrganismos sejam a causa de cerca de 30 milhões de mortes anualmente nos Estados Unidos (WHO 2004). Com frequência, principalmente em crianças, as infecções são assintomáticas, mas nesses casos também ocorre a excreção de

grandes quantidades dos vírus nas fezes. O contato pessoal e a inalação de partículas virais presentes no ar ou em secreções respiratórias são as vias de transmissão predominantes. As infecções por esses agentes têm incidência máxima no verão e início do outono, o que coincide com a época na qual as atividades recreacionais são mais frequentes (Kochwa-Haluch 2001, apud Fong & Lipp 2005). Por outro lado, comprovou-se epidemiologicamente a transmissão por meio de contato recreacional, em crianças (água de lago) para os vírus coxsakie A16 e B5 em dois surtos apenas (WHO 2004).

Existem vários relatos na literatura sobre a ocorrência de enterovírus no ambiente, pois várias linhagens celulares são sensíveis a esses microrganismos podendo assim ser utilizadas na sua detecção. Suas concentrações nas fezes são bastante inferiores àquelas das bactérias indicadoras de contaminação fecal: o número de enterovírus no esgoto bruto pode atingir 10^5 UFP (Unidade Formadora de Placa)/mL enquanto que a contagem de coliformes totais é de cerca de 10^8 /100mL (Wyn-Jones & Sellwood 2001). A eliminação de vírus no ambiente não é constante ao longo do ano. Pesquisas sobre a ocorrência de vírus coxsakie em água de rio demonstraram uma tendência sazonal com densidades máximas na metade do verão, época na qual também ocorrem maior número de relatos da doença em clínica (Sellwood 2000 apud Wyn-Jones & Sellwood 2001; WHO 2004).

2.1.2 – Adenovirus

O gênero *Mastadenovirus* (família Adenoviridae) inclui 22 espécies dentre as quais a espécie tipo *Adenovirus humano C* (ICTV 2009). Os adenovírus estão amplamente disseminados no ambiente e infectam pássaros, mamíferos e anfíbios. Seu genoma é um DNA de fita dupla contido em um cápside de formato icosaédrico, sem envelope. Os adenovírus causam vários tipos de infecção, principalmente no trato respiratório e na conjuntiva.

Os adenovírus são excretados em densidades elevadas nas fezes humanas e ocorrem no esgoto, águas brutas e tratadas e também já foram detectados em moluscos (WHO 2004, Carter 2005). Em 2005, os adenovírus foram incluídos na “Contaminant Candidate List 2” da Agência Ambiental Americana (USEPA 2005) pela sua importância sanitária e ocorrência frequente em muitos ambientes aquáticos.

Existe uma grande variedade de vias de transmissão e exposição e o consumo de água ou alimentos contaminados nas afecções entéricas é uma possibilidade. Somente foi comprovada a associação de surtos de faringite e conjuntivite por esses agentes na exposição recreacional em piscinas (WHO 2004).

Numa recente revisão sobre adenovírus humanos em água, Jiang (2006) relata sua maior resistência à desinfecção pela luz ultra-violeta, ocorrência em águas doces, costeiras, e de consumo humano e também em piscinas.

2.1.3 – *Virus da hepatite A*

Virus da hepatite A é um vírus RNA de cápside icosaédrica, sem envelope. É a única espécie tipo do gênero *Hepatovirus*, família Picornaviridae (ICTV 2009). A infecção é praticamente assintomática em crianças, e confere imunidade duradoura. De uma maneira geral, a gravidade da doença, com icterícia e danos hepáticos aumenta com a idade. O período de incubação é longo e os sintomas incluem febre, mal-estar, náusea, anorexia e desconforto abdominal. A transmissão é fecal-oral, direta ou indireta pelo consumo de água e alimentos (principalmente mariscos) contaminados, e as evidências epidemiológicas de transmissão pela água para esses vírus são mais significativas que para qualquer outro vírus entérico (WHO 2004).

Wyn Jones & Sellwood (2001) relatam a ocorrência de vários surtos da doença em diferentes partes do mundo, bem como a detecção desses organismos em diferentes tipos de amostras ambientais.

2.2 – Métodos de detecção e quantificação de vírus entéricos em amostras ambientais

O princípio da detecção de vírus entéricos em culturas celulares é o método clássico e de referência para análise desses microrganismos, e baseia-se no fato que certos vírus podem multiplicar-se em culturas celulares “in vitro” e que essa multiplicação pode ser visualizada. Essa visualização pode ser direta, pela aparição de um efeito citopatogênico (ECP), o que ocorre por exemplo com poliovírus, vírus coxsackie, *Parecovirus* e *Adenovirus*. O isolamento em monocamada celular é realizado em duas etapas principais: inoculação e adsorção dos vírus sobre as células e a seguir incubação em presença de meios líquidos ou gelificados.

Para alguns vírus que não produzem ECP, ou para os quais as linhagens celulares são pouco sensíveis a detecção é realizada indiretamente, seja por meio de uma técnica imunológica “in situ” ou por técnicas de Biologia Molecular.

Previamente à inoculação em culturas celulares, é necessária uma concentração, que pode ser realizada por filtração em cartuchos (filtros de profundidade) ou membranas. A escolha do filtro depende do volume e tipo de amostra de água a ser concentrada. Após

essa filtração, que resulta ainda em volumes relativamente grandes, é necessária uma concentração secundária (ou reconcentração), que pode ser realizada por floculação orgânica, precipitação com polietileno glicol, ou ultracentrifugação. (Schwartzbrod 2000, APHA 2005).

Após a extração e concentração, segue-se uma etapa de descontaminação e eventualmente de detoxificação, durante a qual o extrato obtido é tratado de forma que sejam eliminados os fungos, as bactérias e na medida do possível substâncias tóxicas. Com esse objetivo, adiciona-se uma mistura de antibióticos à amostra concentrada ou, alternativamente, realiza-se um tratamento com clorofórmio ou filtração por membranas de porosidade de 0,22µm (Schwartzbrod 2000).

Na etapa final de detecção viral, a amostra é inoculada em cultura de células, em meio gelificado contendo vermelho neutro (corante vital). Nesse meio, as células normais apresentam uma coloração rosada devido à incorporação do corante vital. As partículas virais ao infectarem as células normais, replicam-se e propagam-se para as células vizinhas. As células infectadas perdem a capacidade de absorção do corante e aparecem como regiões circulares incolores ou “placas”, que se destacam das demais células que estão coradas pelo vermelho neutro. O fato de uma placa poder ser produzida originalmente por uma única partícula infectante, ou vírion, torna esse método altamente quantitativo, permitindo calcular o número de unidades virais a partir do número de placas formadas no ágar (APHA 2005a).

Os vírus também podem ser detectados e identificados por técnicas imunológicas, sendo bastante utilizada a soro-neutralização, microscopia de imunofluorescência e ELISA (“enzyme linked immuno assay”).

