

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Andrêssa Silvino Ferreira Assis

**OTIMIZAÇÃO DO MÉTODO DE FLOCULAÇÃO ORGÂNICA DE
CONCENTRAÇÃO VIRAL PARA AVALIAÇÃO DO IMPACTO DE
TRATAMENTO POR LODO ATIVADO NA ESTAÇÃO DE
TRATAMENTO DE ESGOTO BARBOSA LAGE, JUIZ DE FORA -
MINAS GERAIS**

Juiz de Fora
2016

ANDRÊSSA SILVINO FERREIRA ASSIS

**OTIMIZAÇÃO DO MÉTODO DE FLOCULAÇÃO ORGÂNICA DE
CONCENTRAÇÃO VIRAL PARA AVALIAÇÃO DO IMPACTO DE
TRATAMENTO POR LODO ATIVADO NA ESTAÇÃO DE
TRATAMENTO DE ESGOTO BARBOSA LAGE, JUIZ DE FORA -
MINAS GERAIS**

Tese de Doutorado submetida à banca examinadora do Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Juiz de Fora para obtenção do Título de Doutor em Ciências Biológicas na área de Imunologia e Doenças Infecto-Parasitárias.

Orientadora: Dr^a. Betânia Paiva Drumond

Co-orientadores: Dr^a. Maria Luzia da Rosa e Silva

Dr. Marcelo Henrique Otenio

Juiz de Fora

2016

Ficha catalográfica elaborada através do programa de geração automática da Biblioteca Universitária da UFJF, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Assis, Andrêssa Silvino Ferreira.

Otimização do método de floculação orgânica de concentração viral para avaliação do impacto de tratamento por lodo ativado na Estação de Tratamento de Esgoto Barbosa Lage, Juiz de Fora - Minas Gerais / Andrêssa Silvino Ferreira Assis. -- 2016.
155 f. : il.

Orientadora: Betânia Paiva Drumond

Coorientadores: Maria Luzia da Rosa e Silva, Marcelo Henrique Otenio

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Imunologia e Genética, 2016.

1. Tratamento de esgoto. 2. Floculação orgânica. 3. Vírus entéricos. I. Drumond, Betânia Paiva, orient. II. Rosa e Silva, Maria Luzia da, coorient. III. Otenio, Marcelo Henrique, coorient. IV. Título.

Andrêssa Silvino Ferreira Assis

**OTIMIZAÇÃO DO MÉTODO DE FLOCULAÇÃO ORGÂNICA DE
CONCENTRAÇÃO VIRAL PARA AVALIAÇÃO DO IMPACTO DE
TRATAMENTO POR LODO ATIVADO NA ESTAÇÃO DE
TRATAMENTO DE ESGOTO BARBOSA LAGE, JUIZ DE FORA -
MINAS GERAIS**

Tese de Doutorado submetida à banca examinadora do Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Juiz de Fora para obtenção do Título de Doutor em Ciências Biológicas na área de Imunologia e Doenças Infecto-Parasitárias.

Aprovada em: 19 / 12 / 2016.

BANCA EXAMINADORA

Betânia Paiva Drumond

Prof.^a Dr.^a Betânia Paiva Drumond (Orientadora)
Universidade Federal de Minas Gerais

Maria Luzia da Rosa e Silva

Prof.^a Dr.^a Maria Luzia da Rosa e Silva (Co-orientadora)
Universidade Federal de Juiz de Fora

Marize Pereira Miagostovich

Dr.^a Marize Pereira Miagostovich
Instituto Oswaldo Cruz (IOC) / Fiocruz-RJ

Pedro Augusto Alves

Dr. Pedro Augusto Alves
Centro de Pesquisa René Rachou (CPqRR) / Fiocruz -MG

André Luiz da Silva Domingues

Prof. Dr. André Luiz da Silva Domingues
Universidade Federal de Juiz de Fora

Alessandra Machado

Prof.^a Dr.^a Alessandra Barbosa Ferreira Machado
Universidade Federal de Juiz de Fora

À minha família, que não mediu esforços, auxiliando-me sempre que preciso.
E a Deus, minha fortaleza e meu refúgio em todos os momentos.

AGRADECIMENTOS

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) pelo suporte financeiro, que tornou possível a concretização dos ensaios e a minha dedicação plena a este trabalho.

À Coordenação da Pós-Graduação em Ciências Biológicas e aos professores do programa, pelos valiosos ensinamentos transmitidos.

À minha orientadora Dr^a. Maria Luzia da Rosa, que me conduziu pelos caminhos da virologia desde a iniciação científica e me estimulou a seguir na trajetória acadêmica. Faltam palavras para expressar toda minha gratidão a você pela confiança, amizade e dedicação. Tenha certeza de que te levarei como referência profissional e pessoal e tentarei ser para meus alunos tudo que você é para mim. Ao final desta etapa, o saldo é muito positivo, pois contornamos vários percalços, colecionamos ótimos momentos e comemoramos muitas conquistas. Assim, me resta apenas dizer muito obrigada por ter me acolhido no Laboratório de Virologia!

À minha orientadora Dr^a Betânia Paiva Drumond, que em meio a tantos obstáculos teve a sensibilidade de vir em meu auxílio e por ter contribuído com toda sua garra e profissionalismo. Meus sinceros agradecimentos pela confiança, amizade, acolhimento em BH e por todos os ensinamentos nesses anos de convívio, tenho orgulho de ter participado da sua equipe de pesquisa.

Ao Presidente da Companhia de Saneamento Municipal (Cesama), André Borges de Souza, que autorizou a realização deste estudo na Estação de Tratamento de Esgoto (ETE) de Barbosa Lage, localizada em Juiz de Fora, MG e disponibilizou dados do Laboratório Central da Cesama para as análises de parâmetros físico-químicos e microbiológico. Agradeço, ainda, a todos os funcionários da ETE, em especial ao Sr. Aluizio, pela atenção e auxílio nas coletas.

Ao Laboratório de Virologia Comparada e Ambiental da Fiocruz-RJ, especialmente, à Dr^a. Marize Pereira Miagostovich, pela grande colaboração e suporte científico, que permitiu a concretização deste trabalho. Agradeço, ainda, ao Dr. Tulio Machado Fumian por me receber na Fiocruz e responder a todos os milhões de e-mail, sempre cheios de dúvidas.

Ao Laboratório de Vírus da Universidade Federal de Minas Gerais, especialmente, à Dr^a Erna Geessien Kroon e à Dr^a Betânia Paiva Drumond, que permitiram a realização dos experimentos de cultivo celular de vírus e disponibilizaram toda a infraestrutura e insumos necessários. Agradeço também às alunas de doutorado Izabela Maurício Rezende e a Lívia Sacchetto Pengo, por todos os ensinamentos na “arte do cultivo de

vírus” e colaboração na execução dos experimentos de cultivo de adenovírus. Meus agradecimentos se estendem ao Dr. Jônatas Santos Abrahão, que lidera a linha de pesquisa com vírus gigantes e à Ana Cláudia dos Santos Pereira Andrade, aluna de doutorado que colaborou com os experimentos de cultivo destes vírus.

À Embrapa Gado de Leite de Juiz de Fora, especialmente, ao Dr. Marcelo Henrique Otenio pela infraestrutura e contribuições científicas.

Aos mestres e colegas do Departamento de Microbiologia do ICB/UFJF, por toda a atenção e incentivo.

Ao meu marido Mayko pelo amor, companheirismo e confiança. Obrigada por dividir comigo todas as decepções, as angústias e as conquistas da “vida científica”. A você que participou de todos os momentos da minha trajetória acadêmica, desde a minha graduação até o doutorado, meu muito obrigada por acreditar em meus sonhos e, principalmente, por estimular voos ainda mais altos. Eu te amo muito e conto sempre com você!

Aos meus pais Lígia e Antônio, que no seu jeito simples de ver a vida me ensinaram a lutar para alcançar todos os objetivos almejados. O esforço de vocês foi meu estímulo maior para buscar o conhecimento e lutar por um lugar ao sol.

Aos meus irmãos Renata e João Vitor, ao meu cunhado Evaldo e ao meu afilhado Guilherme, pela companhia e torcida em todas as horas. Minha família, meu maior tesouro!

À minha querida sogra e amiga Sônia, deixo meus agradecimentos por todo o carinho e o apoio. Tenha certeza de você é um exemplo de garra e determinação a ser seguido.

Aos tios, tias, primos e primas que, mesmo não entendendo muito bem o que eu faço, acreditaram em meus sonhos e torcem pelo meu sucesso. Especialmente, aos meus queridos avós, Zilda e João (Saudades), que iluminaram a minha vida com seu amor, carinho e atenção.

Às eternas amigas do Laboratório de Virologia ICB-UFJF, pelas tardes divertidas que trouxeram muito aprendizado. Em especial, Izabela, Lívia, Tatiane e Jeruza, que participaram de momentos importantes da minha trajetória. Vocês voaram para longe em busca de crescimento, mas ainda estão bem perto de mim em pensamento.

RESUMO

O tratamento de esgoto pode ser insuficiente para a completa eliminação de vírus entéricos, tais como adenovírus humanos (HAdV) e rotavírus do grupo A (RVA). Portanto, o retorno do lodo e do efluente tratado ao ambiente pode representar riscos à saúde pública. Este estudo foi conduzido para otimizar um protocolo de floculação orgânica para recuperação viral a partir de lodo de esgoto e efluente tratado, bem como realizar um monitoramento de HAdV e RVA na estação de tratamento de esgoto (ETE) de Juiz de Fora, MG. Nos estudos de otimização, foram propostas adaptações no protocolo de floculação com leite desnatado para lodo e efluente tratado, com modificações no tempo de agitação da amostra, na concentração final de leite desnatado e/ou na etapa de centrifugação. No estudo de monitoramento, esgoto bruto (P1), esgoto primário (P2), lodo (P3) e efluente tratado (P4) foram coletados bimensalmente em 2014 (durante as épocas seca e chuvosa), totalizando 96 amostras (simples e compostas). As cargas virais foram determinadas por PCR quantitativo e o bacteriófago PP7 foi usado como controle interno. Amostras de HAdV e RVA foram submetidas ao sequenciamento e a viabilidade das partículas de HAdV foi avaliada em amostras de P4. Os parâmetros físico-químicos e a contagem de coliformes termotolerantes (CT) foram determinados em cada ponto. Nos estudos de otimização, foram selecionadas duas condições que apresentaram as maiores taxas de recuperação viral no lodo (menor tempo de agitação e maior concentração de leite desnatado) e no efluente tratado (sem primeira etapa de centrifugação e com maior concentração de leite desnatado). Ambas provaram ser ferramentas úteis para pesquisa viral em amostras de campo, inclusive para a pesquisa de vírus gigantes. No monitoramento, o HAdV foi detectado em 85,4% (82/96) dos concentrados, com cargas virais variando de $3,27 \times 10^2$ a $2,42 \times 10^6$ cópias do genoma por mililitro (cg/mL), ao longo do ano. A presença de RVA foi observada em 52,1% (50/96) dos concentrados ($1,38 \times 10^3$ a $3,65 \times 10^5$ cg/mL), com maior detecção na época seca. A carga viral não foi influenciada pelo tipo de amostra, sendo detectada tanto em amostras simples, quanto em amostras compostas. Todas as amostras de HAdV sequenciadas pertenciam à espécie F tipo 41 e as amostras de RVA pertenciam ao genótipo I1. O tratamento de esgoto reduziu a quantidade de matéria orgânica e sólidos, bem como a contagem de CT e as cargas virais. No entanto, a presença de HAdV e RVA foi observada mesmo após o tratamento, inclusive em amostras de efluente tratado consideradas adequadas pelas legislações atuais, com detecção de partículas infecciosas de HAdV. Foram observadas correlações positivas entre a carga viral e a demanda bioquímica de oxigênio, os sólidos sedimentáveis e sólidos suspensos totais. Os dois protocolos otimizados neste estudo podem ser facilmente adequados para uso em laboratório de rotina, podendo impulsionar o monitoramento viral nos subprodutos gerados na ETE. A carga viral detectada na ETE salienta a disseminação ambiental de RVA e HAdV e aponta o potencial do HAdV como um marcador viral de contaminação em ambientes aquáticos.

Palavras-chave: Tratamento de esgoto. Floculação orgânica. Vírus entéricos. Adenovírus humano. Rotavírus do grupo A. Coliformes termotolerantes. Parâmetros físico-químicos.

ABSTRACT

Sewage treatment may be insufficient for the complete elimination of enteric viruses such as human adenoviruses (HAdV) and group A rotaviruses (RVA). Thus, the return of sewage sludge and treated effluent to the environment poses concerns potential for public health. This study was conducted to optimize an organic flocculation procedure for viral recovery from sludge and treated effluent, and carry out a surveillance of HAdV and RVA in a wastewater treatment plant (WWTP) at Juiz de Fora, MG. In optimization studies, conditions were proposed for sludge and treated effluent with changes in the stirring time, in the final concentration of skimmed-milk and/or in the centrifugation step. In surveillance study, raw sewage (P1), primary sewage (P2), sludge (P3) and treated effluent (P4) were collected bimonthly in 2014 (during the dry and the rainy season), totaling 96 samples (simple and composite). Quantitative PCR determined viral loads and PP7 bacteriophage was used as internal control. HAdV and RVA strains were selected for sequencing, and the HAdV viability was evaluated in P4 samples. Physico-chemical parameters and thermotolerant coliforms (TC) counting were determined at each point. After the optimization studies, two conditions were selected: the ones that showed the highest viral recovery rates in sludge (lower stirring time and higher concentration of skimmed-milk) and treated effluent (without the first centrifugation step and with a higher concentration of skimmed-milk). These conditions proved to be a useful tool for viral search in the field samples, including for the research of giant virus. In surveillance study, HAdV was detected in 85.4% (82/96) of the concentrated, with viral loads ranging from 3.27×10^2 to 2.42×10^6 genome copies per milliliter (gc/mL), throughout the year. RVA presence was observed in 52.1% (50/96) of the samples (1.38×10^3 to 3.65×10^5 gc/mL) with detection greater in the dry season. Viral load was not influenced by the type of sample being detected both in single samples, as in composite samples. All the sequenced HAdV strains belonged to species F type 41, and RVA strains belonged to genotype I1. Sewage treatment reduced the content of organic matter and solids, as well as the TC counts and the viral loads. However, the presence of HAdV and RVA was observed after treatment, even in samples considered adequate by current laws with detection of infectious HAdV particles. Positive correlations were observed between viral load and biochemical oxygen demand, sedimented solids and total suspended solids. Two optimized protocols in this study are easily suitable for routine laboratory use and can boost viral monitoring in by-products generated in the WWTP. Viral load detected in WWTP stress the environmental dissemination of HAdV and RVA and addressed the potential of HAdV as a virological marker of contamination in aquatic environments.

Keywords: Sewage treatment. Organic flocculation. Enteric viruses. Human adenoviruses. Group A rotaviruses. Fecal coliforms. Physico-chemical parameters.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Etapas do gerenciamento do lodo de esgoto e os principais processos utilizados.....	27
Figura 2	Diagrama esquemático da partícula de adenovírus humano.....	34
Figura 3	Representação esquemática do ciclo de replicação dos adenovírus humanos.....	35
Figura 4	Organização do genoma e da partícula de rotavírus.....	37
Figura 5	Representação esquemática do ciclo de replicação dos rotavírus.....	40
Figura 6	Funções da proteína não estrutural 4 (NSP4).....	42
Figura 7	Estratégia experimental utilizadas neste trabalho.....	53
Figura 8	Representação esquemática do processo de tratamento secundário por lodo ativado utilizado na Estação de Tratamento de Esgoto de Barbosa Lage.....	55
Figura 9	Representação esquemática dos pontos de coleta na Estação de Tratamento de Esgoto Barbosa Lage.....	56
Figura 10	Fluxograma comparativo dos protocolos de concentração viral utilizados neste estudo.....	58
Figura 11	Fluxograma das etapas do estudo de otimização do protocolo de concentração viral para lodo de esgoto.....	66
Figura 12	Fluxograma das etapas do estudo de otimização do protocolo de concentração viral para efluente tratado.....	68
Figura 13	Carga de adenovírus e taxa de recuperação do bacteriófago PP7 obtidas em amostras de lodo de esgoto ativado, adensado e digerido nas Estações de Tratamento de Esgoto de Juiz de Fora e do Rio de Janeiro.....	81
Figura 14	Carga de adenovírus humano e rotavírus do grupo A e taxa de recuperação do bacteriófago PP7 em amostras de efluente tratado obtidas na Estação de Tratamento de Esgoto Barbosa Lage.....	83

Figura 15	Efeito citopático observado em <i>A. polyphaga</i> inoculada com amostra de efluente tratado concentrada pelo protocolo de floculação com leite desnatado otimizado neste estudo.....	84
Figura 16	Gráficos obtidos nos ensaios de PCR em tempo real para detecção de mimivírus.....	85
Figura 17	Carga de adenovírus humano e taxa de recuperação de PP7 por época e ponto de coleta.....	88
Figura 18	Carga de rotavírus do grupo A e taxa de recuperação de PP7 por época e ponto de coleta.....	89
Figura 19	Médias mensais de temperatura e pluviosidade registradas em Juiz de Fora no período de janeiro a dezembro de 2014.....	90
Figura 20	Dendograma filogenético baseado nas sequências nucleotídicas parciais do gene que codifica o hexon em amostras de adenovírus humanos.....	93
Figura 21	Dendograma filogenético baseado nas sequências nucleotídicas parciais do gene que codifica a proteína VP6 em amostras de rotavírus do grupo A.....	94
Figura 22	Efeito citopático observado após a segunda passagem do concentrado de efluente tratado em células A549.....	96
Figura 23	Efeito citopático observado após a segunda passagem do concentrado de efluente tratado em células HEK293.....	96
Figura 24	Valores de demanda bioquímica de oxigênio (DBO) e demanda química de oxigênio (DQO) em amostras de esgoto bruto (P1) e esgoto tratado (P4), no período de janeiro a dezembro de 2014.....	99
Figura 25	Valores de óleos e graxas em amostras de esgoto bruto (P1) e esgoto tratado (P4), no período de janeiro a dezembro de 2014.....	100
Figura 26	Valores de pH em amostras de esgoto bruto (P1) e esgoto tratado (P4), no período de janeiro a dezembro de 2014.....	101
Figura 27	Valores de sólidos sedimentáveis (SS) em amostras de esgoto bruto (P1) e esgoto tratado (P4), no período de janeiro a dezembro de 2014.....	102
Figura 28	Valores de sólidos suspensos totais (SST) em amostras de esgoto bruto (P1) e esgoto tratado (P4), no período de janeiro a dezembro de 2014.....	103

Figura 29	Contagem de coliformes termotolerante e carga de adenovírus obtidas em amostras de esgoto bruto (P1) e esgoto tratado (P4), no período de janeiro a dezembro de 2014.....	105
------------------	---	-----

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1	Padrão de lançamento de efluentes e padrão de qualidade para corpos d'água receptores	28
Quadro 2	Taxas de eficiência de remoção de coliformes termotolerantes observadas nos principais sistemas de tratamento de esgoto.....	30
Quadro 3	Esquema de classificação dos adenovírus humanos.....	33
Quadro 4	Descrição dos segmentos genômicos dos rotavírus e das proteínas estruturais e não estruturais codificadas pelos mesmos.....	38
Quadro 5	Valores de <i>cut-off</i> de percentagem de identidade nucleotídica que definem os diferentes genótipos de rotavírus do grupo A.....	40
Quadro 6	Reagentes utilizados na reação da transcrição reversa para a síntese de DNA complementar a partir do RNA total extraído.....	60
Quadro 7	Iniciadores e sondas utilizados no PCR quantitativo para determinação da carga de adenovírus humano, rotavírus do grupo A e bacteriófago PP7.....	62
Quadro 8	Reação de PCR quantitativo e condições de amplificação utilizadas para determinação da carga de adenovírus humano.....	63
Quadro 9	Reação de PCR quantitativo e condições de amplificação utilizadas para determinação da carga de rotavírus do grupo A.....	63
Quadro 10	Reação de PCR quantitativo e condições de amplificação utilizadas para determinação da carga do bacteriófago PP7.....	63
Quadro 11	Condições testadas no estudo de otimização do protocolo de concentração viral para lodo de esgoto.....	66
Quadro 12	Condições testadas no estudo de otimização do protocolo de concentração viral para efluente tratado.....	68
Quadro 13	Iniciadores utilizados no PCR em tempo real para detecção de vírus gigantes.....	71
Quadro 14	Reação de PCR em tempo real e condições de amplificação utilizadas para detecção de vírus gigantes.....	71
Quadro 15	Iniciadores utilizados no PCR convencional para detecção de adenovírus humano e rotavírus do grupo A.....	73

Quadro 16	Reação de PCR convencional e condições de amplificação utilizadas para detecção de adenovírus humano.....	74
Quadro 17	Reação de PCR convencional e condições de amplificação utilizadas para detecção de rotavírus do grupo A.....	74
Quadro 18	Valores limites estabelecidos para os parâmetros físico-químicos e microbiológico no efluente tratado, de acordo com as legislações atuais.....	78
Tabela 1	Eficiência de recuperação de adenovírus e bacteriófago PP7 nas quatro condições de concentração por floculação com leite desnatado, a partir de amostras de lodo de esgoto ativado.....	79
Tabela 2	Eficiência de recuperação de adenovírus humano, rotavírus do grupo A e bacteriófago PP7 nas quatro condições de concentração por floculação com leite desnatado, a partir de amostras de efluente tratado.....	82
Tabela 3	Eficiência do método de concentração viral na detecção de adenovírus humano, rotavírus do grupo A e bacteriófago PP7 nos pontos de coleta avaliados neste estudo.....	86
Tabela 4	Taxa de positividade e carga de adenovírus humano e rotavírus do grupo A detectadas por tipo de amostra nos quatro pontos de coleta.....	91
Tabela 5	Carga de adenovírus humano detectada nos concentrados de efluente tratado antes e após o cultivo celular.....	97
Tabela 6	Valores médios \pm desvio padrão, valores mínimo e máximo dos parâmetros físico-químicos analisados em amostras de esgoto bruto e esgoto tratado, no período de janeiro a dezembro de 2014.....	98
Tabela 7	Resultados das análises qualitativa e quantitativa realizadas entre a carga viral e os parâmetros físico-químicos.....	104

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
A549	Células epiteliais de carcinoma alveolar basal humano
°C	Graus Celsius
cm ²	Centímetro quadrado
cDNA	DNA complementar
cg	Cópias de genoma
Cesama	Companhia Municipal de Saneamento
CERH	Conselho Estadual de Recursos Hídricos do Estado de Minas Gerais
Conama	Conselho Nacional do Meio Ambiente
Copam	Conselho Estadual de Políticas Ambientais
cPCR	Reação em cadeia da polimerase convencional
DBO	Demanda bioquímica de oxigênio
DDA	Doença diarreica aguda
DLP	“Double Layered Particle” – partícula de dupla camada
DMEM	Meio mínimo essencial modificado Dulbecco
DQO	Demanda química de oxigênio
DNA	“ <i>Deoxyribonucleic acid</i> ” – ácido desoxirribonucleico
dNTP	Desoxinucleotídeos trifosfatados
ECP	Efeito citopático
EMA	“ <i>Ethidium monoazide</i> ” - monoazida de etídio
ETE	Estação de tratamento de esgoto
EUA	Estados Unidos da América
Fiocruz	Fundação Oswaldo Cruz
g	gramas
<i>g</i>	Força centrífuga relativa
HAdV	Adenovírus humano
HAdV-F	Adenovírus humano da espécie F
HEK293	Células epiteliais de carcinoma renal humano transformada por HAdV-5
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
L	Litro
LAd	Lodo adensado
LAt	Lodo ativado
LD	Lodo digerido
M	Molar

m	metros
µg	Micrograma
mg	Miligrama
µL	Microlitros
mL	Mililitro
µm	Micrometros
µM	Micromolar
mm	Milímetros
mm ³	Milímetros cúbicos
mM	Milimolar
mRNA	RNA mensageiro
N	Normal
NCBI	“National Center for Biotechnology Information” – Centro Nacional de Informações Biotecnológicas
ng	Nanogramas
nm	Nanômetros
NMP	Número mais que provável
NSP	“Non Structural Protein” – proteína não estrutural
OMS	Organização Mundial da Saúde
ONU	Organização das Nações Unidas
Opas	Organização Pan-Americana da Saúde
P1	Ponto 1 – Esgoto bruto
P2	Ponto 2 – Esgoto primário
P3	Ponto 3 – Lodo de esgoto
P4	Ponto 4 – Efluente tratado
pb	Pares de base
PBS	“Phosphate-buffered saline” – Tampão salino fosfato
PCR	“Polymerase Chain Reaction” – Reação em cadeia da polimerase
PMA	“ <i>Propidium monoazide</i> ” - monoazida de propídio
PYG	“Peptone-yeast extract-glucose” – Extrato de peptone, levedura e glicose
qPCR	Reação em cadeia da polimerase quantitativo
RE	Retículo endoplasmático
RER	Retículo endoplasmático rugoso
RNA	“Ribonucleic acid” – ácido ribonucleico
RNA ⁺	RNA de polaridade positiva
RNA ⁻	RNA de polaridade negativa
rpm	Rotações por minuto
RV	Rotavírus

RVA	Rotavírus do grupo A
SFB	Soro fetal bovino
SNIS	Sistema Nacional de Informação sobre Saneamento
SS	Sólidos sedimentáveis
SST	Sólidos suspensos totais
TCDI ₅₀	“Tissue culture infective dose” - Dose infecciosa na cultura de tecidos que infecta 50% das células da monocamada
Tm	“Temperature of melting” - Temperatura de fusão
TLP	“Triple Layered Particle” – partícula de tripla camada
UFJF	Universidade Federal de Juiz de Fora
Unicef	Fundação das Nações Unidas pela Infância
VP	“Virion Protein” – proteína viral

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
2 REVISÃO DA LITERATURA	23
2.1 Saneamento básico e impactos à saúde	23
2.2 Tratamento de esgoto	24
2.2.1 Etapas do processo	24
2.2.2 Subprodutos do tratamento.....	26
2.2.3 Avaliação do desempenho do processo.....	29
2.3 Doença diarreica aguda e disseminação de vírus em matrizes aquáticas	30
2.4 Considerações gerais sobre os adenovírus.....	33
2.5 Considerações gerais sobre os rotavírus.....	37
2.6 Considerações gerais sobre os vírus gigantes.....	45
2.7 Métodos de detecção de vírus em amostras ambientais	47
3 JUSTIFICATIVA	50
4 OBJETIVOS	52
4.1 Objetivos gerais	52
4.2 Objetivos específicos.....	52
5 MATERIAL E MÉTODOS	53
5.1 Área de estudo	54
5.2 Coletas	56
5.3 Procedimentos para a pesquisa de adenovírus e rotavírus comuns às três etapas do estudo	57
5.3.1 Concentração viral	57
5.3.1.1 Controles.....	59
5.3.2 Extração do ácido nucleico viral.....	59
5.3.3 Obtenção de DNA complementar (cDNA)	59
5.3.4 Determinação da carga viral	60
5.3.4.1 Construção das curvas padrão de adenovírus, rotavírus e PP7	60
5.3.4.2 Quantificação viral.....	62
5.3.4.3 Determinação da eficiência do método de concentração viral	64
5.4 Otimização do protocolo de concentração viral para lodo de esgoto	65
5.4.1 Avaliação da eficiência das alterações propostas	65
5.4.2 Validação do protocolo otimizado para lodo de esgoto	67

5.5 Otimização do protocolo de concentração viral para efluente tratado	67
5.5.1 Avaliação da eficiência das alterações propostas	67
5.5.2 Validação do protocolo otimizado para efluente tratado	68
5.5.3 Pesquisa de vírus gigantes em amostra de efluente tratado	69
5.5.3.1 <i>Procedimentos de cultura celular</i>	69
5.5.3.2 <i>Isolamento de vírus gigantes</i>	70
5.5.3.3 <i>Detecção de vírus gigantes</i>	71
5.6 Monitoramento de adenovírus e rotavírus	72
5.6.1 Avaliação da eficiência do método de concentração	72
5.6.2 Pesquisa de adenovírus e rotavírus	72
5.6.3 Caracterização molecular das amostras de adenovírus e rotavírus	73
5.6.4 Viabilidade das partículas de adenovírus	75
5.6.4.1 <i>Multiplicação e manutenção das células</i>	75
5.6.4.2 <i>Suspensão viral padrão</i>	76
5.6.4.3 <i>Ensaio de citotoxicidade</i>	76
5.6.4.4 <i>Ensaio de viabilidade de partículas virais</i>	77
5.6.5 Análise dos parâmetros físico-químicos e microbiológico	77
5.7 Análises estatísticas	78
6 RESULTADOS	79
6.1 Otimização do protocolo de concentração viral para lodo de esgoto	79
6.1.1 Avaliação da eficiência das alterações propostas	79
6.1.2 Validação do protocolo otimizado para lodo de esgoto	80
6.2 Otimização do protocolo de concentração viral para efluente tratado	81
6.2.1 Avaliação da eficiência das alterações propostas	81
6.2.2 Validação do protocolo otimizado para efluente tratado	83
6.2.3 Pesquisa de vírus gigantes em amostra de efluente tratado concentrada pelo protocolo otimizado.....	84
6.3 Monitoramento de adenovírus e rotavírus	85
6.3.1 Avaliação da eficiência do método de concentração	85
6.3.2 Pesquisa de adenovírus e rotavírus	87
6.3.3 Caracterização molecular das amostras de adenovírus e rotavírus	92
6.3.4 Viabilidade das partículas de adenovírus em cultivo de células	95
6.3.5 Análise dos parâmetros físico-químicos e microbiológico	97
7 DISCUSSÃO	106
7.1 Otimização do protocolo de concentração viral para lodo de esgoto e efluente tratado	106

7.2 Monitoramento de adenovírus e rotavírus.....	112
8 CONCLUSÕES	124
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	126
APÊNDICE A - Curva padrão de adenovírus humanos (HAdV)	149
APÊNDICE B - Curva padrão de rotavírus do grupo A (RVA).....	150
APÊNDICE C - Curva padrão de bacteriófago PP7	151
APÊNDICE D - Produção científica durante o doutorado	152
ANEXO A - Autorização de coleta de amostras na Estação de Tratamento de Esgoto Barbosa Lage, Juiz de Fora – Minas Gerais.....	155

1 INTRODUÇÃO

O esgotamento sanitário é um serviço de saneamento que abrange várias etapas, como coleta, transporte, tratamento e disposição final adequada de esgotos sanitários (BRASIL, 2007). O esgoto bruto consiste em uma mistura de excrementos humanos, sólidos suspensos e detritos, além de conter uma gama variada de substâncias químicas, originadas de atividades domésticas, comerciais e industriais (OKOH et al., 2010; VON SPERLING, 2014).

O tratamento do esgoto é um serviço fundamental para a redução de impactos ambientais e riscos à saúde pública, considerando a grande quantidade de patógenos humanos excretados nas fezes (BOSCH et al., 2008; JEBRI et al., 2012), que retornam ao ambiente juntamente com as águas de abastecimento, depois de utilizadas pela população (IBGE, 2010).

Os processos de tratamento de esgoto utilizam mecanismos físicos e biológicos que, em geral, são eficazes na redução de sólidos suspensos e matéria orgânica. No entanto, os mesmos podem ser insuficientes para a completa remoção de patógenos (VON SPERLING, 2014). Até o momento, a qualidade microbiológica do efluente tratado tem sido avaliada com base, apenas, na eficiência de remoção de coliformes termotolerantes, que são bactérias utilizadas como indicadoras de contaminação fecal (OKOH et al., 2010; VON SPERLING, 2014). Entretanto, o uso deste parâmetro tem se mostrado inadequado como indicador da presença de outros agentes patogênicos humanos, em função das diferentes características existentes entre eles (FONG e LIPP, 2005).

Diante do exposto, deve-se considerar que o despejo de esgoto, ainda que tratado, pode contribuir para a introdução desses agentes em ambientes aquáticos, levando à contaminação dos corpos d'água receptores (FONG e LIPP, 2005; BOSCH et al., 2008; OKOH et al., 2010). Esta contaminação tem implicações sérias para a saúde pública, uma vez que o consumo e/ou o uso recreativo destas matrizes aquáticas pode contribuir para a transmissão de patógenos pela água (FONG e LIPP, 2005; BOSCH et al., 2008). De fato, uma proporção considerável dos leitos hospitalares no mundo é ocupada por pacientes que apresentam complicações decorrente destas infecções (STRAUB e CHANDLER, 2003). A doença diarreica

aguda (DDA) é uma das principais complicações e permanece como uma importante causa de morbidade e de mortalidade infantil, sobretudo nas populações carentes que vivem em áreas com pouca ou nenhuma infraestrutura básica (FARTHING et al., 2013). Esta doença pode ser causada por uma grande variedade de agentes etiológicos, como bactérias, parasitos, protozoários e vírus (WILHELMI et al., 2003; ESTES e GREENBERG, 2013).

Os vírus entéricos humanos desempenham um importante papel na gênese da DDA, com comprovado envolvimento em surtos da doença, desencadeados por veiculação hídrica (CHO et al., 2014; MELLOU et al., 2014; BRAEYE et al., 2015). O caráter explosivo e o espalhamento rápido dos surtos devem-se a algumas características das infecções causadas pelos vírus entéricos, tais como: a excreção de partículas nas fezes em concentrações extremamente elevadas, a necessidade de poucas partículas infecciosas para iniciar a infecção nos indivíduos susceptíveis, além do fato destes vírus permanecerem estáveis em matrizes aquáticas, por longos períodos (FONG e LIPP, 2005; GALL et al., 2015). Os rotavírus (RV) do grupo A e os adenovírus humanos (HAdV) da espécie F estão entre os mais importantes agentes causadores da DDA, envolvidos em casos esporádicos e surtos, acometendo principalmente crianças menores de cinco anos de idade (WILHELMI et al., 2003; BERK, 2013; ESTES e GREENBERG, 2013).

A legislação vigente não obriga o monitoramento de agentes virais para avaliação da qualidade microbiológica do efluente tratado, apesar de já ter sido demonstrado que os vírus entéricos podem resistir aos processos secundários de tratamento de esgoto (BOFILL-MAS et al., 2006; CARDUCCI et al., 2008; PETRINCA et al., 2009; RODRÍGUEZ-DIAZ et al., 2009; FUMIAN et al., 2010; VICTORIA et al., 2010). Somando-se a isso, diversos autores já comprovaram a presença de vírus entéricos em matrizes aquáticas consideradas apropriadas, de acordo com os padrões bacteriológicos utilizados, demonstrando assim uma ausência de associação entre a contaminação por coliformes termotolerantes e a presença desses vírus (MORESCO et al., 2012; VIEIRA et al., 2012; ASSIS et al., 2015). Diante desta realidade, novos indicadores de contaminação viral têm sido propostos, tais como os bacteriófagos, devido às características estruturais e comportamento similar aos vírus entéricos, como por exemplo a maior resistência no ambiente (ARRAJ et al., 2005; GERBA, 2009). Outro candidato proposto como indicador é o HAdV, que apresenta a

vantagem de ser específico para indicar a contaminação viral de origem humana (GIRONES, 2006; OKOH et al., 2010; VIEIRA et al., 2016).

Várias pesquisas têm sido desenvolvidas com a finalidade de avaliar a qualidade da água em diferentes matrizes, utilizando-se os indicadores bacteriológicos estabelecidos (SCOTT et al., 2002; MARQUES, 2003; TEKLEHAIMANOT et al., 2014). Entretanto, os estudos de monitoramento de vírus entéricos em estações de tratamento de esgoto (ETEs), bem como a avaliação do impacto destes tratamentos na carga viral são recentes, principalmente, nos países em desenvolvimento. Este fato pode ser explicado pela baixa eficiência dos métodos de concentração viral já estabelecidos para recuperação de vírus em diferentes matrizes aquáticas e, também, pelo alto custo e complexidade de execução destes métodos (SCHLINDWEIN et al., 2010; HATA et al., 2013; HASSINE-ZAAFRANE et al., 2015). Apesar disso, avanços recentes nestas técnicas têm proporcionado maior êxito nas investigações realizadas nesse campo de estudo (VICTORIA et al., 2009; FUMIAN et al., 2010; FUMIAN et al., 2013 CALGUA et al., 2013a).

Aliada à importância do esgoto como fonte de contaminação ambiental com patógenos humanos e animais, deve-se considerar também que esta matriz apresenta uma composição rica em termos de biodiversidade (CANTALUPO et al., 2011). Neste contexto, é importante destacar o grande impacto causado pelos vírus em biomas e ecossistemas, devido à sua diversidade genética e biológica, com efeitos na composição e no controle de comunidades microbianas em ambientes aquáticos, bem como na transferência lateral de genes entre microrganismos (SANO et al., 2004; WILMES et al., 2009; JURCKAZ-KUREK et al., 2016). Além disso, os vírus são detentores de um repertório genético com grande potencial biotecnológico. Cabe ressaltar que além dos vírus entéricos e dos bacteriófagos, há ainda outros vírus presentes no esgoto, como os vírus gigantes, que infectam amebas de vida livre. Tais vírus possuem genomas grandes, apresentando um rico repertório genético pouco explorado (CLEVERIE et al., 2006). Dada a riqueza da biodiversidade microbiana do esgoto, este microambiente é um alvo interessante de estudos de prospecção de biodiversidade de vírus e genes virais.

Os protocolos de concentração viral podem ser aplicados, não só às pesquisas de qualidade de água, mas também a outros estudos ecológicos, microbianos e biotecnológicos. Assim, o emprego de técnicas de concentração viral mais baratas e de fácil execução pode evidenciar a real situação dos corpos d'água receptores. Este

conhecimento pode impulsionar melhorias no sistema de tratamento de esgotos, que venham a contemplar a necessidade urgente de preservação dos mananciais aquáticos e a saúde das populações que estão em contato com os mesmos.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Saneamento básico e impactos à saúde

As metas de desenvolvimento do milênio, definidas no ano 2000 pelos Estados membros da Organização das Nações Unidas (ONU), desafiaram a comunidade global a reduzir pela metade, até 2015, a proporção de pessoas sem acesso à água potável e esgotamento sanitário. Desde então, um programa de monitoramento desenvolvido pela Organização Mundial da Saúde (OMS) em conjunto com a Fundação das Nações Unidas pela Infância (Unicef) tem divulgado estimativas regulares deste progresso (OMS e UNICEF, 2015). Segundo o último relatório, a meta estabelecida para o abastecimento de água potável foi atingida em 2010, cinco anos antes do prazo inicial previsto, revelando um avanço considerável ao garantir o acesso a fontes seguras de água potável, para mais de 90% da população mundial. Por outro lado, a meta para os serviços de esgotamento sanitário não foi cumprida, tendo progredido muito lentamente e deixado quase um terço da população mundial (2,4 bilhões) sem acesso a instalações sanitárias adequadas (OMS e UNICEF, 2015).