A utilização de técnicas de Biologia Molecular, principalmente RT-PCR (reação em cadeia da polimerase após transcrição reversa) resultaram na obtenção de uma grande quantidade de informações na área de virologia ambiental (Wyn-Jones 2001), permitindo a detecção de vírus patogênicos com crescimento inadequado ou nenhum crescimento em culturas celulares. Entretanto, a grande desvantagem dessa técnica é a falta de informação sobre a infecciosidade dos vírus detectados. Para superar esse inconveniente vem sendo bastante utilizada atualmente a integração dos dois métodos, ou seja a Reação em Cadeia da Polimerase Integrada à Cultura Celular. As amostras concentradas são inoculadas previamente em cultura celular, o que permite a amplificação viral e em seguida submetidas ao RT-PCR (Schwartzbrod 2000; Wyn-Jones & Sellwood 2001). Uma revisão recentemente publicada sobre avaliação da infectividade de vírus entéricos em amostras

ambientais discute igualmente as vantagens dessa técnica, bem como a aplicação de outros métodos baseados na técnica de PCR para este fim (Rodriguez et. al. 2009).

3 – MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 – Amostragem

3.1.1- Locais e periodicidade das coletas

A coleta das amostras foi realizada nos locais descritos na Tabela 1, nas datas programadas no projeto da CETESB “Rede de Monitoramento da Qualidade das Águas Interiores do Estado de São Paulo”, que foi criado em 1974, em atendimento à Lei Estadual nº 118/73. Esse projeto tem por principal objetivo avaliar a qualidade das águas de rios e reservatórios do Estado, utilizados, dentre outros usos para abastecimento público, realizar o levantamento de áreas prioritárias para controle da poluição, dar subsídio técnico para elaboração dos Relatórios de Situação dos Recursos Hídricos realizados pelos Comitês de Bacias Hidrográficas e identificar trechos de maior degradação nos quais fosse requerida a ação preventiva e controle da CETESB, por meio da construção de ETEs (Estações de Tratamento de Esgoto) pelos municípios ou adequação de lançamentos industriais (CETESB 2007). Na época da realização deste trabalho, a Rede Básica de Monitoramento incluía 163 pontos de amostragem nos quais eram analisados bimestralmente vários parâmetros físicos, químicos e biológicos. Dentre os pontos de amostragem utilizados para captação e abastecimento público, para a 1ª fase do Projeto, foram selecionados 10 pontos situados em regiões de elevada densidade populacional para as análises de vírus entéricos (Tabela 1).

Tabela 1 – Descrição dos locais de coleta das amostras de água durante a 1ª fase do projeto

Unidade de Gerenciamento de Recursos Hídricos (UGRHI)		Número do Ponto/Local de Coleta
Nº	Nome	
2	Paraíba do Sul	1 - R. Paraíba, captação de Aparecida
5	Piracicaba, Capivari, Jundiaí	2 - R. Atibaia, captação de Atibaia
		3 - R. Atibaia, captação nº 3 de Campinas
		4 - R. Piracicaba, captação de Piracicaba
		5 - R. Piracicaba, captação de Americana
		6 - R. Capivari, captação de Campinas
6	Tietê	7 - Ribeirão dos Cristais, captação da ETA de Cajamar
		8 - R. Cotia, captação da ETA do Baixo Cotia
		9 - Reservatório Guarapiranga, captação da SABESP
7	Baixada Santista	10 - Canal de Fuga II, Usina H. Borden

Numa 2ª fase do Projeto, os pontos que apresentaram porcentagens elevadas de resultados positivos foram recoletados para quantificação de *Enterovirus* nos pontos e datas apresentados na Tabela 2.

Tabela 2 – Descrição dos locais de coleta das amostras de água durante a 2ª fase do projeto

Unidade de Gerenciamento de Recursos Hídricos		Local de coleta	Data de coleta
Nº	Nome		
2	Paraíba do Sul	R. Paraíba, captação de Aparecida	21/02/2008 03/04/2008
5	Piracicaba, Capivari, Jundiaí	R. Atibaia, captação de Campinas	15/01/08 26/05/08
		R. Piracicaba, captação de Piracicaba	29/01/08 12/03/08
6	Alto Tietê	R. Cotia, captação ETA Baixo Cotia	23/01/08 25/03/08

3.1.2 – Características da UGRHIs avaliadas

3.1.2.1 – UGRHI 02 – Paraíba do Sul

Esta Unidade engloba uma área de 14.444 km², está situada ao leste do Estado, sendo composta por 34 municípios com cerca de 5% da população paulista. São coletados 89% do esgoto produzido e o índice de tratamento é da ordem de 33% do esgoto gerado.

Os constituintes principais são os rios Paraibuna e Paratinga, formadores do rio Paraíba do Sul e rios Parateí, Jaguari e Una. Os principais usos do solo incluem atividades urbano-industriais e rurais. A água é utilizada para abastecimento público e industrial, afastamento de efluentes domésticos e industriais e irrigação de plantações.

São atualmente monitorados pela Rede CETESB sete pontos de captação, e para avaliação dos vírus foi selecionado o ponto de captação da cidade de Aparecida do Norte. Nesse ponto, as coletas e análises para a 1ª fase do projeto foram realizadas nos meses de junho, agosto, outubro e dezembro de 2006, e em fevereiro e abril de 2007.

3.1.2.2 – UGRHI 05 – Piracicaba, Capivari, Jundiaí

Esta UGRHI possui uma área de 14.178 km², sendo composta por 57 municípios e compreende mais de 11% da população do Estado. São coletados 84% do esgoto total produzido, enquanto que o índice de tratamento é da ordem de 27% do esgoto gerado. São constituintes principais os rios Capivari e Capivari Mirim (Bacia do rio Capivari), rios Jundiaí, Jundiaí Mirim e Pirai (bacia do rio Jundiaí) e rios Atibaia, Corumbataí, Jaguari, Camanducaia, Pirapitingui, Jacareí e Piracicaba (bacia do rio Piracicaba). Quanto aos usos do solo, a UGRHI caracteriza-se por acentuado desenvolvimento industrial e alta densidade populacional, englobando a Região Metropolitana de Campinas. A água é utilizada para abastecimento público e industrial, afastamento de efluentes domésticos e industriais, irrigação de plantações, geração de energia e recreação.

São atualmente monitorados 18 pontos de captação nesta UGRHI e para avaliação na 1ª fase deste projeto foram selecionados dois pontos no rio Atibaia (captação de Atibaia e de Campinas) e dois pontos no rio Piracicaba (captação de Piracicaba e de Americana). Nesses pontos, as coletas e análises foram realizadas nos meses de maio, julho, setembro e novembro de 2006, e em janeiro, março e maio de 2007. Também foi avaliado o ponto de captação de Campinas no rio Capivari, com coletas e análises nos meses de junho, agosto, outubro e dezembro de 2006, e em fevereiro e junho de 2007.

3.1.2.3 – UGRHI 06 – Tietê

Esta UGRHI possui uma área de 5.868 km², é composta por 34 municípios e abrange a parte superior do Tietê desde sua cabeceira até a barragem do reservatório de Pirapora, numa extensão de 133 km. Nesta região reside praticamente a metade da população do Estado e está incluída parte da região metropolitana da Grande São Paulo. São coletados 81% do esgoto produzido e o índice de tratamento é da ordem de 37% do esgoto gerado. São seus principais constituintes os rios Tietê, Claro, Paraitinga, Biritiba Mirim, Jundiá e Taiacupeba Mirim; rios Embu-Guaçú e Embu-Mirim; rio Cotia; rios Baquirivu-Guaçú, Tamanduateí, Pinheiros e Juqueri, e córregos Aricanduva e Cabuçú de Baixo. Quanto aos usos do solo, nas áreas das cabeceiras do rio Tietê predominam a produção hortifrutigranjeira, a silvicultura, e a mineração de não-metálicos para a construção civil. A produção industrial está mais concentrada nos municípios de Santo André, São Bernardo do Campo, São Caetano do Sul, Diadema e Guarulhos. A água é utilizada para abastecimento público e industrial, recepção de efluentes domésticos e industriais, geração de energia, pesca, recreação e irrigação.

São atualmente monitorados 11 pontos de captação e para avaliação da ocorrência de vírus na 1ª fase deste Projeto foram selecionados três pontos, no Ribeirão dos Cristais, na ETA de Cajamar, no rio Cotia, na captação da ETA do Baixo Cotia e no reservatório Guarapiranga na captação da SABESP. Nesses pontos as coletas e análises foram realizadas nos meses de maio, julho, setembro e novembro de 2006 e em janeiro e março de 2007.

3.1.3 – Técnica de coleta

Foram coletados volumes de 40L de água, em dois frascos de polietileno de 20L, conforme procedimento de coleta descrito no “Standard Methods” (APHA 2006). As amostras foram transportadas ao laboratório na temperatura de 2° a 8°C e analisadas no período máximo de 24 horas após a coleta.

3.2 – Análise de *Enterovirus*, *Adenovirus* e *Virus da hepatite A*

3.2.1 - Concentração das amostras

Para a concentração das amostras foi utilizado o método descrito em Norma Técnica CETESB (CETESB 1986). Volumes de 40 litros foram filtrados em membrana de éster de celulose de 293 mm de diâmetro e 0,45 µm de porosidade e um pré-filtro AP20 como

clarificante (Millipore). Para concentração das partículas virais adicionou-se ao volume total de 40 litros, 200 mL de cloreto de alumínio 0,1 M e o pH foi ajustado para 3,5 com HCl 6N. Após a filtração foram adicionados à superfície da membrana 300 mL de extrato de carne 3% em tampão glicina 0,05 M, pH 9,5 (Puig et al. 1994). O eluente foi recolhido em um erlemeyer estéril, o pH ajustado para 3,5 com agitação lenta por 30 minutos e centrifugado a 7000 rpm por meia hora (Centrífuga Beckman, modelo J2 – HS). O precipitado foi ressuspensionado em 8 mL de solução fosfato de sódio 0,15 M e armazenado em freezer -70°C.

3.2.2 – Reconcentração das amostras

O concentrado de cada amostra foi centrifugado por uma hora a 34.500 rpm em ultracentrífuga (Sorvall, modelo RC90) previamente resfriada a 4° C. O sedimento foi ressuspensionado em 1 mL de solução tampão glicina 0,25 N, pH 9,5, (solução usada para eluição das partículas virais do material orgânico) e transferido para um tubo tipo “ependorf” de 1,5 mL, mantido em banho de gelo com agitação manual por 30 minutos. Adicionou-se a seguir 1 mL de uma solução de PBS (solução fisiológica tamponada com fosfato) duas vezes concentrada e seguiu-se uma centrifugação por 20 minutos a 7000 rpm (Centrífuga Beckman, modelo J2 – HS). O sobrenadante foi colocado em tubo de ultracentrífuga e novamente centrifugado por 1 hora a 34.500 rpm a 4° C. O sedimento obtido foi ressuspensionado em 500 µL de PBS e armazenado a -70° C (Puig et al. 1994).

3.2.3 – Extração dos ácidos nucleicos

Os ácidos nucleicos foram extraídos segundo metodologia descrita por Boom et al. (1990) com pequenas modificações utilizando-se o isotiocianato de guanidina como principal componente do tampão de lise e adsorção dos ácidos nucleicos a partículas de sílica.

Os 500 µL do concentrado obtidos no item 3.2.2 foram adicionados a uma mistura contendo 50 µL de partículas de sílica e 900 µL de tampão de lise. Essa mistura foi incubada à temperatura ambiente por 10 minutos, submetida a lavagem e centrifugação, duas vezes com tampão de lavagem, duas vezes com etanol 70% gelado e uma vez com acetona. O sedimento obtido após completa evaporação da acetona foi ressuspensionado em 30 µL de tampão de eluição para vírus DNA e em 30 µL de tampão de eluição contendo inibidor de RNase para vírus RNA, ambos preparados no momento do uso.

3.2.4 - Sequência de oligonucleotídeos “primers” utilizados na técnica de PCR

A sequência, especificidade e sensibilidade dos “primers” utilizados neste estudo foram descritos previamente (Formiga-Cruz et al. 2005). Na Tabela 3 estão descritas as sequências e localização no genoma dos iniciadores para detecção de *Adenovirus*, *Enterovirus* e *Virus da hepatite A*.

Tabela 3 – Sequência e número de pares de bases de oligonucleotídeos dos primers utilizados

Tipo de Vírus ^a	Primers	Sequência	Nº de pares de bases (bp)
Ad 40	hexAA1885	5'-GCCGCAGTGGTCTTACATGCACATC-3'	301
Ad 41	hexAA1913	5'-CAGCACGCCGCGGATGTCAAAGT-3'	
Ad 2	nehexAA1893	5'-GCCACCGAGACGTACTTCAGCCTG-3'	143
Ad2	nehexAA1905	5'-TTGTACGAGTACGCGGTATCCTCGCGGTC-3'	
CV B4	Ent 1	5'-CGGTACCTTTGTACGCCTGT-3'	540
Pólio 1	Ent 2	5'-ATTGTCACCATAAGCAGCCA-3'	
Pólio 1	neEnt 1	5'-TCCGGCCCCTGAATGCGGCTA-3'	123
CV B4	neEnt 2	5'-GAAACACGGACACCCAAAGTA-3'	
HAV	HAV 1	5'-TTGGAACGTCACCTTGACAGTG-3'	368
HAV	HAV 2	5'-CTGAGTACCTCAGAGGCAAAC-3'	
HAV	neHAV 1	5'-ATCTCTTTGATCTTCCACAAG-3'	290
HAV	neHAV 2	5'-GAACAGTCCAGCTGTCAATGG-3'	

^aAd, adenovirus; CV, coxsackievirus; HAV vírus da hepatite A, 5' - NTR; non translated region

3.2.5 - Detecção dos vírus RNA (*Enterovirus* e *Virus da Hepatite A*) pela reação em cadeia de polimerase, precedida de transcrição reversa (RT-PCR)

3.2.5.1 - Síntese de cDNA para *Enterovirus* e *Virus da Hepatite A*

Todas as misturas foram preparadas em tubos tipo “ependorf” estéreis e os reagentes utilizados foram adicionados na ordem descrita abaixo. Em seguida, as misturas foram homogeneizadas, centrifugadas rapidamente (5 segundos) a 12.000 rpm (microcentrífuga refrigerada Eppendorf).