No Brasil, os dados do Sistema Nacional de Informações sobre Saneamento (SNIS) revelaram que menos da metade da população (46,8%) do país tem acesso aos serviços de coleta de esgoto e, ainda assim, grande parte do esgoto coletado (39%) não recebe tratamento adequado (SNIS, 2013). Em Minas Gerais, embora o índice de cobertura por rede coletora de esgoto seja mais elevado (74,2%), pouco mais de um terço (32,7%) deste esgoto é tratado (SNIS, 2013). Segundo o Plano de Saneamento Básico de Juiz de Fora, um panorama semelhante pode ser observado na cidade com relação ao elevado índice de cobertura por rede coletora de esgoto (98,1%). No entanto, apenas 10% do esgoto coletado é submetido ao tratamento, antes de ser lançado em corpos d'água (JUIZ DE FORA, 2014).

As condições precárias de saneamento e higiene, bem como a ingestão de água contaminada pela população podem ocasionar doenças infecciosas de transmissão hídrica, como a DDA, que ainda representa um sério problema de saúde pública (BOSCH et al. 2008; OKOH et al., 2010; IBGE, 2011). Esta realidade aponta

para a necessidade de implementar ações de ampliação e avaliação dos serviços de saneamento básico, a fim de prevenir os impactos ambientais e à saúde da população.

2.2 Tratamento de esgoto

O termo esgoto sanitário é utilizado para designar os resíduos líquidos provenientes de esgotos doméstico e industrial, além da água da chuva que infiltra na rede de esgoto (ABNT, 1986). O esgoto doméstico é originado a partir da utilização da água de abastecimento pelo homem, em função de seus hábitos de higiene e de suas necessidades fisiológicas, sendo constituído por, aproximadamente, 99,9% de água. A necessidade de tratamento do esgoto é justificada pela fração restante (0,1%), que engloba os sólidos orgânicos e inorgânicos, dissolvidos ou suspensos, além dos patógenos excretados nas fezes (NAIDOO e OLANIRAN, 2014; VON SPERLING, 2014).

2.2.1 Etapas do processo

O processo de tratamento de esgoto engloba os níveis preliminar, primário, secundário e terciário. O tratamento preliminar deve ser, obrigatoriamente, realizado em todas as ETEs, sendo fundamental para evitar a abrasão nos equipamentos e a obstrução de tubulações. Nesta etapa, grades de metal são utilizadas para remover sólidos grosseiros, enquanto unidades denominadas desarenadores removem a areia por sedimentação (NAIDOO e OLANIRAN, 2014; VON SPERLING, 2014). A inclusão de um tanque de equalização pode ser necessária após o tratamento preliminar. Isso garante a operação contínua das etapas seguintes, caso o volume de esgoto bruto, que chegue na estação (vazão afluente) varie muito ao longo das horas do dia. Neste caso, o esgoto é armazenado e homogeneizado no tanque de equalização, sendo bombeado com fluxo constante (vazão efluente) para a próxima etapa (VON SPERLING, 2014).

O tratamento primário pode ser opcional e neste a remoção de sólidos em suspensão ocorre no tanque de sedimentação, também conhecido como tanque de decantação. Nesta etapa, o esgoto deve fluir, vagarosamente, pelo decantador permitindo a deposição dos sólidos suspensos na parte inferior do tanque. Essa massa de sólidos é denominada lodo primário, que pode ser estabilizado em digestores convencionais ou por adição de cal (NAIDOO e OLANIRAN, 2014; VON SPERLING, 2014).

O tratamento secundário consiste, principalmente, na remoção da matéria orgânica que se encontra dissolvida ou em suspensão no esgoto, podendo reduzir, em parte, o número de patógenos (GERBA e PEPPER, 2014). A essência deste tratamento está na inclusão de uma etapa biológica, enquanto nos tratamentos preliminar e primário predominam os processos físicos. Nesta etapa, os microrganismos degradam a matéria orgânica presente no esgoto, na presença ou não de oxigênio, gerando metano (em condições de anaerobiose), gás carbônico, água e nutrientes necessários para o seu crescimento e reprodução (NAIDOO e OLANIRAN, 2014; VON SPERLING, 2014). Embora seja possível utilizar no nível secundário uma grande variedade de metodologias, os processos mais comuns são: lagoas de estabilização, reatores anaeróbios, reatores aeróbios com biofilme, disposição sobre o solo e lodos ativados (GERBA e PEPPER, 2014; VON SPERLING, 2014).

Após o tratamento secundário, podem ser empregadas etapas adicionais para reduzir, ainda mais, os níveis de compostos orgânicos, turbidez, nitrogênio, fósforo, metais e agentes patogênicos. Essas etapas constituem o tratamento terciário, raramente utilizado nos países em desenvolvimento, envolvendo processos como coagulação, filtração, adsorção de compostos orgânicos em carvão ativado, osmose reversa e desinfecção (GERBA e PEPPER, 2014; VON SPERLING, 2014). A desinfecção de esgotos sanitários não pretende a eliminação total de microrganismos, mas sim a inativação seletiva daqueles que ameaçam a saúde humana, utilizando a adição de cloro e ozônio, a incidência de radiação ultravioleta e a ultrafiltração em membranas (NAIDOO e OLANIRAN, 2014; VON SPERLING, 2014).

De acordo com a Pesquisa Nacional de Saneamento Básico desenvolvida pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), 57,1% dos municípios brasileiros utilizam processos de tratamento de esgoto secundários, enquanto apenas cerca de 9,3% destes empregam, também, o tratamento terciário (IBGE, 2010). Dentre os

processos de tratamento secundários, grande parte das estações em operação no país utilizam tecnologias de aeração, com predomínio dos sistemas de lodo ativado, lagoas aeradas e filtros biológicos (IBGE, 2010). Essas tecnologias apresentam algumas vantagens quando comparadas aos processos anaeróbios, tais como maior eficiência na remoção de nutrientes e, em alguns casos, de microrganismos patogênicos (OLIVEIRA e VON SPERLING, 2008; JAMWAL et al., 2009). Entretanto, as técnicas aeróbias requerem um grande consumo de energia, em razão da utilização de bombas difusoras de oxigênio e homogeneizadores mecânicos (VON SPERLING, 2014).

2.2.2 Subprodutos do tratamento

Vários subprodutos sólidos (material retido nas grades, areia e lodo) são produzidos ao longo do processo de tratamento, porém o lodo representa uma problemática em função do grande volume gerado durante o processo (VON SPERLING, 2014). O lodo é formado pela sedimentação dos sólidos suspensos do esgoto, acumulando matéria orgânica e uma variedade de contaminantes, principalmente, metais pesados e diversos patógenos, a maioria entéricos (GERBA e PEPPER, 2014). Todos os processos de tratamento biológico geram lodo, que recebe designações distintas ao longo das etapas do tratamento: lodo primário, produzido no decantador primário; lodo secundário ou biológico ou excedente, gerado no tanque de aeração; lodo misto, resultante da mistura de lodo primário e secundário; e lodo químico, produzido em sistemas que incorporam uma etapa físico-química no decantador primário (VON SPERLING, 2014).

De modo geral, todo lodo gerado na ETE precisa ser tratado, passando por várias etapas de processamento (Figura 1), antes de ser descartado.

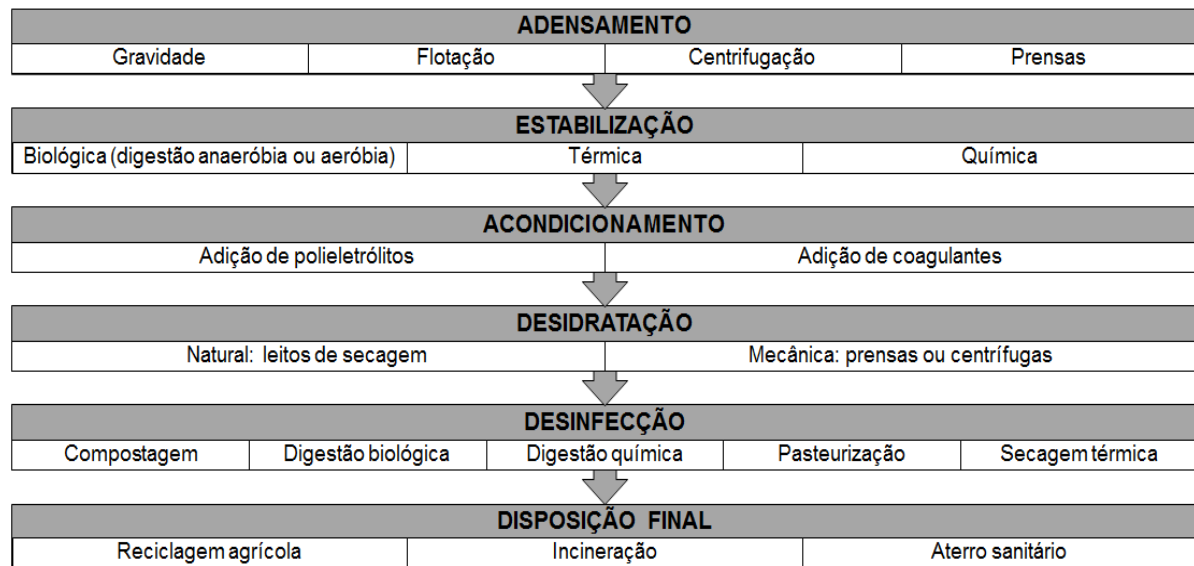


Figura 1: Etapas do gerenciamento do lodo de esgoto e os principais processos utilizados. Adaptada de VON SPERLING, 2014.

O adensamento é um processo de concentração de sólidos, necessário para a redução da umidade e do volume. A estabilização visa a redução de mau odor pela remoção de matéria orgânica biodegradável. O acondicionamento é uma etapa de preparação do lodo para facilitar a retirada de líquido. A desidratação consiste na remoção da água para reduzir mais o volume do lodo e, conseqüentemente, os custos com transporte e disposição final. A desinfecção visa a redução de patógenos a um nível compatível com lodos sanitariamente seguros e deve ser realizada em função da disposição final do lodo, sendo obrigatória para aplicações na agricultura e dispensável em casos de incineração ou disposição em aterro sanitário (VON SPERLING, 2014). No Brasil, aproximadamente, 15% do lodo gerado em ETEs são reaproveitados na agricultura, enquanto 40% são dispostos em aterros sanitários, 15% são descartados diretamente nos rios, 8% em terrenos baldios e 1% em oceanos (IBGE, 2010).

O efluente tratado é outro importante subproduto gerado na ETE, que desperta preocupações com relação à sua disposição final. No país, apenas 8,2% dos municípios utilizam o efluente tratado em atividades de irrigação, na agricultura, em serviços urbanos ou na aquicultura, enquanto 91,7% lançam este efluente nos corpos d'água (IBGE, 2010). Os efluentes oriundos de sistemas de tratamento de esgotos sanitários podem ser lançados em corpos d'água, após o devido tratamento, desde que obedeçam aos padrões de lançamento de efluentes (Quadro 1). Estes padrões

foram estabelecidos pela Resolução do Conselho Nacional do Meio Ambiente (Conama) nº 430/2011, que define valores limites para os parâmetros físico-químicos de qualidade da água (CONAMA, 2011). No estado de Minas Gerais, a legislação é determinada pela Deliberação Normativa nº 01/2008, do Conselho Estadual de Política Ambiental (Copam), em conjunto com o Conselho Estadual de Recursos Hídricos (CERH), que define limites mais rigorosos para os mesmos parâmetros (COPAM e CERH, 2008).

Além de atender a estes requisitos, o despejo de efluente tratado não deve alterar as características de qualidade do corpo d'água receptor, definidas pelas legislações federal (Resolução Conama nº 357/2005) e estadual (Deliberação Normativa Copam/CERH nº 01/2008), que dispõem sobre a classificação dos corpos d'água e as diretrizes ambientais para o seu enquadramento (Quadro 1), determinando os valores limites estabelecidos para os parâmetros microbiológicos (coliformes termotolerantes) e físico-químicos de qualidade da água (CONAMA, 2005; COPAM e CERH, 2008).

Quadro 1: Padrão de lançamento de efluentes e padrão de qualidade para corpos d'água receptores

Parâmetro	Padrão de lançamento de efluentes		Padrão de qualidade em água doce (Conama nº357/2005)			
	Conama nº430/2011	Copam/CERH nº01/2008	Classe 1	Classe 2	Classe 3	Classe 4
Coliformes termotolerantes (NMP/100mL*)	.*1	-	< 200	< 1000	< 1000 < 2500 <4000*2	-
Demanda bioquímica de oxigênio ([DBO] mg/L*3)	< 120	< 60*4	< 3	< 5	< 10	-
Demanda química de oxigênio ([DQO] mg/L)	-	< 180*5	-	-	-	-
Óleos e graxas (mg/L)	< 100	< 20 / < 50*6	VA*7	VA	VA	VA
pH	5 a 9	6 a 9	6 a 9	6 a 9	6 a 9	6 a 9
Sólidos sedimentáveis ([SS] mL/L)	< 1	< 1	-	-	-	-
Sólidos suspensos totais ([SST] mg/L)	-	< 100	-	-	-	-

* NMP/100mL: número mais que provável/100 mililitros; *1 -: Sem limite determinado pela legislação; *2 Limites para dessedimentação, recreação e demais usos; *3 mg/L: miligramas/litro; *4 Ou tratamento com eficiência de redução de DBO > 60% e média anual > 70%; *5 Ou tratamento com eficiência de redução de DQO > 55% e média anual > 65% para sistemas de esgotos sanitários; *6 Limites para óleos minerais / óleos vegetais e gorduras animais; *7 VA: virtualmente ausentes. Adaptado de CONAMA, 2005; COPAM e CERH, 2008 e CONAMA, 2011.

2.2.3 Avaliação do desempenho do processo

O desempenho do processo de tratamento de esgoto pode ser avaliado tanto em relação à remoção de sólidos e de matéria orgânica, quanto em relação à redução de patógenos, respectivamente, pela análise dos parâmetros físico-químicos e microbiológico, no efluente tratado (VON SPERLING, 2014).

Os sólidos sedimentáveis (SS) e os sólidos suspensos totais (SST) são amplamente utilizados para avaliar a remoção de sólidos, de tal modo que, quanto maior a eficiência do tratamento, menor deve ser o valor destes parâmetros no efluente tratado, quando comparado ao esgoto bruto (VON SPERLING, 2014). Com relação à determinação de matéria orgânica, métodos indiretos são frequentemente utilizados, como a demanda bioquímica de oxigênio (DBO) e a demanda química de oxigênio (DQO). A DBO reflete a quantidade de oxigênio necessária para estabilizar a matéria orgânica biodegradável por processos bioquímicos, realizados por microrganismos. Enquanto, a DQO corresponde à oxidação química da matéria orgânica (fração inerte e biodegradável), que ocorre em meio ácido, sob ação de um oxidante forte, como o dicromato de potássio (VON SPERLING, 2014). A relação DQO/DBO varia ao longo do processo de tratamento, sendo utilizada para avaliar a eficiência do mesmo. No esgoto bruto, a fração biodegradável é muito elevada, resultando em valores de relação DQO/DBO menores que 2,5. Essa relação tende a aumentar com o tratamento, uma vez que o mesmo reduz a fração biodegradável, mas não altera a fração inerte da matéria orgânica. Assim, quanto maior for a eficiência do tratamento na remoção de matéria orgânica biodegradável, maior será essa relação no efluente tratado, podendo variar de 2,5 a 5,0 (VON SPERLING, 2014). A presença de matéria orgânica também é avaliada pelos níveis de óleos e graxas, que são substâncias orgânicas de origem mineral, vegetal ou animal, oriundas de resíduos industriais e domésticos. A concentração destes compostos está diretamente relacionada com os valores de DBO e DQO, pois o seu processo de decomposição exige um grande consumo de oxigênio dissolvido (ORSSATTO et al., 2010).

A contagem de coliformes termotolerantes, por sua vez, é utilizada como indicador da eficiência de remoção de patógenos no tratamento de esgoto e pode variar bastante entre os processos utilizados (Quadro 2). Assim, os processos que atingem eficiência de remoção de 99,9% podem assegurar uma redução de

aproximadamente duas unidades logarítmicas na contagem de coliformes termotolerantes. Cabe salientar, ainda, que apesar de ser amplamente utilizado como marcador microbiológico de contaminação fecal, os coliformes termotolerantes têm sido considerados como uma ferramenta inadequada para indicar a presença de outros patógenos (FONG e LIPP, 2005).

Quadro 2: Taxas de eficiência de remoção de coliformes termotolerantes observadas nos principais sistemas de tratamento de esgoto.

Tipo de tratamento	Eficiência na remoção de coliformes termotolerantes (%)
Lagoas de estabilização	80,0 – 99,9
Lodos ativados	85,0 - 99,9
Reatores aeróbios	70,0 – 90,0
Reatores anaeróbios	70,0 – 90,0
Disposição controlada no solo	> 99,0

Adaptado de VON SPERLING, 2014.

2.3 Doença diarreica aguda e disseminação de vírus em matrizes aquáticas

O despejo de esgoto em corpos de água superficiais pode contribuir diretamente para a introdução dos patógenos entéricos nos ambientes aquáticos, contaminando os corpos d'água receptores. Tal situação representa uma ameaça frente ao uso recreativo deste manancial ou até mesmo para fins de cultivo de moluscos bivalves (ostras e mexilhões) e de produtos agrícolas, contribuindo para a disseminação de patógenos veiculados pela água, que podem causar a DDA (CARTER, 2005; RUGGERI e FIORE, 2012). Em todo o mundo, a DDA destaca-se no grupo das doenças mais comuns, estando associada à mortalidade infantil, principalmente, nos países em desenvolvimento (OMS e UNICEF, 2015).

No Brasil, os esforços empreendidos pelo governo reduziram a taxa de mortalidade associada à DDA em menores de cinco anos, de 10,8% para 2,1%, no período de 1990 a 2010. Entretanto, nas cinco regiões geográficas foram observadas variações significativas nas taxas de prevalência da doença, com os índices mais elevados registrados nas regiões Norte e Nordeste (BRASIL, 2016). É importante, no entanto, considerar que estes índices podem ser maiores, devido aos casos não

notificados da doença, que ocorrem, sobretudo, em localidades onde o acesso aos serviços básicos de saúde é menor.

Os vírus entéricos são os principais causadores desta doença, destacando-se entre eles os RVA e os HAdV-F. Ambos são transmitidos pela via fecal oral, replicados no trato gastrointestinal do hospedeiro e eliminados em número muito elevado nas fezes de indivíduos infectados, sintomáticos e assintomáticos (FONG e LIPP, 2005; RUGGERI e FIORE, 2012). Segundo Hass e colaboradores (1993), a chance de se estabelecer uma infecção, pela ingestão de água contaminada com vírus entéricos, chega a ser até dez mil vezes maior do que a exposição similar com bactérias patogênicas. Em adição, no ambiente estes agentes podem resistir a uma ampla variação de pH (pH 3 a 10) e a extensos períodos a baixas temperaturas, podendo permanecer infectantes por até 130 dias em água do mar, 120 dias em água doce e esgoto e 100 dias em solo (FONG e LIPP, 2005).

Sabe-se que processos físicos utilizados no tratamento de esgoto podem reduzir a carga viral em cerca de 90-99%, por meio da remoção das partículas virais adsorvidas às superfícies de sólidos em suspensão (UEDA e HORAN, 2004; TEMPLETON et al., 2008), além de uma remoção adicional, obtida por processos de desinfecção (MEZZANOTTE et al., 2007). No entanto, diversos autores já demonstraram que os vírus de disseminação entérica podem resistir a tais processos, sofrendo apenas uma pequena redução de sua carga (BOFILL-MAS et al., 2006; VILLAR et al., 2007; CARDUCCI et al., 2008; KATAYAMA et al., 2008; PETRINCA et al., 2009; RODRÍGUEZ-DIAZ et al., 2009; VICTORIA et al., 2009; FUMIAN et al., 2010).

Outra situação preocupante é a disposição de lodo de esgoto no solo, seja em culturas aráveis, pastagens, florestas, parques, gramados ou jardins de casas, que também pode criar um potencial para a exposição humana aos patógenos, caso este subproduto do esgoto não seja adequadamente tratado (SINGH e AGRAWAL, 2008). Esta exposição pode ocorrer por contato direto, que inclui o manuseio do lodo e/ou do solo onde o resíduo foi aplicado, bem como a contaminação por aerossóis, durante a aplicação. O contato indireto pode acontecer pelo consumo de alimentos contaminados cultivados em solos fertilizados com o lodo ou provenientes de animais que pastaram nestas terras; pela ingestão de água contaminada por infiltração de patógenos ou pelo arraste da água de chuva em locais próximos da aplicação do lodo (SIDHU e TOZE, 2009).

Diante do exposto, mesmo que o tratamento de esgoto e do lodo seja realizado, existe a possibilidade de os vírus entéricos resistirem nestas matrizes que serão devolvidas ao ambiente, seja no corpo hídrico receptor ou no solo (CARTER, 2005; RODRÍGUEZ-DIAZ et al., 2009). A situação torna-se mais crítica, pelo fato da qualidade microbiológica da água ser determinada, exclusivamente, pela contagem de coliformes termotolerantes, considerados inadequados para indicar a presença de vírus entéricos na água. Diversos trabalhos demonstraram ausência de associação entre contaminação bacteriana e viral, de modo que águas não submetidas a tratamento sanitário ou submetidas a tratamento ineficiente podem conter vírus, apesar de serem consideradas próprias, de acordo com os parâmetros bacterianos, atualmente utilizados (SKRABER et al., 2004; JIANG, 2006; ROSE et al., 2006; VILLAR et al., 2007; MIAGOSTOVICH et al., 2008; ESPINOSA et al., 2009; FERGUSON et al., 2012; MORESCO et al., 2012; VIEIRA et al., 2012, 2016). Tal fato tem sugerido a necessidade de se utilizar novos parâmetros de qualidade, que sejam mais adequados para avaliar a contaminação viral em matrizes aquáticas (BOFILL-MAS et al., 2006; ALBINANA-GIMENEZ et al., 2009).

Pesquisas de detecção de vírus entéricos em diferentes matrizes aquáticas têm sido impulsionadas, considerando-se o uso da água para diversas finalidades e o envolvimento dos vírus entéricos em surtos de DDA veiculados pela mesma (CHO et al., 2014; MELLOU et al., 2014; BRAEYE et al., 2015). Tais estudos demonstraram a importância de avaliar a qualidade da água não apenas com base em parâmetros bacteriológicos, apontando a necessidade da inclusão de parâmetros virológicos (ALBINANA-GIMENEZ et al., 2009).

No Brasil, estudos de monitoramento de vírus entéricos já foram realizados em efluentes bruto e/ou tratado, provenientes de processos de tratamento aeróbio e anaeróbio, para avaliar a remoção dos vírus da hepatite A, astrovírus, HAdV, RVA e norovírus, tendo sido demonstrado que os mesmos resistem ao processo de tratamento (VILLAR et al., 2007; GUIMARÃES et al., 2008; FERREIRA et al., 2009; VICTORIA et al., 2010; RIGOTTO et al., 2010; SCHLINDWEIN et al., 2010; FUMIAN et al., 2010, 2011; 2013; PRADO et al., 2011, 2012). Por outro lado, existe uma grande dificuldade de pesquisar a presença destes vírus em lodo de esgoto, em função da complexidade desta matriz.

2.4 Considerações gerais sobre os adenovírus

Os HAdV pertencem a família *Adenoviridae*, gênero *Mastadenovirus*, sendo classificados em espécies e tipos (Quadro 3), com base em suas propriedades biológicas e na sequência do genoma (BERK, 2013).

Quadro 3: Esquema de classificação dos adenovírus humanos.

Espécie	Grupos de hemaglutinação	Tipos	Potencial oncogênico		Doença associada
			Tumor em animais	Transformação em cultura	
HAdV-A	IV	12, 18,31	Alto	Positivo	Infecção entérica oculta
HAdV-B	I	3, 7, 11, 14, 16, 21, 34-35, 50, 55	Moderado	Positivo	Conjuntivite Doença respiratória aguda Cistite hemorrágica Sistema nervoso central
HAdV-C	II	1-2, 5-6, 57	Baixo ou nulo	Positivo	Sintomas respiratórios
HAdV-D	III	8-10, 13, 15, 17, 19-20, 22-30, 32-33, 36-39, 42-49, 51, 53-54, 56, 58-60	Baixo ou nulo	Positivo	Ceratoconjuntivite em imunocomprometidos
HAdV-E	III	4	Baixo ou nulo	Positivo	Conjuntivite Doença respiratória aguda
HAdV-F	III	40, 41	-	Negativo	Gastroenterite
HAdV-G	-	52	-	-	Gastroenterite

Adaptado de BERK, 2013 e ROBINSON et al., 2013.

As partículas virais não possuem envelope, medem cerca de 90 nanômetros (nm) de diâmetro e são compostas por 12 proteínas, das quais sete formam o capsídeo (polipeptídeos II, III, IV, VI, VIII, IIIa e IX) e cinco compõem o cerne viral (polipeptídeos V, VII, μ , TP [proteína terminal] e p23) (BERK, 2013). O capsídeo de simetria icosaédrica é constituído por 252 capsômeros, dos quais 240 hexons formam as faces do icosaedro e 12 pentons formam os vértices (Figura 2). O genoma viral é

envolvido pelo capsídeo, sendo constituído de uma fita dupla de DNA (do inglês *deoxyribonucleic acid*) (BERK, 2013).

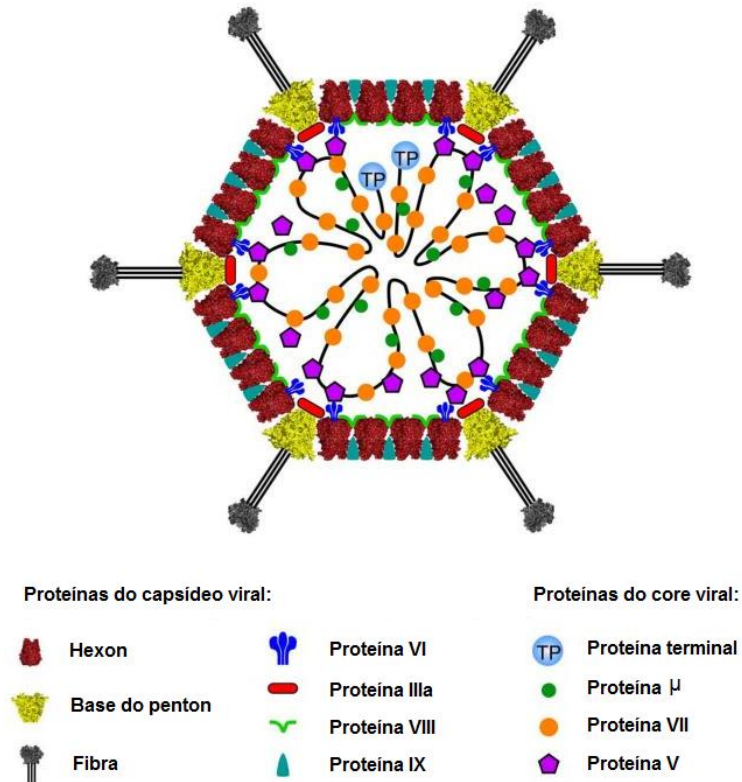


Figura 2: Diagrama esquemático da partícula de adenovírus humano. Adaptada de NEMEROW et al., 2009.

Os tipos de HAdV podem diferir em seu tropismo e patogenicidade, podendo infectar e ser replicados em células epiteliais do trato respiratório (superior e inferior), gastrointestinal, conjuntivas e, com menor frequência, trato urinário e fígado (BERK, 2013). O ciclo de replicação (Figura 3) começa com a adsorção da partícula viral à célula epitelial, que ocorre através da ligação da fibra às integrinas da superfície celular, com consequente internalização via endocitose mediada por receptor. O processo de desencapsidação inicia-se após a endocitose. A alteração do pH dentro do endossoma provoca alterações conformacionais no penton, que expõe regiões hidrofóbicas, provocando a lise do endossoma e a liberação de seu conteúdo no citoplasma celular. O genoma viral migra até o núcleo, onde entra através dos poros e é convertido em um complexo DNA viral-histonas celulares (BERK, 2013).

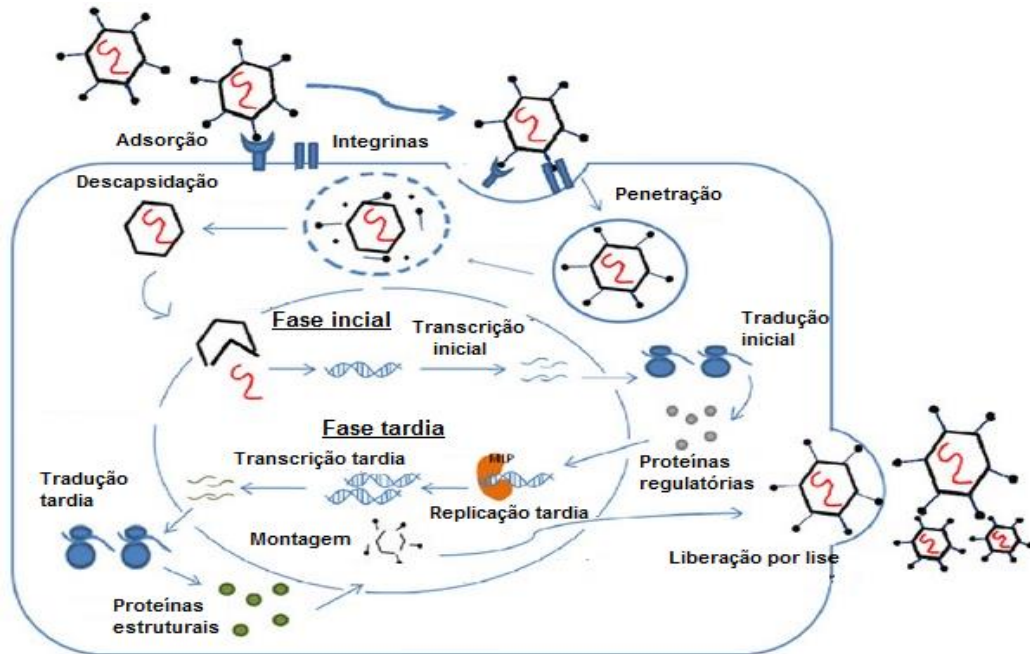


Figura 3: Representação esquemática do ciclo de replicação dos adenovírus humanos. Adaptada de WAYE e SING, 2010.

A replicação do DNA viral e a montagem da partícula ocorrem no núcleo da célula. Entretanto, a etapa inicial da morfogênese se dá no citoplasma, onde os polipeptídeos recém-sintetizados reúnem-se em capsômeros, formando os hexons e os pentons. No núcleo, os capsômeros reúnem-se em capsídeos vazios, no quais o DNA desnudo penetra. As proteínas precursoras do cerne são clivadas, formando as partículas maduras que se acumulam no núcleo. Este acúmulo promove uma desestruturação do citoesqueleto, que altera a morfologia celular (a célula torna-se redonda), tornando a célula mais susceptível a lise, com consequente liberação das partículas virais (BERK, 2013).

As lesões produzidas pela lise dos enterócitos infectados provocam atrofia das microvilosidades intestinais e hiperplasia compensatória das criptas, com consequente má absorção e perda de líquido, caracterizando a diarreia. Além disso, vômitos, febre e sintomas respiratórios são manifestados em mais de 20% das crianças. A doença apresenta um período de incubação de três a dez dias e duração de mais de uma semana (WILHELM et al., 2003; BERK, 2013).

Os HAdV das espécies F (tipos 40 e 41) e G (tipo 52) são de transmissão fecal oral e a quantidade abundante destes vírus nas fezes diarreicas (cerca de 10^{11} partículas/grama de fezes), sugere uma intensa replicação no trato gastrointestinal (JONES et al., 2007; BERK, 2013). A caracterização molecular dos HAdV é crucial

para definir as espécies que causam diarreia, uma vez que alguns tipos não-entéricos podem ser excretados nas fezes, intermitentemente, após uma infecção anterior (BERK, 2013). Os HAdV tipos 40 e 41 estão associados a casos esporádicos e surtos de DDA, acometendo, principalmente, crianças nos seus primeiros anos de vida (BERK, 2013; MOYO et al., 2014). Estes vírus são responsáveis por até 20% dos casos de doença em todo o mundo, tendo sido detectados em pacientes internados e não internados, confirmando o importante papel epidemiológico desses patógenos (FILHO et al., 2007; LENNON et al., 2007; MAGALHÃES et al., 2007; VERMA et al., 2009; FREITAS et al., 2010; DEY et al., 2011; KOTLOFF et al., 2013). O HAdV tipo 52 também foi associado a casos de gastroenterite, após o isolamento deste vírus em amostras fecais obtidas durante um surto, que ocorreu na cidade de Los Angeles nos Estados Unidos da América (EUA) em 2003 (JONES et al., 2007).

O HAdV tipo 12 é um vírus não entérico, pertencente a espécie A, que foi associado pela primeira vez a um surto de gastroenterite no Brasil, ocorrido no Rio de Janeiro durante o ano de 2013 (PORTES et al., 2016). As elevadas cargas virais de HAdV tipo 12 detectadas neste estudo ($>10^6$ cópias de genoma/gramas de fezes) sugerem a replicação destes vírus no intestino (PORTES et al., 2016) e corroboram relato anterior que implica o HAdV tipo 12 como um provável agente etiológico da gastroenterite (AKIHARA et al., 2005).

Em 1998, a agência de proteção ambiental dos Estados Unidos da América incluiu os HAdV em uma lista de “contaminantes candidatos”, que devem ser considerados para garantir a segurança da água potável, por causa das suas implicações na saúde pública (FONG e LIPP, 2005). Estudos ambientais apontaram estes vírus como um provável marcador de contaminação fecal humana em ambientes aquáticos, em função de sua ampla disseminação ao longo do ano, sem perfil de sazonalidade; estabilidade em esgoto doméstico e amostras ambientais; e resistência aos processos de tratamento de água e esgoto (PUSCH et al, 2005; BOFFIL-MAS et al, 2006; ALBINANA-GIMENEZ et al., 2009; OKOH et al., 2010). A capacidade dos HAdV de permanecerem viáveis em ambientes aquáticos por meses está associada à sua estabilidade frente a condições adversas de pH e temperatura (MENA e GERBA, 2009; SAUERBREI e WUTZLER, 2009), além de sua resistência à ação de compostos químicos e físicos, tais como o cloro e a radiação ultravioleta (THURSTON-ENRIQUEZ et al., 2003a,b).

2.5 Considerações gerais sobre os rotavírus

Os RV pertencem a família *Reoviridae*, subfamília *Sedoreovirinae*, gênero *Rotavirus*. As partículas viriais não envelopadas medem cerca de 100 nm, incluindo as projeções proteicas. Na microscopia eletrônica, as partículas apresentam três camadas proteicas concêntricas que lhe conferem aspecto de roda de carroça, origem do nome dado ao vírus (MATTHEWS, 1979; ESTES e GREENBERG, 2013).

A camada externa é formada pelas proteínas estruturais (do inglês *virion protein* – VP) VP7 e VP4, enquanto a camada intermediária é constituída pela proteína VP6. A camada interna, também conhecida como cerne, é constituída por uma camada de proteína VP2 que envolve o genoma viral, ao qual estão associadas as proteínas VP1 e VP3 (ESTES e GREENBERG, 2013). O genoma viral é constituído por 11 segmentos de RNA (do inglês *ribonucleic acid*) de fita dupla (Figura 4), que são responsáveis pela codificação de seis proteínas estruturais (VP1-VP4, VP6 e VP7) e seis proteínas não estruturais (do inglês *non structural protein* – NSP1 a 6) do vírus (Quadro 4).

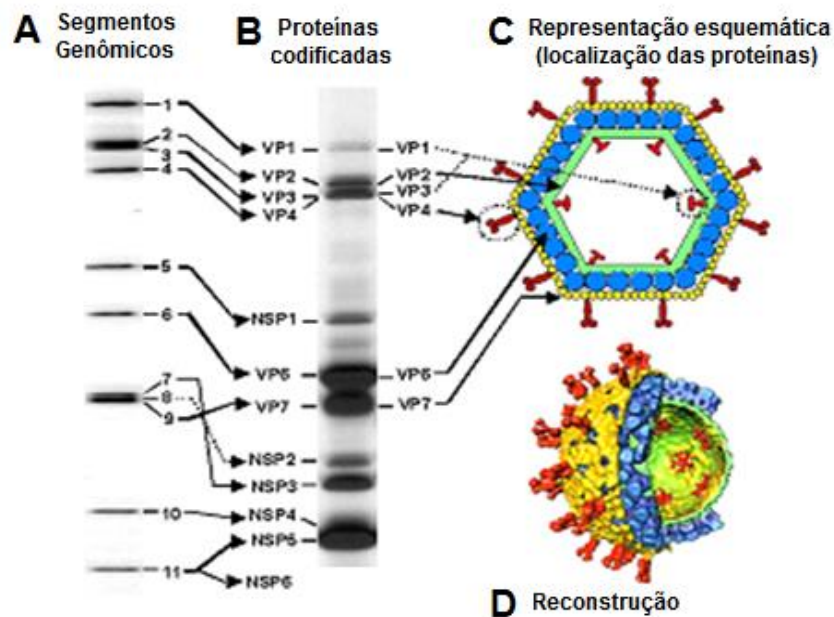


Figura 4: Organização do genoma e da partícula de rotavírus. **(A)** Representação esquemática dos 11 segmentos genômicos dos RV visualizados em gel de poliacrilamida após eletroforese. **(B)** Proteínas virais estruturais e não estruturais. **(C)** Localização das proteínas estruturais na partícula viral. **(D)** Reconstrução da partícula viral em três dimensões. Adaptada de ANDRADE-GOES, 2005.

Quadro 4: Descrição dos segmentos genômicos dos rotavírus e das proteínas estruturais e não estruturais codificadas pelos mesmos.

Segmento de RNA (número de pares de base)	Proteínas virais codificadas			
	Designação (número de aminoácidos)	Localização na partícula viral	Número de cópias por <i>virion</i>	Propriedades e funções
1 (3302)	VP1 (1088)	Cerne	12	RNA polimerase dependente de RNA.
2 (2690)	VP2 (881)	Cerne	120	Necessária para atividade de VP1 e formação do cerne viral.
3 (2591)	VP3 (835)	Cerne	12	Forma um complexo com VP1 e atua como guaniltransferase e metiltransferase.
4 (2362)	VP4 (776) VP5* (529) VP8* (247)	Capsídeo externo	120 (60 dímeros)	Hemaglutinina (adesão celular), clivada em VP5* e VP8* por ação de proteases (tripsina); apresenta propriedades antigênicas.
5 (1611)	NSP1 (495)	Não estrutural	----	Apresenta atividade de ligação ao RNA, mas não é essencial em algumas linhagens.
6 (1356)	VP6 (397)	Capsídeo interno	780 (260 trimeros)	Proteína hidrofóbica e imunogênica que contém os antígenos de grupo e subgrupo; representa 50-60% da massa viral.
7 (1105)	NSP3 ¹ (315)	Não estrutural	----	Intensifica a síntese de proteínas virais e inibe a tradução de proteínas da célula hospedeira.
8 (1059)	NSP2 ¹ (317)	Não estrutural	----	Apresenta atividade de ligação ao RNA viral, atua como helicase e forma o viroplasma com NSP5.
9 (1062)	VP7 ¹ (326)	Capsídeo externo	780 (260 trimeros)	Glicoproteína integrada à membrana do RER, dependente de cálcio e altamente imunogênica.
10 (751)	NSP4 (175)	Não estrutural	----	Glicoproteína integrada à membrana do RER que atua como receptora intracelular da partícula viral; modula o cálcio intracelular; atua na morfogênese e como enterotoxina viral.
11 (667)	NSP5 (198)	Não estrutural	----	Atua como fosfoquinase, forma o viroplasma com NSP2 e interage com VP2 e NSP6.
	NSP6 (92)	Não estrutural	----	Constitui o viroplasma e interage com NSP5.