Mistura RT-1 (volume final 11,5 μ L)

- 1 μ L de tampão PCR 10 vezes concentrado
- 0,6 μ L de $MgCl_2$ (25 mM)
- 0,4 μ L de dNTPs (25 mM)
- 1 μ L de Primer Ent 1 (0,4 μ M)
- 1 μ L de Primer Ent 2 (0,4 μ M)
- 5 μ L do RNA extraído (obtido no item 3.2.3)

Esta mistura foi incubada a 95° C por 5 minutos, levada ao banho de gelo e em seguida acrescentou-se a segunda mistura:

Mistura RT-2

- 1 μ L de DTT (0,1 M)
- 0,5 μ L de Inibidor de RNase (20 U/ μ L)
- 1 μ L de transcriptase reversa (50 U/ μ L)

As misturas RT-1 e RT-2 foram incubadas por 30 minutos a 42° C e por 5 minutos a 95° C. Para reduzir a probabilidade de contaminação com moléculas amplificadas de cDNA, áreas separadas foram usadas para manipulação dos reagentes e amostras.

3.2.5.2 - Primeira Amplificação enzimática do cDNA/DNA

Para reação de amplificação do cDNA, foram utilizados 50 μ L de uma mistura contendo:

- 4 μ L de tampão PCR 10 vezes concentrado
- 2,4 μ L de $MgCl_2$ (25 mM)
- 29,7 μ L de água ultra pura estéril
- 0,4 μ L de Taq DNA Polimerase
- 1 μ L de cada oligonucleotídeo específico na conc. 0,4 μ M (direito e esquerdo)

Esta mistura foi homogeneizada, centrifugada e transferida para o termociclador onde foi processada com a seguinte programação:

1 ciclo de denaturação a 95° C durante 2 minutos, seguido de 30 ciclos sucessivos a 95° C (1 minuto); 55° C (1 minuto) ; 72° C (1 minuto) e após esses 30 ciclos uma extensão final a 72° C - 5 minutos; e armazenamento a 4° C.

3.2.5.3 - Segunda amplificação enzimática (Nested PCR)

1 µL do produto da primeira amplificação foi adicionado a 49 µL da seguinte mistura:

- 5 µL do Tampão PCR 10 vezes concentrado
- 3 µL de MgCl₂ 25 mM
- 0,5 µL de dNTPs 25 mM
- 1 µL de cada oligonucleótido específico para segunda amplificação (direito e esquerdo) a 0,18 µM
- 38 µL de água ultra pura estéril
- 0,5 µL da Taq DNA Polimerase (5 U/µL)

Esta mistura foi homogeneizada, centrifugada e transferida para o termociclador e processada pelo mesmo programa utilizado na primeira amplificação.

3.2.6- Detecção de *Adenovirus* pela reação em cadeia de polimerase

3.2.6.1 – Primeira amplificação

Para primeira amplificação, utilizou-se uma mistura de 50 µL contendo:

- 5 µL de tampão PCR 10 vezes concentrado
- 3 µL de MgCl₂ (25mM)
- 0,5 µl de dNTPs (25mM)
- 1 µL de cada oligonucleótido específico para primeira amplificação à 0,4 µM (direito e esquerdo)
- 0,4 µL de Taq DNA polimerase (5 U/uL)
- 29,1 µL de água ultrapura estéril
- 10 µL do DNA extraído

Esta mistura foi homogeneizada, centrifugada e transferida para o termociclador e processada segundo o programa descrito no item 3.2.5.2.

3.2.6.2 – Segunda amplificação

Para segunda amplificação, utilizou-se uma mistura de 50 µL contendo:

- 5 µL de tampão PCR 10 vezes concentrado
- 3 µL de MgCl₂ (25mM)
- 0,5 µl de dNTPs (25mM)
- 1 µL de cada oligonucleótido específico para primeira amplificação a 0,4 µM (direito e esquerdo)
- 0,4 µL de Taq DNA polimerase (5U/uL)
- 38,1 µL de água ultrapura estéril
- 1 µL do produto da primeira amplificação

Esta mistura foi homogeneizada, centrifugada, transferida para o termociclador e processada segundo o programa descrito no item 3.2.5.2.

3.2.7 – Separação eletroforética

Foram aplicados 10 µL dos produtos da reação de PCR provenientes da segunda amplificação, bem como os controles positivos [vírus padrão: *Enterovirus* (Pólio 1, 2 e 3 Sabin), *Virus da Hepatite A*- HAV HM-175 e *Adenovirus* tipo 40 e 41], negativos (água ultra-pura) e 1µL do marcador de peso molecular “øX174 Hae III digest” (Invitrogen) e 2 µL do corante azul de bromofenol 0,1%, em gel de agarose 2,5% .

A seguir foi efetuada a corrida eletroforética a 80V durante 3 horas e após o gel foi corado por 15 minutos com brometo de etídeo (0,5 µg/ mL).

Os resultados dos amplicons foram analisados em transiluminador com lâmpada UV e registrados no sistema de captura de imagem (UVP, Doc-It).

3.3 – Quantificação dos *Enterovirus* por meio de inoculação em cultura de células

Neste trabalho a quantificação de *Enterovirus* foi realizada pela técnica de plaqueamento em meio semi-sólido (meio Eagle gelificado), utilizando a linhagem celular RD (rabdiosarcoma humano) segundo procedimentos descritos em CETESB (1987).

3.3.1 – Concentração das amostras

As amostras (volume de 40 L) foram concentradas de acordo com o procedimento descrito no item 3.2.1.

3.3.2 – Redução do efeito citotóxico

Para redução do efeito citotóxico, a amostra concentrada foi submetida a filtração em pré-filtro AP20 e membrana de 0,45 µm (Millipore).

3.3.3 – Descontaminação e teste de esterilidade

Para a descontaminação, foram adicionados à amostra concentrada, 0,5 mL de solução estoque de penicilina G potássica, 0,5 mL solução de sulfato de gentamicina e, 0,5 mL de solução de fungizona.

Após contato de uma hora, 1 mL do concentrado da amostra foi adicionado a dois tubos com caldo tripton e soja. Os tubos foram incubados a $35 \pm 0,5^\circ \text{C}$ durante 14 dias, realizando-se leituras diárias para verificação de turvação ou qualquer outra evidência de crescimento de microrganismos.

3.3.4 – Ensaio de quantificação

3.3.4.1 – O meio de cultura das garrafas contendo a monocamada perfeitamente formada foi eliminado, adicionando-se a seguir 0,5 ou 1,0 mL da amostra concentrada (ou diluições da mesma).

3.3.4.2 – Após incubação a 35°C durante duas horas para adsorção dos vírus, a amostra foi descartada e foram adicionados 5,0 mL de meio gelificado, que foram distribuídos de maneira uniforme sobre a monocamada.

3.3.4.3 – As garrafas foram incubadas em posição invertida a 35°C , realizando-se leituras diárias para contagem das placas de lise, até 14 dias no máximo.

3.4 – Determinação de coliformes termotolerantes

Os coliformes termotolerantes foram analisados pela técnica de membrana filtrante, utilizando-se o ágar mFC (APHA 2005b).