Siglas: VP: proteína estrutural; NSP: proteína não estrutural; RER: Retículo endoplasmático rugoso. * O asterisco é utilizado para identificar as proteínas resultantes da clivagem de VP4 (VP5* e VP8*). ¹ Pode ser codificada pelos segmentos 7, 8 ou 9 dependendo da amostra viral. Adaptado de ESTES e GREENBERG, 2013.

De acordo com as características antigênicas da proteína VP6, os RV são classificados em sete grupos, designados de A a G. Recentemente, com base em análises filogenéticas do gene que codifica a proteína VP6, uma nova espécie de RV tem sido proposta e denominada como grupo H (MATTHIJNSSENS et al., 2012; KINDLER et al., 2013). Os RV do grupo A (RVA) são os de maior importância epidemiológica, tendo sido claramente estabelecidos como causadores de doença diarreica em crianças e indivíduos jovens, de várias espécies de mamíferos e aves (WILHELMI et al., 2003).

A classificação genotípica dos RVA tem sido realizada por um sistema binário, baseada na determinação dos genótipos G (gene que codifica a glicoproteína VP7) e P (gene que codifica a proteína VP4, que é sensível à protease). Em 2008, um grupo de pesquisadores propôs um sistema completo de classificação destes vírus, tendo como base as propriedades moleculares de seus 11 segmentos de RNA. Este novo sistema baseou-se na caracterização molecular e análise filogenética do genoma completo de 53 protótipos do vírus. Os diferentes genótipos descritos para cada um dos segmentos são divididos segundo valores de *cut-off* específicos de identidade nucleotídica, para cada um destes genes (Quadro 5). Assim, foi determinada a nova designação dos genótipos, que passa a ser descrita da seguinte forma: Gx-P[x]-Ix-Rx-Cx-Mx-Ax-Nx-Tx-Ex-Hx, onde cada letra simboliza, respectivamente, os genes responsáveis pela codificação das proteínas VP7-VP4-VP6-VP1-VP2-VP3-NSP1-NSP2-NSP3-NSP4-NSP5/6 e o x, um número arábico iniciando em 1 (MATTHIJNSSENS et al., 2008a,b).

Os RV apresentam um tropismo natural para as células epiteliais maduras das microvilosidades intestinais, nas quais ocorre a replicação viral. O passo inicial do ciclo (Figura 5) consiste na ligação da partícula viral à superfície da célula hospedeira, através da interação de VP4 e VP7 com receptores celulares (ARIAS et al., 2004; DESSELBERGER et al., 2009; ESTES e GREENBERG, 2013). A penetração pode ocorrer diretamente através da membrana ou por endocitose mediada por receptores. As partículas infecciosas sofrem desnudamento, pela ação de enzimas celulares e baixa concentração de cálcio, perdendo as duas proteínas do capsídeo externo (ARIAS et al., 2004; DESSELBERGER et al., 2009; GREENBERG e ESTES, 2009; ESTES e GREENBERG, 2013).

Quadro 5: Valores de *cut-off* de porcentagem de identidade nucleotídica que definem os diferentes genótipos de rotavírus do grupo A.

Gene	Proteína codificada	Valores de <i>cut-off</i> de identidade nucleotídica (%)	Designação dos nomes de genótipos	Genótipos
1	VP1	83	RNA polimerase - RNA dependente (R)	9
2	VP2	84	Proteína do cerne (C)	9
3	VP3	81	Metiltransferase (M)	8
4	VP4	80	Sensível à protease (P)	35
5	NSP1	79	Antagonista do Interferon (A)	16
6	VP6	85	Capsídeo interno (I)	16
7, 8 ou 9	NSP3	85	Intensificador de tradução (T)	12
	NSP2	85	NTPase (N)	9
	VP7	80	Glicoproteína (G)	27
10	NSP4	85	Enterotoxina (E)	14
11	NSP5	91	Fosfoproteína (<i>pHosphoprotein</i>) (H)	11

Adaptado de MATTHIJNSSENS et al., 2008a,b e ESTES e GREENBERG, 2013.

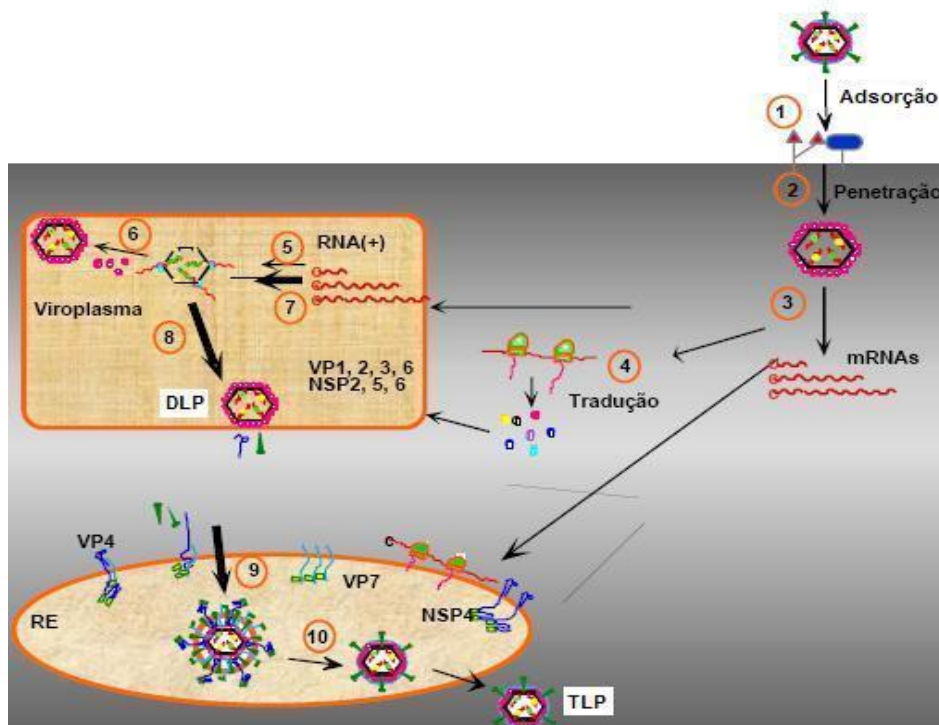


Figura 5: Representação esquemática do ciclo de replicação dos rotavírus. Etapas: (1) Adsorção do vírus à superfície celular; (2) Penetração e desnudamento da partícula viral, produzindo partículas de dupla camada (do inglês *Double Layered Particles* - DLPs); (3) Transcrição primária (RNA⁺); (4) Síntese das proteínas virais; (5) Síntese primária de RNA; (6) Montagem da partícula viral; (7) Síntese secundária de RNA; (8) Montagem das DLPs; (9) Brotamento da DLP na membrana do retículo endoplasmático (RE); (10) Perda do envoltório transitório, gerando partículas de tripla camada (do inglês *Triple Layered Particles* - TLPs). Adaptada de MASCARENHAS, 2006.

A replicação ocorre totalmente no citoplasma da célula e se inicia com a RNA polimerase dependente de RNA (VP1) em conjunto com VP3, transcrevendo fitas de RNA de polaridade positiva (RNA⁺) a partir de todos os 11 segmentos genômicos virais. Parte destas moléculas de RNA⁺ funcionam como RNA mensageiro viral, sendo traduzidas em proteínas estruturais e não estruturais (DESSELBERGER et al., 2009; ESTES e GREENBERG, 2013).

A maioria das proteínas virais são sintetizadas em ribossomos livres e se acumulam no citoplasma, à exceção de VP7 e NSP4, que são sintetizadas em ribossomos ligados ao retículo endoplasmático rugoso, onde são glicosiladas e a seguir inseridas em sua membrana (COSTA et al., 2005; DESSELBERGER et al., 2009; ESTES e GREENBERG, 2013). Cerca de três horas após o início da infecção formam-se inclusões citoplasmáticas denominadas viroplasmas, que são essenciais para a replicação, o empacotamento do genoma e as etapas iniciais de morfogênese do vírus (DESSELBERGER et al., 2009; ESTES e GREENBERG, 2013). Partículas de dupla camada emergem dos viroplasmas e brotam para dentro do retículo endoplasmático (RE), adquirindo um envelope transitório, que contém NSP4, VP4 e VP7 (ARIAS et al., 2004; ESTES e GREENBERG, 2013).

O brotamento é mediado pela NSP4, que atua como receptor da VP6, presente na partícula viral. À medida que as partículas se movem em direção ao interior do RE, o envelope vai sendo substituído por uma fina camada de proteína que constitui o capsídeo externo, formando a partícula viral completa e infecciosa (DESSELBERGER et al., 2009; ESTES e GREENBERG, 2013). Estudos mostraram que em células não polarizadas, o ciclo termina quando a progênie viral é liberada por lise da célula hospedeira. Nas células epiteliais polarizadas, os vírus induzem a apoptose e desestabilizam a membrana, sendo liberados da célula antes dos efeitos citopáticos (ECP) se tornarem evidentes. Finalmente, as partículas virais liberadas infectam outros enterócitos, reiniciando o ciclo (DESSELBERGER et al., 2009; ESTES e GREENBERG, 2013).

A lise das células infectadas causa a atrofia das vilosidades intestinais, desencadeando uma repopulação compensatória com células secretoras imaturas. Deste modo, ocorre um desequilíbrio entre os processos de absorção (comprometida pela destruição de enterócitos maduros) e secreção (aumentada pela proliferação de células da crista). Simultaneamente, a permeabilidade intestinal a macromoléculas como a lactose é reduzida, o que aumenta a osmolaridade intestinal e as perdas

líquidas, resultando na diarreia osmótica. Também ocorrem alterações vasculares que levam à isquemia das microvilosidades e alterações inflamatórias na mucosa intestinal (WILHELMI et al., 2003; COSTA et al., 2005).

Outro mecanismo de indução de diarreia é desencadeado pela proteína NSP4, que sofre transformações, adquirindo funções intracelulares (iNSP4) e extracelulares (eNSP4) (DESSELBERGER et al., 2009; HYSER e ESTES, 2009; ESTES e GREENBERG, 2013). Na célula infectada, a iNSP4 (Figura 6A) apresenta atividades fundamentais para a replicação viral, atuando no aumento do cálcio intracelular e facilitando a montagem da partícula. O mecanismo de alteração da homeostase do cálcio é desconhecido, mas acredita-se que a iNSP4 promova um aumento da permeabilidade da membrana plasmática por induzir a formação de canais de cálcio. Por outro lado, a montagem das partículas é facilitada à medida que a iNSP4 presente na membrana do RE se liga à proteína VP6 das partículas imaturas, facilitando o seu brotamento (HYSER e ESTES, 2009).

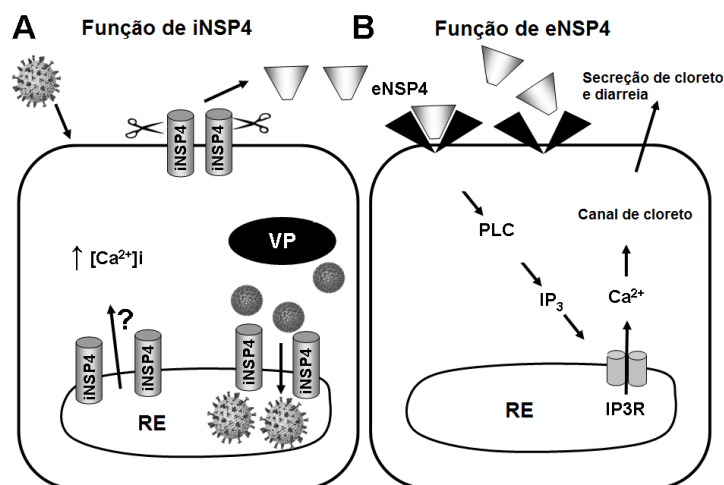


Figura 6: Funções da proteína não estrutural 4 (NSP4): intracelular (A) e extracelular (B). Adaptada de HYSER e ESTES, 2009.

Quando a iNSP4 atravessa a membrana plasmática da célula infectada, ela é clivada por ação de proteases, gerando a eNSP4 (Figura 6B), que possui atividade de enterotoxina. Esta por sua vez, liga-se a receptores celulares e inicia uma cascata de sinalização em células não infectadas. Esta sinalização ativa a fosfolipase C, culminando com a liberação de cálcio do RE e consequente aumento do seu nível

intracelular, perturbando o equilíbrio eletrolítico da célula (DESSELBERGER et al., 2009; HYSER e ESTES, 2009; ESTES e GREENBERG, 2013). Se a eNSP4 atuar no enterócito, um dos efeitos é a ruptura da junção celular resultando em permeabilidade paracelular, ou seja, entre as células. Por outro lado, se a eNSP4 atuar nas células da crista, ocorre um aumento nos níveis de cálcio mediado por um transportador de cloreto, aumentando a secreção em um processo chamado de diarreia secretória (DESSELBERGER et al., 2009; HYSER e ESTES, 2009; ESTES e GREENBERG, 2013).

A dose infectante necessária para estabelecer a infecção por RVA é de apenas dez partículas viáveis, o que demonstra sua elevada infecciosidade, principalmente quando se considera que estes vírus são transmitidos pela via fecal-oral, sendo excretados em concentrações elevadas nas fezes (10^9 a 10^{10} partículas/grama) (CARTER, 2005; COSTA et al., 2005). A gastroenterite causada pelos RVA inicia, abruptamente, após um período de incubação de 2 a 4 dias, com um quadro clínico clássico: vômito, febre, dor abdominal e diarreia, que podem se manifestar juntos ou isolados e podem desencadear rapidamente a desidratação (COSTA et al., 2005; DESSELBERGER et al., 2009).

Os RVA são responsáveis por altas taxas de hospitalização e procura por cuidados clínicos, principalmente, considerando as infecções que acometem crianças menores de cinco anos (ESTES e GREENBERG, 2013; GURGEL et al., 2014). Na América Latina, na era pré-vacinal, estimava-se que 10 milhões de casos de DDA, 75 mil hospitalizações e 15 mil mortes, por ano, poderiam ser atribuídas à rotavirose (OPAS, 2007). No Brasil, a situação não era diferente e a infecção por RVA era uma importante causa de morbidade e mortalidade na população infantil, com ocorrência de cerca de 850 mortes anuais relacionadas com esse agente (SARTORI et al., 2008).

Nos países de clima temperado, os RVA exibem um padrão sazonal de infecção, apresentando picos epidêmicos nos meses mais frios do ano (DESSELBERGER et al., 2009). Por outro lado, nos países tropicais, a infecção ocorre durante todo o ano, com tendências sazonais em algumas regiões (ESTES e GREENBERG, 2013; DESSELBERGER et al., 2009). No Brasil, a distribuição sazonal da DDA por RVA apresentava um nítido perfil sazonal na região sudeste, com expressiva ocorrência das infecções no período mais frio e seco do ano (maio a setembro) (ROSA E SILVA et al., 2001; ARAUJO et al., 2002; ROSA E SILVA et al., 2002; CARVALHO-COSTA et al., 2006).

A constatação de epidemias anuais nos países desenvolvidos mostrou que a adoção de medidas higiênicas clássicas não seria suficiente para o controle da infecção, apontando para a necessidade de desenvolvimento de uma vacina eficaz contra os RVA (MASCARENHAS, 2006; ANDREASI, 2008; ESTES e GREENBERG, 2013). A vacina monovalente, produzida a partir do vírus humano G1P[8] atenuado, amostra RIX4414 (Rotarix® - GlaxoSmithKline, Rixensart, Belgium) foi licenciada no Brasil pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária em 2005, estando disponível inicialmente em clínicas pediátricas privadas. Somente em março de 2006, a vacina oral de RV humano foi incluída no Programa Nacional de Imunização, estando a partir de então disponível no Sistema Único de Saúde (BRASIL, 2005).

Desde a implantação dessa vacina, vários estudos foram realizados para avaliar o seu impacto, tendo sido demonstrado um declínio considerável da taxa de mortalidade e do número de internações por diarreia (LANZIERI et al., 2011; DESAI et al., 2011; DO CARMO et al., 2011). Em adição, as pesquisas de monitoramento desenvolvidas nos períodos pré e pós-vacinação apontaram reduções significativas da taxa de detecção de RVA (CARVALHO-COSTA et al.; 2009; MORILLO et al., 2010; DULGHEROFF et al., 2012; 2014). Um estudo realizado no município de Juiz de Fora corroborou a queda na prevalência de RVA no período 2007-2011, principalmente na faixa etária de 0 a 36 meses, bem como uma redução na circulação de genótipos não-G2 no município, após a implantação da vacina (ASSIS et al., 2013). Apesar da redução acima relatada, os RVA tem sido detectados em estudos clínicos (ASSIS et al., 2013; DULGHEROFF et al., 2012, 2014; GLASS et al., 2014) e ambientais (FERREIRA et al., 2009; VIEIRA et al., 2012; FUMIAN et al., 2013; ASSIS et al., 2015), mostrando que eles continuam circulando na população.

A detecção de RVA em matrizes aquáticas pode estar associada à sua resistência aos fatores ambientais e aos diversos processos físico-químicos empregados no tratamento de água e esgoto (MEHNERT et al., 1999). Estes vírus podem manter sua viabilidade por dias ou meses em ambientes com baixas temperaturas (4 a 20°C) e resistem a amplas variações de pH, sofrendo inativação apenas em pH 11,5 (MENG et al., 1987; D'SOUZA et al., 2007). Além disso, os RVA podem resistir a tratamentos de desinfecção por incidência de luz ultravioleta ou por cloração, mediante concentrações de cloro variando entre 1,5 e 1,7 mg/L (RAO et al., 1986).

2.6 Considerações gerais sobre os vírus gigantes

Os vírus grandes núcleo-citoplasmáticos de DNA, também designados como vírus gigantes, são multiplicados em parte ou totalmente no citoplasma de células eucarióticas, possuem capsídeo com dimensão maior que 150 nm e apresentam um genoma relativamente grande, que codifica milhares de genes (IYER et al., 2001; YUTIN et al., 2009). Esse grupo de vírus é composto pelas famílias *Ascoviridae*, *Asfarviridae*, *Iridoviridae*, *Phycodnaviridae*, *Poxviridae*, *Marseilleviridae* e *Mimiviridae*, além de algumas espécies, como os pandoravírus, pithovírus e mollivírus, que não se enquadram dentro de nenhuma família viral (IYER et al., 2001; ABERGEL et al., 2015).

O primeiro vírus gigante foi descrito em 2003, a partir de amostras de água coletadas de uma torre de resfriamento, após um surto de pneumonia ocorrido no ano de 1992, em um hospital da Inglaterra (LA SCOLA et al., 2003). Naquela época, amebas de vida livre e cocos Gram-positivos foram detectados na amostra, sendo os últimos identificados como o possível agente causador desse surto. No início dos anos 2000, análises de microscopia eletrônica realizadas por pesquisadores franceses revelaram que as amebas continham partículas virais de grandes dimensões (~750 nm de diâmetro), que apresentavam simetria pseudo-icosaédrica (LA SCOLA et al., 2003). Esse vírus foi denominado de *Acanthamoeba polyphaga mimivirus* (APMV) por parasitar amebas de vida livre da espécie *Acanthamoeba polyphaga* e por mimetizar uma bactéria (mimivírus), devido ao tamanho visível ao microscópio óptico e pelas características de coloração.

O genoma do APMV, considerado o protótipo da família *Mimiviridae*, é constituído de DNA de fita dupla linear e contém mais de mil genes codificadores de proteínas estruturais, não estruturais e alguns RNA transportadores. Embora 70% desses genes ainda não possuam função descrita, análises do genoma dos mimivírus já revelaram a presença de marcadores antes desconhecidos em vírus, alguns relacionados à tradução de proteínas, a enzimas de reparo do DNA e novas vias enzimáticas (LEGENDRE et al., 2010).

Com o passar dos anos, diferentes espécies de vírus gigantes foram detectadas em amebas de vida livre, que são consideradas hospedeiras naturais destes vírus (LA SCOLA, 2014). Dentre estas amebas, destacam-se aquelas

pertencentes ao gênero *Acanthamoeba* spp., que podem fazer parte da microbiota normal de alguns animais e humanos e já foram isoladas a partir de vários ambientes (DORNAS, 2016). Essas amebas apresentam estabilidade após o tratamento com desinfetantes, além de resistirem quando expostas a condições extremas de pH e temperatura (FOUQUE et al., 2012).

A partir da descrição de vírus gigantes, os pesquisadores têm buscado aprimorar estratégias para o isolamento destes vírus, sendo a técnica de filtração a primeira opção proposta para a concentração de amostras (LA SCOLA et al., 2008). Apesar de ser eficiente na retenção de bactérias, este método também restringiu a pesquisa de vírus gigantes, devido ao maior tamanho dessas partículas virais. Deste modo, a filtração foi substituída pela adição de antibióticos às amostras, antes de serem inoculadas, uma vez que as condições de cultivo das amebas favorecem o crescimento bacteriano (LA SCOLA et al., 2010). É importante destacar, no entanto, que a elevada concentração de antibióticos pode afetar o crescimento da ameba, reduzindo o número de vírus gigantes isolados. Alternativamente, uma etapa de pré-enriquecimento da amostra foi proposta para diminuir o crescimento bacteriano. A execução dessa metodologia exige a incubação da amostra em câmara escura com fontes orgânicas, antes da sua inoculação nas amebas, a fim de favorecer a multiplicação de bactérias heterotróficas em detrimento das autotróficas (ARSLAN et al., 2011; DORNAS et al., 2014a). Apesar de permitir o isolamento de alguns vírus gigantes, esse método tem apresentado baixos índices de positividade (CAMPOS et al., 2014; ANDRADE et al., 2015).

Até o momento, os estudos de prospecção de vírus gigantes têm gerado informações importantes a respeito da sua circulação, sugerindo que assim como as amebas de vida livre, esses vírus podem ser ubíquos. Tal fato pode ser explicado pela detecção e isolamento de vírus gigantes em diferentes tipos de amostras, tais como solo, ar, água, ambientes hospitalares, sistemas de ventilação, ar condicionado, lentes de contato e, até mesmo, em sistemas de tratamento de esgoto (LA SCOLA et al., 2003, 2008; PAGNIER et al., 2013, BOUGHALMI et al., 2013; DORNAS et al., 2015).

2.7 Métodos de detecção de vírus em amostras ambientais

A pesquisa ambiental de vírus inclui etapas fundamentais como a concentração dos vírus na amostra e a detecção de ácidos nucleicos virais por técnicas moleculares. Os principais entraves para obter resultados seguros em pesquisas com matrizes aquáticas incluem a grande diversidade de amostras, a alta dispersão das partículas virais nesses ambientes e a presença de inibidores naturais que afetam a reação de amplificação de ácidos nucleicos (GUZMÁN et al., 2007; ROCK et al., 2010).

O método de concentração deve ser simples, rápido, barato, proporcionar boas taxas de recuperação viral e ser adequado para uma grande variedade de vírus. Como não existe um método ideal que atenda a todos esses requisitos, é preciso selecionar a metodologia mais adequada levando-se em consideração a natureza da amostra, o vírus a ser monitorado e os recursos disponíveis no laboratório (WYN-JONES e SELLWOOD, 2001; BOSCH et al., 2008; SILVA et al., 2011). Em geral, os métodos de concentração são baseados nas técnicas de ultracentrifugação, ultrafiltração, adsorção-eluição e floculação (WYN-JONES e SELLWOOD, 2001; SILVA et al., 2011).

No método de ultracentrifugação, as amostras são centrifugadas em alta velocidade (maior que 100.000 x g), o que faz com que os vírus precipitem e sejam, posteriormente, eluídos de forma eficiente. Esta técnica apresenta a vantagem de poder utilizar amostras sem que haja um processamento prévio das mesmas, porém, a falta de portabilidade do equipamento, os custos elevados e os pequenos volumes que podem ser processados, limitam a sua utilização (SILVA et al., 2011).

Outro método bastante utilizado é a ultrafiltração, que consiste na passagem da amostra através de membranas, filtros ou capilares, cujos poros tem dimensões tais, que permitem a passagem de água e solutos de baixo peso molecular, mas retêm vírus e macromoléculas. Esse método é útil apenas nos casos de amostras de pequeno volume, visto que os constituintes não filtráveis obstruem rapidamente o dispositivo filtrante (WYN-JONES e SELLWOOD, 2001).

Nos protocolos de adsorção e eluição, a amostra é filtrada em uma membrana eletricamente carregada, na qual o vírus é adsorvido sob condições específicas de pH e força iônica. A seguir, as partículas são eluídas da membrana pela lavagem com ácido e então concentradas por centrifugação. Uma das variações desse método

envolve a utilização de membranas carregadas negativamente, como na técnica desenvolvida por Katayama e colaboradores (2002), que tem sido utilizada em vários trabalhos (ROSE et al., 2006; PRADO et al., 2011; VIEIRA et al., 2012; ASSIS et al., 2015).

Na concentração por floculação orgânica, a amostra é adicionada de um eluente e submetida a agitação, para promover a liberação das partículas virais adsorvidas na matéria orgânica. Os eluentes mais utilizados são o extrato de carne (pH 9,5) e a glicina, seguida de hidróxido de sódio (pH 9,5 a 11,5). Após a eluição, a amostra é centrifugada para eliminar o excesso de matéria orgânica. O sobrenadante é adicionado de uma suspensão de flocos de leite em pó desnatado (pH 3,5) capazes de adsorver as partículas virais. Estes flocos são precipitados por centrifugação e, a seguir, ressuspensos em tampão (WYN-JONES e SELLWOOD, 2001). Variações desta técnica já foram propostas para recuperação de vírus em água do mar, água doce e esgoto bruto (CALGUA et al., 2008, 2013a,b). A concentração por floculação dispensa o uso de membranas e ultracentrífuga, reduzindo o custo do processo, além da execução ser fácil e rápida.

Após a etapa de concentração, a análise virológica prossegue com a detecção e identificação dos vírus no concentrado. A seleção do método de detecção de vírus entéricos em amostras ambientais depende se o agente viral se replica ou não em culturas celulares (WYN-JONES e SELLWOOD, 2001). A cultura consiste na inoculação do concentrado em linhagens celulares específicas para cada tipo de vírus (FONG e LIPP, 2005; SILVA et al., 2011). A seguir, a replicação viral é avaliada, observando-se a presença de alterações celulares, também denominadas como ECP. Apesar de permitir a determinação da infecciosidade e a realização de ensaios quantitativos, a metodologia em questão é cara, trabalhosa e requer um longo tempo para ser executada (FONG e LIPP, 2005; FORMIGA-CRUZ et al., 2005). O cultivo de HAdV pode ser realizado em diversas linhagens celulares, tais como BGMK, CaCo-2, HeLa, HEP-2, A549 e HEK293, sendo observadas variações na eficiência da replicação de acordo com o tipo viral (JIANG, 2006). Com relação aos RVA, existe uma grande dificuldade de adaptação destes vírus em linhagens celulares, no entanto, seu cultivo já foi descrito em células MA104 e CaCo-2, com adição de tripsina ao meio de cultivo (WARD et al., 1984; CUMINO et al., 1998).

O avanço das metodologias moleculares tem possibilitado o desenvolvimento de estudos de monitoramento de vírus em ambiente, tornando as análises mais

específicas, sensíveis e rápidas (BOSCH et al., 2008; GIRONES et al., 2010). Além disso, tais técnicas permitem a detecção de vírus fastidiosos; a determinação da carga viral e a caracterização molecular dos vírus detectados (GIRONES et al., 2010). A maioria das técnicas moleculares aplicadas é baseada em protocolos de amplificação dos ácidos nucleicos *in vitro*, com destaque para a reação em cadeia da polimerase quantitativa (qPCR), que é amplamente utilizada na virologia ambiental (GIRONES et al., 2010). A qPCR pode utilizar corantes fluorescentes, tais como *SYBR Green*, conhecido por intercalar entre as duas fitas de DNA para a detecção de um segmento amplificado. Entretanto, as sondas fluorescentes, tais como *TaqMan* (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), conferem maior especificidade, por serem baseadas no uso de regiões complementares para a quantificação do segmento do genoma selecionado (GIRONES et al., 2010). Esses métodos são conhecidos por apresentarem alta sensibilidade e especificidade para identificar e quantificar vírus, mesmo presentes em baixas concentrações. Entretanto, a quantificação acurada de cópias de genoma virais presentes nas matrizes ambientais demanda o controle de passos cruciais, tais como a eficiência dos procedimentos de concentração, extração dos ácidos nucleicos virais e de amplificação do genoma viral.

Além dos controles positivos e negativos específicos nas reações de PCR, outros controles são necessários. Neste sentido, o uso de um controle interno nas reações é uma alternativa adotada para monitorar a eficiência de todas as etapas de detecção. Este controle deve apresentar características físico-químicas similares aos microrganismos alvos e, de preferência, não ser encontrado no ambiente avaliado. Os melhores candidatos para esse propósito são os vírus de RNA, tais como os bacteriófagos (BOSCH et al., 2008). Outra estratégia para evitar resultados falso negativos é a diluição do ácido nucleico antes da etapa de amplificação, para avaliar a presença de inibidores potenciais que podem afetar a eficiência da quantificação (GIRONES et al., 2010).

A avaliação da eficiência dos métodos de detecção e quantificação é necessária para estabelecer estudos de monitoramento de vírus a fim de determinar a qualidade da água, bem como de subprodutos gerados nas ETEs. Embora os métodos de concentração de vírus em água e esgoto bruto estejam bem estabelecidos, os mesmos ainda não foram otimizados ou não apresentam eficiência comprovada para processar amostras de lodo de esgoto, que contém numerosos compostos capazes de inibir a reação de PCR (ROCK et al., 2010).

3 JUSTIFICATIVA

O desenvolvimento e a implantação de planos de saneamento básico vêm assumindo grande importância na atualidade, frente à preocupação crescente com a escassez da água e contaminação dos ambientes aquáticos. Apesar dos avanços, o cenário nacional ainda é preocupante e aponta para a necessidade de investimentos na expansão do serviço de esgotamento sanitário, tanto na etapa de coleta quanto no tratamento.

Levando-se em conta a grande quantidade de partículas virais excretadas nas fezes e a elevada infecciosidade dos RVA e dos HAdV, é importante monitorar a presença desses vírus no efluente tratado e no lodo de esgoto. Estes subprodutos do tratamento de esgoto merecem atenção, uma vez que serão devolvidos à natureza, pelo despejo do efluente em corpos d'água receptores e pela deposição de lodo em aterros sanitários, ambos podendo contribuir para a introdução de patógenos no ambiente.

Os estudos de virologia ambiental têm sido impulsionados, considerando-se dois aspectos já reconhecidos: a resistência dos vírus de disseminação entérica aos processos de tratamento de esgoto e a ausência de associação entre estes patógenos e os indicadores bacterianos, utilizados para monitorar a qualidade microbiológica da água. No entanto, as informações sobre o desempenho dos processos de tratamento de esgoto na remoção de vírus entéricos ainda são muito limitadas no Brasil, restritas apenas à pesquisas desenvolvidas no Rio de Janeiro, São Paulo e em Florianópolis. A falta de informação sobre a presença e a carga de patógenos virais nos subprodutos do tratamento de esgoto em Minas Gerais estimulou a realização deste estudo de monitoramento de HAdV e RVA na ETE Barbosa Lage, localizada em Juiz de Fora.

Um importante entrave no desenvolvimento de estudos de vigilância ambiental de vírus deve-se ao fato da execução da maioria das técnicas de concentração já descritas exigir a utilização de insumos e infraestrutura laboratorial de alto custo, apesar de nem sempre garantir uma eficiência satisfatória na recuperação viral. Neste contexto, deve-se destacar o método de floculação orgânica com leite desnatado, que foi descrito pela primeira vez para a concentração de partículas virais presentes na água do mar. Os resultados satisfatórios obtidos com a utilização deste método

estimularam sua avaliação em outras matrizes aquáticas, como água doce e esgoto bruto, e até mesmo em frutas para avaliação de contaminação viral em alimentos. Esta técnica apresenta vantagens sobre outros métodos, tais como filtração por membrana e ultracentrifugação, por ser fácil e rápida de ser realizada e requerer uma infraestrutura de laboratório simples, eliminando equipamentos dispendiosos, além de utilizar insumos de baixo custo. Assim, parte deste estudo buscou adaptar o protocolo de floculação orgânica com leite desnatado para avaliar a recuperação e a detecção de vírus entéricos presentes em amostras de lodo de esgoto e efluente tratado, que apresentam características muito diferentes.

Além de avaliar o impacto do esgoto como fonte de contaminação ambiental, é importante considerar a riqueza desta matriz em termos de biodiversidade, o que a torna um alvo interessante para estudos de prospecção viral. Neste contexto, vale ressaltar a presença dos vírus gigantes, já descrita em amostras de efluente, especialmente, considerando que os mesmos apresentam uma grande diversidade genética, pouco explorada até o momento. Sabendo que o isolamento de vírus gigantes pode ser favorecido pela utilização de técnicas de concentração, desde que as mesmas dispensem etapas de filtração e centrifugação em alta velocidade, o protocolo otimizado para efluente tratado foi testado quanto à sua aplicabilidade na pesquisa desses vírus.

Diante dos inúmeros desafios e limitações que se apresentam no campo da virologia ambiental, a execução deste trabalho pode contribuir de forma significativa para disseminação de conhecimento sobre o impacto do tratamento de esgoto por lodo ativado na carga de HAdV e RVA. Em adição, a aplicação de um protocolo de baixo custo e fácil execução para concentração de vírus em amostras lodo de esgoto e efluente tratado pode impulsionar a monitorização da carga viral dos subprodutos gerados nas ETEs, permitindo avaliar possíveis riscos para a saúde pública associados ao retorno destes materiais para o ambiente.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivos gerais

Otimizar o protocolo de concentração viral por floculação com leite desnatado para amostras de lodo de esgoto e efluente tratado, visando monitorar a presença de HAdV e RVA em uma ETE, a fim de avaliar o impacto do tratamento por lodo ativado sobre a carga viral e a adequação do efluente tratado aos padrões vigentes.

4.2 Objetivos específicos

- Otimizar e validar o protocolo de concentração viral por floculação com leite desnatado para recuperação de HAdV e RVA em lodo de esgoto e em efluente tratado.
- Testar a aplicabilidade do protocolo otimizado para efluente tratado na pesquisa de vírus gigantes.
- Determinar a carga de HAdV e RVA em amostras de diferentes etapas do tratamento de esgoto e caracterizar molecularmente as amostras positivas.
- Avaliar a influência da época de coleta (seca e úmida) e do tipo de amostra (simples e composta) na carga de HAdV e RVA.
- Verificar a infecciosidade das partículas de HAdV detectadas em amostras de efluente tratado.
- Avaliar o impacto do tratamento de esgoto sobre os parâmetros físico-químicos e microbiológico.
- Avaliar a ocorrência de associação entre a detecção viral e os parâmetros físico-químicos e microbiológico em amostras de efluente tratado, considerando os padrões definidos na legislação.
- Avaliar a ocorrência de correlação entre a carga viral e os parâmetros físico-químicos e microbiológico em amostras obtidas nas diferentes etapas do tratamento.

5 MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi dividido em três etapas, conforme a estratégia experimental abaixo.

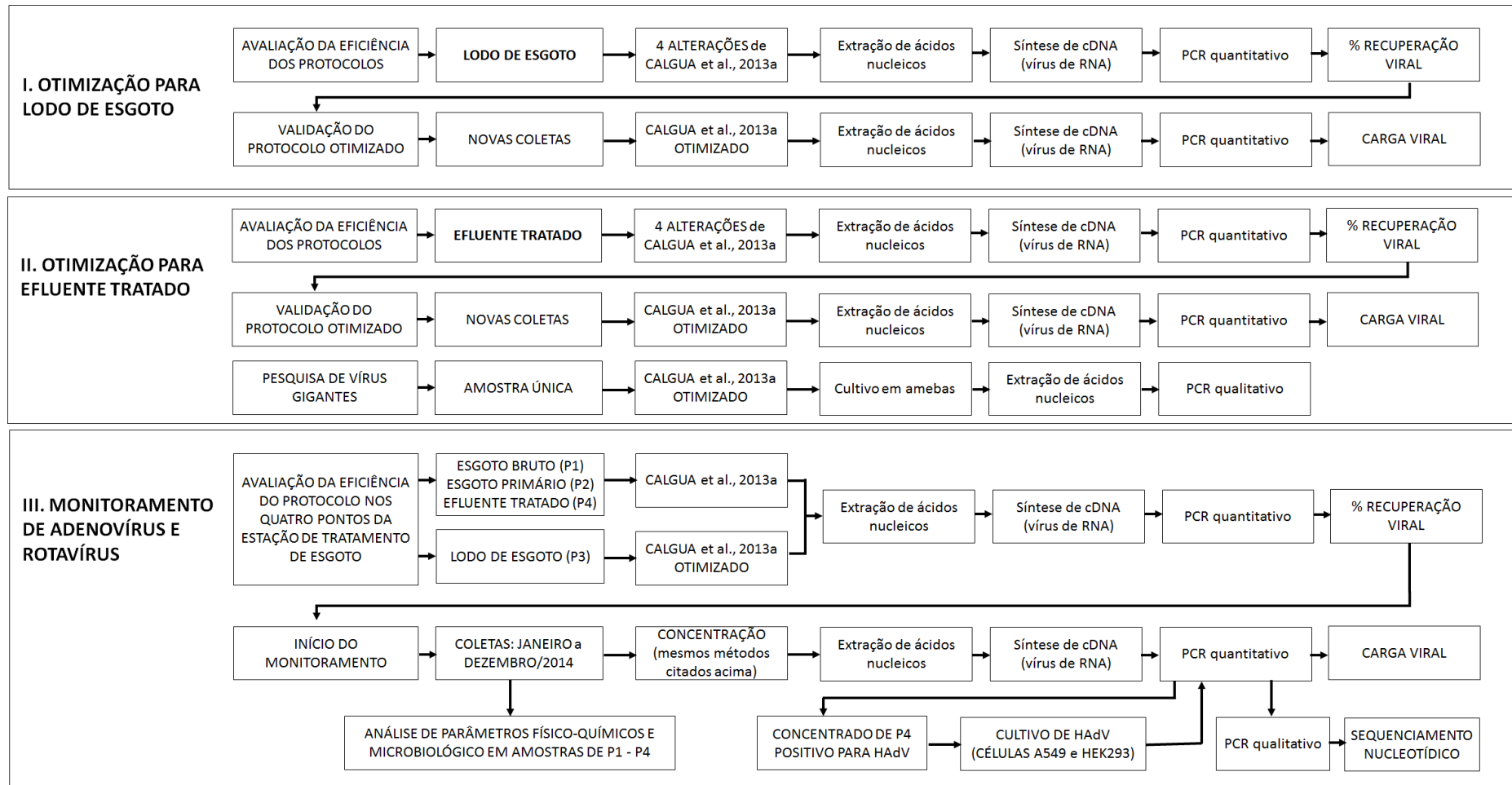


Figura 7: Estratégia experimental utilizada neste trabalho. cDNA: DNA complementar; PCR: reação em cadeia da polimerase; P1, P2, P3 e P4: pontos de coleta.