4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

O monitoramento rotineiro de microrganismos patogênicos em águas destinadas a captação e tratamento não é recomendado devido à complexidade e desempenho analítico insatisfatório (baixas porcentagens de recuperação e mesmo desconhecimento desse dado) dos métodos disponíveis. Por outro lado, uma avaliação periódica deve ser realizada para fornecer subsídios às autoridades sanitárias e às empresas de saneamento, que poderão dessa forma otimizar os processos de tratamento.

O monitoramento de *Enterovirus* em águas superficiais já havia realizado em ampla escala dentro de Programa de Avaliação da Qualidade das Águas Interiores da CETESB. Martins et al. (1986), utilizando a técnica de inoculação em linhagem celular BS-C-1, relataram a presença de *Enterovirus* em 14,9 % de 383 amostras de águas brutas, coletadas em diferentes reservatórios do Estado de São Paulo.

Nesse trabalho, onde foram analisadas 60 amostras de águas brutas provenientes de dez mananciais situados em quatro UGRHIs do Estado, foram detectadas porcentagens elevadas de amostras positivas para os vírus entéricos analisados (85 %), mesmo considerando-se que a técnica utilizada não determina se o microrganismo é ou não viável. (Figura 1)

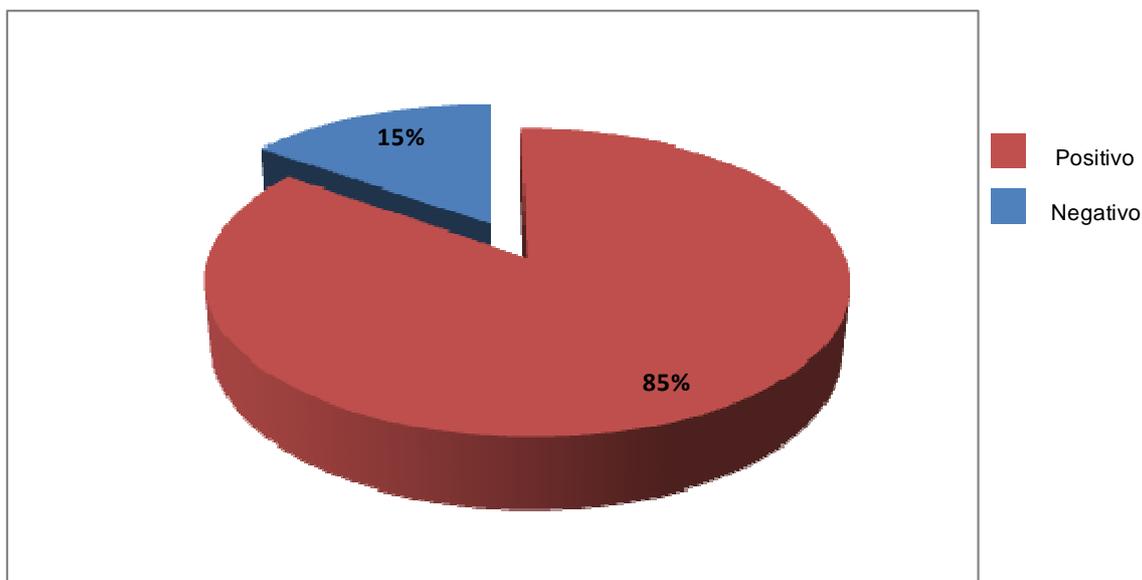


Figura 1 – Porcentagens de amostras positivas e negativas para os vírus analisados

No que diz respeito à detecção dos diferentes vírus analisados, pode ser verificada uma porcentagem mais elevada de positividade para a ocorrência de *Adenovirus* e *Enterovirus* simultaneamente (53 %), seguindo-se amostras positivas para *Adenovirus* e *Enterovirus* isoladamente. Foi muito baixa a porcentagem de amostras positivas para o *Virus da hepatite A* (Figura 2).

Esse padrão de positividade foi observado na maior parte dos dez pontos analisados, exceto nos pontos 3 e 5, nos quais a porcentagem de *Enterovirus* e *Adenovirus* foi um pouco menor (Figura 3 e Tabela 4).

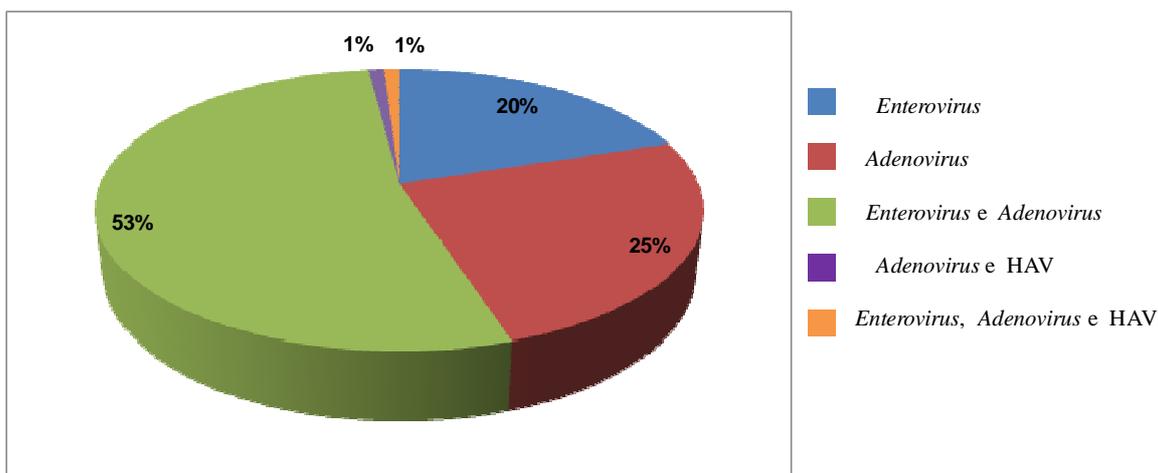


Figura 2 – Percentagens de amostras positivas para os diferentes vírus analisados

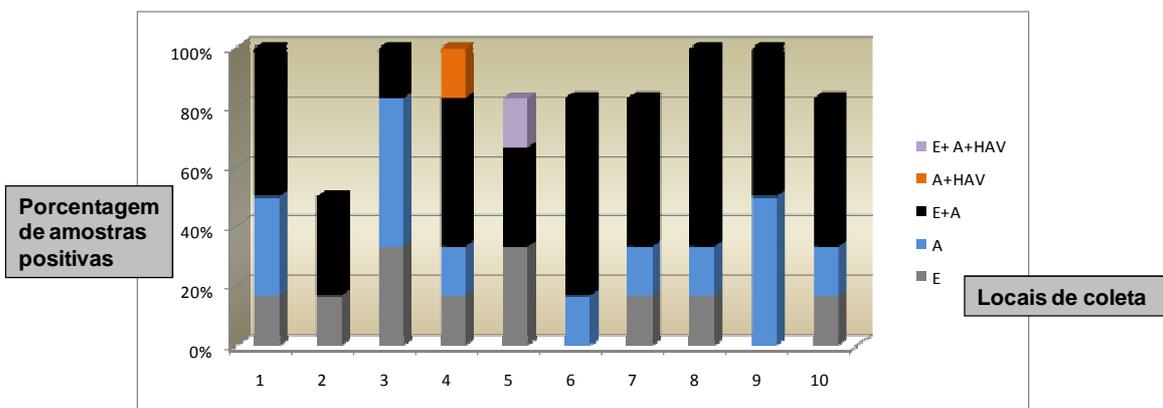


Figura 3 – Percentagens de amostras positivas para os diferentes vírus analisados