A ordem de descrição das etapas não corresponde à ordem cronológica de execução das mesmas (Figura 7). Isso significa que os dois estudos de otimização não foram realizados sequencialmente, mas foram organizados deste modo para garantir uma apresentação mais didática. Para evitar repetições desnecessárias, os procedimentos comuns (5.1 a 5.3) foram descritos antes do detalhamento de cada uma das etapas (5.4 a 5.6).

5.1 Área de estudo

Este trabalho foi realizado na cidade de Juiz de Fora, situada na Zona da Mata Mineira, com uma população de, aproximadamente, 550 mil habitantes. Segundo a classificação de Köppen, predomina em Juiz de Fora o clima tropical de altitude (Cwa), caracterizado por duas épocas bem definidas. A seca (maio a setembro) apresenta temperaturas mais baixas e menores índices pluviométricos e a úmida (outubro a abril) apresenta temperaturas mais elevadas e maiores precipitações pluviométricas (UFJF, 2016). Este estudo foi realizado na ETE Barbosa Lage, localizada às margens do Rio Paraibuna, próximo à confluência do Ribeirão das Rosas, no bairro Barbosa Lage, na zona norte de Juiz de Fora (MINAS GERAIS, 2014). Até o momento, esta é a única ETE em operação na cidade e recebe o esgoto produzido por cerca de 60 mil habitantes.

Nesta ETE é utilizado o processo de tratamento secundário por lodo ativado, com aeração prolongada (Figura 8). Inicialmente, o esgoto bruto é encaminhado a ETE, onde recebe o tratamento preliminar para separação de materiais, como termoplásticos, celulose, madeira e metais, que ficam retidos em grades. Na sequência, o material inorgânico, constituído basicamente de areia, é removido no desarenador e junto com os resíduos citados anteriormente são encaminhados ao aterro sanitário (MINAS GERAIS, 2014).

Após o tratamento preliminar, todo o esgoto é direcionado ao tanque de equalização, que tem o objetivo de acumular e homogeneizar o esgoto que chega na estação de forma intermitente, garantindo assim o funcionamento contínuo das etapas seguintes do processo de tratamento (JUIZ DE FORA, 2013; MINAS GERAIS, 2014).

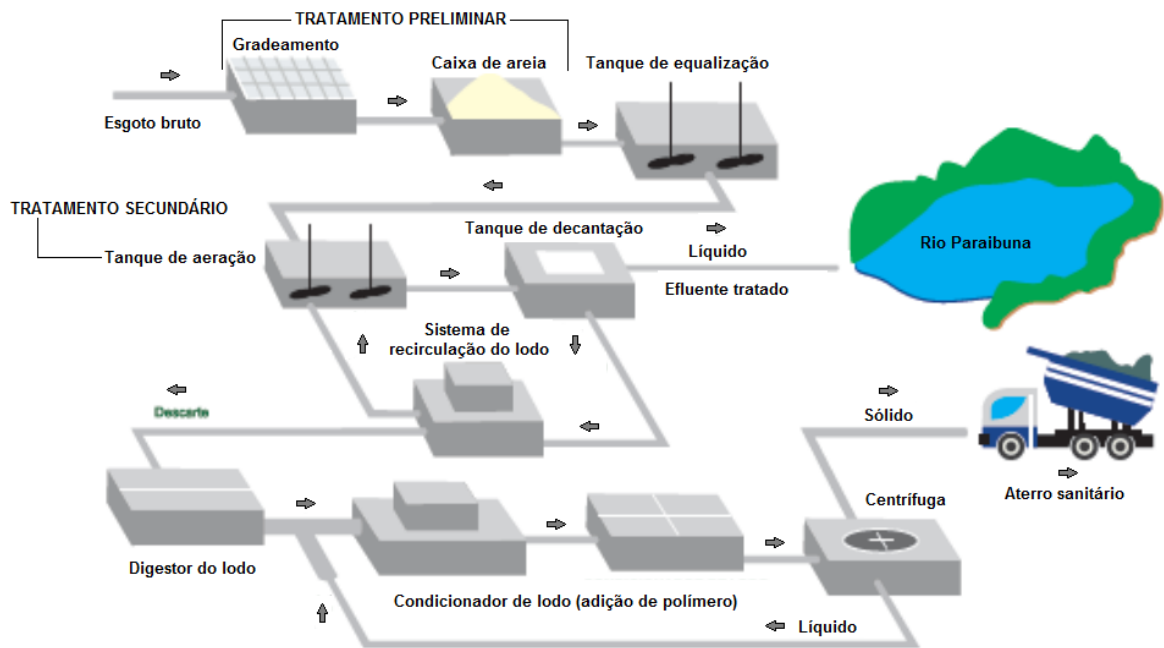


Figura 8: Representação esquemática do processo de tratamento secundário por lodo ativado utilizado na Estação de Tratamento de Esgoto Barbosa Lage. Adaptada de JUIZ DE FORA, 2013.

Na sequência, o esgoto é bombeado para o tanque de aerção, também conhecido como tanque reator ou reator biológico. Neste tanque, o efluente é misturado a uma massa de microrganismo (lodo) e o ar é insuflado por um sistema de aerção difuso, garantindo que todo o material receba oxigênio. Esta etapa corresponde ao tratamento secundário, na qual a matéria orgânica é decomposta por microrganismos na presença de oxigênio (JUIZ DE FORA, 2013; MINAS GERAIS, 2014).

A seguir, o efluente é bombeado para o tanque de decantação, que apresenta formato cilíndrico-cônico, característica que facilita a sedimentação dos flocos formados na etapa anterior (MINAS GERAIS, 2014). Após o tempo de retenção adequado, o sobrenadante do tanque de decantação passa a corresponder ao efluente tratado (JUIZ DE FORA, 2013). Este efluente poderá ser lançado ao Rio Paraibuna, desde que não altere as características de qualidade deste corpo receptor, enquadrado como água doce de classe 2 pela Portaria do Ministério Interior nº 86/1981, no trecho que vai da barragem de Chapéu D'uvas até sua foz no Rio Paraíba do Sul (MINTER, 1981). Além disso, o lançamento de efluentes oriundos de sistemas de tratamento de esgotos sanitários em corpos d'água está atrelado ao cumprimento de condições, padrões e exigências dispostas pelas legislações federal (Resolução

Conama n° 430/2011) e estadual (Deliberação Normativa Conjunta Copam/CERH n° 01/2008) em vigência.

O material que se acumula no fundo do tanque de decantação constitui o lodo de esgoto, que é removido por bombas. Parte deste lodo retorna ao tanque de aeração, para funcionar como inóculo de microrganismos, sendo denominado lodo ativado. O lodo excedente é direcionado ao tanque digestor aeróbio, equipado com um aerador de superfície (MINAS GERAIS, 2014). Este tanque funciona como um depósito, pois no sistema de lodo ativado com aeração prolongada a estabilização ocorre no tanque de aeração, devido ao seu prolongado período de retenção (18 a 30 dias). Antes de ser direcionado ao sistema de desidratação, o lodo excedente passa por uma etapa de condicionamento com adição de polímero para retirada de líquido. A seguir, o processo de desidratação é realizado por centrifugação, gerando dois produtos. O líquido resultante deste processo é reencaminhado ao tanque de equalização, retornando ao sistema de tratamento, enquanto a torta ou lodo desidratado é destinado ao aterro sanitário (JUIZ DE FORA, 2013; MINAS GERAIS, 2014).

5.2 Coletas

As amostras de esgoto foram coletadas em quatro pontos distintos da ETE (Figura 9), representativos de diferentes etapas do processo de tratamento, após autorização da Companhia Municipal de Saneamento de Juiz de Fora (Cesama) (ANEXO A).

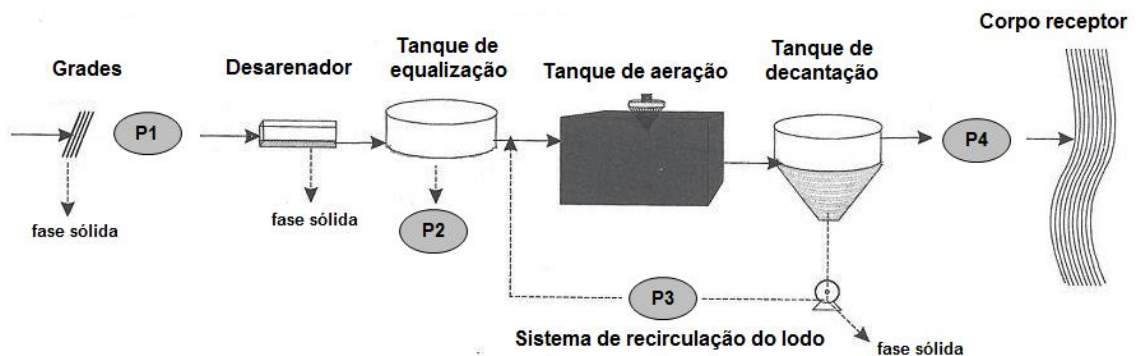


Figura 9: Representação esquemática dos pontos de coleta na Estação de Tratamento de Esgoto Barbosa Lage. Adaptada de VON SPERLING, 2014.

O ponto 1 (P1) está localizado na entrada da ETE, após as grades que retêm grandes objetos, onde foi coletado o esgoto bruto. O ponto 2 (P2) corresponde ao tanque de equalização, onde foi obtido o esgoto primário, após a passagem pela caixa de areia e homogeneização. O ponto 3 (P3) está localizado entre o tanque de sedimentação e o tanque de aeração no sistema de recirculação, no qual foi coletado o lodo de esgoto ativado. O ponto 4 (P4) corresponde à canaleta de escoamento do tanque de sedimentação, onde foi coletado o efluente tratado.

Todas as amostras (250 mL) foram acondicionadas em frasco de polietileno estéril e encaminhadas, sob refrigeração, ao laboratório de Virologia, onde foram armazenadas a - 20°C até o processamento.

5.3 Procedimentos para a pesquisa de adenovírus e rotavírus comuns às três etapas do estudo

5.3.1 Concentração viral

Para concentração das diferentes amostras de esgoto foram utilizadas a metodologia original de concentração viral por floculação com leite desnatado (CALGUA et al., 2013a) e duas alterações deste protocolo, otimizadas para recuperação de HAdV e RVA em amostras de lodo de esgoto e de efluente tratado (Figura 10).

No protocolo original, inicialmente, a amostra de esgoto (50mL) foi diluída em 100 mL de um tampão alcalino de glicina (0,25 N / pH 9,5 / proporção 1:2), com objetivo de eluir as partículas virais adsorvidas à matéria orgânica. A seguir, a suspensão foi submetida à agitação por 30 minutos em gelo, seguida de centrifugação a 8000 x g por 30 minutos a 4°C (*Centrifuga Sorvall RC 5B Plus, DuPont, EUA; Rotor Sorvall GSA, r=155mm*).

O precipitado foi descartado e o sobrenadante (150 mL) transferido para um novo frasco. O pH do sobrenadante foi ajustado para 3,5 e adicionado da suspensão floculada de leite desnatado (Difco, EUA), preparada imediatamente antes da sua utilização, para obtenção de uma concentração final de 0,01% (v/v). Para obtenção

correta da suspensão floculada de leite, a água do mar artificial (Sigma, EUA) deve ser preparada com 24 horas de antecedência. Esta etapa é importante, uma vez que o pH ácido e os cátions presentes na água do mar atuam sobre as partículas virais, carregando-as positivamente, o que favorece a adsorção das mesmas aos flocos de leite, na etapa seguinte.

Na sequência, a amostra foi agitada durante oito horas à temperatura ambiente para adsorção das partículas virais. Em seguida, os flocos de leite foram sedimentados por centrifugação ($8000 \times g$ durante 30 minutos a 4°C) e o sobrenadante, cuidadosamente, removido e descartado. O sedimento foi dissolvido em 1 mL de tampão fosfato 0,2 M com pH neutro (7,5), favorecendo a liberação das partículas virais na solução. Este concentrado foi aliquoteado e armazenado a -80°C .

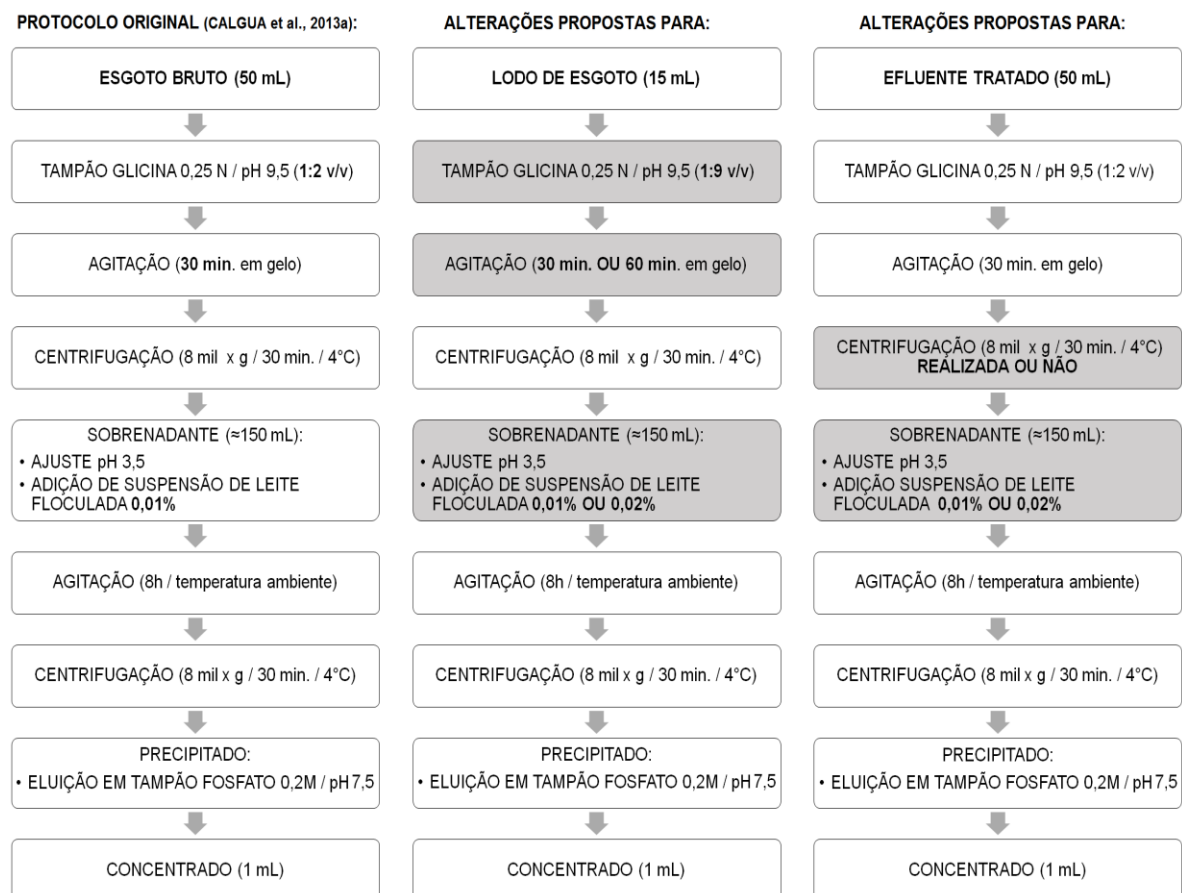


Figura 10: Fluxograma comparativo dos protocolos de concentração viral utilizados neste estudo.

5.3.1.1 Controles

O PP7 é um bacteriófago de *Pseudomonas aeruginosa*, que foi utilizado como controle interno para monitorar a execução das técnicas de concentração, extração, síntese de DNA complementar (cDNA) e qPCR. Este controle foi empregado tanto nos experimentos de otimização da técnica para lodo de esgoto e efluente tratado, como nos experimentos de monitoramento. A escolha deste bacteriófago deve-se ao fato de não ser detectado no ambiente e apresentar tamanho e propriedades físico-químicas similares a alguns vírus entéricos (RAJAL et al., 2007a,b). Todas as amostras foram inoculadas com PP7 antes da etapa de concentração e a carga viral foi determinada em cada fase do estudo.

5.3.2 Extração do ácido nucleico viral

Todos os concentrados obtidos na etapa anterior, bem como todos os inóculos (controles positivos de HAdV, RVA e PP7) utilizados nos experimentos foram submetidos à extração do ácido nucleico viral (DNA/RNA), utilizando os kits comerciais *QIAamp® MinElute Spin Virus* (Qiagen, EUA) ou *High Pure Viral Nucleic Acid* (Roche, Alemanha), de acordo com as recomendações do fabricante.

O sobrenadante final (60 µL), obtido de todos os concentrados e inóculos extraídos, foi quantificado em espectrofotômetro (*NanoDrop®*, Thermo Scientific, EUA), submetido a diluições seriadas de base 10 (10^{-1} e 10^{-2}), separado em alíquotas (3 x 20 µL) e estocado a - 80°C.

5.3.3 Obtenção de DNA complementar (cDNA)

Para a pesquisa de RVA e PP7, cujos genomas são constituídos de RNA, a síntese do cDNA foi realizada utilizando-se iniciadores aleatórios (Invitrogen®, EUA). Em microtubos de 0,2 mL, 5 µL de RNA extraído foram adicionados a 1 µL de dimetil

sulfóxido e, posteriormente, incubados a 97°C por 7 minutos para desnaturação, seguida de resfriamento em banho de gelo por 2 minutos. Na sequência, os microtubos foram adicionados de 19 µL da mistura de reagentes (Quadro 6) e submetidos à seguinte condição: 25°C por 5 minutos, 50°C por 1 hora e 70°C por 20 minutos. Ao final, todos os cDNAs foram aliquotados (2 x 12,5 µL) e armazenados a -20°C, até o momento da análise por qPCR.

O cDNA foi preparado usando RNA não diluído e diluições seriadas de base 10 (10^{-1} e 10^{-2}) para avaliar a presença de inibidores nas amostras de esgoto. Controles positivo (inóculos de RVA e PP7), negativo (amostra negativa) e branco (água livre de DNase e RNase) foram utilizados para verificar a ocorrência da transcrição reversa e garantir a ausência de contaminação. Esta etapa é dispensável para a pesquisa de HAdV, por se tratar de um vírus de genoma de DNA.

Quadro 6: Reagentes utilizados na reação da transcrição reversa para a síntese de DNA complementar a partir do RNA total extraído.

Reagentes	Volume (µL)
Água livre de DNase/RNase *	10,5
Tampão de PCR sem MgCl ₂ [10X] * ¹	2,5
dNTP [2,5mM] * ²	2,0
MgCl ₂ [50mM] * ¹	0,7
RT Superscript III [200U/µL] * ¹	0,5
Iniciador aleatório [25U]* ¹	2,0
Ditiotreitol [100mM] * ¹	0,5
RNase out [40U/µL] *	0,3
Total	19,0

* Life Technologies®, EUA; *¹ Invitrogen®, EUA; *² Promega®, EUA.

5.3.4 Determinação da carga viral

5.3.4.1 Construção das curvas padrão de adenovírus, rotavírus e PP7

Curvas padrão foram preparadas para cada vírus pesquisado, a fim de realizar a quantificação absoluta por qPCR. Os plasmídeos recombinantes contendo insertos de genoma de HAdV, RVA e PP7 foram gentilmente cedidos pela Dr^a Marize Pereira

Miagostovich do Laboratório de Virologia Ambiental e Comparada da Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz), no Rio de Janeiro. As suspensões de plasmídeos foram homogeneizadas em vortex e quantificadas em triplicata no espectrofotômetro (*NanoDrop*[®], Thermo Scientific, EUA). A concentração média de DNA, obtida em nanogramas por microlitro (ng/μL), foi aplicada na fórmula descrita a seguir, para obtenção do resultado em *número de cópias por microlitro* (nº cópias/μL):

$$\text{Nº cópias/ } \mu\text{L} = \frac{\text{Concentração de DNA em ng/}\mu\text{L} \times 6.022 \times 10^{23}}{\text{nº de pares de base do plasmídeo recombinante} \times 1 \times 10^9 \times 650}$$

Onde:

- 6.022×10^{23} = Número de Avogadro;
- 1×10^9 = Fator de conversão de gramas para nanogramas;
- 650 = Massa molecular aproximada de um par de bases (A-T ou G-C) em Daltons.

Para a construção da curva padrão de HAdV foram utilizadas oito diluições seriadas de base 10 do plasmídeo recombinante, contendo o genoma deste vírus. Considerando o volume de plasmídeo aplicado por reação (2,5 μL) e o fator de diluição (7,84), a curva construída para HAdV variou de $1,96 \times 10^0$ a $1,96 \times 10^7$ cópias/ μL.

Foram preparadas 10 diluições seriadas de base 10 dos plasmídeos recombinantes, contendo o genoma de RVA e PP7. Do mesmo modo, considerando o volume de plasmídeo aplicado por reação (3 μL para ambos) e o fator de diluição em cada caso (1,84 para RVA e 9,43 para PP7), a curva construída para RVA variou de $5,53 \times 10^0$ a $5,53 \times 10^9$ cópias/ μL, enquanto a curva de PP7 variou de $2,83 \times 10^0$ a $2,83 \times 10^9$ cópias/ μL.

No total, foram preparadas 32 curvas completas (com 1 tubo de cada ponto) para cada vírus, que foram estocadas em embalagens individuais a - 80°C, de forma a garantir que não ocorressem alterações no padrão de quantificação, ao longo de toda a pesquisa.

5.3.4.2 Quantificação viral

Todos os concentrados e inóculos obtidos foram submetidos à qPCR para determinação das cargas de HAdV, RVA e PP7, seguindo as técnicas descritas por Heim e colaboradores (2003), Zeng e colaboradores (2008) e Rajal e colaboradores (2007a), respectivamente. Os iniciadores e as sondas utilizadas nos protocolos citados acima podem ser observados no quadro 7.

Quadro 7: Iniciadores e sondas utilizados no PCR quantitativo para determinação da carga de adenovírus humano, rotavírus do grupo A e bacteriófago PP7.

Vírus	Região do genoma	Iniciador e sonda	Sequência (5' a 3') *
Adenovírus humano	Gene do hexon	AQ1 (+)	GCCACGGTGGGGTTTCTAACTT
		AQ2 (-)	GCCCCAGTGGTCTTACATGCACATC
		AP (S)	FAM-TGCACCAGACCCGGGCTCAGGTACTCCGA-TAMRA
Rotavírus do grupo A	Gene NSP3	NSP3 (+)	ACCATCTWCACRTRACCCTCTATGAG
		NSP3 (-)	GGTCACATAACGCCCTATAGC
		NSP3 (S)	VIC-AGTTAAAAGCTAACACTGTCAAA-MGB
Bacteriófago PP7	Gene da Replicase	247 (+)	GTTATGAACCAATGTGGCCGTTAT
		320 (-)	CGGGATGCCTCTGAAAAAAG
		274 (S)	FAM-TCGGTGGTCAACGAGGAACTGGAAC-TAMRA

* Código de nucleotídeos IUB: W=A/T, R=A/G; AQ1: Adenoquant 1; AQ2: Adenoquant 2; AP: Adenoprobe; NSP3: Proteína não estrutural 3. (+): Iniciador senso; (-): Iniciador anti-senso; (S): Sonda; FAM e VIC: fluoróforos; MGB (Minor Groove Binder) e TAMRA (Tetrametil rodamina): Bloqueadores de fluoróforos.

As qPCR e as condições de amplificação utilizadas para determinação da carga de HAdV, RVA e PP7 podem ser observados, respectivamente, nos quadros 8, 9 e 10. Todas as reações foram realizadas utilizando o sistema TaqMan (Applied Biosystems, EUA). Na primeira etapa deste estudo (item 5.4), as qPCR foram realizadas na plataforma ABI 7500 (Applied Biosystems, EUA) do Laboratório de Virologia Ambiental e Comparada da Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz), no Rio de Janeiro. Nas demais etapas (itens 5.5 e 5.6), as reações foram realizadas no StepOne Plus Real-Time PCR System (Applied Biosystems, EUA) do Laboratório de uso comum da Pós-Graduação de Ciências Biológicas.

Quadro 8: Reação de PCR quantitativo e condições de amplificação utilizadas para determinação da carga de adenovírus humano.

Reagentes	Volume (µL)	Condições de amplificação			
Água livre de DNase/RNase *	2,25				
<i>TaqMan Universal PCR Master Mix</i> * ¹	6,25	Etapa	Temperatura	Tempo	
Iniciador AQ1 [12,5µM] * ²	0,50	Ativação UNG	50°C	2 min.	
Iniciador AQ2 [12,5µM] * ²	0,50	Ativação <i>Taq Polimerase</i>	95°C	10 min.	
Sonda AP FAM-TAMRA [10µM] * ¹	0,50	45 ciclos	Desnaturação	95°C	3 seg.
DNA	2,50		Hibridização	55°C	10 seg.
Total	12,50		Extensão	65°C	1 min.

* Life Technologies®, EUA; *¹ Applied Biosystems, EUA; *² Eurofins MWG Operon®, Alemanha.

Quadro 9: Reação de PCR quantitativo e condições de amplificação utilizadas para determinação da carga de rotavírus do grupo A.

Reagentes	Volume (µL)	Condições de amplificação			
Água livre de DNase/RNase*	2,00				
<i>TaqMan Universal PCR Master Mix</i> * ¹	6,25	Etapa	Temperatura	Tempo	
Iniciador NSP3F [10µM] * ²	0,50	Ativação UNG	50°C	2 min.	
Iniciador NSP3R [10µM] * ²	0,50	Ativação <i>Taq Polimerase</i>	95°C	10 min.	
Sonda NSP3 VIC-MGB [10µM]* ¹	0,25	40 ciclos	Desnaturação	95°C	15 seg.
cDNA	3,00		Hibridização /	60°C	1 min.
Total	12,50		Extensão		

* Life Technologies®, EUA; *¹ Applied Biosystems, EUA; *² Eurofins MWG Operon®, Alemanha.

Quadro 10: Reação de PCR quantitativo e condições de amplificação utilizadas para determinação da carga do bacteriófago PP7.

Reagentes	Volume (µL)	Condições de amplificação			
Água livre de DNase/RNase *	1,75				
<i>TaqMan Universal PCR Master Mix</i> * ¹	6,25	Etapa	Temperatura	Tempo	
Iniciador 247F [10µM] * ²	0,625	Ativação UNG	50°C	2 min.	
Iniciador 320R [10µM] * ²	0,625	Ativação <i>Taq Polimerase</i>	95°C	10 min.	
Sonda 274 FAM-TAMRA [10µM]* ¹	0,25	40 ciclos	Desnaturação	95°C	15 seg.
cDNA	3,00		Hibridização /	60°C	1 min.
Total	12,50		Extensão		

* Life Technologies®, EUA; *¹ Applied Biosystems, EUA; *² Eurofins MWG Operon®, Alemanha.

Suspensões não diluídas e as diluições seriadas de base 10 (10^{-1} e 10^{-2}) de DNA e cDNA foram analisadas em duplicata (seis reações/amostra) para verificar a possível presença de inibidores da qPCR. Em todas as corridas, a curva padrão foi obtida utilizando-se no mínimo seis diluições do plasmídeo, cada uma delas aplicadas em triplicata. Controles positivo, negativo e branco foram incluídos em cada corrida.

5.3.4.3 Determinação da eficiência do método de concentração viral

A eficiência do método de concentração foi determinada tanto nos estudos de otimização do protocolo para lodo de esgoto e efluente tratado, quanto no estudo de monitoramento de HAdV e RVA. Para tanto, antes da concentração, amostras representativas de todas as condições testadas e dos pontos avaliados foram inoculadas com suspensões contendo uma quantidade conhecida de HAdV, RVA e PP7. A seguir, os concentrados obtidos foram submetidos às técnicas de extração, síntese de cDNA (apenas para vírus de RNA) e qPCR.

Os resultados de qPCR são reportados em cópias por reação, logo, foi necessário utilizar a fórmula matemática abaixo, para converter o resultado no número exato de cópias detectadas nos inóculos e nos concentrados (inoculados ou não):

$$N_{\text{total cópias}} = (N_{\text{cópias/reação}} \times [V_{\text{f cDNA}} / V_{\text{cDNA}}]) \times (V_{\text{f ácido nucleico}} / V_{\text{ácido nucleico}}) \times (V_{\text{total}} / V_{\text{ext}})$$

Onde:

- V_{total} = volume total da amostra (500µL para o cálculo do número de cópias do genoma no inóculo e 1000 µL para o cálculo do número de cópias do genoma no concentrado)
- V_{ext} = volume de amostra submetido à extração de DNA/RNA (200µL)
- $V_{\text{f ácido nucleico}}$ = volume final de DNA/RNA extraído (60µL)
- $V_{\text{ácido nucleico}}$ = volume de RNA aplicado na reação de cDNA (5µL para RVA e PP7) ou volume de DNA aplicado na reação de qPCR (2,5µL para HAdV)
- $V_{\text{f cDNA}}$ = volume final da reação de cDNA para RVA e PP7 (25µL)
- V_{cDNA} = volume de cDNA aplicado na reação de qPCR para RVA e PP7 (3µL)
- $N_{\text{cópias/reação}}$ = número de cópias por reação obtido pelo qPCR (valor bruto)

- $N_{\text{total cópias}}$ = número total de cópias detectadas

A seguir, o número total de cópias encontrado para HAdV e RVA nos concentrados inoculados foi subtraído do valor obtido nos concentrados não inoculados (controle negativo), com intuito de descontar a contaminação viral pré-existente. Como PP7 não é encontrado naturalmente nas amostras ambientais, esta etapa não foi realizada para o bacteriófago. Na sequência, o percentual de recuperação que avalia a eficiência do método de concentração viral foi calculado para HAdV, RVA e PP7, a partir do número total de cópias do genoma detectadas no inóculo e no concentrado inoculado, utilizando-se a fórmula abaixo:

$$\% \text{ Recuperação} = N_{\text{cópias concentrado inoculado}} \times 100 / N_{\text{cópias do inóculo}}$$

Onde:

- $N_{\text{cópias concentrado inoculado}}$ = número total de cópias do genoma recuperadas
- $N_{\text{cópias do inóculo}}$ = número total de cópias do genoma inoculadas
- % Recuperação = percentual de recuperação do método

5.4 Otimização do protocolo de concentração viral para lodo de esgoto

5.4.1 Avaliação da eficiência das alterações propostas

Neste estudo (primeira etapa) foram propostas quatro alterações na técnica de concentração viral por floculação com leite desnatado (CALGUA et al., 2013a), originalmente descrita para amostras de esgoto bruto, visando otimizar um protocolo de baixo custo para recuperação de HAdV e RVA em amostras de lodo de esgoto.

Para tanto, 240 mL de lodo de esgoto ativado, obtidos no ponto 3 da ETE Barbosa Lage, foram divididos em quatro alíquotas de 60 mL para testar as alterações no protocolo de concentração, denominadas condições A, B, C e D. Em cada condição testada, três alíquotas (15 mL cada) de lodo de esgoto foram inoculadas com

suspensões, contendo HAdV (10^4 cópias de genoma/500 μ L), RVA (10^3 cópias de genoma/500 μ L) e PP7 (10^{10} cópias de genoma/500 μ L). Paralelamente, uma alíquota não inoculada (15 mL) foi utilizada como controle negativo (Figura 11).

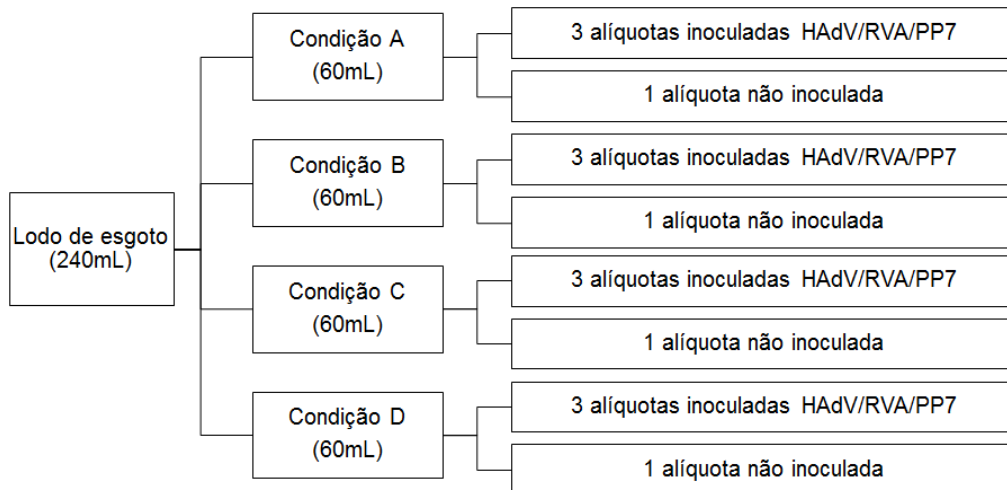


Figura 11: Fluxograma das etapas do estudo de otimização do protocolo de concentração viral para lodo de esgoto. HAdV: adenovírus humano; RVA: Rotavírus do grupo A; PP7: bacteriófago PP7.

Nas quatro condições testadas, 15 mL de amostra de lodo de esgoto foram diluídos em 135 mL de tampão de glicina 0,25 N, pH 9,5 (1:9, v/v). Foram propostas alterações no tempo de agitação em tampão glicina e na concentração final de leite desnatado, para cada condição testada (Quadro 11).

Os inóculos de HAdV (controle positivo) e PP7 (controle interno) e os concentrados de lodo de esgoto foram armazenados a -80°C até serem processados, como descrito nos itens 5.3.2 a 5.3.4, para determinar a carga viral e estimar a eficiência do método de concentração

Quadro 11: Condições testadas no estudo de otimização do protocolo de concentração viral para lodo de esgoto.

Condição	Tempo de agitação ^a	Concentração final de leite desnatado ^b
A	30 minutos	0,01 % (p/v)
B	60 minutos	0,01 % (p/v)
C	30 minutos	0,02 % (p/v)
D	60 minutos	0,02 % (p/v)

^a Agitação em tampão glicina 0.25 N, pH 9.5 (1:9, v/v). ^b Suspensão pré-floculada de leite desnatado (1%, p/v).

5.4.2 Validação do protocolo otimizado para lodo de esgoto

A validação do protocolo de concentração viral otimizado para recuperação de HAdV e RVA foi realizada com amostras de lodo ativado, adensado e digerido, com objetivo de avaliar seu desempenho em diferentes populações e tipos de lodo. Para este propósito, foram utilizadas oito amostras de lodo de esgoto ativado obtidas no ponto 3 da ETE Barbosa Lage e duas amostras de três diferentes tipos de lodo (ativado, adensado e digerido) coletadas em uma ETE do Rio de Janeiro, pela equipe do Laboratório de Virologia Ambiental e Comparada (Fiocruz, RJ). Todas as amostras foram inoculadas com PP7 (10^{10} cópias de genoma/500 μ L) e submetidas à técnica de concentração. A carga de HAdV e a taxa de recuperação de PP7 foram determinadas após o processamento dos concentrados virais, como descrito nos itens 5.3.2 a 5.3.4.

5.5 Otimização do protocolo de concentração viral para efluente tratado

5.5.1 Avaliação da eficiência das alterações propostas

Neste estudo (segunda etapa) também foram propostas quatro alterações na técnica de concentração viral descrita por Calgua e colaboradores (2013a), visando otimizar este protocolo de baixo custo, para recuperação de HAdV e RVA em amostras de efluente tratado.

Para tanto, 800 mL de efluente tratado, obtidos no ponto 4 da ETE Barbosa Lage, foram divididos em quatro alíquotas de 200 mL para testar as alterações denominadas condições A', B', C' e D'. Em cada condição testada, três alíquotas (50 mL) de efluente tratado foram inoculadas com suspensões, contendo HAdV (10^5 cópias de genoma/500 μ L), RVA (10^5 cópias de genoma/500 μ L) e PP7 (10^7 cópias de genoma/500 μ L). Paralelamente, uma alíquota não inoculada (50 mL) foi utilizada como controle negativo (Figura 12).

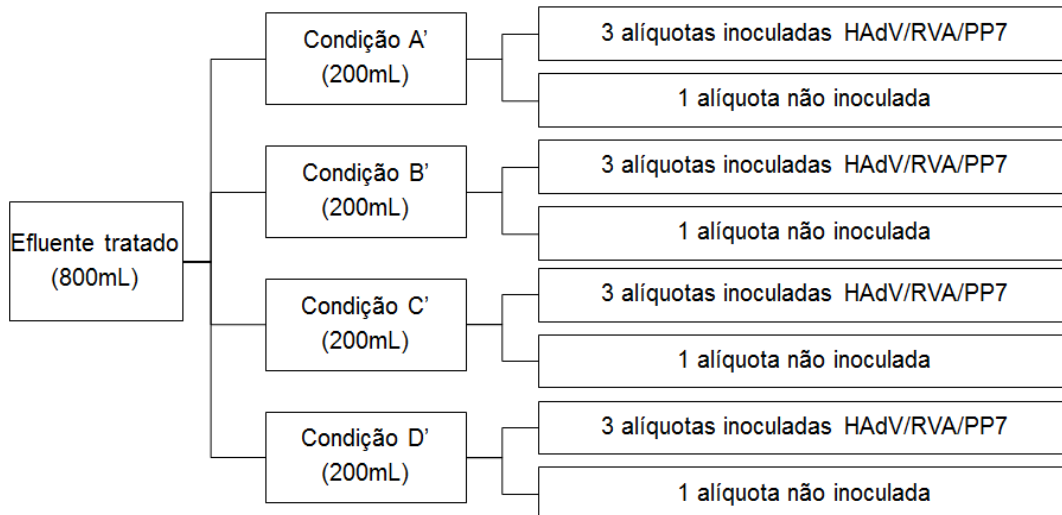


Figura 12: Fluxograma das etapas do estudo de otimização do protocolo de concentração viral para efluente tratado. HAdV: adenovírus humano; RVA: rotavírus do grupo A; PP7: bacteriófago PP7.

Para cada condição foram testadas modificações na primeira centrifugação e na concentração final de leite (Quadro 12). Os inóculos de HAdV, RVA (controles positivos) e PP7 (controle interno) e os concentrados de efluente tratado foram armazenados a -80°C até serem processados, como descrito nos itens 5.3.2 a 5.3.4, para determinar a carga viral e estimar a eficiência do método de concentração.

Quadro 12: Condições testadas no estudo de otimização do protocolo de concentração viral para efluente tratado.

Condições	1ª centrifugação	Concentração final de leite desnatado ^a
A'	8000 x g por 30 minutos à 4°C	0,01 % (p/v)
B'	Não realizada	0,01 % (p/v)
C'	8000 x g por 30 minutos à 4°C	0,02 % (p/v)
D'	Não realizada	0,02 % (p/v)

^a Suspensão pré-floculada de leite desnatado (1%, p/v).

5.5.2 Validação do protocolo otimizado para efluente tratado

A validação do protocolo de concentração otimizado para recuperação de HAdV e RVA foi realizada com 24 amostras de efluente tratado, coletadas quinzenalmente no ponto 4 da ETE Barbosa Lage, no período de janeiro a dezembro

de 2015. Todas as amostras foram inoculadas com PP7 (10^7 cópias de genoma/500 μ L) e submetidas à técnica de concentração. A carga de HAdV e RVA e a taxa de recuperação de PP7 foram determinadas após o processamento dos concentrados virais, como descrito nos itens 5.3.2 a 5.3.4.

5.5.3 Pesquisa de vírus gigantes em amostra de efluente tratado

Todos os experimentos necessários para a pesquisa de vírus gigantes foram realizados no Laboratório de Vírus da Universidade Federal de Minas Gerais.

5.5.3.1 *Procedimentos de cultura celular*

Amebas da espécie *Acanthamoeba polyphaga* (cepa AP2T4) foram utilizadas como suporte para o isolamento dos vírus gigantes. O cultivo foi realizado em frascos de 125 cm², com 25 mL de meio de peptona, extrato de levedura e glicose (PYG), que foram mantidos a 30°C. Após 24 horas de crescimento, as células foram coletadas e centrifugadas a 1.000 x *g* por 10 minutos (*Centrifuge* 5430 R, Eppendorf, EUA; Rotor FA-45-48-11, *r*=95mm). O sobrenadante foi removido e as amebas foram homogeneizadas com 30 mL de PBS. Esse procedimento foi repetido por duas vezes.

Após a última etapa de centrifugação, o sedimento foi suspenso em 30 mL de PBS para a contagem das amebas, utilizando a câmara de Neubauer. Posteriormente, a suspensão de amebas foi tratada com uma mistura de antibióticos, com as seguintes concentrações de uso: penicilina 200 U/mL (Sigma-Aldrich, EUA), gentamicina 50 mg/mL (Thermo Fisher Scientific, EUA), anfotericina B 2,5 mg/mL (Bristol-Myers-Squibb, EUA), ciprofloxacino 4 μ g/mL (Cellofarm, Brasil), vancomicina 4 μ g/mL (Sigma-Aldrich, EUA) e doxiciclina 20 μ g/mL (Sigma-Aldrich, EUA) (DORNAS, 2016).

5.5.3.2 Isolamento de vírus gigantes

Para o isolamento viral foi utilizado o método de inoculação direta (DORNAS et al., 2015). Inicialmente, 100 µL de suspensão de amebas ($4,0 \times 10^3$ amebas/poço) foram adicionados em cada poço da placa de 96 poços. A placa foi mantida a 30°C até obtenção de uma monocamada de amebas, com cerca de 90% de confluência.

O concentrado de efluente tratado obtido pelo protocolo otimizado foi centrifugado a $8.000 \times g$ por 30 minutos (*Centrifuge 5430 R*, Eppendorf, EUA; Rotor FA-45-48-11, $r=95\text{mm}$) e o sedimento suspenso em 750 µL de tampão salina fosfato (PBS) 1X, para evitar possíveis efeitos tóxicos nas amebas. A seguir, 100 µL deste concentrado viral foram inoculados em cada poço. A placa foi incubada a 30°C por um período de seis dias. No controle negativo foi utilizada adição de PBS sobre a monocamada de amebas.

Durante o período de cultivo, todos os poços foram visualizados diariamente em microscópio óptico para verificar a ocorrência de ECP. Em caso de ausência de ECP, foram realizadas mais duas passagens com intervalo de sete dias, utilizando-se a amostra recém-cultivada juntamente com meio PYG e antibióticos.

Os poços que apresentaram ECP foram analisados como possíveis novos isolados de vírus gigantes. Neste caso, 100 µL do conteúdo destes poços foram coletados e inoculados em uma garrafa de cultivo de 25 cm², contendo 5 mL de suspensão de amebas ($3,0 \times 10^5/\text{mL}$). A garrafa foi mantida à 30°C por até seis dias, sendo observada diariamente em microscópio óptico, para confirmação da presença de ECP. Após a visualização de ECP, o material contido na garrafa foi alíquotado e armazenado a -20°C. Uma alíquota de 200 µL foi aquecida a 75°C por uma hora para romper o capsídeo viral. A seguir, essa alíquota foi submetida a extração de ácidos nucleicos, utilizando-se o kit comercial *High Pure Viral Nucleic Acid* (Roche, Alemanha).

5.3.3.3 Detecção de vírus gigantes

A presença de vírus gigantes foi investigada por PCR em tempo real qualitativo, utilizando diferentes alvos (Quadro 13). Todos os ensaios foram realizados usando o SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems, EUA), no termociclador Step One (Applied Biosystem, EUA), seguindo as recomendações do fabricante.

Quadro 13: Iniciadores utilizados no PCR em tempo real para detecção de vírus gigantes.

Vírus	Região do genoma	Iniciadores (sequência 5' a 3')*
Mimivírus	Proteína 1 do capsídeo (conservado nas linhagens A, B e C)	ACTTTATTATCATTATCAGCGAATA
		GCTCTTAACCCTGAAGAACA
Mimivírus	Helicase (conservado na linhagem A)	ACCTGATCCACATCCCATAACTAA
		GCCTCATCAACAAATGGTTTCT
Marseillevírus	Proteína do capsídeo	CTTTTGACCTGCTTCATGA
		GCGGTAACCCTCCCACTTAT
Pandoravírus	β DNA polimerase	GGATGGCTCGACGTCTCTT
		CCTYGGTRAGCAMAGGCAAC
Faustovírus	β DNA polimerase	CATGACATGAGCTTCGGATACT
		GTTTCTCTGATCCCACACCTAC

* Código de nucleotídeos IUB: Y=C/T; R=A/G; M=A/C.

As reações de PCR e as condições de amplificação utilizadas para detecção de vírus gigantes podem ser observados no quadro 14. A temperatura de *melting* (T_m) foi avaliada após todas as reações, a fim de identificar as amplificações específicas. As reações foram testadas em duplicata e só foram consideradas positivas aquelas que apresentaram T_m específico.

Quadro 14: Reação de PCR em tempo real e condições de amplificação utilizadas para detecção de vírus gigantes.

Reagentes	Volume (μ L)	Condições de amplificação			
		Etapas	Temperatura	Tempo	
Água livre de DNase/RNase *	qsp.	Ativação <i>Taq</i> <i>Polimerase</i>	95°C	10 min.	
SYBR Green Master Mix *	5,0				
Iniciador senso [10 μ M] * ¹	0,4	40 ciclos	Desnaturação	95°C	
Iniciador anti-senso [10 μ M] * ¹	0,4				
DNA (30 a 100 ng)	-		Hibridização / Extensão	60°C	1 min.
Total	10,0				

* Applied Biosystems, EUA; *¹ Eurofins MWG Operon®, Alemanha. qps: Quantidade suficiente para.

5.6 Monitoramento de adenovírus e rotavírus

5.6.1 Avaliação da eficiência do método de concentração

Antes de realizar o monitoramento viral (terceira etapa), foi necessário avaliar a eficiência do método de concentração nas diferentes amostras de esgoto. Para tanto, amostras de esgoto bruto (P1), esgoto primário (P2), lodo de esgoto (P3) e efluente tratado (P4) foram obtidas na ETE Barbosa Lage.

De cada ponto, três alíquotas (50 mL) foram inoculadas com suspensões contendo HAdV (10^5 cópias de genoma/500 μ L), RVA (10^5 cópias de genoma/500 μ L) e PP7 (10^3 cópias de genoma/500 μ L) e uma alíquota (50mL) foi utilizada como controle negativo, sem adição de inóculo.

As amostras de esgoto bruto (P1), esgoto primário (P2) e efluente tratado (P4) foram submetidas à técnica de concentração por floculação com leite desnatado original (CALGUA et al., 2013a), descrita no item 5.3.1. As amostras de lodo de esgoto (P3) foram processadas utilizando o protocolo modificado (condição A, B, C ou D), que se mostrou mais eficiente no estudo de otimização, descrito no item 5.4.

A seguir, todos os inóculos de HAdV (controle positivo), RVA (controle positivo) e PP7 (controle interno) e concentrados virais obtidos foram processados, como descrito nos itens 5.3.2 a 5.3.4, para determinar a carga viral e estimar a taxa de recuperação viral.

5.6.2 Pesquisa de adenovírus e rotavírus

Para o estudo de monitoramento, amostras (250 mL) representativas de diferentes etapas do processo de tratamento de esgoto por lodo ativado (pontos 1 a 4) foram obtidas na ETE Barbosa Lage, de janeiro a dezembro de 2014.

As coletas foram realizadas, quinzenalmente, na época úmida (outubro a abril) e na época seca (maio a setembro), a fim de avaliar se houve influência do período de coleta na carga viral.

Buscando obter uma maior representatividade nos pontos 1, 2 e 4 foram coletadas amostras do tipo composta (mistura de amostras individuais tomadas em intervalos regulares, durante um período de 24 horas). No ponto 3, foram coletadas amostras do tipo simples, tomada num determinado instante de tempo, uma vez que o próprio sistema de recirculação de lodo ativado pode manter tal representatividade.

As amostras de esgoto bruto (P1), esgoto primário (P2) e efluente tratado (P4) foram submetidas à técnica de concentração por floculação com leite desnatado original (CALGUA et al., 2013a), descrita no item 5.3.1. As amostras de lodo de esgoto (P3) foram processadas utilizando o protocolo modificado (condição A, B, C ou D), que se mostrou mais eficiente no estudo de otimização, descrito no item 5.4.

Todos os concentrados obtidos foram armazenados a -80°C até serem processados, como descrito nos itens 5.3.2 a 5.3.4, para determinar a carga de HAdV e RVA e estimar a taxa de recuperação de PP7.

5.6.3 Caracterização molecular das amostras de adenovírus e rotavírus

As amostras positivas de HAdV e RVA no qPCR foram submetidas a protocolos de PCR convencional (cPCR), seguidos de sequenciamento nucleotídico.

A detecção de HAdV foi realizada pela amplificação parcial do gene que codifica o hexon, a qual apresenta identidade entre os diferentes tipos de HAdV, segundo protocolo descrito por Allard e colaboradores (2001). A presença de RVA foi investigada pela amplificação parcial do gene que codifica a proteína VP6, de acordo com protocolo de Iturriza-Gómara e colaboradores (2002). O quadro 15 mostra os iniciadores utilizados nos protocolos acima citados.

Quadro 15: Iniciadores utilizados no PCR convencional para detecção de adenovírus humano e rotavírus do grupo A.

Vírus	Região do genoma	Iniciador	Sequência (5' a 3') *	Fragmento esperado (pb)
Adenovírus humano	Gene do Hexon	Hex1 (+)	GCCSCARTGGKWCWTACATGCACATC	301
		Hex2 (-)	CAGCACSCCICGRATGTCAAA	
Rotavírus do grupo A	Gene VP6	VP6 (+)	GACGGVGCRACTACATGGT	379
		VP6 (-)	GTCCAATTCATNCCTGGTGG	

* Código de nucleotídeos IUB: S=C/G, R=A/G, K=G/T, W=A/T, V=A/C/G, N=A/C/G/T; VP6: Proteína estrutural 6. (+): Iniciador senso; (-): Iniciador anti-senso; pb: pares de base.

As reações de cPCR e as condições de amplificação utilizadas para detectar HAdV e RVA podem ser observadas, respectivamente, nos quadros 16 e 17.

Os produtos obtidos na cPCR foram purificados a partir do gel de agarose 2%, utilizando o kit comercial (*QIAquick Gel Extraction Kit*[®], Qiagen, EUA). Amostras representativas dos quatro pontos de coleta, cujos produtos purificados apresentavam quantidade adequada de DNA, foram encaminhadas para um serviço de sequenciamento nucleotídico. Neste passo, foram utilizados os mesmos iniciadores descritos nos protocolos de cPCR. Ambas as cadeias foram sequenciadas utilizando o kit *ABI Prism[®] BigDye[™] Terminator Cycle* (Applied Biosystems, EUA) no sequenciador automatizado *ABI Prism 3730* (Applied Biosystems, EUA), seguindo as recomendações do fabricante.

Quadro 16: Reação de PCR convencional e condições de amplificação utilizadas para detecção de adenovírus humano.

Reagentes	Volume (µL)	Condições de amplificação			
		Etapa	Temperatura	Tempo	
Água livre de DNase/RNase*	13,0	40 ciclos	Desnaturação inicial	94°C	2 min.
PCR Master Mix [2x] * ¹	25,0		Desnaturação	94°C	30 seg.
Iniciador Hex1 [25µM] * ²	1,0		Hibridização	60°C	30 seg.
Iniciador Hex2 [25µM] * ²	1,0		Extensão	72°C	1 min.
DNA	10,0		Extensão final	72°C	5 min.
Total	50,0		4°C	Manter	

* Life Technologies[®], EUA; *¹ Promega[®], EUA; *³ Eurofins MWG Operon[®], Alemanha.

Quadro 17: Reação de PCR convencional e condições de amplificação utilizadas para detecção de rotavírus do grupo A.

Reagentes	Volume (µL)	Condições de amplificação			
		Etapa	Temperatura	Tempo	
Água livre de DNase/RNase*	29,2	40 ciclos	Desnaturação inicial	94°C	2 min.
Tampão de PCR sem MgCl ₂ [10X] * ¹	5,0		Desnaturação	94°C	30 seg.
dNTP [2,5mM] * ²	4,0		Hibridização	58°C	30 seg.
MgCl ₂ [50mM] * ¹	1,5		Extensão	72°C	1 min.
Iniciador VP6F [20µM] * ³	2,0		Extensão final	72°C	7 min.
Iniciador VP6R [20µM] * ³	2,0		4°C	Manter	
<i>Taq Polimerase Platinum</i> [5U/µL] * ¹	0,3				
cDNA	6,0				
Total	50,0				

* Life Technologies[®], EUA; *¹ Invitrogen[®], EUA; *² Promega[®], EUA; *³ Eurofins MWG Operon[®], Alemanha.

As sequências obtidas foram alinhadas e montadas utilizando o método CLUSTAL W contido no *BioEdit* 7.2.0 (Hall et al., 1999). As sequências foram comparadas com sequências de nucleotídeos depositadas no *GenBank* e as relações filogenéticas entre as amostras virais foram inferidas com software *MEGA* 6.0.6 (Tamura et al., 2013), utilizando o método de *Neighbor-joining* e o modelo de substituição de nucleotídeos Kimura 2-parâmetros. A confiabilidade dos padrões de agrupamento de ramos foi testada com uma amostragem de 1.000 *bootstrap*.

5.6.4 Viabilidade das partículas de adenovírus

Os experimentos de determinação da viabilidade das partículas de HAdV em efluente tratado, por cultivo celular, foram realizados no Laboratório de Vírus da Universidade Federal de Minas Gerais. Nesta etapa, foram testados todos os concentrados de efluente tratado (P4) positivos para HAdV por qPCR, em 2014.

Os concentrados de efluente tratado (200µL) foram submetidos a três ciclos de sonicação (exposição a ultrassom por 30 segundos, intercalados com banho de gelo de 30 segundos) e centrifugados por 10 minutos a 4.000 x *g* (*Centrifuge* 5430 R, Eppendorf, EUA; Rotor FA-45-48-11, r=95mm), para reduzir a quantidade de leite, devido aos efeitos indesejáveis do mesmo sobre as células, durante o cultivo. A seguir, os sobrenadantes foram centrifugados (20.000 x *g* por duas horas e meia) e os sedimentos foram suspensos em PBS 1X (400µL), substituindo o tampão fosfato utilizado no protocolo de concentração viral. Cada concentrado obtido foi submetido a três ciclos de sonicação e aliquoteado em quatro microtubos (100 µL), sendo dois testados nos ensaios de citotoxicidade e dois nos ensaios de viabilidade.

5.6.4.1 Multiplicação e manutenção das células

Dois linhagens celulares foram utilizadas nos experimentos de cultivo de HAdV: células A549 (epiteliais, originárias de carcinoma alveolar basal humano) e células HEK293 (epiteliais, originárias de carcinoma renal humano transformada por

HAdV-5). Ambas as células foram cultivadas em garrafas de 75 cm², utilizando meio mínimo essencial modificado por *Dulbecco* (DMEM de Eagle, Gibco - Invitrogen, EUA), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), 1 mM de piruvato de sódio, 10 U/mL de penicilina G e 10 µg/mL de sulfato de estreptomicina (JIANG et al., 2009; RIGOTTO et al., 2011). As células foram mantidas a 37°C sob atmosfera de 5% de CO₂, até atingirem uma monocamada confluenta.

5.6.4.2 *Suspensão viral padrão*

Foi utilizada uma suspensão de HAdV do tipo 35 (1,0 x 10⁹ TCID₅₀/mL), gentilmente, cedida pela Dra. Marize Miagostovich do Laboratório de Virologia Ambiental e Comparada da Fiocruz do Rio de Janeiro.

O controle de vírus foi submetido à mesma condição de centrifugação dos concentrados de efluente tratado (20.000 x *g* por duas horas e meia). O sobrenadante e o sedimento (suspenso em PBS 1X) foram utilizados nos ensaios de citotoxicidade e viabilidade.

5.6.4.3 *Ensaio de citotoxicidade*

Para avaliar a citotoxicidade, os concentrados de efluente tratado positivos para HAdV foram submetidos à ação da luz ultravioleta por 30 minutos, seguido de aquecimento a 95°C por 30 minutos, para inativação do vírus.

As células A549 e HEK293 foram cultivadas em placas de 24 cavidades (9,0 x 10⁴ células/mL), até atingirem 90% de confluência. O meio de cultivo foi retirado e sobre elas foi adicionado 100µL do concentrado inativado. As placas foram mantidas a 37°C, em atmosfera de 5% de CO₂, com homogeneização a cada 15 minutos. Após 90 minutos, os concentrados foram aspirados e foi adicionado DMEM, acrescido de 2% de SFB e 1% de antibiótico/antifúngico (meio de manutenção).

As células foram observadas, diariamente, em microscópio invertido para identificar possíveis alterações morfológicas celulares por um período de 72h,

comparando-as com controles celulares (apenas células e meio de manutenção) e virais (células infectadas com diferentes diluições do estoque viral - 10^{-1} a 10^{-5}).

5.6.4.4 *Ensaio de viabilidade de partículas virais*

As células A549 e HEK293 foram cultivadas em placas de 24 cavidades ($9,0 \times 10^4$ células/mL), até atingirem 90% de confluência. O meio de cultivo foi retirado e sobre elas foram adicionados 100 μ L do concentrado de efluente tratado (preparado como descrito no item 5.6.4). Estas células foram mantidas por 90 minutos a 37°C, sob atmosfera de 5% de CO₂, com homogeneização a cada 15 minutos. Após a adsorção, foi adicionado o meio de manutenção e as placas foram mantidas sob as mesmas condições descritas anteriormente (SCHLINDWEIN et al., 2010).

As células foram observadas, diariamente, ao microscópio óptico invertido para visualização do ECP. Controles de células (não infectadas) e controles virais (células infectadas com diferentes diluições do estoque viral - 10^{-1} a 10^{-5}) foram utilizados. Após um período de cinco a sete dias, as amostras foram submetidas a 3 ciclos de congelamento e descongelamento e o sobrenadante foi, novamente, inoculado sendo realizadas duas passagens.

Para confirmar a replicação de HAdV, os sobrenadantes foram extraídos e testados por qPCR, como descrito anteriormente (itens 5.3.2 e 5.3.4.2).

5.6.5 Análise dos parâmetros físico-químicos e microbiológico

Os parâmetros físico-químicos e microbiológico foram avaliados em amostras de esgoto bruto (P1) e efluente tratado (P4) para verificar a eficiência do tratamento de esgoto por lodo ativado, na redução e/ou adequação dos mesmos. Os dados relativos a estes parâmetros foram obtidos em laudos emitidos pelo Laboratório Central da Cesama, que realiza análises quinzenais para os parâmetros físico-químicos (DBO, DQO, óleos e graxas, pH, SS e SST) e mensais para o parâmetro microbiológico (contagem de coliformes termotolerantes).

5.7 Análises estatísticas

Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o software SPSS 13.0 (SPSS® Inc., EUA). Nos estudos de otimização, os dados relativos à carga viral e à taxa de recuperação viral foram analisados pelo teste não paramétrico de *Kruskal-Wallis*, a fim de verificar diferenças entre as condições testadas. Os valores de *rank* foram calculados para cada condição, atribuindo o valor mais alto para a condição mais eficaz.

No estudo de monitoramento viral foram avaliados os dados de carga de HAdV e RVA, ponto de coleta, época de coleta, tipo de amostra, parâmetros físico-químicos e microbiológico. Para verificar se houve associação da carga viral com a época de coleta (seca ou úmida) e com o tipo de amostra (composta ou simples) foi realizado o teste U de *Mann-Whitney*. O teste de *Wilcoxon* foi utilizado para avaliar o impacto do tratamento de esgoto tanto na carga viral, quanto nos parâmetros físico-químicos e microbiológico, comparando-se os resultados observados antes (P1) e após (P4) o tratamento. O teste de qui-quadrado com correção de *Yates* foi aplicado para verificar a associação entre a detecção viral e o fato da amostra de efluente tratado estar dentro ou fora dos limites indicados nas legislações em vigor, referentes ao padrão de lançamento de efluentes em corpos d'água (Tabela 10). Para os parâmetros físico-químicos (P1 a P4) e microbiológico (P1 e P4) foram realizadas, também, análises de correlação com a carga viral, utilizando-se o teste de correlação de *Pearson*. Em todas as análises, valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos.

Quadro 18: Valores limites estabelecidos para os parâmetros físico-químicos e microbiológico no efluente tratado, de acordo com as legislações atuais.

Parâmetros	Limites
Demanda Bioquímica de Oxigênio (mg/L)	< 60*
Demanda Química de Oxigênio (mg/L)	< 180*
Óleos e graxas (mg/L)	< 100* ¹
pH	6 a 9*
Sólidos Sedimentáveis (mL/L)	< 1*
Sólidos Suspensos Totais (mg/L)	< 100*
Coliformes termotolerante (NMP/100mL)	<1000* ²

* Limites determinados pela Deliberação Normativa nº01/2008 do Conselho Estadual de Política Ambiental em conjunto com Conselho Estadual de Recursos Hídricos do estado de Minas Gerais. *¹ Limite determinado pela Resolução nº430/2011 do Conselho Nacional do Meio Ambiente. *²Limite determinado para água doce de classe 2 pela Resolução nº357/2005 do Conselho Nacional do Meio Ambiente.

6 RESULTADOS

6.1 Otimização do protocolo de concentração viral para lodo de esgoto

6.1.1 Avaliação da eficiência das alterações propostas

Os experimentos que testaram as quatro variações do protocolo original de Calgua e colaboradores (2013a) para lodo de esgoto (item 5.4.1) mostraram a presença de inibidores em todas as reações de qPCR realizadas com DNA e cDNA não diluídos. Assim, a carga viral, expressa em cópias de genoma por mililitro (cg/mL), foi definida como a média dos dados obtidos no ensaio de qPCR com DNA e cDNA diluídos (10^{-1} e 10^{-2}). A análise dos controles negativos mostrou a ausência de contaminantes.

A taxa de recuperação do bacteriófago PP7 variou de 12,1% a 16,2% (Tabela 1), sem diferença significativa entre as quatro condições testadas (A - D), independentemente, do tempo de agitação e/ou da concentração final de leite desnatado ($p = 0,459$). Entretanto, a condição C apresentou o maior valor de *rank* no teste estatístico de *Kruskal-Wallis* (8,3), seguido por A, D e B (Tabela 1).

Tabela 1: Eficiência de recuperação de adenovírus humano e bacteriófago PP7 nas quatro condições de concentração por floculação com leite desnatado, a partir de amostras de lodo de esgoto ativado.

Vírus	Condições	Carga viral Inoculada ^a	Carga viral Recuperada ^b	% Recuperação			
				Média	Desvio padrão	Rank ^c	p-Valor
HAdV	A	$1,29 \times 10^4$	$3,24 \times 10^3$	25,1	2,1	2,0	0,016
	B	$1,29 \times 10^4$	$3,86 \times 10^3$	29,9	2,2	5,0	
	C	$1,15 \times 10^4$	$9,65 \times 10^3$	83,9	3,7	11,0	
	D	$1,15 \times 10^4$	$4,96 \times 10^3$	43,1	10,5	8,0	
PP7	A	$5,83 \times 10^{10}$	$8,57 \times 10^9$	14,7	1,5	8,0	0,459
	B	$5,83 \times 10^{10}$	$7,08 \times 10^9$	12,1	3,3	4,6	
	C	$5,13 \times 10^{10}$	$8,33 \times 10^9$	16,2	3,9	8,3	
	D	$5,13 \times 10^{10}$	$6,75 \times 10^9$	13,1	1,2	5,0	

HAdV: Adenovírus humano; PP7: Bacteriófago PP7; A: agitação por 30 minutos e leite desnatado 0,01%; B: agitação por 60 minutos e leite desnatado 0,01%; C: agitação por 30 minutos e leite desnatado 0,02%; D: agitação por 60 minutos e leite desnatado 0,02%; ^a Carga viral inoculada em cópias de genoma/500 μ L; ^b Carga viral recuperada em cópias de genoma/mL

As taxas médias de recuperação de HAdV variaram de 25,1% a 83,9% (Tabela 1) com diferença significativa entre as condições testadas ($p = 0,016$). A taxa mais elevada de recuperação foi observada na condição C, que utilizou um tempo mais curto de agitação em tampão glicina e uma maior concentração final de leite desnatado. O teste de comparação múltipla confirmou este resultado, mostrando que a condição C foi a variação mais eficaz ($Rank = 11,0$) do protocolo original (Tabela 1), sendo denominado, a partir de então, protocolo otimizado para lodo de esgoto.

Não foi possível determinar a carga de RVA no inóculo (controle positivo) utilizado nos experimentos de otimização do protocolo para lodo de esgoto, o que impossibilitou a realização de cálculos e as análises das taxas de recuperação deste vírus.

6.1.2 Validação do protocolo otimizado para lodo de esgoto

Considerando os resultados obtidos no ensaio de qPCR com o cDNA diluído (10^{-1} e 10^{-2}) de todos os concentrados testados, a taxa de recuperação de PP7 variou 8,0 a 26,6%. Na ETE 1, a taxa média de recuperação de PP7 foi de 9,0% nos concentrados obtidos de amostras de lodo ativado coletadas na primeira semana (LAt 1 e 2), 13,8% na segunda semana (LAt 3 e 4), 9,9% na terceira semana (LAt 5 e 6) e 23,2% na quarta semana (LAt 7 e 8) do estudo (Figura 13). Em relação à ETE 2, todas as amostras de lodo foram obtidas na mesma semana. Nesta estação, a taxa média de recuperação de PP7 foi de 26,5% nos concentrados de lodo ativado (LAt 9 e 10), 23,5% nos concentrados de lodo adensado (LAd 1 e 2) e 18,1% nos concentrados de lodo digerido (LD 1 e 2).

O HAdV foi detectado nos concentrados de lodo de esgoto de ambas as ETEs, com carga variando de $1,08 \times 10^4$ a $2,56 \times 10^5$ cg/mL (Figura 13). Na ETE 1, durante as três primeiras semanas do estudo, a carga média de HAdV foi de $4,45 \times 10^4$ cg/mL, entretanto, na última semana de coleta, a concentração viral aumentou três vezes no concentrado lodo ativado 7 (LAt 7 - $1,24 \times 10^5$ cg/mL) e seis vezes no concentrado LAt 8 ($2,56 \times 10^5$ cg/mL). Em relação à ETE 2, cargas semelhantes de HAdV foram detectadas nos concentrados de lodo ativado (LAt 9 a 10 - $1,08 \times 10^4$ a $2,67 \times 10^4$ cg/mL) e de lodo digerido (LD 1 a 2 - $2,07 \times 10^4$ a $2,71 \times 10^4$ cg/mL), enquanto uma

concentração dez vezes maior foi observada nos concentrados de lodo adensado (LAd 1 a 2 - $1,26 \times 10^5$ a $1,65 \times 10^5$ cg/mL).

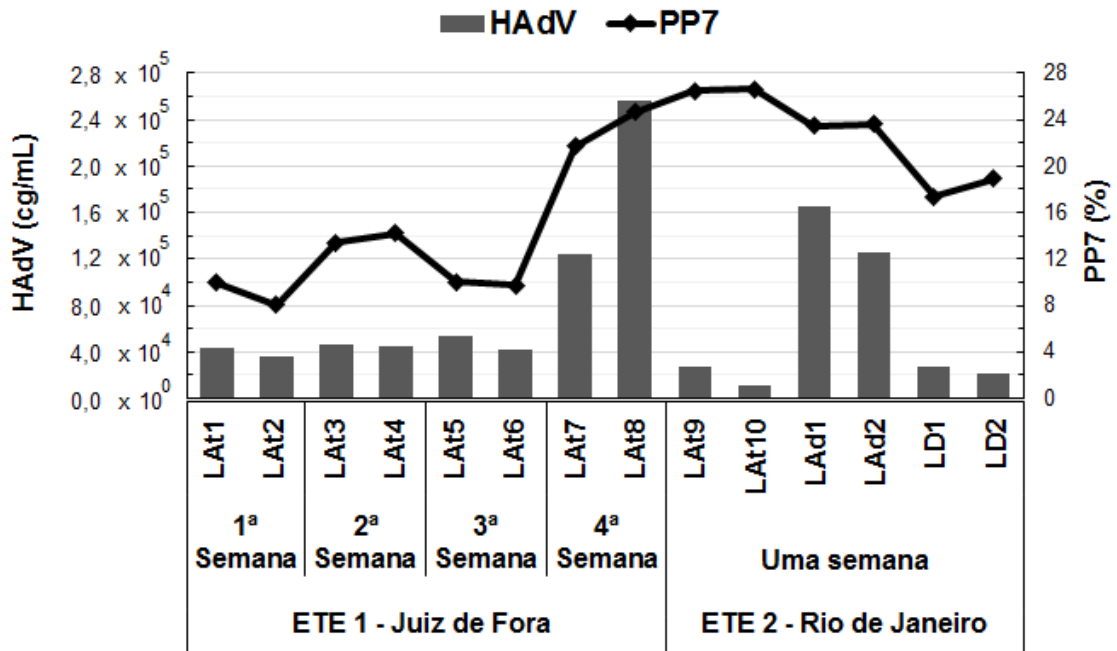


Figura 13: Carga de adenovírus e taxa de recuperação do bacteriófago PP7 obtidas em amostras de lodo de esgoto ativado, adensado e digerido nas Estações de Tratamento de Esgoto de Juiz de Fora e do Rio de Janeiro. cg/mL: cópias de genoma por mililitro; HAdV: adenovírus humano; PP7: bacteriófago PP7; LAt: Lodo ativado; LAd: lodo adensado; LD: lodo digerido. ETE: Estação de tratamento de esgoto.

A carga de RVA foi detectada somente nos últimos ciclos da qPCR e extrapolaram o ponto mais diluídos da curva padrão ($5,53 \times 10^0$ cg/mL). Estes resultados não foram considerados confiáveis e, portanto, foram descartados.

6.2 Otimização do protocolo de concentração viral para efluente tratado

6.2.1 Avaliação da eficiência das alterações propostas

Os experimentos que testaram as quatro variações do protocolo original de Calgua e colaboradores (2013a) para efluente tratado (item 5.5.1) mostraram que

houve inibição em todos os ensaios de qPCR realizados para os HAdV, quando foi utilizado o DNA não diluído. Para RVA e PP7, a carga viral foi estimada pela média dos dados obtidos com cDNA não diluídos e na diluição 10^{-1} , já que com a diluição 10^{-2} não foi possível detectar o genoma. A análise dos controles negativos mostrou a ausência de contaminantes.

As taxas médias de recuperação de HAdV, RVA e PP7 apresentaram diferença significativa entre as condições testadas (A' - D'), mediante as alterações realizadas na etapa de centrifugação e/ou na concentração final de leite desnatado (Tabela 2). O teste de comparação múltipla de médias confirmou que a condição D' (primeira centrifugação não realizada e maior concentração leite desnatado) foi a variação mais eficaz do protocolo original (Tabela 2), sendo denominado, a partir de então, protocolo otimizado para efluente tratado.

Tabela 2: Eficiência de recuperação de adenovírus humano, rotavírus do grupo A e bacteriófago PP7 nas quatro condições de concentração por floculação com leite desnatado, a partir de amostras de efluente tratado.

Vírus	Condições	Carga viral Inoculada ^a	Carga viral Recuperada ^b	% Recuperação			
				Média	Desvio padrão	Rank ^c	p-Valor
HAdV	A'	8,91 x 10 ⁵	2,37 x 10 ⁵	26,5	0,2	1,5	0,037
	B'		2,84 x 10 ⁵	31,9	3,2	4,0	
	C'		4,13 x 10 ⁵	46,4	1,9	6,5	
	D'		6,22 x 10 ⁵	69,8	6,0	9,0	
RVA	A'	5,56 x 10 ⁵	7,02 x 10 ⁴	12,6	3,9	2,0	0,033
	B'		1,16 x 10 ⁵	20,9	5,9	6,0	
	C'		1,17 x 10 ⁵	21,0	3,5	6,0	
	D'		2,70 x 10 ⁵	48,6	5,0	10,0	
PP7	A'	4,46 x 10 ⁷	6,38 x 10 ⁶	14,3	1,2	2,0	0,024
	B'		1,49 x 10 ⁷	33,4	8,4	7,5	
	C'		1,14 x 10 ⁷	25,6	5,6	5,0	
	D'		2,87 x 10 ⁷	64,3	7,7	10,0	

HAdV: Adenovírus humano; RVA: Rotavírus do grupo A; PP7: Bacteriófago PP7; A': 1ª centrifugação a 8000 x g por 30 minutos à 4°C e leite desnatado 0,01%; B: 1ª centrifugação não realizada e leite desnatado 0,01%; C: centrifugação a 8000 x g por 30 minutos à 4°C e leite desnatado 0,02%; D: 1ª centrifugação não realizada e leite desnatado 0,02%; ^a Carga viral inoculada em cópias de genoma/500µL; ^b Carga viral recuperada em cópias de genoma/mL.

6.2.2 Validação do protocolo otimizado para efluente tratado

A taxa média de recuperação de PP7 nos concentrados de efluente tratado foi de 24,4% (18 a 30%), considerando os resultados obtidos no ensaio de qPCR com cDNA não diluído e a com diluição 10^{-1} . Os HAdV e os RVA foram detectados, respectivamente, em 50% (12/24) e em 33,3% (08/24) dos concentrados de efluente tratado (Figura 14). Variações aleatórias foram observadas tanto na carga de HAdV ($2,94 \times 10^3$ a $2,89 \times 10^4$ cg/mL), quanto na carga de RVA ($6,19 \times 10^2$ a $1,54 \times 10^4$ cg/mL), ao longo de todo o período de estudo.

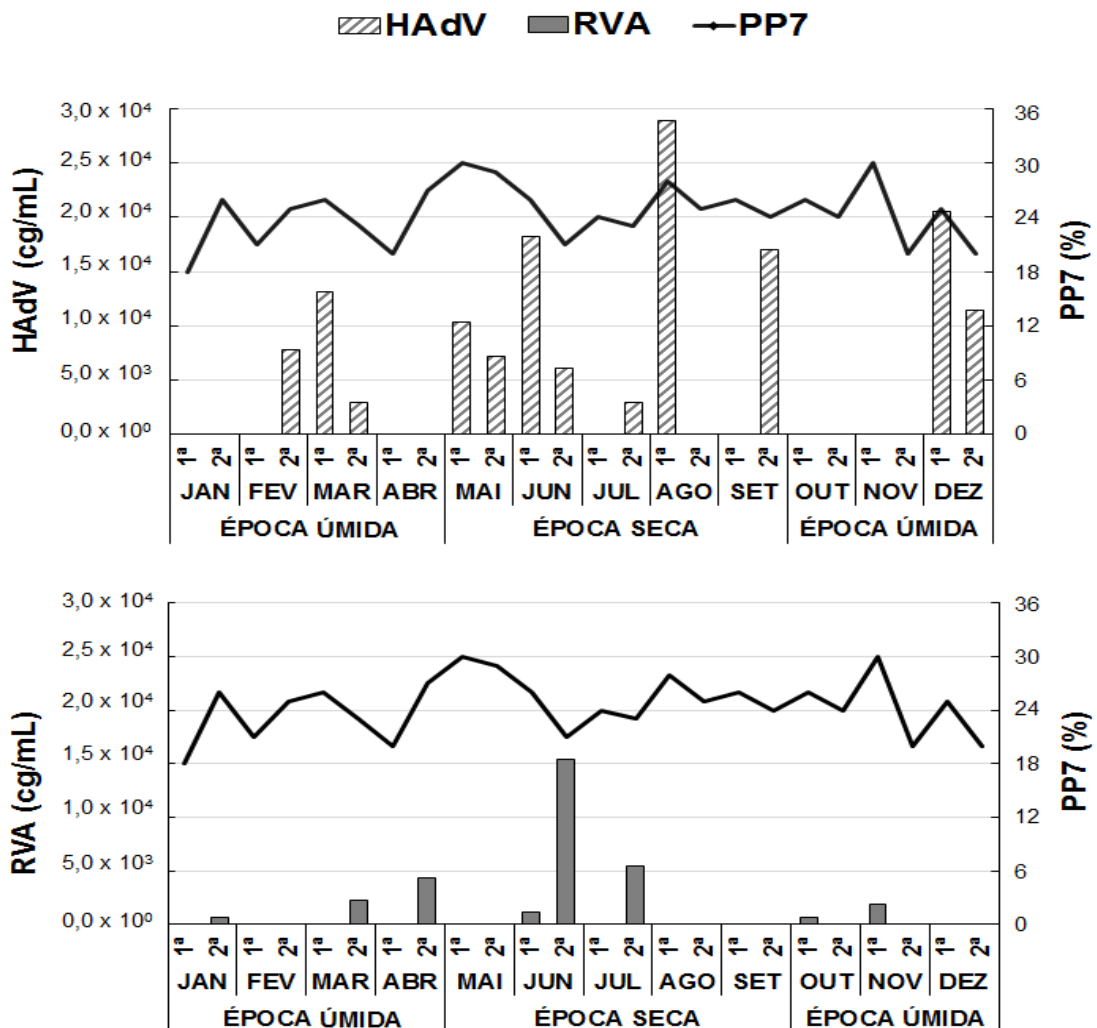


Figura 14: Carga de adenovírus humano e rotavírus do grupo A e taxa de recuperação do bacteriófago PP7 em amostras de efluente tratado obtidas na Estação de Tratamento de Esgoto Barbosa Lage. cg/mL: cópias de genoma por mililitro; HAdV: adenovírus humano; RVA: rotavírus do grupo A; PP7: bacteriófago PP7.