Tabela 4 – Número e porcentagens de amostras positivas para os diferentes tipos de vírus em cada ponto de coleta

UGRHI		Local de Coleta	RESULTADOS				
Nº	Nome		Número e porcentagem (%) de amostras positivas				
			<i>Enterovirus</i>	<i>Adenovirus</i>	<i>Enterovirus e Adenovirus</i>	<i>Adenovirus e HAV</i>	<i>Enterovirus, Adenovirus e HAV</i>
2	Paraíba do Sul	R. Paraíba, captação de Aparecida	1 (16,7)	2 (33,3)	3 (50)	0	0
5	Piracicaba, Capivari, Jundiáir	R. Atibaia, captação de Atibaia	1 (16,7)	0	2 (33,3)	0	0
		R. Atibaia, captação nº 3 de Campinas	2 (33,3)	3 (50)	1 (16,7)	0	0
		R. Piracicaba, captação de Piracicaba	1 (16,7)	1 (16,7)	3 (50)	1 (16,7)	
		R. Piracicaba, captação de Americana	2 (33,3)	0	2 (33,3)	0	1 (16,7)
		R. Capivari, captação de Campinas	0	1 (16,7)	4 (66,7)	0	0
6	Tietê	Ribeirão dos Cristais, captação da ETA de Cajamar	1 (16,7)	1 (16,7)	3 (50)	0	0
		R. Cotia, captação da ETA do Baixo Cotia	1 (16,7)	1 (16,7)	4 (66,7)	0	0
		Reservatório Guarapiranga, captação da SABESP	0	3 (50)	2 (50)	0	0
7	Baixada Santista	Canal de Fuga II, Usina H. Borden	1 (16,7)	1 (16,7)	2(50)	0	0

Quanto à sazonalidade, uma porcentagem muito mais baixa de amostras positivas foi detectada nos meses de julho e agosto, meses mais frios, com menor precipitação pluviométrica (Figura 4).

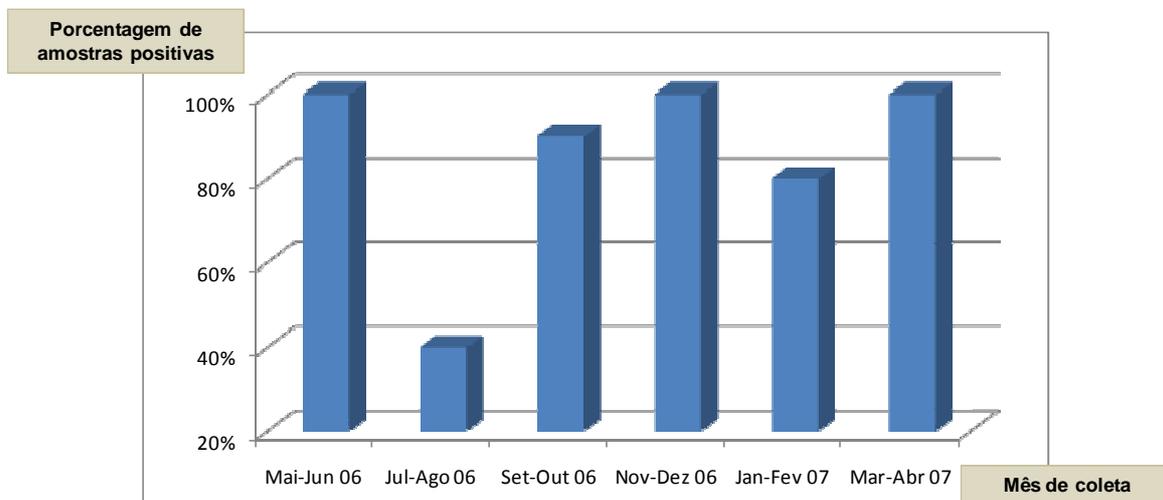


Figura 4 – Porcentagem de amostras positivas para os vírus analisados nos diferentes meses de coleta

As concentrações de coliformes termotolerantes foram elevadas em quase todos os pontos avaliados, com médias geométricas superiores a 1000 UFC/100 mL em sete desses pontos. Em dois pontos (Reservatório Guarapiranga, na captação da SABESP e no Canal de Fuga da Usina Henry Borden), esses valores foram inferiores a 100 UFC/100 mL. Não se verifica portanto, relação entre as concentrações médias desses indicadores e as porcentagens de amostras positivas para os vírus entéricos (Tabela 5 e Figura 5)

Tabela 5 – Concentração mínima e máxima de coliformes termotolerantes nos 10 pontos de captação avaliados

UGRHI		Local de Coleta	Coliformes Termotolerantes Concentração UFC/100 mL
Nº	Nome		
2	Paraíba do Sul	R. Paraíba, captação de Aparecida	$7 - 3,4.10^5$
5	Piracicaba, Capivari, Jundiáir	R. Atibaia, captação de Atibaia	$48 - 2,3.10^3$
		R. Atibaia, captação nº 3 de Campinas	$1,7.10^3 - 4,9.10^4$
		R. Piracicaba, captação de Piracicaba	$7,9.10^3 - 4,9.10^4$
		R. Piracicaba, captação de Americana	$20 - 3,3.10^4$
		R. Capivari, captação de Campinas	$47 - 9,4.10^3$
6	Tietê	Ribeirão dos Cristais, captação da ETA de Cajamar	$2,5.10^3 - 2,3.10^4$
		R. Cotia, captação da ETA do Baixo Cotia	$1,1.10^4 - 2,4.10^5$
		Reservatório Guarapiranga, captação da SABESP	4 - 820
7	Baixada Santista	Canal de Fuga II, Usina H. Borden	23 - 170

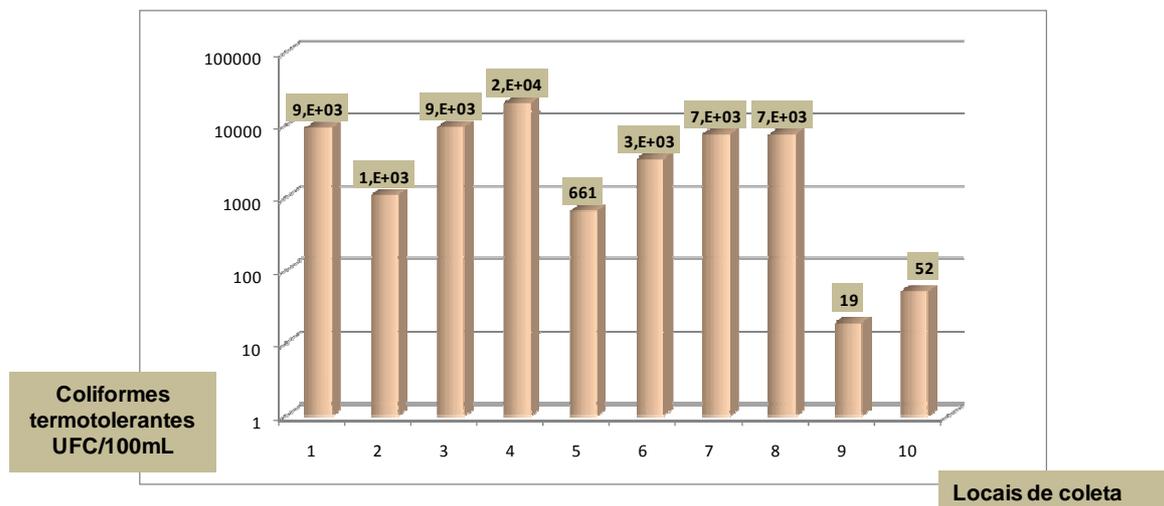


Figura 5 – Concentrações de coliformes termotolerantes (média geométrica) em cada local de coleta