6.2.3 Pesquisa de vírus gigantes em amostra de efluente tratado concentrada pelo protocolo otimizado

O protocolo de concentração viral por floculação com leite desnatado descrito para esgoto bruto inviabiliza a pesquisa de vírus gigantes, que em função do maior tamanho e peso são eliminados com o sedimento, após a primeira etapa de centrifugação (8.000 x g por 30 minutos). Como o protocolo de floculação otimizado para amostras de efluente tratado (item 5.5) dispensa essa etapa de centrifugação, a presença de vírus gigantes foi verificada em uma amostra, para testar a aplicabilidade deste método nas pesquisas destes vírus.

O concentrado não diluído apresentou ECP após 6 dias de inoculação, quando comparada ao controle de célula (Figura 15; A e B). Em uma segunda passagem, após 24 horas, foi possível observar o mesmo ECP, caracterizado pelo arredondamento e lise das amebas, indicando um possível isolado de vírus gigante (Figura 15, C e D).

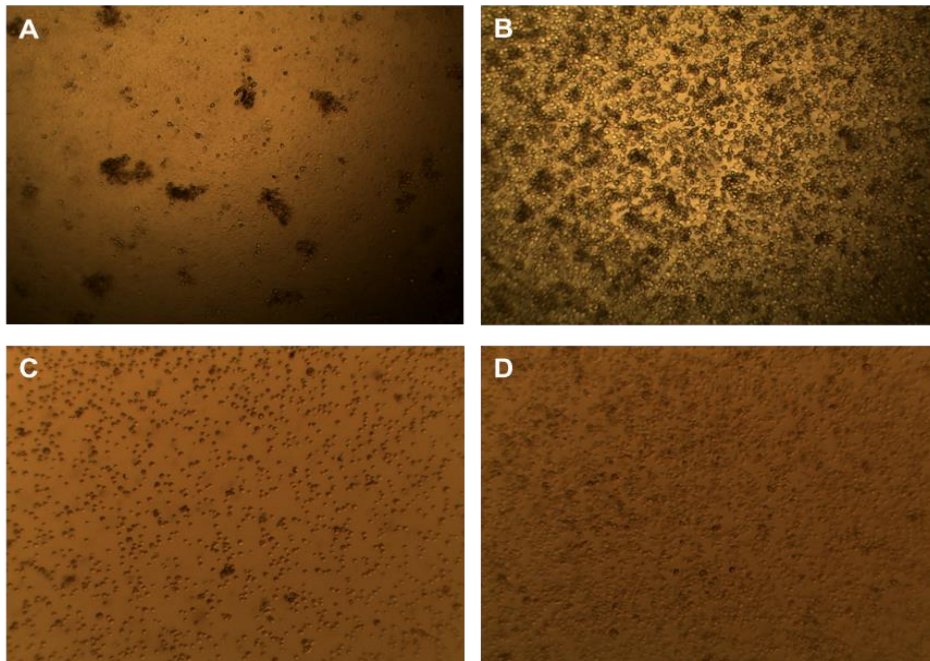


Figura 15: Efeito citopático observado em *A. polyphaga* inoculada com amostra de efluente tratado concentrada pelo protocolo de floculação com leite desnatado otimizado neste estudo. **A** – *A. polyphaga* após seis dias de infecção, na primeira passagem. **B** – *A. polyphaga* inoculada com PBS, após seis dias de cultivo, na primeira passagem. **C** – *A. polyphaga* após 24 horas de infecção, na segunda passagem. **D** – *A. polyphaga* inoculada com PBS, após 24 horas de cultivo, na segunda passagem (aumento 40X).

Os ensaios de PCR em tempo real, realizados com o material coletado na segunda passagem, confirmaram a presença de mimivírus (Figura 16). Os resultados positivos observados tanto para o gene que codifica a proteína 1 do capsídeo (conservada nas linhagens A, B e C), quanto para o gene que codifica a helicase (conservada na linhagem A), sugerem que estes vírus pertencem a linhagem A. Os demais ensaios realizados apresentaram resultados negativos para marseillevírus, pandoravírus e faustovírus.

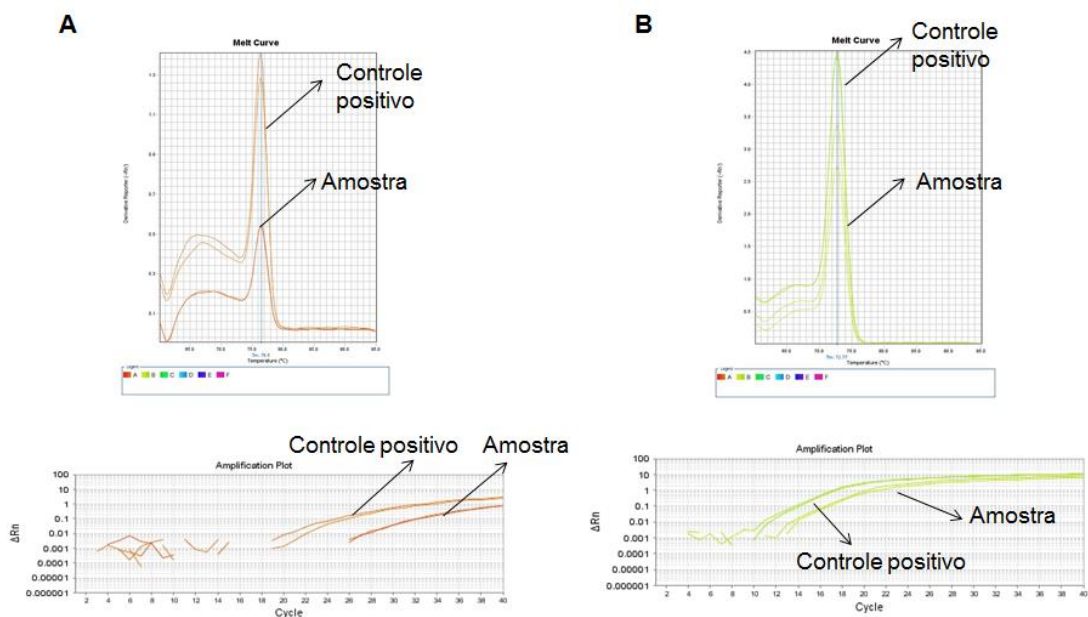


Figura 16: Gráficos obtidos nos ensaios de PCR em tempo real para detecção de mimivírus . **A** – Temperatura de *melting* e curva de amplificação observada no ensaio de detecção do gene que codifica a proteína 1 do capsídeo de mimivírus, conservada nas linhagens A, B e C. **B** – Temperatura de *melting* e curva de amplificação observada no ensaio de detecção do gene que codifica a helicase, conservada em mimivírus da linhagem A.

6.3 Monitoramento de adenovírus e rotavírus

6.3.1 Avaliação da eficiência do método de concentração

No estudo de avaliação da eficiência do método de concentração (item 5.6.1), considerando a análise de inibição, a carga de HAdV foi determinada pela média dos dados obtidos no ensaio de qPCR com DNA não diluído e diluído (10^{-1} e 10^{-2}) em

P1 (esgoto bruto) e P2 (esgoto primário) e com DNA diluído (10^{-1} e 10^{-2}) em P3 (lodo de esgoto) e P4 (efluente tratado). Com relação a RVA e PP7, a carga viral foi obtida com cDNA não diluído e diluído em P1 e P2, apenas com as diluições (10^{-1} e 10^{-2}) em P3 e com cDNA não diluído e diluição 10^{-1} em P4.

Os percentuais de recuperação de HAdV, RVA e PP7 foram superiores a 30% em P1 e P2, ao utilizar o protocolo original descrito por Calgua e colaboradores (2013a). Com o mesmo protocolo foram obtidas as menores taxas de recuperação para os três vírus em P4. Este resultado motivou o desenvolvimento do estudo de otimização do protocolo de concentração viral para amostras de efluente tratado. Embora os resultados obtidos com o protocolo otimizado para efluente tratado tenham sido mais satisfatórios, não foi possível aplicá-lo às amostras do estudo de monitoramento por uma questão de tempo. Em P3, utilizando o protocolo otimizado para lodo de esgoto (condição C), a taxa de recuperação de HAdV foi cerca de três vezes superior àquelas observadas para RVA e PP7 (Tabela 3).

Tabela 3: Eficiência do método de concentração viral na detecção de adenovírus humano, rotavírus do grupo A e bacteriófago PP7 nos pontos de coleta avaliados neste estudo.

Vírus	Ponto	Carga viral Inoculada ^a	Carga viral Recuperada ^b	% Recuperação	
				Média	Desvio padrão
HAdV	1	$6,64 \times 10^5$	$2,61 \times 10^5$	39,3	7,4
	2		$3,25 \times 10^5$	48,9	8,1
	3		$4,23 \times 10^5$	63,7	5,8
	4		$2,83 \times 10^4$	4,2	1,6
RVA	1	$2,90 \times 10^5$	$1,03 \times 10^5$	35,5	6,5
	2		$9,66 \times 10^4$	33,3	4,3
	3		$6,35 \times 10^4$	21,9	2,9
	4		$1,65 \times 10^4$	5,7	2,4
PP7	1	$4,42 \times 10^3$	$2,28 \times 10^3$	51,5	5,4
	2		$1,34 \times 10^3$	30,3	3,3
	3		$1,14 \times 10^3$	25,8	4,5
	4		$5,82 \times 10^2$	13,1	2,5

HAdV: adenovírus humano; RVA: rotavírus do grupo A; PP7: bacteriófago PP7; ^a Carga viral inoculada em cópias de genoma/500 μ L; ^b Carga viral recuperada em cópias de genoma/mL.

6.3.2 Pesquisa de adenovírus e rotavírus

O controle interno (PP7) foi detectado em todos os concentrados avaliados (Figuras 17 e 18), com uma taxa média de recuperação de 28,4% no P1 (10,5% a 53,5%), 30,6% no P2 (12,6% a 61,2%), 34,1% no P3 (13,5% a 66,0%) e 12,4% no P4 (5,5% a 23,5%).

O HAdV foi detectado em 85,4% (82/96) dos concentrados obtidos no período de janeiro a dezembro de 2014, com carga viral mínima de $3,27 \times 10^2$ cg/mL e máxima de $2,42 \times 10^6$ cg/mL. Altas taxas de positividade de HAdV foram detectadas em todos os pontos avaliados neste estudo, sendo de 100% (24/24) no P1, 95,8% (23/24) no P2, 70,8% (17/24) no P3 e 75,0% (18/24) no P4. A carga viral se manteve elevada nos concentrados de P1 ($1,68 \times 10^3$ a $5,14 \times 10^5$ cg/mL), P2 ($6,71 \times 10^2$ a $2,42 \times 10^6$ cg/mL) e P3 ($2,33 \times 10^3$ a $1,74 \times 10^5$ cg/mL), com redução significativa ($p < 0,001$) no P4 ($3,27 \times 10^2$ a $5,03 \times 10^3$ cg/mL) (Figura 17).

A presença de RVA foi detectada em 52,1% (50/96) dos concentrados obtidos durante o estudo de monitoramento, com carga viral variando de $7,82 \times 10^2$ cg/mL a $3,65 \times 10^5$ cg/mL. A taxa de positividade de RVA foi de 58,3% (14/24) nos concentrados de P1, 66,7% (16/24) nos de P2, 45,8% (11/24) nos de P3 e 37,5% (09/24) nos de P4. Valores de carga viral mais elevados foram observados nos concentrados de P1 ($7,82 \times 10^2$ a $4,93 \times 10^4$ cg/mL), P2 ($1,38 \times 10^3$ a $3,65 \times 10^5$ cg/mL) e P3 ($3,84 \times 10^3$ a $4,54 \times 10^4$ cg/mL), com redução significativa ($p = 0,004$) no P4 ($8,61 \times 10^2$ a $1,51 \times 10^4$ cg/mL) (Figura 18).

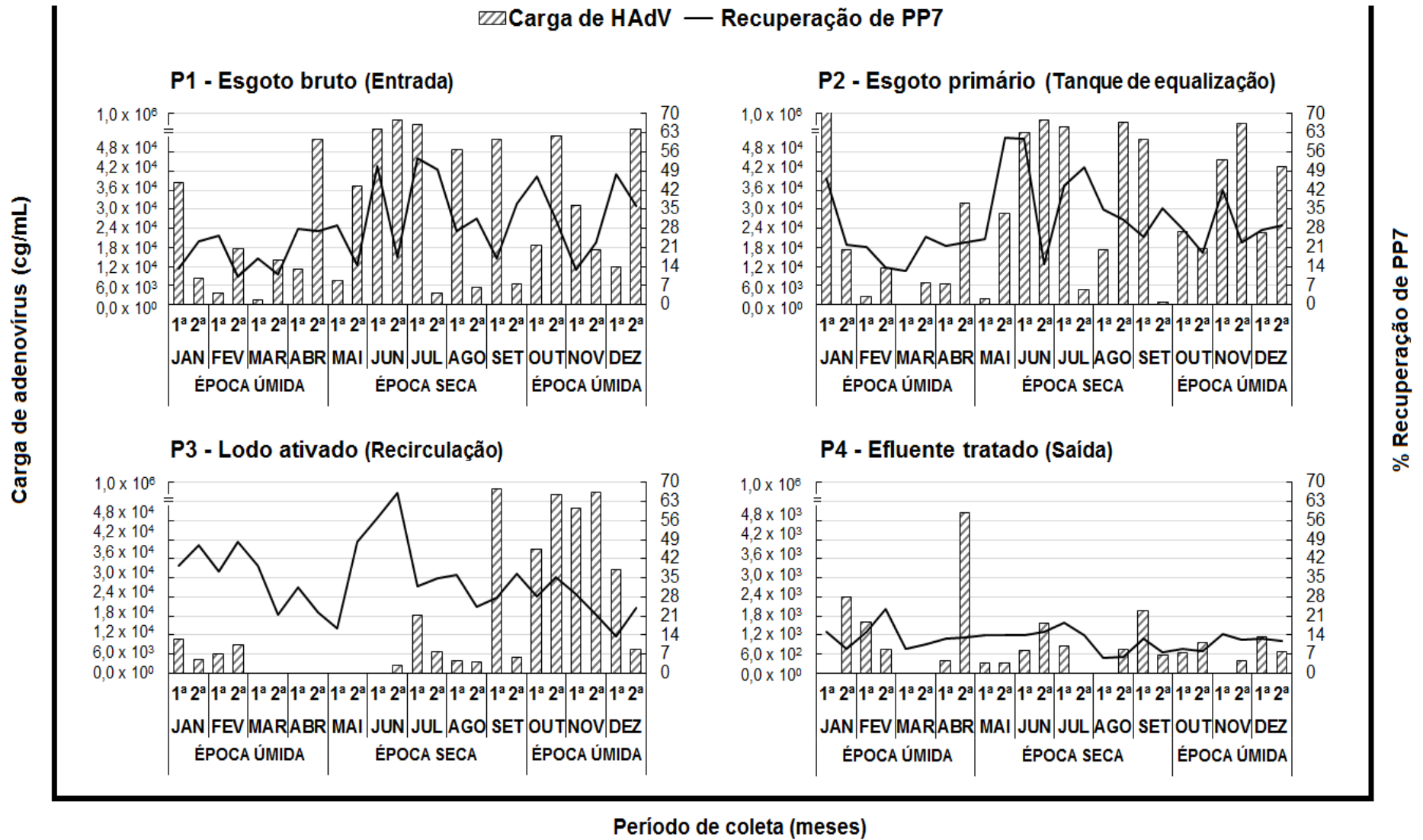


Figura 17: Carga de adenovírus humano e taxa de recuperação de PP7 por época e ponto de coleta. HAdV: adenovírus humano; PP7: bacteriófago PP7; cg/mL: cópias de genoma por mililitro; P1, P2, P3 e P4: pontos de coleta.

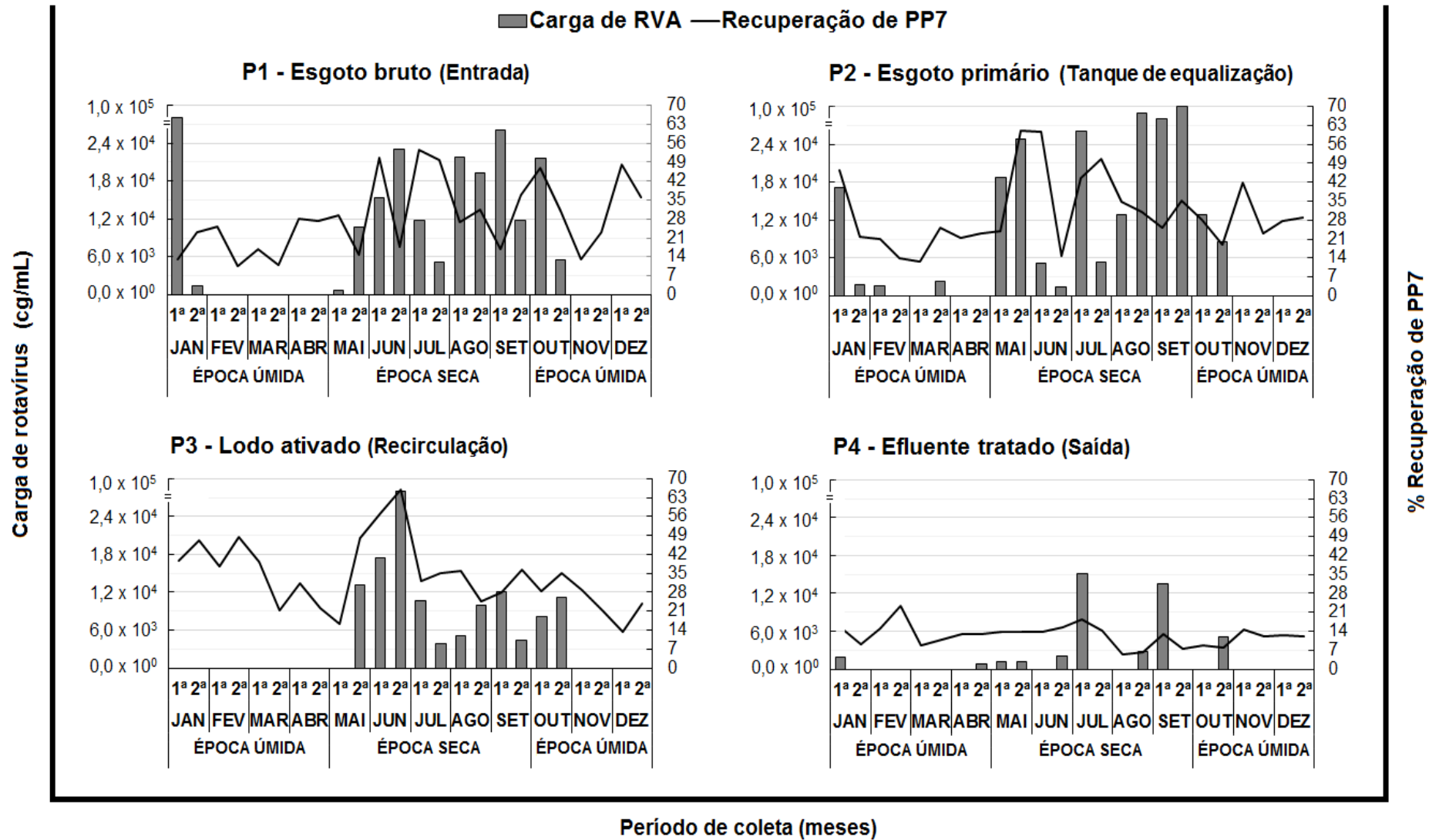


Figura 18: Carga de rotavírus do grupo A e taxa de recuperação de PP7 por época e ponto de coleta. RVA: rotavírus do grupo A; PP7: bacteriófago PP7; cg/mL: cópias de genoma por mililitro; P1, P2, P3 e P4: pontos de coleta.

As médias mensais de temperatura e pluviosidade registradas em Juiz de Fora, durante o período de estudo, confirmaram a ocorrência de dois perfis bem definidos (Figura 19). Na época úmida (outubro a abril) foram registradas temperaturas superiores a 20°C e o índice de pluviosidade variou de 51,5 a 374,2 mm³. Por outro lado, na época seca (maio a setembro) as temperaturas foram inferiores a 20°C e o índice de pluviosidade menor que 33,5 mm³.

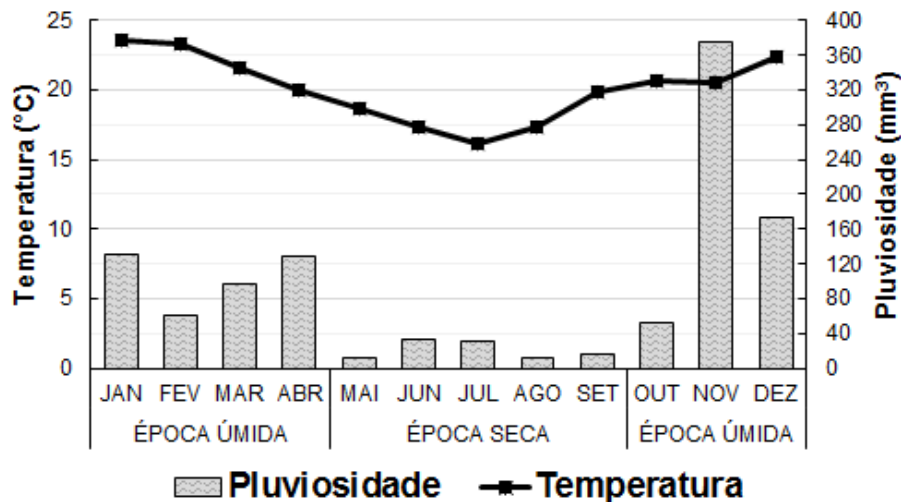


Figura 19: Médias mensais de temperatura e pluviosidade registradas em Juiz de Fora no período de janeiro a dezembro de 2014. °C: graus Celsius; mm³: milímetros cúbicos. Fonte: UFJF, 2016.

Considerando a distribuição da carga de HAdV por época de coleta, em P1, P2 e P4, variações aleatórias da carga viral foram observadas durante todo o ano. No P3, os HAdV não foram detectados durante 7 coletas consecutivas (março a junho), abrangendo meses da época úmida e seca (Figura 17). De modo geral, foi possível detectar a presença do genoma de HAdV e determinar a sua carga, tanto na época úmida ($47/56 = 83,9\%$) quanto na época seca ($35/40 = 87,5\%$), sem associação entre carga de HAdV e época de coleta ($p = 0,885$). A análise da distribuição da carga de RVA por época de coleta mostrou que o maior número de amostras positivas ($70\% = 35/50$) e as cargas virais mais elevadas foram detectadas durante a época seca ($p < 0,001$), indicando a ocorrência de um perfil sazonal (Figura 18).

A tabela 4 mostra a carga de HAdV e RVA detectada nos diferentes pontos de coleta, considerando o tipo de amostras obtidas. Embora tenha sido planejado coletar apenas amostras do tipo composta em P1, P2 e P4, por questões operacionais foi

possível obtê-las em 79,2% (19/24) das coletas em P1 e P4 e em 50% (12/24) das coletas em P2. Em P3, todas as amostras obtidas foram do tipo simples, como proposto inicialmente. O HAdV foi detectado tanto em amostras compostas (46/50 = 92,0%), quanto em amostras simples (36/46 = 78,3%). O mesmo padrão foi verificado para RVA, detectado em 50,0% (28/56) das amostras compostas e 47,8% (22/46) das amostras simples. A análise estatística mostrou que não houve associação entre o tipo de amostra e a carga viral, tanto para HAdV ($p = 0,567$), quanto para RVA ($p = 0,355$).

Tabela 4: Taxa de positividade e carga de adenovírus humano e rotavírus do grupo A detectadas por tipo de amostra nos quatro pontos de coleta.

Vírus	Ponto de coleta	Tipo de amostra	Positividade	Carga viral (cg/mL)	
			%(Positivas/Total)	Mínima	Máxima
Adenovírus humano	P1	Composta	100,0% (19/19)	$3,61 \times 10^3$	$5,14 \times 10^5$
		Simples	100,0% (05/05)	$1,68 \times 10^3$	$3,84 \times 10^5$
	P2	Composta	100,0% (12/12)	$6,71 \times 10^2$	$3,78 \times 10^5$
		Simples	91,7% (11/12)	$1,89 \times 10^3$	$2,46 \times 10^6$
P3	Composta	-	-	-	
	Simples	70,8 % (17/24)	$2,33 \times 10^3$	$1,74 \times 10^5$	
P4	Composta	78,9% (15/19)	$2,37 \times 10^2$	$5,03 \times 10^3$	
	Simples	60,0% (03/05)	$7,46 \times 10^2$	$2,41 \times 10^3$	
Rotavírus do grupo A	P1	Composta	63,1% (12/19)	$7,82 \times 10^2$	$4,23 \times 10^4$
		Simples	40,0% (02/05)	$1,39 \times 10^3$	$4,93 \times 10^3$
	P2	Composta	66,7% (08/12)	$1,38 \times 10^3$	$3,65 \times 10^5$
		Simples	66,7% (08/12)	$1,54 \times 10^3$	$6,10 \times 10^4$
P3	Composta	-	-	-	
	Simples	45,8 % (11/24)	$3,84 \times 10^3$	$4,54 \times 10^4$	
P4	Composta	42,1% (08/19)	$8,16 \times 10^2$	$1,51 \times 10^4$	
	Simples	20,0% (01/05)	$1,83 \times 10^3$	-	

cg/mL: cópias de genoma por mililitro; P1 a P4: pontos de coleta

6.3.3 Caracterização molecular das amostras de adenovírus e rotavírus

As sequências parciais do gene que codifica o hexon foram obtidas para 12 amostras positivas para HAdV. Essas sequências foram comparadas com sequências disponíveis no banco de dados do *GenBank*, considerando representantes das sete espécies de HAdV (A a G). A análise filogenética mostrou que as amostras caracterizadas neste estudo pertencem à espécie F tipo 41 (Figura 20), apresentando elevada identidade nucleotídica entre si (99,98 a 100%). O mesmo foi observado ao comparar estas amostras de HAdV com aquelas detectadas em estudos clínicos (99,97 a 100%) e ambientais (99,95 a 100%).

A análise filogenética da sequência nucleotídica parcial do gene que codifica a proteína VP6 confirmou a presença de RVA em outras 12 amostras da ETE Barbosa Lage, submetidas ao sequenciamento. As sequências obtidas foram comparadas com aquelas disponíveis no *Genbank*, considerando representantes dos 16 genótipos I de RVA. Todas as amostras caracterizadas neste estudo pertencem ao genótipo I1 (Figura 21), com valores de identidade nucleotídica variando de 99,88 a 100%. Valores semelhantes de identidade foram observados ao comparar as amostras deste estudo com outras amostras de RVA de origem clínica (99,58 a 99,97%) e ambiental (98,98 a 99,98%), pertencentes ao genótipo I1.

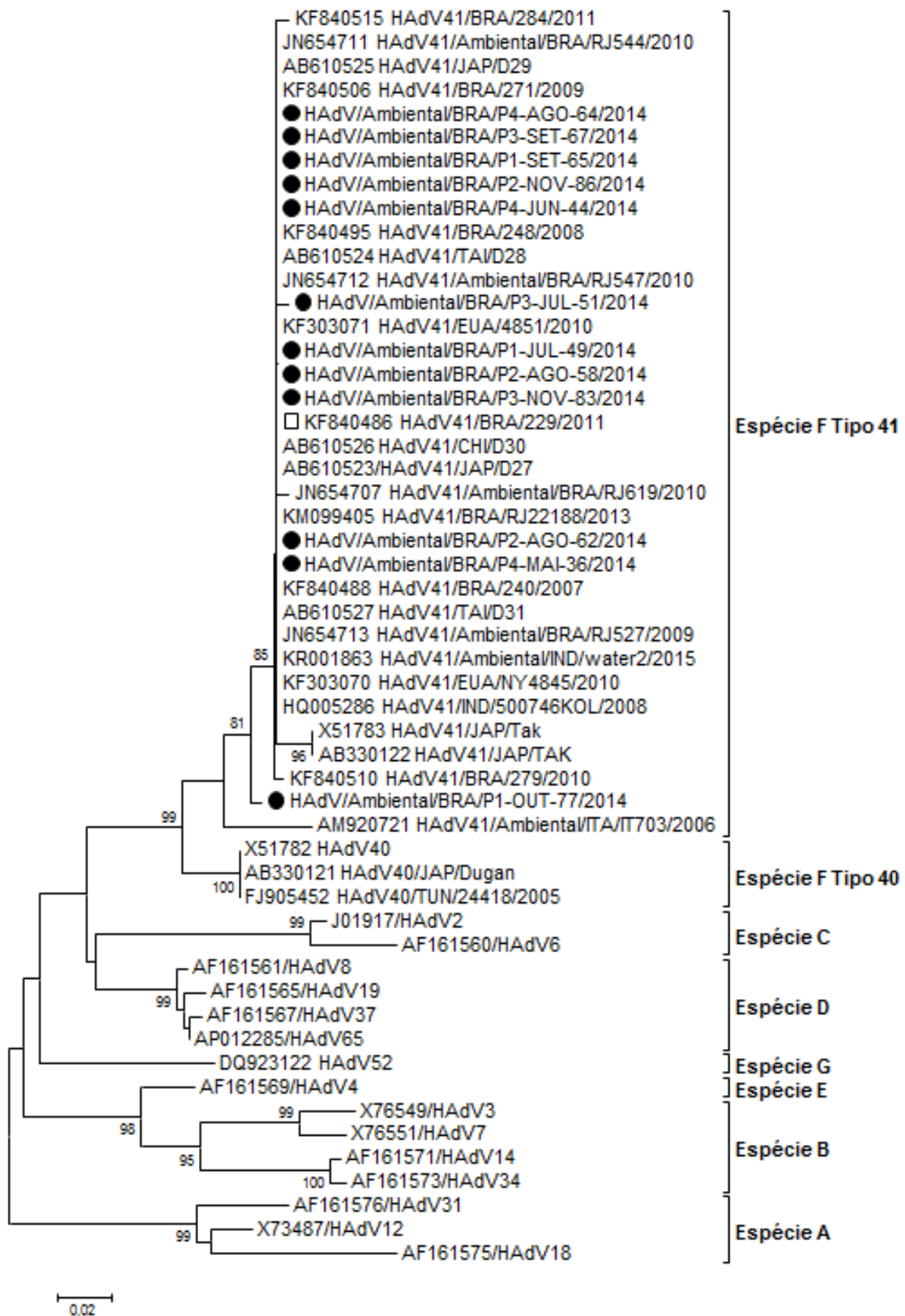


Figura 20: Dendograma filogenético baseado nas sequências nucleotídicas parciais do gene que codifica o hexon em amostras de adenovírus humanos (HAdV). As sequências obtidas neste estudo foram marcadas com um círculo preto e o controle positivo, com um quadrado branco. O número de acesso no *GenBank* foi informado para todas as sequências. Apenas valores de *bootstrap* maiores que 80% foram informados.

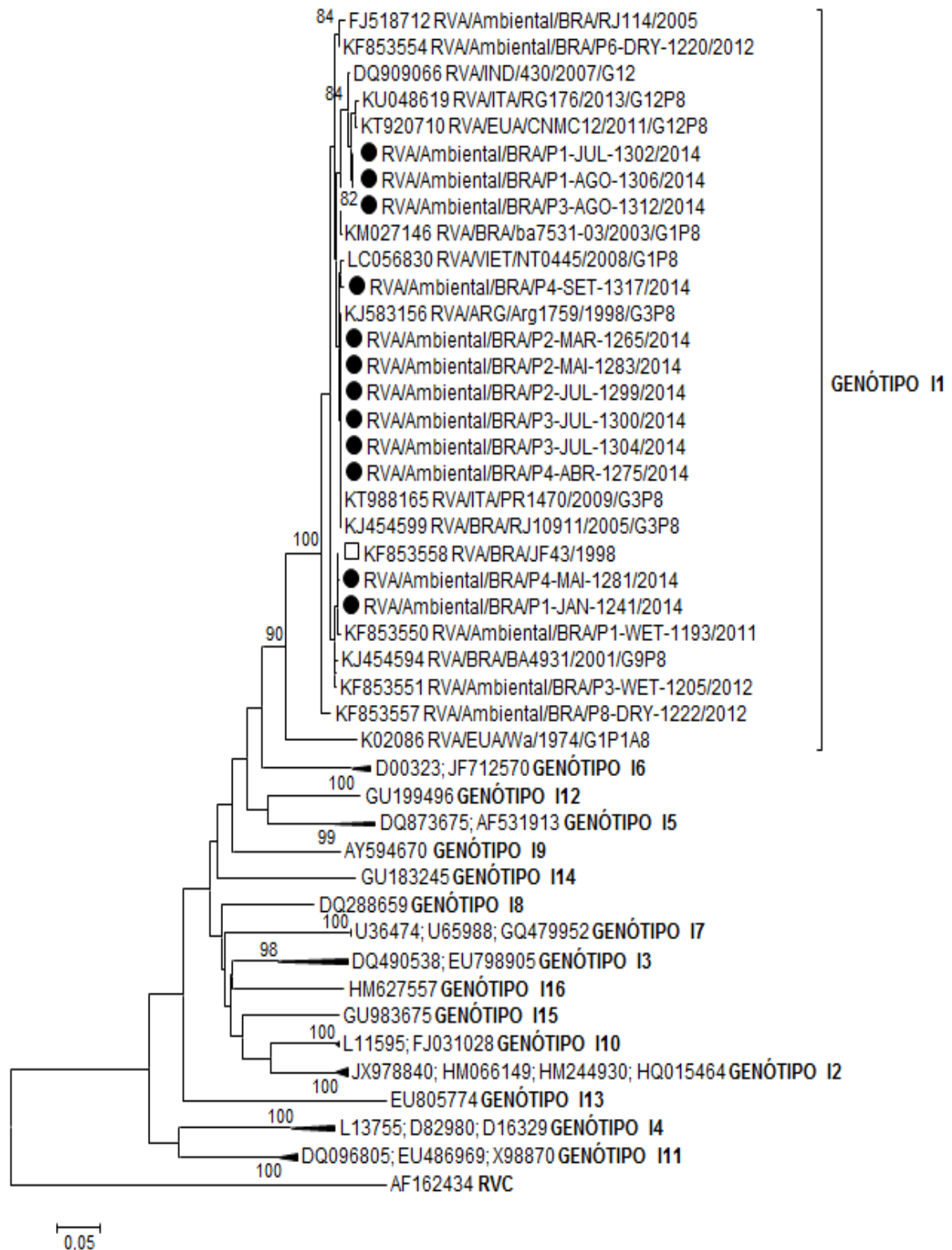


Figura 21: Dendrograma filogenético baseado nas sequências nucleotídicas parciais do gene que codifica a proteína VP6 em amostras de rotavírus do grupo A (RVA). As sequências obtidas neste estudo foram marcadas com um círculo preto e o controle positivo, com um quadrado branco. O número de acesso no *GenBank* foi informado para todas as sequências. No clado do genótipo I1, todas as sequências foram designadas de acordo com a nova nomenclatura proposta por Matthijnssens e colaboradores (2011). Apenas valores de *bootstrap* maiores que 80% foram informados. Uma sequência de rotavírus do grupo C (RVC) foi utilizada como grupo externo.

6.3.4 Viabilidade das partículas de adenovírus em cultivo de células

Na tentativa de reduzir a quantidade de leite no concentrado de efluente tratado e substituir o tampão fosfato utilizado no protocolo de floculação orgânica, todos os concentrados de efluente tratado foram homogeneizados, centrifugados e suspensos em PBS 1X. A solução final obtida de concentrado viral (diluição 1:2) foi dividida em alíquotas e testada nos ensaios de citotoxicidade. O processo de retirada do sedimento de leite e do tampão fosfato, seguida da inativação viral foi eficiente para eliminar o efeito citotóxico, observado, anteriormente, quando as células foram infectadas com o concentrado viral original (dados não mostrados). Em paralelo, alíquotas não inativadas de concentrado viral (diluição 1:2) foram utilizadas nos ensaios de viabilidade de HAdV.

Na primeira passagem, não foram observadas alterações morfológicas nas células A549 e HEK293 inoculadas com os concentrados de efluente tratado, quando comparadas ao controle de célula e ao controle de vírus (dados não mostrados).

Na segunda passagem, o ECP foi observado em células A549, com arredondamento das células e formação de grumos, que tendem a se soltar da monocamada celular (Figura 22). A intensidade do efeito variou entre os concentrados testados, sendo mais discreta em uns e mais pronunciada em outros. Efeito semelhante foi observado no controle viral e não foi observado ECP em células não infectadas.

O ECP foi observado, também, na segunda passagem em células HEK293, onde foram observadas placas de lise, apresentando um aspecto de teia, com posterior desprendimento das células (Figura 23) e formação de grumos.

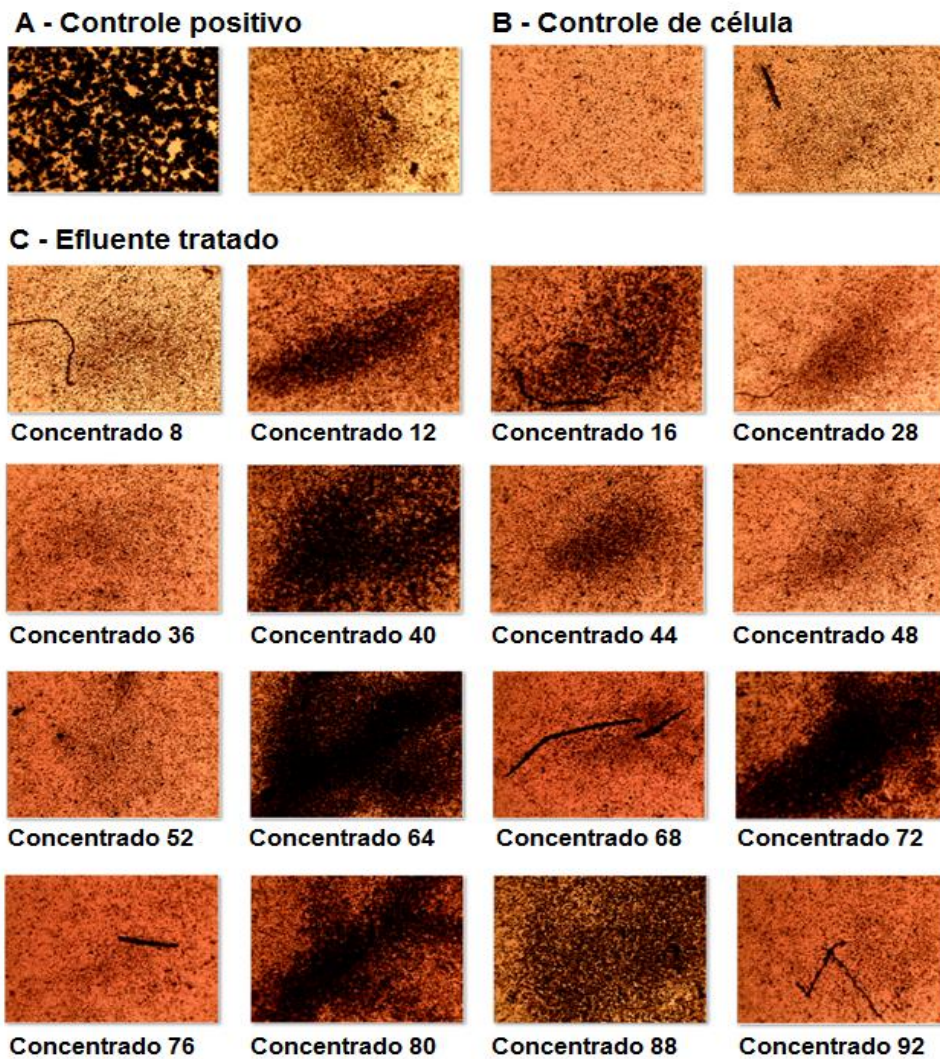


Figura 22: Efeito citopático observado após a segunda passagem do concentrado de efluente tratado em células A549. **A** – Controle positivo (diluições 10^{-2} e 10^{-4}). **B** – Controle de células. **C** – Efluente tratado. Aumento de 4x. Áreas escuras correspondem a acúmulos de células soltas, formando grumos.

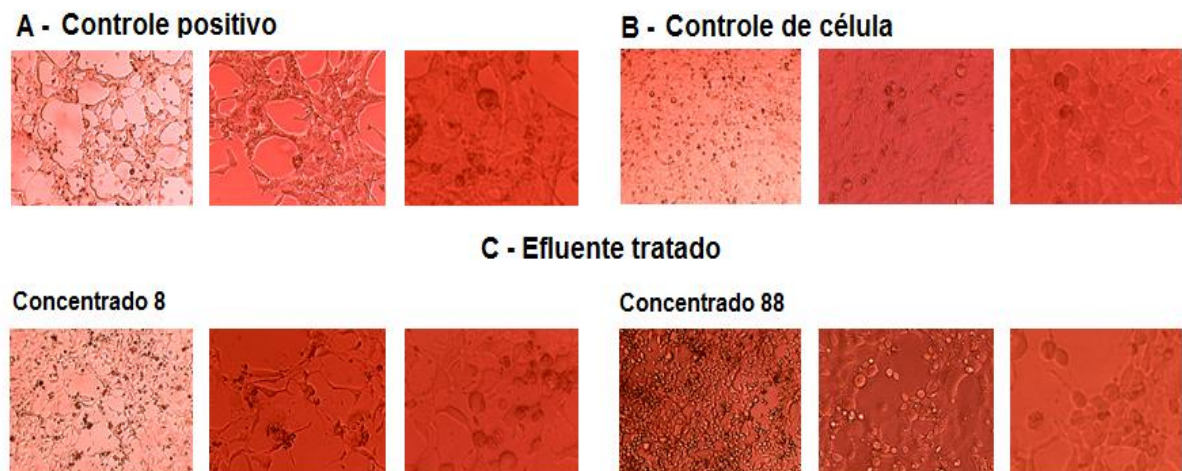


Figura 23: Efeito citopático observado após a segunda passagem do concentrado de efluente tratado em células HEK293. **A** – Controle positivo (diluição 10^{-2}). **B** – Controle de célula. **C** – Efluente tratado. Aumentos de 4x, 10x e 20x. São observadas placas de lise, com aspecto de teia.

A presença de partículas virais infecciosas foi confirmada em 12 dos 16 concentrados de efluente tratado obtidos em 2014, que apresentaram um aumento de até três unidades logarítmicas na carga viral, após a segunda passagem em células A549 (Tabela 5). Apenas em quatro concentrados não foi possível determinar a carga viral, após o cultivo.

Tabela 5: Carga de adenovírus humano detectada nos concentrados de efluente tratado antes e após o cultivo celular.

Concentrado de efluente tratado	Carga de adenovírus humano (cg/mL)	
	Antes do cultivo celular	Após segunda passagem
8	$2,41 \times 10^3$	$1,42 \times 10^4$
12	$1,61 \times 10^3$	$3,49 \times 10^4$
16	$7,46 \times 10^2$	$5,41 \times 10^4$
28	$3,91 \times 10^2$	$1,46 \times 10^4$
36	$3,35 \times 10^2$	Indeterminada
40	$3,27 \times 10^2$	$1,17 \times 10^5$
44	$7,28 \times 10^2$	$2,77 \times 10^4$
48	$1,56 \times 10^3$	$1,48 \times 10^4$
52	$8,75 \times 10^2$	Indeterminada
64	$7,42 \times 10^2$	$2,27 \times 10^5$
68	$1,97 \times 10^3$	$2,33 \times 10^4$
72	$5,55 \times 10^2$	$8,69 \times 10^4$
76	$6,61 \times 10^2$	Indeterminada
80	$9,67 \times 10^2$	$5,63 \times 10^4$
88	$4,08 \times 10^2$	$3,51 \times 10^5$
92	$1,13 \times 10^3$	Indeterminada
Controle de vírus	-	$6,08 \times 10^8$

cg/mL: cópias de genoma por mililitro.

6.3.5 Análise dos parâmetros físico-químicos e microbiológico

Foram avaliados os valores médios \pm desvio padrão, valores mínimo e máximo de demanda bioquímica de oxigênio (DBO), demanda química de oxigênio (DQO), óleos e graxas, pH, sólidos sedimentáveis (SS) e sólidos suspensos totais (SST), obtidos em amostras de esgoto bruto (P1) e efluente tratado (P4) (Tabela 6).

Tabela 6: Valores médios \pm desvio padrão, valores mínimo e máximo dos parâmetros físico-químicos analisados em amostras de esgoto bruto e efluente tratado, no período de janeiro a dezembro de 2014.

Parâmetros	P1 – Esgoto Bruto	P4 – Efluente Tratado
	Média \pm desvio (Mínimo – Máximo)	Média \pm desvio (Mínimo – Máximo)
Demanda bioquímica de oxigênio (mg/L)	217,3 \pm 114,0 (77,0 – 489,0)	52,3 \pm 63,0 (11,0 – 317,0)
Demanda química de oxigênio (mg/L)	441,0 \pm 243,6 (45,0 – 1.000,0)	89,5 \pm 60,9 (3,0 – 250,0)
Óleos e graxas (mg/L)	1124,0 \pm 4091,9 (19,0 – 20.130,0)	113,1 \pm 157,7 (0,62 – 670,0)
pH	7,4 \pm 0,4 (6,8 – 8,7)	7,4 \pm 0,4 (6,4 – 8,0)
Sólidos sedimentáveis (mL/L)	4,7 \pm 2,5 (2,5 – 12,0)	2,9 \pm 3,2 (0,5 – 12,0)
Sólidos suspensos totais (mg/L)	193,8 \pm 84,8 (84,0 – 451,5)	46,5 \pm 42,4 (10,0 – 153,0)

mg/L: miligramas por mililitro; mL/L: mililitros por litro.

Os valores de demanda bioquímica de oxigênio (DBO) e demanda química de oxigênio (DQO) (Figura 24) apresentaram maior oscilação entre as amostras de esgoto bruto (P1) quando comparados com aqueles observados nas amostras de efluente tratado (P4). Valores superiores ao limite fixado para DBO (< 60mg/L) e DQO (< 180mg/L) foram encontrados, respectivamente, em cinco e em duas amostras de P4. Na maioria nas amostras de efluente tratado foi observada uma relação DQO/DBO maior que 2,5, indicando que o tratamento foi eficiente na degradação de matéria orgânica após o tratamento. Em geral, o tratamento de esgoto por lodo ativado apresentou uma média anual de remoção significativa de 77,2% de DBO e 76,9% de DQO ($p < 0,001$ [ambos os casos]), resultados superiores às metas definidas pela legislação, que correspondem, respectivamente, a 70% e 65%.

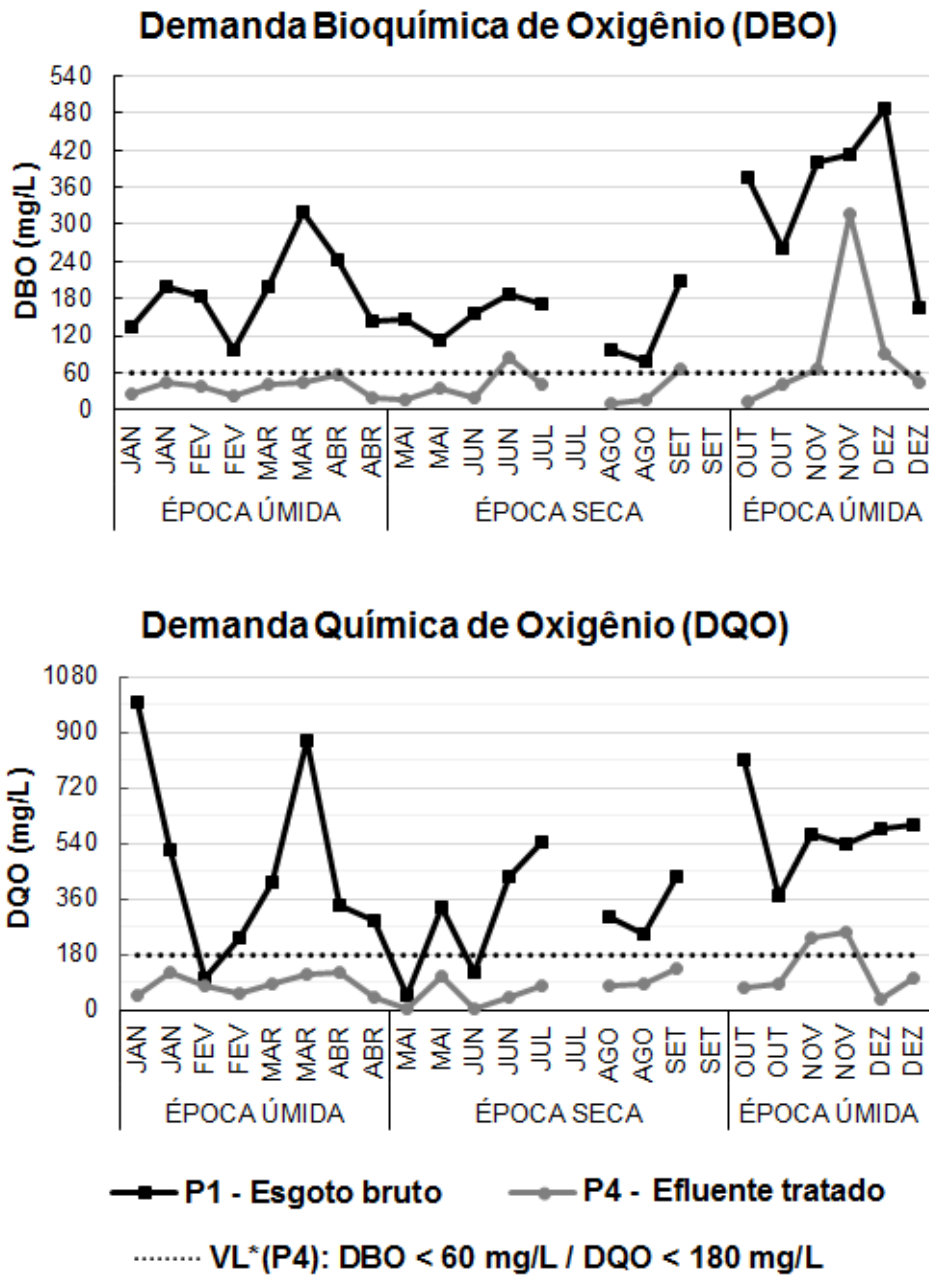


Figura 24: Valores de demanda bioquímica de oxigênio (DBO) e demanda química de oxigênio (DQO) em amostras de esgoto bruto (P1) e efluente tratado (P4), no período de janeiro a dezembro de 2014. VL: Valor limite estabelecido pela legislação; mg/L: miligramas por litro. Nos meses de julho e setembro os dados não foram disponibilizados pela Cesama.

No que diz respeito ao parâmetro óleos e graxas, observou-se grandes oscilações em P1 e P4, com valores extremamente elevados em algumas coletas (Figura 25). Embora esses valores tenham sido reduzidos, significativamente, após o tratamento ($p < 0,001$), 41,7% (10/24) das amostras de P4 excederam o padrão exigido (< 100 mg/L) para lançamento de efluentes tratados em um corpo d'água receptor.

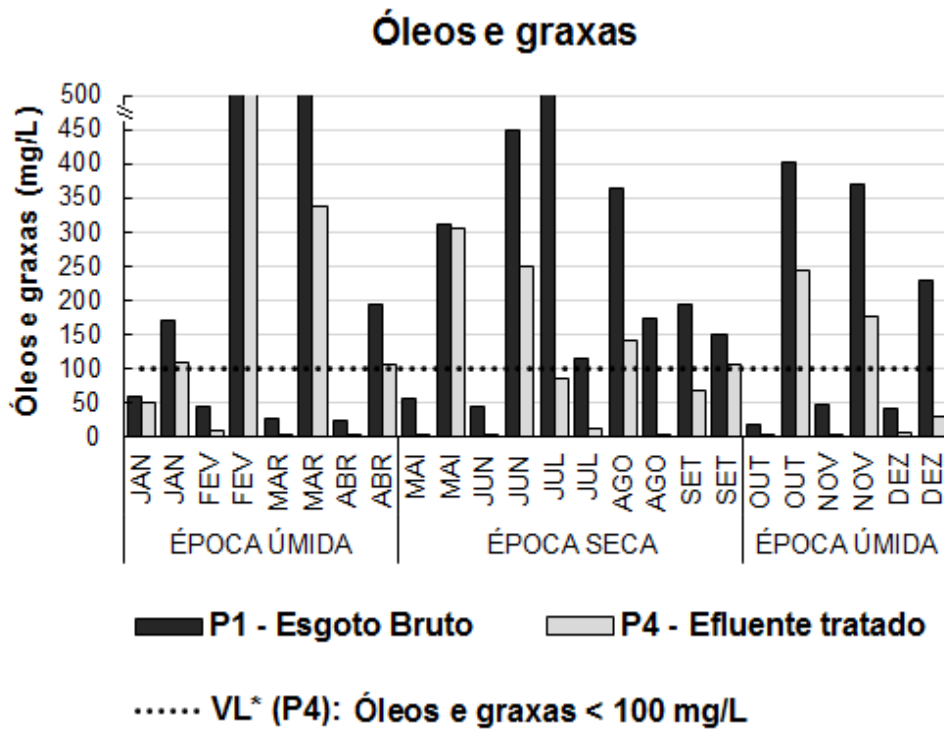


Figura 25: Valores de óleos e graxas em amostras de esgoto bruto (P1) e efluente tratado (P4), no período de janeiro a dezembro de 2014. *VL: Valor limite estabelecido pela legislação; *1 mg/L: miligramas por litro.

Os valores de pH apresentaram discretas variações entre os pontos avaliados neste estudo (Figura 26), não tendo sido verificada uma alteração significativa nestes valores após o tratamento ($p = 0,337$). Todas as amostras encontraram-se dentro do limite estabelecido para pH (6 a 9), apresentando um valor médio de 7,4 nas amostras de P1 e P4.

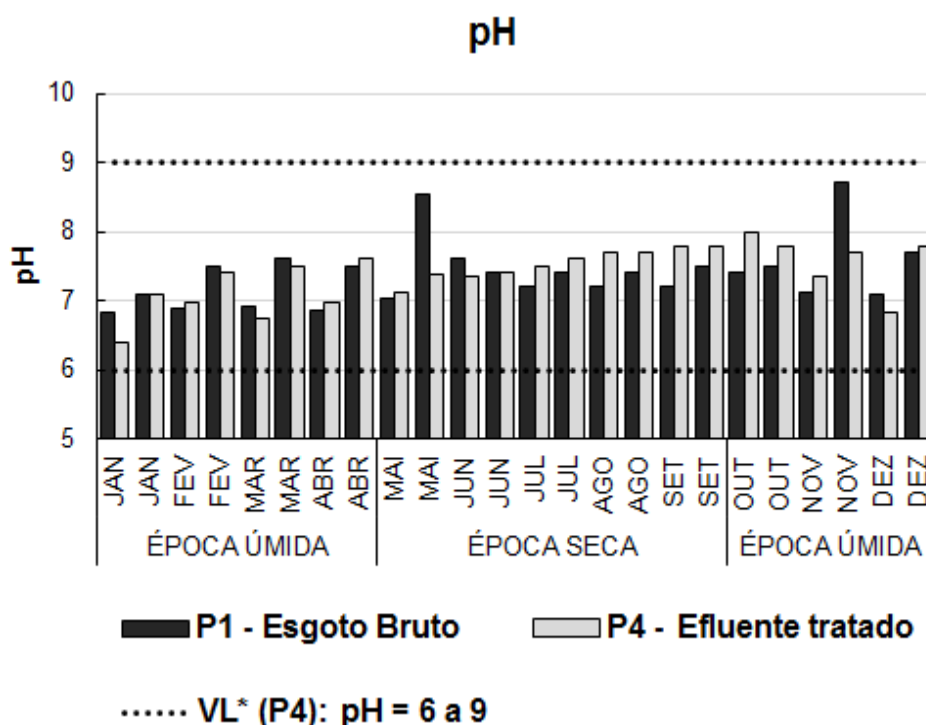


Figura 26: Valores de pH em amostras de esgoto bruto (P1) e efluente tratado (P4), no período de janeiro a dezembro de 2014. *VL: Valor limite estabelecido pela legislação.

O parâmetro sólidos sedimentáveis (SS) apresentou alterações ao longo das coletas, em ambos os pontos avaliados, tendo sido observado que os valores de P4 excederam os valores de P1, em algumas coletas (Figura 27). O tratamento resultou em remoção significativa de SS ($p = 0,027$), garantindo a adequação de 54,2% (13/24) das amostras de P4 aos padrões exigidos para este parâmetro (< 1 mL/L).

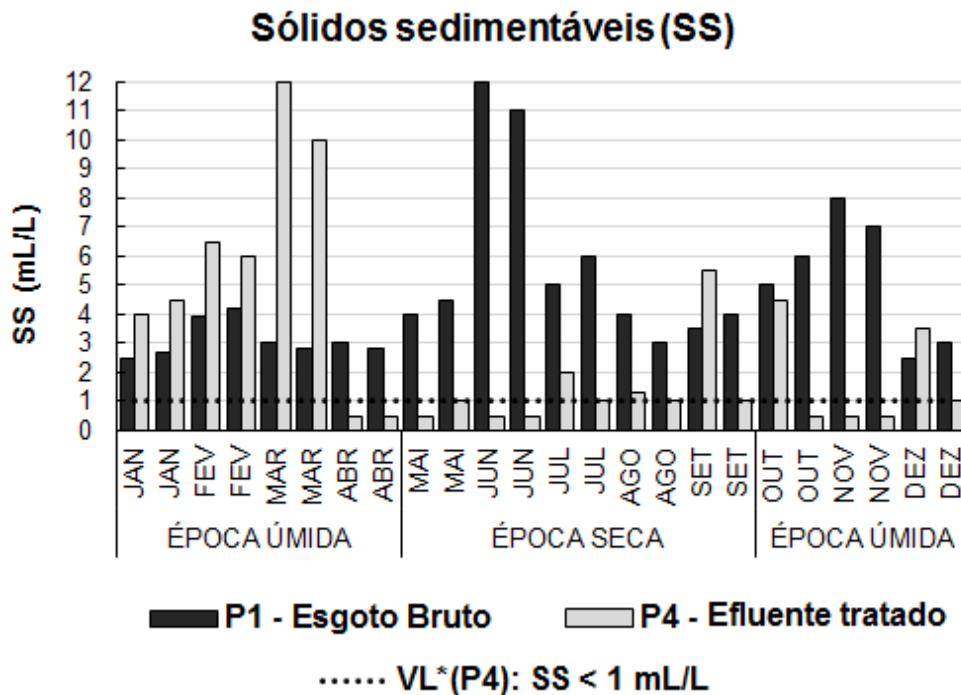


Figura 27: Valores de sólidos sedimentáveis (SS) em amostras de esgoto bruto (P1) e efluente tratado (P4), no período de janeiro a dezembro de 2014. * VL: Valor limite estabelecido pela legislação; ¹ mL/L: mililitro por litro.

Em relação ao parâmetro sólidos suspensos totais (SST) (Figura 28), foi possível observar uma redução significativa ($p = 0,002$) destes valores após o tratamento em todas as coletas, resultando na adequação de 83,3% (20/24) das amostras de P4 ao limite fixado pela legislação (< 100 mg/L).

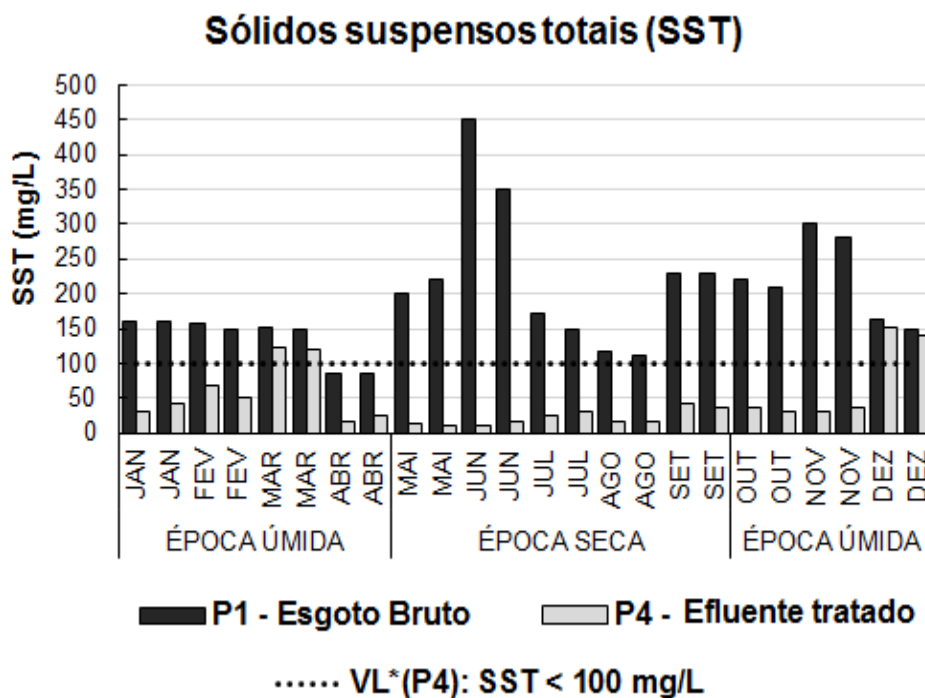


Figura 28: Valores de sólidos suspensos totais (SST) em amostras de esgoto bruto (P1) e efluente tratado (P4), no período de janeiro a dezembro de 2014. *VL: Valor limite estabelecido pela legislação; *1 mg/L: miligramas por litro

Em geral, o tratamento de esgoto permitiu a adequação da maioria das amostras de efluente aos limites estabelecidos na legislação para os parâmetros físico-químicos. No entanto, a presença de HAdV e RVA foi observada tanto nas amostras de efluente tratado que estavam de acordo com os padrões, quanto naquelas que excederam os mesmos, com ausência de associação entre a detecção viral e a adequação do efluente aos parâmetros físico-químicos (Tabela 7). Essa avaliação não foi realizada para pH, visto que todas as amostras estavam dentro do limite estabelecido.

Ao avaliar todas as amostras de esgoto (P1, P2, P3 e P4), independente da etapa de tratamento realizada, a análise quantitativa apontou a existência de correlações positivas entre a carga viral e os parâmetros DQO, SS e SST (Tabela 7).

Tabela 7: Resultados das análises qualitativa e quantitativa realizadas entre a carga viral e os parâmetros físico-químicos.

Parâmetros físico-químicos	Análise qualitativa		Análise quantitativa	
	HAdV	RVA	HAdV	RVA
Demanda bioquímica de oxigênio	$p = 0,869$	$p = 0,962$	$p = 0,386$ $r = 0,134$	$p = 0,585$ $r = 0,085$
Demanda química de oxigênio	$p = 0,936$	$p = 0,494$	$p = 0,002^*$ $r = 0,449^{*1}$	$p < 0,001$ $r = 0,450$
Óleos e graxas	$p = 0,633$	$p = 0,831$	$p = 0,930$ $r = -0,013$	$p = 0,571$ $r = -0,084$
pH	-	-	$p = 0,556$ $r = -0,087$	$p = 0,608$ $r = -0,076$
Sólidos sedimentáveis	$p = 0,594$	$p = 0,665$	$p = 0,027$ $r = 0,318$	$p = 0,305$ $r = 0,151$
Sólidos suspensos totais	$p = 0,584$	$p = 0,784$	$p = 0,002$ $r = 0,443$	$p = 0,010$ $r = 0,367$

^{*}Valor de $p < 0,05$, considerado significativo; ^{*1}r: coeficiente de correlação de Pearson; HAdV: adenovírus humano; RVA: rotavírus do grupo A.

No que diz respeito ao parâmetro microbiológico, a contagem de coliformes termotolerantes em P1 variou de $4,6 \times 10^6$ a $1,8 \times 10^7$ NMP/100mL, enquanto em P4 a variação foi de $1,0 \times 10^4$ a $8,7 \times 10^5$ NMP/100mL (Figura 29). Estes resultados mostraram que o tratamento de esgoto por lodo ativado reduziu a contagem de coliformes em duas unidades logarítmicas, com eficiência média de remoção de 97,9% ($p = 0,005$). No entanto, todas as amostras de efluente tratado excederam os padrões considerados adequados (1000NMP/100mL) para o seu lançamento no Rio Paraibuna. A contagem de coliformes termotolerantes e a carga de HAdV e RVA variaram, aleatoriamente, nas amostras de P1 e P4, tendo sido observada a ausência de correlação entre essas duas variáveis, tanto para HAdV ($r = 0,248$; $p = 0,292$), quanto para RVA ($r = 0,344$; $p = 0,138$).

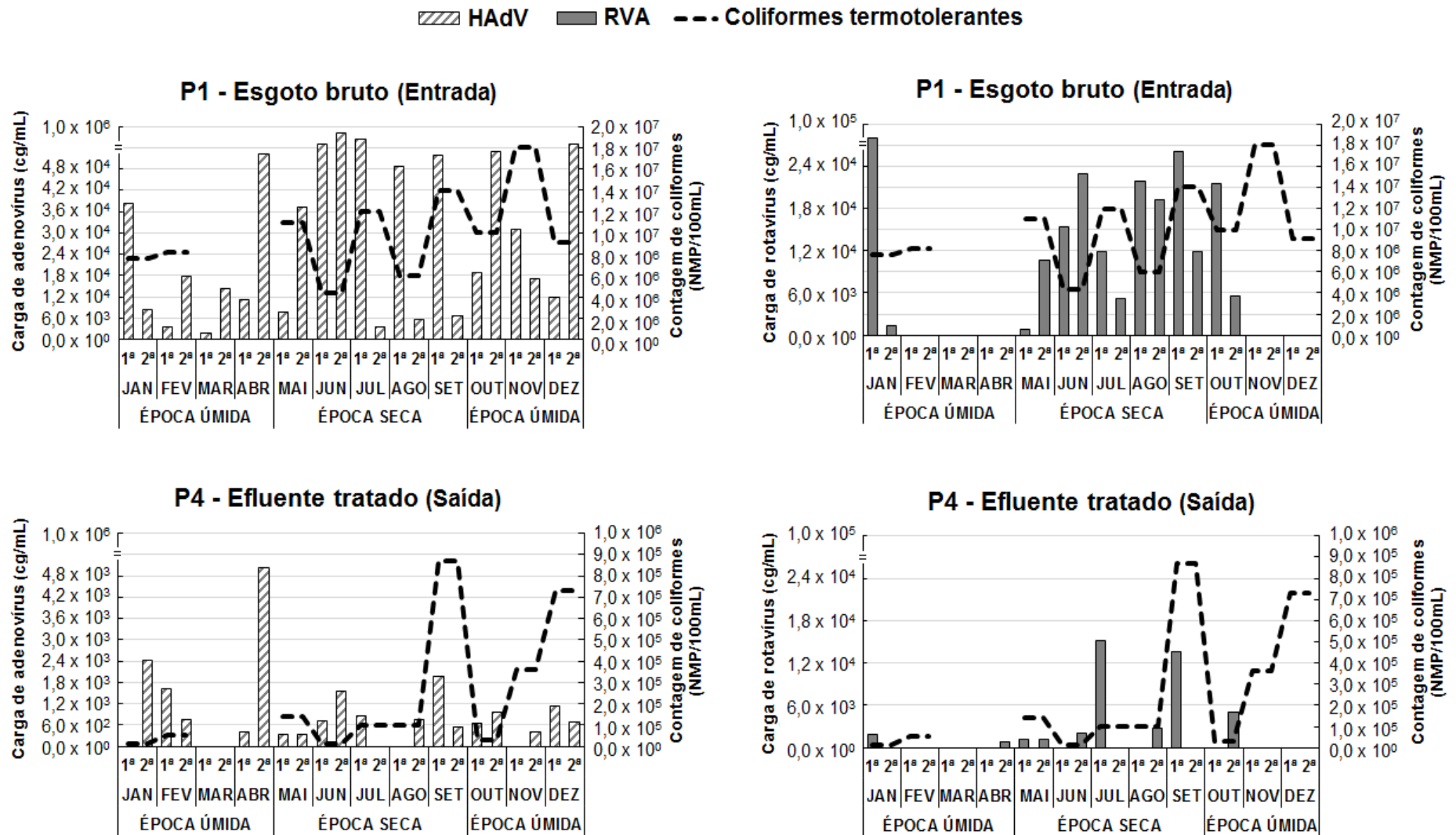


Figura 29: Contagem de coliformes termotolerantes e carga de adenovírus humano e rotavírus do grupo A obtidas em amostras de esgoto bruto (P1) e efluente tratado (P4), no período de janeiro a dezembro de 2014. cg/mL: cópias de genoma por mililitro; NMP/100mL: número mais que provável por 100 mililitros. Nos meses de março e abril os dados não foram disponibilizados pela Cesama.

7 DISCUSSÃO

7.1 Otimização do protocolo de concentração viral para lodo de esgoto e efluente tratado

O tratamento e a disposição final do lodo de esgoto e do efluente tratado são etapas essenciais no gerenciamento de uma ETE, principalmente, considerando o grande incentivo à utilização do lodo na agricultura e à reutilização de águas residuárias, tanto sob o aspecto ambiental, quanto econômico (SINGH e AGRAWAL, 2008; WANG et al., 2008; ROSARIO et al., 2009). Por outro lado, o reconhecimento da presença de patógenos virais humanos entéricos capazes de resistir aos processos de tratamento (VIAU e PECCIA, 2009; WONG et al., 2010; PRADO et al., 2014) é preocupante, pois o retorno destes subprodutos ao solo e/ou aos corpos d'água pode conferir risco de contaminação ambiental, com potenciais implicações para a saúde pública. Diante da necessidade de se estabelecer um manejo seguro para o lodo de esgoto e o efluente tratado, mais estudos de monitoramento viral nestas matrizes precisam ser desenvolvidos e impulsionados.

Nos dois estudos de otimização, a utilização de um controle interno (PP7) permitiu o monitoramento das etapas envolvidas na concentração e detecção viral, confirmando a ausência de resultados falso negativos, como observado em estudos anteriores (MORALES-MORALES et al., 2003; RAJAL et al., 2007a,b, PRADO et al., 2013; FUMIAN et al., 2013). Em geral, as taxas de recuperação de PP7 e RVA foram menores do que a observada para HAdV, o que provavelmente está relacionado com a menor estabilidade do RNA genômico de PP7 e RVA e com as perdas associadas à etapa de síntese de cDNA.

A diluição do ácido nucleico, antes da etapa de amplificação, garantiu resultados mais robustos na quantificação viral, corroborando outros estudos (GIRONES et al., 2010; CALGUA et al., 2013a,b; PRADO et al., 2013). Nos experimentos realizados com lodo de esgoto, a presença de inibidores potenciais da qPCR foi evidenciada nas amostras não diluídas, tanto para o vírus de DNA, quanto para os vírus de RNA. Tal fato reflete a composição do lodo, que tende a apresentar

maior concentração de substâncias inibidoras, exigindo a utilização de amostras diluídas (10^{-1} and 10^{-2}) para a obtenção de valores mais precisos de quantificação viral (ROCK et al., 2010). O mesmo perfil foi observado nas amostras de efluente tratado para o vírus de DNA, enquanto os vírus de RNA foram quantificados apenas nas amostras não diluídas e em sua menor diluição (10^{-1}). É provável que essa diferença seja atribuída à menor carga viral presente no efluente tratado, que pode ter sido influenciada pela diluição realizada na etapa de síntese de cDNA.

Nos estudos já realizados com lodo, várias técnicas de concentração viral foram utilizadas, algumas adaptadas de metodologias desenvolvidas para esgoto bruto e tratado (SANO et al., 2003; GUZMÁN et al., 2007; SCHLINDWEIN et al., 2010; CALGUA et al., 2013a; MYRMEL et al., 2015). A maioria dessas técnicas requer insumos mais caros e/ou infraestrutura laboratorial mais sofisticada (KATAYAMA et al., 2008; FUMIAN et al., 2010; FUMIAN et al., 2013; PRADO et al., 2011).

Neste estudo (itens 5.4 e 6.1), alterações foram propostas no método de floculação orgânica (CALGUA et al., 2013a), considerando a importância de se dispor de uma técnica economicamente mais acessível para estudos no lodo. Sabendo que essa matriz apresenta alta concentração de matéria orgânica e cargas virais mais elevadas do que o esgoto bruto (PRADO et al., 2014), inicialmente, as amostras de lodo foram diluídas em um volume maior de tampão. Essa modificação foi realizada com intuito de facilitar a eluição das partículas virais adsorvidas aos sólidos suspensos, além de reduzir a concentração de inibidores presentes na amostra (ROCK et al., 2010).

A alteração no tempo de agitação foi realizada considerando que um período mais prolongado poderia favorecer a liberação de um número maior de partículas e, conseqüentemente, um aumento na taxa de recuperação viral. No entanto, os resultados mostraram que o maior tempo de agitação não resultou em um efeito positivo. É provável que a maior exposição ao tampão básico (pH 9,5), tenha afetado a integridade das partículas virais, reduzindo a eficiência do processo de concentração.

A modificação na concentração de leite desnatado foi testada, levando em conta que uma quantidade maior de partículas virais poderiam ser adsorvidas na presença de mais flocos. Os resultados obtidos no estudo mostraram que o aumento na concentração do leite desnatado aumentou a eficiência de recuperação, independentemente do período de agitação.

A análise geral das alterações propostas nesta primeira etapa do estudo apontou a condição C como a melhor estratégia de concentração de HAdV em amostras de lodo, garantindo uma elevada taxa de recuperação viral (83,9%). Esse resultado merece destaque quando comparado com as taxas de recuperação observadas em estudos realizados com técnicas mais onerosas, como a ultracentrifugação (7,3%) e a eluição com extrato de carne (4,2%) (PRADO et al., 2014). Outras metodologias já foram utilizadas em pesquisas de agentes virais no lodo, dentre elas a descrita pela Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (United States Environmental Protection Agency - USEPA, 2003), a precipitação por polietilenoglicol (LEWIS e METCALF, 1988) e a eluição enzimática (SANO et al., 2003). No entanto, a maioria desses estudos não disponibiliza informações sobre a taxa de recuperação viral, o que impossibilita comparações de eficiência com o método utilizado neste trabalho.

Inicialmente, a técnica de floculação orgânica com leite desnatado foi proposta para a concentração de HAdV em água do mar artificial e natural, com uma taxa média de recuperação de 52% e 49%, respectivamente (CALGUA et al., 2008). A seguir, a técnica foi adaptada para amostras de esgoto bruto (CALGUA et al., 2013a) e água doce (CALGUA et al., 2013b), com taxas de recuperação de HAdV variando de 30 a 95% e 22 a 29%, respectivamente. Logo, a eficiência do protocolo otimizado neste estudo, também, se destaca por superar ou estar próxima daquelas observadas em pesquisas realizadas com outras matrizes aquáticas, demonstrando a flexibilidade do protocolo de floculação orgânica.

A eficiência do protocolo otimizado foi confirmada no estudo de campo realizado com diferentes tipos de lodo de esgoto (itens 5.4.2 e 6.1.2), mostrando que todos os concentrados avaliados estavam naturalmente contaminados com HAdV. Na ETE de Juiz de Fora, foi observada uma maior quantidade de cópias de genoma de HAdV nos concentrados obtidos na quarta semana de coleta. Esses resultados podem refletir uma maior prevalência da infecção por HAdV ou um efeito da diluição de inibidores, pelo grande volume de chuva coletado junto com o esgoto. Segundo dados oficiais da Defesa Civil do município de Juiz de Fora, nos três dias que antecederam a quarta semana de coleta foram registrados 60 mm³ de chuva, após um período de estiagem de 28 dias. De maneira semelhante ao observado para HAdV, as maiores taxas de recuperação de PP7, também, foram registradas na quarta semana de coleta,

reforçando a hipótese da diluição de inibidores pelo volume de chuva, como descrito em estudo anterior realizado em Manaus (MIAGOSTOVICH et al., 2008).

O protocolo otimizado também permitiu a detecção de HAdV nos concentrados de lodo ativado obtidos na ETE do Rio de Janeiro. As menores cargas detectadas nesta planta devem ser interpretadas com cautela, pois a mesma foi monitorada em uma única semana. Embora, as duas ETEs avaliadas utilizem o mesmo processo de tratamento, o lodo ativado gerado em cada estação de tratamento pode apresentar características distintas, atribuídas às particularidades da composição e ao volume do esgoto bruto a ser tratado (VON SPERLING, 2014).

O estudo mostrou que o protocolo otimizado possibilitou a detecção de HAdV, também, em lodo de esgoto adensado e digerido. Tais tipos de lodo são considerados de maior complexidade, tendo em vista a adição de polieletrólitos e o processo de estabilização por digestão, que tendem a tornar a detecção viral mais difícil. De fato, neste trabalho foi observada uma redução de cerca de uma unidade logarítmica na carga de HAdV detectada nos concentrados de lodo adensado, quando comparada com o lodo digerido. Resultado semelhante foi descrito, anteriormente, para enterovírus (MONPOEHO et al., 2004), mostrando que o processo de digestão está associado a uma redução da carga viral. As variações observadas na recuperação de PP7 na ETE do Rio de Janeiro, provavelmente, refletem as características distintas das amostras de lodo ativado, adensado e digerido.

A recuperação de PP7 pode indicar a provável utilidade deste protocolo para detecção de outros vírus entéricos humanos de RNA. No entanto, estudos futuros devem ser conduzidos para uma melhor avaliação sobre a taxa de detecção dos mesmos.

Em relação ao efluente tratado, as baixas taxas de recuperação viral observadas no estudo de monitoramento, quando se utilizou a técnica de concentração descrita para esgoto bruto (CALGUA et al., 2013a), motivou o estudo de otimização do protocolo original, buscando melhorar os resultados obtidos nesta matriz (itens 5.5 e 6.2).