Na segunda fase do Projeto, isto é, avaliação quantitativa pela técnica de inoculação em cultura de células RD, em amostras recoletadas em locais com altas porcentagens de resultados positivos na primeira fase, foram observadas concentrações variáveis entre 0,23 e 9,58 UFP/L (Tabela 6 e Figura 6). Em todos os pontos, esses resultados foram mais elevados na segunda campanha, sem aparente relação com outros parâmetros avaliados (coliformes termotolerantes, pH, temperatura, ocorrência de chuvas, turbidez, sólidos totais, etc.).

Tabela 6 – Concentrações de *Enterovirus* em quatro pontos de coleta, em duas campanhas de amostragem

Local de coleta	Resultados (UFP/L)	
	1ª Campanha	2ª Campanha
R. Paraíba, captação de Aparecida	0,80	9,58
R. Atibaia, captação de Campinas	0,23	0,95
R. Piracicaba, captação de Piracicaba	0,25	2,7
R. Cotia, captação ETA Baixo Cotia	0,53	5,68

UFP = Unidade Formadora de Placa; 1ª Campanha: 15/1 a 21/2/2008; 2ª Campanha: 12/3 a 26/5/2008

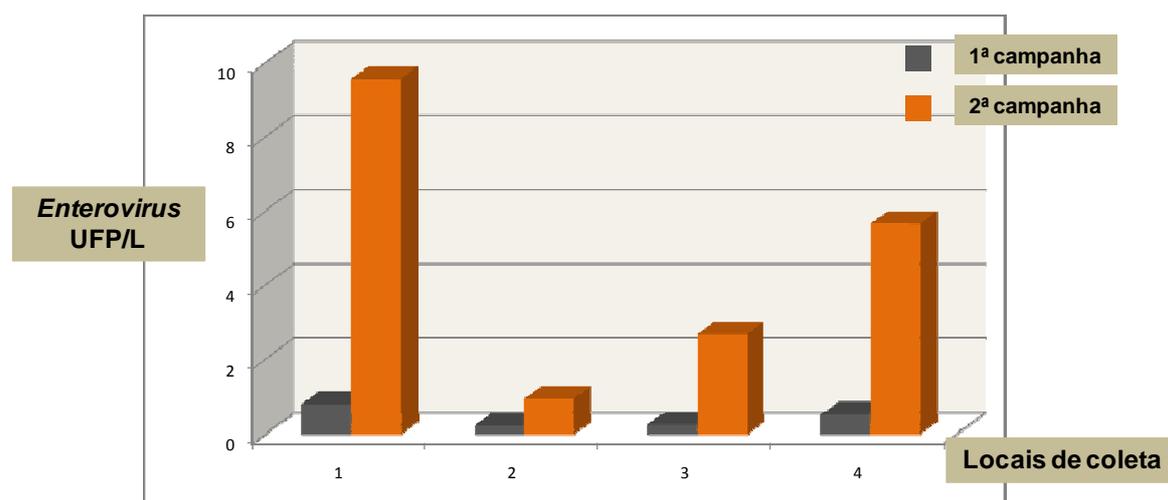


Figura 6 – Concentrações de *Enterovirus* em quatro pontos de coleta, em duas campanhas de amostragem

Schwartzbrod (2000), numa revisão sobre vírus e saúde pública, relata as concentrações de vírus entéricos a partir de avaliações realizadas em águas superficiais de diferentes países do mundo. As porcentagens de amostras positivas detectadas nesses estudos, que utilizaram tanto a técnica de inoculação em cultura como outros métodos, variam de 10 a 100%.

Denis-Mize et al (2004) utilizaram a técnica de inoculação em cultura celular (linhagem RD) e RT-PCR multiplex para avaliar a ocorrência de vírus (*Enterovirus*, *Reovirus*, *Virus da hepatite A* e *Norovirus*) em cinco bacias hidrográficas com variadas características climáticas, de ocupação do solo e de qualidade da água, localizadas em diferentes estados americanos. Em 87 % das amostras foram detectados vírus cultiváveis. A cada campanha de amostragem, uma das amostras era inoculada com poliovírus, tendo sido obtida uma recuperação média de 54 %. Os autores destacam a importância de testes de controle de qualidade também na interpretação dos resultados das técnicas de biologia molecular: após exclusão dos resultados potencialmente falso-positivos, *Reovirus*, *Rotavirus* e o *Virus da hepatite A* foram detectados em 30 %, 20 % e 17 % das amostras analisadas pelo método de RT-PCR multiplex.

Sedmak et al. (2005), realizaram um estudo de nove anos sobre a ocorrência de vírus cultiváveis em diferentes tipos de amostras ambientais, em Milwaukee, Wisconsin, nos Estados Unidos. Além das células BGM, requeridas pelo método ICR-USEPA (USEPA 1996), foram utilizadas as linhagens Hep-2, CACO 2 e RD. Das 18 amostras do lago Michigan (captação para a cidade de Milwaukee) avaliadas, 8,8% foram positivas (*Reovirus*), na maior parte das vezes durante os meses mais frios. Na quantificação desses vírus, foram verificadas concentrações máximas de 59 NMP (Número Mais Provável)/L.

Em estudo realizado no rio Tamagawa, no Japão, Haramoto et al. (2005) avaliaram um novo método de concentração para a detecção de *Norovirus*, *Enterovirus* e *Torque Teno Virus* pela técnica de TaqMan PCR. A quantificação dos norovírus foi realizada por PCR em tempo real e *Enterovirus* também foi analisado por cultura celular (BGM) associada ao PCR. Mais de um tipo de vírus foi detectado em 43 (67 %) de 64 amostras: *Norovirus* genótipo 1 e 2 e *Adenovirus* foram detectados em 53 %, 44 % e 45 % das amostras respectivamente. As concentrações médias de *Norovirus* genótipo 1 e 2 foram 0,087 e 0,61 genoma/L, respectivamente, com valores mais elevados no inverno (0,21 genomas/L e 2,3 genomas/L, respectivamente). Foram verificadas amostras positivas para *Enterovirus*

por PCR direto (9 %) e por cultura celular associada ao PCR (3 %). *Torque teno Virus* (vírus emergentes da hepatite) foi isolado em 5 % das amostras. Observou-se uma correlação elevada entre a ocorrência dos vírus e a concentração de coliformes totais e presença de fagos F-específicos.

Quanto a *Adenovirus*, sua prevalência em água tratada e bruta foi estudada por Van Heerden et al. (2005), na África do Sul. Esses autores detectaram 44% de amostras positivas para *Adenovirus* utilizando uma técnica integrada de cultura celular e nested PCR.

Num trabalho de revisão sobre *Adenovirus* em águas, Jiang (2006) resume os resultados das pesquisas sobre a ocorrência desses microrganismos em águas interiores e costeiras, que vem aumentando com o advento da técnica de PCR, com relatos de ocorrência de porcentagens mais elevadas de amostras positivas, em comparação com as avaliações que utilizaram a técnica de cultura de células apenas.

5 – CONCLUSÕES E RECOMENDAÇÕES

- De acordo com os resultados obtidos nesse trabalho são elevadas as porcentagens de amostras positivas dos vírus entéricos, *Enterovirus* e *Adenovirus* em mananciais localizados em algumas áreas densamente povoadas do Estado de São Paulo;
- Esses resultados devem ser utilizados pelas empresas responsáveis pelo abastecimento de água nessas regiões para seleção dos pontos de captação mais adequados e para otimização dos processos de tratamento da água. Tais dados são igualmente úteis para as autoridades sanitárias na investigação de surtos de doenças virais, com possível transmissão hídrica e devem igualmente orientar a utilização desses recursos hídricos para outros fins, como por exemplo, contato recreacional e irrigação ;
- É recomendada a realização de um estudo semelhante em outras UGRHIs do Estado de São Paulo de forma a obter dados sobre a ocorrência desses vírus nas demais regiões do Estado para esses mesmos fins;
- Esse estudo poderia servir de modelo para estudos semelhantes em outras regiões do Brasil, cuja realização seria regulamentada por meio da legislação brasileira sobre água de consumo humano, que, em sua versão atual recomenda a pesquisa de *Enterovirus* em água tratada.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

American Association of Public Health 2005a. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 21ª edição. Seção 9510G. APHA/AWWA/WEF. Washington DC.

American Association of Public Health 2005b. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 21ª edição. Seção 9222D. APHA/AWWA/WEF. Washington DC.

American Association of Public Health 2006 . Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater on line. Seção 9060. Approved by Standard Methods Committee 2006. APHA/AWWA/WEF. Washington DC. Disponível em [<http://www.standardmethods.org>]. Acesso em 7/8/2009.

Boom R. et al. 1990. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. J. Clin. Microbiol. 28: 495-503.

Brasil. Ministério da Saúde. Portaria 518 de 25 de março de 2004. Disponível em [<http://www.anvisa.gov.br/e-legis>]. Data de acesso 22/2/2011.

Carter MJ 2005. Enterically infecting viruses: pathogenicity, transmission and significance for food and waterborne infection. J. Appl. Microbiol. 98:1354-1380.

CETESB 1986. Enterovírus em água – Concentração de amostras a partir de grandes volumes de água. Método de Ensaio. São Paulo, 1986, 25p. Norma Técnica.

CETESB 1987. Enterovírus em água. Isolamento e quantificação. Procedimento. São Paulo, 1987. 29p. Norma Técnica.

CETESB 2007. Relatório de Qualidade das Águas Interiores no Estado de São Paulo 2006.

Denis-Mize K, Fout GS, Dahling DR, Francy D. 2004. Detection of enteric viruses in stream water with RT-PCR and cell culture. Journal of Water and Health, 2(1): 37-47.

Fong TT, Lipp EK. 2005. Enteric viruses of humans and animals in aquatic environments: health risks, detection and potential water quality assessment tools. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 69 (2): 357-371.

Formiga-Cruz M et al. 2002. Distribution of human viral contamination in shellfish from different growing areas in Greece, Spain, Sweden and the United Kingdom. *Appl. Environm. Microbiol.* 68: 5990-5998.

Formiga-Cruz M. et al. 2005. Nested multiplex PCR assay for detection of human enteric viruses in shellfish and sewage. *J. Virol. Methods* 125: 111-118.

Haramoto E, Katayama H, Oguma K, Ohgaki S. 2005. Application of cation-coated filter method to detection of noroviruses, enteroviruses, adenoviruses and Torque Teno viruses in the Tamagawa River in Japan. *Appl Environ Microbiol* 71(5): 2403-11.

ICTV (International Committee on Taxonomy of Viruses) 2009. Virus taxonomy: 2009 release. Disponível em [<http://www.ictvonline.org/virusTaxonomy.asp?version=2009>]. Data de acesso: 24/2/2011.

Jiang SC 2006. Human adenoviruses in water: Occurrence and health implications: a critical review. *Environm. Sci. Technol.* 40: 7132-7140.

Martins MT, Sanchez PS, Marques E, Monteiro, CK, Molina, AG. 1986. Ten year survey pf *Salmonella* and enterovirus in raw and treated waters in the great São Paulo area, Brazil. *Water Sci. Technol.* 18(10): 53-60.

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. *Appl. Environ. Microbiol.* 64(9): 3376-3382.

Puig M et al. 1994. Detection of adenoviruses and enteroviruses in polluted waters by nested PCR amplification. *Appl. Environ. Microbiol.* 60 (8): 2963-2970.

Rodriguez RA, Pepper IL, Gerba CP. 2009. Application of PCR-based methods to assess the infectivity of enteric viruses in environmental samples. *Appl. Environm. Microbiol.* 75(2): 297-307.

Schwartzbrod L 2000. Virus humain et santé publique: consequences de l'utilisation des eaux usées et des boues en agriculture et conchyliculture. Disponível em [www.who.int/entity/water_sanitation_health/.../virus.pdf]. Acesso em 22/9/2009.

Sedmak G, Bina D, MacDonald, J, Couillard L 2005 Nine-year study of the occurrence of culturable viruses in source water for two drinking water plants and the influent and effluent of a wastewater treatment plant in Milwaukee, Wisconsin (August 1994 through July 2003). *Appl. Environm. Microbiol.* 71(2):1042-1050.

United States Environmental Protection Agency (USEPA) 1989. Part II: National Primary Drinking Water Regulations; Filtration, Disinfection; Turbidity, *Giardia lamblia*, Viruses, *Legionella*, and Heterotrophic Bacteria; Final Rule. 40 CFR Parts 141 and 142. June 29, 1989.

United States Environmental Protection Agency (USEPA) 1996. National Primary Drinking Water Regulations: Monitoring Requirements for Public Drinking Water Supplies; Final Rule. 40 CFR Part 141. May 14, 1996.

United States Environmental Protection Agency (USEPA) 2005. CCL 2 List & regulatory determinations. Disponível em: <http://www.epa.gov/ogwdw000/ccl/ccl2.html>. Acesso em 23/9/2009.

Van Heerden J; Ehlers MM; Helm A; Grabow WOK 2005 Prevalence, quantification and typing of adenoviruses detected in river and treated drinking water in South Africa. *J. Appl. Microbiol.* 99: 234-42.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. 2004 Guidelines for drinking water quality. Volume 1. Recommendations. 3rd ed. World Health Organization. Geneva.. Disponível: [http://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/guidelines/en/index.html]. Acesso em 13 de julho de 2009.

Wyn Jones AP, Selwood J. 2001. Enteric viruses in the environment. *J. Appl. Microbiol.* 91:945-62.