A primeira modificação avaliou a necessidade de centrifugação da amostra de efluente tratado, no estágio inicial do processo de concentração. De fato, observou-se que a não realização desta etapa aumentou as taxas de recuperação dos três vírus pesquisados (HAdV, RVA e PP7). Como as partículas virais que persistem no efluente tratado tendem a estar associadas a pequenos materiais coloidais (TEMPLETON et

al., 2008; OKOH et al., 2010), é provável que a centrifugação contribua para a perda destas partículas, eliminando-as juntamente com o sedimento. Os resultados indicaram que a primeira centrifugação pode ser dispensada, pois o baixo teor de sólidos em suspensão presentes nestas amostras não afetou as etapas seguintes do protocolo de concentração. Além disso, a presença destes sólidos pode favorecer a adsorção das partículas virais (TEMPLETON et al., 2008; OKOH et al., 2010) e, conseqüentemente, a sua recuperação no final do processo.

A segunda alteração foi realizada para avaliar o efeito da concentração final de leite desnatado na eficiência do protocolo. Como observado com as amostras de lodo, anteriormente, a solução mais concentrada de leite desnatado favoreceu a adsorção de um número maior de partículas virais, aumentando a taxa de recuperação de HAdV, RVA e PP7, principalmente, quando a centrifugação não foi realizada. Esse resultado é importante, pois aumenta a chance de detecção destes patógenos, especialmente, quando se considera a menor carga viral observada em amostras de efluente tratado (FUMIAN et al., 2011, 2013).

Na análise conjunta das alterações, a condição D' foi a estratégia mais eficiente de concentração viral, permitindo as maiores taxas de recuperação de HAdV (69,8%), RVA (48,6%) e PP7 (64,3%). Uma busca extensiva na literatura mostrou que HAdV e RVA já foram pesquisados em amostras de efluente tratado usando diferentes técnicas de concentração viral, tais como ultracentrifugação (FUMIAN et al., 2011, 2013), adsorção e eluição em membrana carregada negativamente (KATAYAMA et al., 2008; FERREIRA et al., 2009; FONG et al., 2010; HATA et al., 2013; PRADO et al., 2011; KITAJIMA et al., 2014; ADEFISOYE et al., 2016) e precipitação por polietilenoglicol (AW e GIN, 2010; MYRMEL et al., 2015), que pode ser precedida de eluição com extrato de carne (BOFILL-MAS et al., 2006; SDIRI-LOULIZI et al., 2010; HASSINE-ZAAFRANE et al., 2015). Dentre todos estes estudos, a recuperação de HAdV foi descrita apenas por Boffil-Mas e colaboradores (2006), com taxas de eficiência variando de 2 a 25%, um resultado bem inferior ao observado neste estudo. Outras comparações entre a eficiência do protocolo otimizado para efluente tratado e os demais métodos de concentração viral não foram possíveis, devido a inexistência de dados sobre as taxas de recuperação de HAdV e RVA nestes estudos.

A eficiência do protocolo otimizado para efluente tratado foi confirmada no estudo de campo realizado com amostras coletadas em 2015, na ETE de Juiz de Fora. A carga de HAdV foi semelhante àquela observada em estudos de monitoramento

realizados no Brasil (PRADO et al., 2011; FUMIAN et al., 2013), no Japão (HATA et al., 2013) e na Espanha (BOFILL-MAS et al., 2006) que, no entanto, utilizaram metodologias de concentração viral de alto custo. Por outro lado, com relação aos RVA, tanto o percentual de positividade, quanto a carga viral foram menores quando comparados com estudos anteriores (FUMIAN et al., 2011; PRADO et al., 2011; KITAJIMA et al., 2014; HASSINE-ZAAFRANE et al., 2015). Além das diferenças nos métodos de concentração utilizados, essa variação observada na carga de RVA pode refletir a circulação destes vírus nas populações testadas.

A presença de vírus gigantes na amostra de efluente tratado, concentrada pelo protocolo otimizado, mostrou que o mesmo pode ser aplicado com sucesso, também, nas pesquisas destes vírus (itens 5.5.3 e 6.2.3). Esse resultado merece destaque, visto que a maioria dos métodos de concentração inviabiliza a detecção de alguns vírus gigantes, como os mimivírus e os marseillevírus, que são eliminados junto com o sedimento, após centrifugação a 3.000 x g por cinco minutos. Outra característica da concentração por floculação orgânica que torna o protocolo otimizado adequado à pesquisa é o fato do mesmo não envolver etapa de filtração, considerada como o principal impedimento para o isolamento viral, já que a maior parte dos vírus gigantes ficam retidos em poros de 0,2 µm (LA SCOLA et al., 2003).

A técnica de floculação orgânica é mais rápida, fácil e econômica, quando comparada com as demais técnicas utilizadas para concentração viral em efluente tratado. Os resultados satisfatórios observados neste estudo indicaram que o protocolo otimizado para efluente tratado é uma alternativa promissora, não apenas para a detecção vírus menores como HAdV e RVA, mas também para pesquisa de vírus gigantes. Tal fato mostra o potencial de utilização deste protocolo em pesquisas de prospecção destes últimos, principalmente, considerando o grande repertório genético dos mesmos, ainda não totalmente explorado. Desde o primeiro relato de isolamento de mimivírus (LA SCOLA et al., 2003), muitos vírus gigantes já foram detectados em diferentes tipos de amostras ambientais, bem como em amostras clínicas (LA SCOLA et al., 2008; ARSLAN et al., 2011; SAADI et al., 2013; CAMPOS et al., 2014; DORNAS et al., 2014a; SCHEID et al., 2014; ANDRADE et al., 2015; RETENO et al., 2015). A maioria destes estudos tem demonstrado um alto percentual de positividade de vírus gigantes em amostras de solo, água e esgoto, destacando a sua ubiquidade no ambiente (PAGNIER et al., 2013; CAMPOS et al., 2014; DORNAS et al., 2014a,b; RETENO et al., 2015).

Os ECP de arredondamento e lise de amebas, observados após o cultivo da amostra, são bem característicos e já foram descritos para todos os vírus gigantes que parasitam amebas do gênero *Acanthamoeba spp.* (PAGNIER et al., 2013; CAMPOS et al., 2014; RETENO et al., 2015). Os resultados positivos observados nas reações de qPCR, utilizando alvos distintos, indicaram que o mimivírus detectado neste estudo, provavelmente, pertence à linhagem A, a mais frequente encontrada nos estudos brasileiros (DORNAS et al., 2014a,b; ANDRADE et al., 2015). A detecção de mimivírus no efluente tratado mostrou que estes vírus também podem resistir ao processo de tratamento de esgoto por lodo ativado, como observado em um estudo realizado na Lagoa da Pampulha, em Belo Horizonte. Neste estudo, os mimivírus foram detectados em 44% das amostras avaliadas, sugerindo que nem mesmo um processo químico pode ser suficiente para eliminar esses vírus da água (DORNAS et al., 2015).

7.2 Monitoramento de adenovírus e rotavírus

Os estudos de monitoramento de vírus entéricos em ETEs são fundamentais para avaliar a circulação destes patógenos no ambiente e na população (BOSCH et al., 2008; AW e GIN, 2010; FUMIAN et al., 2011). Além disso, estes estudos podem gerar informações sobre o desempenho dos processos de tratamento de esgoto na remoção de vírus, principalmente, considerando que o tratamento secundário, predominantemente utilizado nos municípios brasileiros, não garante a completa eliminação de patógenos (GERBA e PEPPER, 2014). No que diz respeito aos vírus entéricos, vários trabalhos já descreveram a sua resistência aos processos de tratamento de esgoto (FONG et al., 2010; FUMIAN et al., 2010; PRADO et al., 2011) e a ausência de associação entre estes vírus e os indicadores bacterianos utilizados para monitorar a qualidade microbiológica da água (MORESCO et al., 2012; VIEIRA et al., 2012; ASSIS et al., 2015). Esta realidade é preocupante, pois o retorno do lodo e/ou do efluente à natureza, ainda que tratado, pode resultar na introdução destes patógenos humanos nos corpos de água superficiais e/ou no solo, contribuindo para a contaminação ambiental.

No estudo de avaliação da eficiência do método de concentração (itens 5.6.1 e 6.3.1), a combinação desses protocolos com técnicas moleculares de detecção permitiu a recuperação de HAdV, RVA e PP7 nas diferentes etapas do tratamento de esgoto. O protocolo de floculação orgânica descrito para amostras de esgoto bruto (CALGUA et al., 2013a) apresentou resultados satisfatórios (taxa de recuperação viral > 30%) quando aplicado em amostras de esgoto bruto (P1) e primário (P2). Por outro lado, ao concentrar amostras de efluente tratado (P4) com este mesmo protocolo foram observadas baixas taxas de recuperação para HAdV (4,2%), RVA (5,7%) e PP7 (13,1%). Esse resultado pode ser explicado pela maior fragilidade do sedimento obtido no final do processo de concentração das amostras, facilmente perturbado durante o descarte do sobrenadante, o que pode ter levado à perda de partículas virais. Embora o protocolo otimizado para efluente tratado tenha aumentado as taxas de recuperação viral, o mesmo só foi realizado após o estudo de monitoramento, não tendo sido aplicado nas amostras de 2014, o que provavelmente implica em cargas virais subestimadas em P4. Nas amostras de lodo (P3), a utilização do protocolo otimizado garantiu uma taxa considerável de recuperação de HAdV, RVA e PP7, especialmente, considerando a maior dificuldade de trabalhar com vírus de RNA. Em conjunto, estes resultados mostram que a taxa de recuperação viral não depende apenas dos métodos de concentração e detecção utilizados, mas também do tipo de amostra (ALBINANA-GIMENEZ et al., 2009; HARAMOTO et al., 2009; HMAIED et al., 2016), apontando a importância de se adaptar os protocolos, de acordo com as características da amostra, para melhorar o seu rendimento.

O uso de controle interno e a diluição do ácido nucleico, antes da etapa de amplificação, foram estratégias importantes para a obtenção de resultados confiáveis. O PP7 foi detectado em todas as amostras avaliadas no estudo de monitoramento, com taxas médias de recuperação semelhantes àsquelas observadas na avaliação de eficiência do método para cada ponto de coleta. Vale ressaltar, entretanto, que a taxa média de recuperação de PP7 observada no estudo de monitoramento em P4 (12,4%) poderia ter sido maior, se o protocolo otimizado para efluente tratado tivesse sido utilizado.

Durante o estudo de monitoramento (itens 5.6 e 6.3), um alto percentual de positividade de HAdV (85,4%) foi verificado nos concentrados de esgoto, corroborando resultados observados em ETEs de São Paulo (SANTOS et al., 2004; BARRELLA et al., 2009), Florianópolis (SCHLINDWEIN et al., 2010) e Rio de Janeiro

(PRADO et al., 2010; FUMIAN et al., 2013), nos quais a taxa de detecção viral variou de 71 a 100%. A detecção de RVA em 52,1% dos concentrados de esgoto avaliados foi semelhante a resultados anteriores, quando taxas de positividade variando de 32,2 a 50% foram descritas em pesquisas realizadas em outras ETEs no Brasil (FERREIRA et al., 2009; PRADO et al., 2011), na China (HE et al., 2011) e na França (ARRAJ et al., 2008). Por outro lado, taxas de detecção de RVA superiores a 70% já foram relatadas em outras ETEs brasileiras (FUMIAN et al., 2011; PRADO et al., 2011), bem como nos Estados Unidos (KITAJIMA et al., 2014) e na Tunísia (HASSINE-ZAAFRANE et al., 2015). Percentuais de positividade de RVA maiores foram observados em estudos realizados apenas com amostras de esgoto bruto, com taxas variando de 85,7 a 100% (VILLENA et al., 2003; FUMIAN et al., 2010; BARRIL et al., 2015). Esses resultados foram obtidos utilizando-se diferentes metodologias e, por isso, podem sofrer influência de fatores ambientais distintos. Embora tal fato dificulte comparações, juntos estes resultados reforçam a importância do desenvolvimento de estudos de monitoramento em diferentes regiões para avaliar a disseminação desses vírus no ambiente (KIULIA et al., 2015).

A detecção de HAdV e RVA nas amostras de esgoto obtidas na ETE Barbosa Lage aponta a circulação destes vírus na população de Juiz de Fora, uma vez que os mesmos são excretados nas fezes de indivíduos infectados, sintomáticos ou assintomáticos (BERK, 2013; ESTES e GREENBERG, 2013). De fato, estudos clínicos realizados neste município, no período 2002 a 2011, comprovaram a participação de RVA (ASSIS et al., 2013) e de HAdV (REIS et al., 2016) em casos de DDA. A presença de RVA foi detectada, também, em um estudo ambiental recente realizado em Juiz de Fora, que evidenciou a contaminação de águas superficiais pelo despejo de esgoto não tratado (ASSIS et al., 2015), mostrando uma conexão entre os resultados obtidos em estudos clínicos e ambientais, quando desenvolvidos em uma mesma área geográfica. Diante desta realidade, a combinação destes estudos deve ser estimulada, principalmente, se realizados de forma simultânea, pois seus resultados podem indicar o predomínio e a circulação de novos genótipos virais na população, contribuindo com os estudos de vigilância epidemiológica.

Com relação à dinâmica do tratamento de esgoto, as cargas mais elevadas de HAdV e RVA foram observadas nas amostras de esgoto primário obtidas no tanque de equalização (P2). Diante da possível remoção de partículas virais na caixa de areia e do despejo de percolado de aterro sanitário (chorume) após P1, que provavelmente

contém muitos inibidores da qPCR, era de se esperar uma redução da carga viral em P2. Por outro lado, o maior tempo de retenção do esgoto no tanque de equalização e a agitação constante que ocorre nesta etapa do tratamento podem favorecer a maior concentração de vírus, devido à homogeneização do esgoto, que chega de forma intermitente, podendo apresentar diferentes cargas virais. A detecção de cargas virais elevadas no lodo (P3) deve ser atribuída aos resíduos sólidos que se concentram nesta matriz após a sedimentação, nos quais grande parte das partículas virais estão adsorvidas (HATA et al., 2013). Por outro lado, o menor número de amostras positivas em P3 pode ser explicada pela grande quantidade de substâncias inibidoras, que também se concentram nesta matriz, e que podem interferir com as técnicas de detecção. O menor número de amostras positivas e as menores cargas virais detectadas no efluente tratado (P4) devem-se à remoção de partículas virais associadas aos materiais particulados, em decorrência dos processos físicos utilizados, como a filtração e a sedimentação (TEMPLETON et al., 2008; HATA et al., 2013).

De modo geral, o tratamento de esgoto por lodo ativado resultou na redução significativa da carga de HAdV e RVA, quando comparados os valores observados no esgoto bruto e no efluente tratado. No entanto, é importante destacar que mesmo com carga reduzida ainda foi possível detectar estes vírus, mostrando sua persistência no efluente tratado. É provável que as partículas virais resistentes ao tratamento estejam associadas a materiais coloidais, com tamanho inferior a 10 μm , que passam pelos processos físicos do tratamento e protegem os vírus, contribuindo com a sua estabilidade no ambiente por longos períodos de tempo (TEMPLETON et al., 2008; OKOH et al., 2010). Tal observação já foi relatada por outros autores em pesquisas realizadas em ETEs que utilizam o mesmo tratamento (FERREIRA et al., 2009; FUMIAN et al., 2011; KITAJIMA et al., 2014; HASSINE-ZAAFRANE et al., 2015; MYRMEL et al., 2015), inclusive após a etapa de desinfecção por cloração (PETRINCA et al., 2009; FONG et al., 2010; PRADO et al., 2011; ADEFISOYE et al., 2016). Assim, o despejo deste efluente, ainda que tratado, em corpos d'água receptores pode resultar na disseminação de HAdV e RVA no ambiente. Estes fatos geram dúvidas a respeito do impacto de diferentes tipos de tratamento sobre a carga viral e devem estimular melhorias nestes processos, a fim de que possam realmente auxiliar na redução dos riscos de contaminação ambiental por estes patógenos.

O HAdV foi detectado em amostras de diferentes etapas do tratamento de esgoto, com variações da carga viral ao longo dos meses do ano, confirmando a ausência de sazonalidade da infecção, descrita na literatura (KATAYAMA et al., 2008; BARRELLA et al., 2009; FONG et al., 2010; SCHLINDWEIN et al., 2010, FUMIAN et al., 2013). Nas amostras de lodo (P3), os HAdV não foram detectados no período de março a junho. As amostras destas coletas foram processadas juntamente com as de outras coletas, nas quais houve detecção destes vírus em P3, diminuindo assim a possibilidade de ocorrência de falhas na execução das técnicas de concentração, extração e qPCR. Além disso, houve detecção de HAdV em P1, P2 e P4 nestas mesmas coletas, sugerindo que neste período as amostras de P3 tenham apresentado uma maior concentração de inibidores, inviabilizando a detecção viral.

Em conjunto, os dados de detecção e carga refletem a ampla disseminação dos HAdV em amostras de esgoto, independente de variações sazonais, mostrando sua estabilidade no ambiente, mesmo em amostras de efluente tratado. Resultados semelhantes foram descritos em estudos com amostras de esgoto bruto e/ou efluente tratado realizados em vários países, reforçando o potencial dos HAdV como indicador viral de contaminação fecal humana (AW e GIN, 2010; HATA et al., 2013; FUMIAN et al., 2013; KITAJIMA et al., 2014; MYRMEL e tal., 2015; ADEFISOYE et al., 2016). A presença dos HAdV também foi observada em água doce, salobra e do mar, provavelmente, em decorrência da contaminação destas matrizes com esgoto (HAMZA et al., 2009; MORESCO et al., 2012; VIEIRA et al., 2012; CALGUA et al., 2013b; MIAGOSTOVICH et al., 2014; VECCHIA et al., 2015; ELMAHDY et al., 2016; VIEIRA et al., 2016). Tal fato confirma a estabilidade destes vírus em diferentes amostras ambientais, o que merece atenção especial no que diz respeito aos interesses de saúde pública, considerando o possível consumo e/ou o uso recreativo destas matrizes.

A presença de RVA também foi observada nas amostras de diferentes etapas do tratamento de esgoto, predominantemente, na época mais seca do ano, com cargas virais mais elevadas neste período, que se estende de maio a setembro em Juiz de Fora. Este resultado sugere o retorno de um perfil sazonal destas infecções, anteriormente, observado em estudos clínicos realizados neste município (ROSA E SILVA et al., 2001; ROSA E SILVA et al., 2002) e em outras cidades do sudeste do Brasil (ARAUJO et al., 2002; CARVALHO-COSTA et al., 2006). Alterações neste cenário foram observadas após a introdução da vacina contra RVA, quando estes

vírus passaram a ser detectados ao longo de todo o ano em estudos clínicos (RABONI et al., 2014) e ambientais (FUMIAN et al., 2011; ASSIS et al., 2015), realizados nesta mesma região. Assim, mais uma vez destaca-se a importância de realizar estudos clínicos e ambientais simultâneos para compreender melhor a epidemiologia das infecções causados por vírus entéricos.

O delineamento dos estudos de monitoramento ambiental requer cuidados com a determinação da amostragem, principalmente, no que se refere ao tipo de amostra. Aliada à representatividade, é fundamental garantir a homogeneidade das amostras nas pesquisas realizadas em ETEs, devido à operação ininterrupta do tratamento. Neste contexto, a obtenção de amostra composta é imprescindível para avaliar o real impacto do tratamento de esgoto, visto que os parâmetros físico-químicos e microbiológico, incluindo a carga viral, podem sofrer variações ao longo do tempo (MYRMEL et al., 2015). De fato, dois estudos recentes, realizados apenas com amostras simples, descreveram a ocorrência de amostras negativas no esgoto bruto e positivas no efluente tratado e/ou a detecção de cargas virais mais elevadas após o tratamento (KITAJIMA et al., 2014; HASSINE-ZAAFRANE et al., 2015). Segundo os autores, esses resultados conflitantes poderiam ser explicados pela obtenção de amostra simples (uma alíquota), colhida ao mesmo tempo na entrada e na saída da ETE, o que desconsidera o tempo de retenção necessário para o tratamento, criando um viés na sua avaliação. No presente estudo, a detecção e a determinação da carga de HAdV e RVA não sofreram alterações significativas quando avaliadas em amostras simples e compostas. No entanto, a obtenção de amostras compostas em P1 e P4 (19 das 24 coletas) permitiu a avaliação do impacto do tratamento de esgoto, ao garantir o tempo de retenção necessário para o tratamento, mostrando que houve uma redução significativa da carga viral após este processo.

O HAdV entérico tipo 41 foi o único encontrado nas amostras de esgoto avaliadas neste estudo, confirmando relatos prévios que demonstraram uma maior prevalência da espécie F em matrizes aquáticas (FONG et al., 2010; MYRMEL et al., 2015). Esta tendência também foi observada em pesquisas brasileiras desenvolvidas em outras ETEs da região sudeste (SANTOS et al., 2004; BARRELLA et al., 2009; FUMIAN et al., 2013), tendo sido sugerido que a persistência destes vírus em ambientes naturais pode estar relacionada a sua maior resistência à radiação com luz ultravioleta (KO et al., 2005; BAXTER et al., 2007). A prevalência de HAdV 41 também foi descrita em estudos clínicos, que o apontam como um importante agente etiológico

de gastroenterite infantil, em todo o mundo (BANYAI et al., 2009; VERMA et al., 2009; DEY et al., 2011; REIS et al., 2016). O elevado percentual de identidade nucleotídica observada entre as amostras de HAdV 41 detectadas em estudos clínico (KF840488; KF840495, KF840506; KF840510 e KF840515) e ambiental realizados em Juiz de Fora, ainda que em períodos diferentes, reforça a importância da abordagem ambiental no âmbito da vigilância epidemiológica, ao contribuir com informações sobre a circulação dos vírus na população.

O sequenciamento e análise do gene VP6 mostrou a presença de RVA pertencente ao genótipo I1 na ETE de Juiz de Fora. Estes vírus mostraram uma relação genética próxima com RVA detectados em estudos clínicos e ambientais realizados em diferentes países, no período 1998-2013, inclusive em amostras detectadas em águas superficiais de Juiz de Fora (KF853550; KF853551; KF853554 e KF853557), contaminadas com esgoto (ASSIS et al., 2015). A maior identidade das amostras detectadas neste estudo com sequências previamente caracterizadas como G1P[8], G3P[8], G9P[8] e G12P[8] reforçam estudos anteriores, que relataram que RVA humanos pertencentes ao genótipo I1 são, geralmente, classificados como genótipos G (G1, G3, G4 ou G9) e P[8], com base na análise dos genes VP7 e VP4, respectivamente (MATTHIJNSSENS et al., 2008a).

O emprego de técnicas moleculares, tais como a PCR, representou um grande avanço no monitoramento ambiental de vírus. No entanto, estas técnicas não fornecem informações sobre a infecciosidade da partícula viral, uma vez que o genoma detectado pode ser oriundo de partículas infecciosas ou de vírus inativados e/ou defectivos (GASSILLOUD et al., 2003; FONG e LIPP, 2005; HARAMOTO et al., 2007; HAMZA et al., 2009; GIRONES et al., 2010). Por outro lado, alguns autores acreditam que a detecção do genoma viral em matrizes aquáticas pode indicar a presença recente de partículas virais, considerando-se a menor estabilidade do ácido nucleico livre em ambientes aquáticos (CARDUCCI et al., 2003). Essa hipótese de que as técnicas moleculares podem ser utilizadas para indicar a contaminação viral foi reforçada por Espinosa e colaboradores (2008), que observaram uma boa correlação entre a infecciosidade viral e a persistência do material genético de RVA e astrovírus, em águas superficiais. Além disso, as técnicas moleculares são ferramentas importantes para pesquisas de vírus entéricos considerados fastidiosos.

A técnica de PCR pode ser associada a um pré-tratamento da amostra com intercalantes de ácidos nucleicos, tais como a monoazida de propídio (do inglês

propidium monoazide - PMA) e a monoazida de etídio (do inglês *ethidium monoazide* - EMA). Esta estratégia foi proposta com intuito de alcançar resultados mais seguros sobre a infecciosidade das partículas virais, sendo utilizada com sucesso em estudos realizados com vírus entéricos (PARSHIONIKAR et al., 2010; SÁNCHEZ et al., 2012). O ensaio baseia-se na penetração do PMA ou EMA pelo capsídeo danificado ou comprometido, o que ocorre quando a partícula viral se encontra inativada e/ou não infecciosa (PARSHIONIKAR et al., 2010). Após um período adequado de exposição da amostra à luz, o PMA ou EMA sofre modificações e se liga ao genoma viral (DNA ou RNA) de forma covalente, tornando o material genético das partículas não infecciosas indisponível para amplificação por PCR (PARSHIONIKAR et al., 2010; TAYLOR et al., 2014). Por outro lado, a integridade do capsídeo viral impede a entrada do composto intercalante (PMA / EMA), possibilitando a amplificação e posterior detecção do material genético oriundo de partículas infecciosas (PARSHIONIKAR et al., 2010; SÁNCHEZ et al., 2012; TAYLOR et al., 2014).

Uma outra alternativa atual, que vem sendo observada com frequência, é a utilização da cultura de células integrada à PCR, combinando a sensibilidade e a especificidade dessas técnicas (FONGARO et al., 2015). Esta estratégia permite que apenas partículas infecciosas sejam propagadas e, posteriormente, detectadas por métodos moleculares, o que a torna apropriada, até mesmo para vírus que não produzem ECP (FONG e LIPP, 2005).

Antes de avaliar a viabilidade das partículas de HAdV, todos os concentrados de efluente tratado obtidos neste estudo foram submetidos a sonicação e centrifugação. Este processamento foi realizado com intuito de reduzir a quantidade de leite desnatado presente no concentrado, uma vez que este pode ter efeito citotóxico sobre as células durante o cultivo (HAKANSSON et al., 1995; MAO et al., 2009). Em adição, os concentrados foram centrifugados em alta velocidade e ressuspensos em PBS 1X. O mesmo procedimento foi aplicado ao controle de vírus, que apresentou ECP nas duas passagens de cultivo, mostrando que esta centrifugação garantiu a sedimentação de pelo menos uma parte das partículas virais. A suspensão do sedimento em PBS 1X foi adotada para reduzir o efeito do tampão fosfato 0,2M, utilizado no protocolo de concentração viral, que se mostrou tóxico para as células em experimentos iniciais. É provável, que esse efeito seja consequência da elevada concentração de sais de fosfato presente neste tampão, que é cerca de 20 vezes maior do que a observada na composição do tampão PBS 1X (0,01M),

amplamente utilizado em experimentos de cultivo celular. De fato, a detecção de HAdV já foi realizada com sucesso em suspensões de concentrados de lodo de esgoto, efluente tratado e águas superficiais, preparadas com PBS 1X (SCHLINWEIN et al., 2010; WONG et al., 2010; ELMAHDY et al., 2016). Cabe ressaltar que todo esse processamento antes do cultivo foi importante, pois nenhum concentrado foi tóxico para as células, o que possibilitou o estudo de determinação de viabilidade das partículas de HAdV.

O cultivo de HAdV tem sido realizado com sucesso em diversas linhagens celulares, com destaque para as células HEK293 e A549, que apresentam um melhor desempenho na avaliação de contaminação ambiental por este vírus, inclusive para os tipos entéricos (40 e 41), que apresentam um crescimento muito lento, podendo produzir pouco ou nenhum ECP (JIANG, 2006; JIANG et al., 2009). Neste trabalho, a observação de ECP característico de HAdV em células A549 e HEK293 indicou a presença de partículas virais viáveis na maioria dos concentrados de efluente tratado testados. Este resultado foi confirmado pelo qPCR, com detecção viral e observação do aumento da carga viral após o cultivo. Juntos estes dados reforçam a existência de um risco potencial à saúde pública, em decorrência do retorno do efluente aos corpos d'água receptores e da possibilidade de uso recreativo destas matrizes. A situação torna-se mais crítica, diante da possibilidade de captação destes corpos d'água para produção de água potável, considerando a resistência desses vírus ao processo de cloração, aplicado ao controle da população bacteriana (CARTER, 2005). O envolvimento dos vírus entéricos em surtos de doenças veiculadas pela água descrito em vários países (KUKKULA et al., 1997; GALLAY et al., 2006; MARTINELLI et al., 2007; GREER et al. 2009; SINCLAIR et al., 2009) aponta para a necessidade de desenvolver estudos de risco microbiológico com vírus entéricos, diante da ampla disseminação e persistência destes patógenos no meio ambiente (CARTER, 2005). Neste contexto, destaca-se a análise quantitativa de risco microbiológico (do inglês – *Quantitative Microbial Risk Assessment* – QMRA), uma ferramenta útil para estimar a dose de exposição a um patógeno que tem probabilidade de estabelecer infecção e doença em um indivíduo, em um cenário específico (HAAS et al., 1999). Apesar da importância destes estudos, até o momento, foram geradas poucas informações sobre as estimativas de riscos relacionados à presença de vírus entéricos em água de consumo, recreativas ou de reuso, devido ao custo e a complexidade das análises (WAARBEEK et al., 2010; BARKER et al., 2013).

A análise dos parâmetros físico-químicos (itens 5.6.5 e 6.3.5) mostrou um desempenho satisfatório do tratamento de esgoto por lodo ativado empregado na ETE Barbosa Lage, com relação à remoção de matéria orgânica. A redução dos valores de DBO e DQO após o tratamento e, também, os valores elevados da relação DQO/DBO, observados na maioria nas amostras de efluente tratado, evidenciaram a eficiência do tratamento na degradação da matéria orgânica. O teor de óleos e graxas variou bastante durante o estudo e permaneceu elevado na metade das amostras de efluente tratado. Estes compostos são considerados indesejáveis, por formarem uma densa camada de gordura na superfície dos tanques da ETE, além de se depositarem no interior das tubulações, provocando entupimentos que prejudicam a eficiência do tratamento do esgoto (ORSSATTO et al., 2010). Com relação ao pH, os valores observados neste estudo caracterizaram um ambiente ligeiramente alcalino nas amostras de esgoto bruto e efluente tratado, como observado anteriormente por outros pesquisadores (EMMANUEL et al., 2009), indicando que o tratamento não teve influência sobre este parâmetro.

O tratamento de esgoto também resultou na redução de sólidos presentes no esgoto, mas apresentou eficiência de remoção variável para os parâmetros SS e SST. A adequação de apenas 50% das amostras ao limite determinado pela legislação para SS pode refletir uma falha do sistema de tratamento. É provável que tenha ocorrido “fuga de sólidos” para o efluente tratado durante a etapa de decantação, o que explicaria os valores elevados de SS observados após o tratamento.

Considerando todos os parâmetros físico-químicos avaliados nas amostras de efluente tratado, é possível observar que o tratamento de esgoto permitiu a adequação de muitas dessas amostras de efluente aos limites estabelecidos na legislação. No entanto, vale ressaltar que HAdV e RVA foram detectados, tanto nas amostras de efluente tratado que estavam de acordo com os padrões, quanto naquelas que excederam os mesmos. Isso mostrou que a adequação do efluente tratado aos parâmetros físico-químicos não garantiu a ausência de contaminação viral. Em adição, a análise quantitativa de todas as amostras de esgoto (P1 a P4) revelou a existência de relação direta entre a carga viral e os parâmetros DQO, SS e SST. Esses resultados mostraram que a probabilidade de detectar cargas virais mais elevadas aumenta em amostras com valores maiores de DQO e alto teor de sólidos, confirmando a forte tendência que os vírus apresentam de se adsorverem a matéria

orgânica e aos materiais particulados (CARTER, 2005; TEMPLETON et al., 2008; OKOH et al., 2010).

O desempenho do tratamento de esgoto no Brasil tem sido avaliado, apenas, pela contagem de indicadores bacterianos, como coliformes termotolerantes e coliformes totais. Entretanto, o uso destes parâmetros como indicador de contaminação fecal humana, vem sendo questionado e tem se mostrado inadequado, em função das diferenças existentes entre os diferentes grupos de patógenos. Várias características comuns aos coliformes tornam inconveniente o seu uso como indicadores de contaminação: maior sensibilidade à luz solar e ao tratamento de desinfecção, aplicado em estações de tratamento de água e esgoto; menor tempo de sobrevivência, quando comparados a outros patógenos; não são encontrados, exclusivamente, nas fezes humanas, mas também em fezes animais e, naturalmente, no solo; capacidade de se multiplicar em vários ambientes e, principalmente, pela fraca correlação encontrada entre sua contagem e de vários agentes patogênicos (SCOTT et al., 2002; FONG e LIPP, 2005; SAVICHTCHEVA e OKABE, 2006).

Neste estudo, o tratamento de esgoto por lodo ativado apresentou uma eficiência de remoção de coliformes termotolerantes próxima de 100%, concordando com resultados já obtidos após este tipo de tratamento secundário (PETRINCA et al., 2009; HATA et al., 2013). No entanto, devido à elevada carga de coliformes detectada no esgoto bruto (cerca de 10^7 NMP/100mL), a redução observada pelo tratamento não garantiu a adequação de nenhuma amostra de efluente tratado. De acordo com a legislação em vigência, estas amostras não deveriam ter sido devolvidas ao Rio Paraibuna, pois excederam o limite máximo permitido para coliformes termotolerantes (1000 NMP/100mL), podendo alterar as características da qualidade deste corpo receptor, enquadrado como água doce de classe 2. Resultado semelhante foi observado em um estudo realizado na África, quando cerca de 30% das amostras de efluentes tratado foram consideradas inadequadas, pelos critérios de qualidade vigente determinados para coliformes termotolerantes (ADEFISOYE et al., 2016). Estes resultados são preocupantes, pois mostram que o tratamento secundário de esgoto pode ser ineficiente, até mesmo, para a remoção de coliformes, considerados mais sensíveis do que os demais patógenos entéricos. Diversos trabalhos realizados com diferentes matrizes aquáticas já comprovaram que a presença destes indicadores não está associada à ocorrência de patógenos virais (MIAGOSTOVICH et al., 2008; ESPINOSA et al., 2009; FERGUSON et al., 2012; MORESCO et al., 2012; VIEIRA et

al., 2012; ASSIS et al., 2015; VECCHIA et al., 2015). Nossos resultados reforçaram essa tese e indicaram que ela também é válida em termos quantitativos, mostrando uma ausência de correlação entre a contagem de coliformes e a carga viral em amostras de esgoto, mesmo após o tratamento. Tal fato demonstra a necessidade de encontrar um indicador microbiológico mais adequado para investigar a contaminação viral. Os resultados obtidos neste trabalho confirmaram as características de estabilidade, resistência e prevalência dos HAdV, que o colocam como provável indicador viral de contaminação fecal humana (PUIG et al, 1994; PUSCH et al., 2005; BOFILL-MAS et al., 2006; VIEIRA et al., 2016).

8 CONCLUSÕES

Os dados obtidos neste estudo levaram às seguintes conclusões:

- Os protocolos de floculação orgânica otimizados para lodo (condição C) e para efluente tratado (condição D') provaram ser ferramentas úteis para concentração e detecção de HAdV e RVA.
- O protocolo otimizado para efluente tratado (condição D') mostrou-se adequado, também, para a pesquisa de vírus gigantes.
- O HAdV foi detectado na maioria dos concentrados de esgoto avaliados neste estudo sem apresentar variações sazonais e foi caracterizado molecularmente como HAdV entérico pertencente a espécie F tipo 41.
- O RVA foi detectado na metade dos concentrados de esgoto avaliados neste estudo com maior prevalência durante a época seca e foi caracterizado molecularmente como RVA pertencente ao genótipo I1.
- O tratamento de esgoto por lodo ativado reduziu, significativamente, a carga de HAdV e RVA, porém estes vírus ainda foram detectados no efluente tratado, sendo possível verificar a presença de partículas infecciosas de HAdV nesta matriz.
- O tratamento de esgoto permitiu a adequação da maioria das amostras de efluente aos limites estabelecidos na legislação para os parâmetros físico-químicos, entretanto a presença de HAdV e RVA foi observada tanto nas amostras que estavam de acordo com os padrões, quanto naquelas que excederam os mesmos.
- Embora eficiente na redução da contagem de coliformes termotolerantes, o tratamento de esgoto não foi suficiente para adequar nenhuma das amostras de efluente tratado aos limites determinados na legislação para este parâmetro.

Os estudos de otimização mostraram que é possível concentrar vírus utilizando uma técnica simples e de baixo custo, como a floculação orgânica com leite desnatado. Em adição, os resultados obtidos durante o monitoramento viral confirmaram as características de prevalência, estabilidade e resistência dos HAdV,

que permaneceram viáveis mesmo após o tratamento, reforçando seu papel como provável indicador viral de contaminação fecal humana. Juntos estes dados podem estimular a realização de novos estudos de monitoramento viral em ETE, a fim de avaliar melhor o impacto do tratamento sobre a carga viral, bem como contribuir para o desenvolvimento de políticas mais eficazes de gestão de lodo e águas residuárias.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABNT. Associação Brasileira de Normas Técnicas. **NBR 9648** - Estudo de concepção de sistemas de esgoto sanitário. Rio de Janeiro, 1986.
- ABERGEL, C.; LEGENDRE, M.; CLAVERIE, J.M. The rapidly expanding universe of giant viruses: Mimivirus, Pandoravirus, Pithovirus and Mollivirus. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 39, n. 6, p. 779-796, 2015.
- ADEFISOYE, M.A.; NWODO, U.U.; GREEN, E.; OKOH, A.I. Quantitative PCR Detection and Characterisation of Human Adenovirus, Rotavirus and Hepatitis A Virus in Discharged Effluents of Two Wastewater Treatment Facilities in the Eastern Cape, South Africa. **Food and Environmental Virology**, v. 8, n. 4, p. 262-274, 2016.
- AKIHARA, S.; PHAN, T.G.; NGUYEN, T.A.; HANSMAN, G.; OKITSU, S.; USHIJIMA, H. Existence of multiple outbreaks of viral gastroenteritis among infants in a day care center in Japan. **Archives of Virology**, v. 150, n. 10, p. 2061-2075, 2005.
- ALBINANA-GIMENEZ, N.; MIAGOSTOVICH, M.P.; CALGUA, B.; HUGUET, J.M.; MATIA, L.; GIRONES, R. Analysis of adenoviruses and polyomaviruses quantified by qPCR as indicator of water quality in source and drinking water treatment plants. **Water Research**, v. 43, n. 7, p. 2011-2019, 2009.
- ALLARD, A.; ALBINSSON, B.; WADELL, G. Rapid typing of human adenoviruses by a general PCR combined with restriction endonuclease analysis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n. 2, p. 498-505, 2001.
- ANDRADE, K.R.; BORATTO, P.P.V.M.; RODRIGUES, F.P.; SILVA, L.C.F.; DORNAS, F.P.; PILOTTO, M.R.; LA SCOLA, B.; ALMEIDA, G. M. F.; KROON, E.G.; ABRAHÃO, J. S. 2015. Oysters as hot spots for mimivirus isolation. **Archives of virology**, v. 160, n. 2, p. 477-482, 2015.
- ANDRADE-GÓES ACM. **Expressão, Isolamento, Purificação e Caracterização de proteínas recombinantes de Rotavírus e Astrovírus**. 2005. 269f. Tese (Doutorado em Ciências) - Instituto de Química, Universidade do Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2005.
- ANDREASI, M.S.A. **Detecção de vírus entéricos em crianças com gastroenterite aguda e idosos institucionalizados em Campo Grande, MS**. 2008. 86f. Tese (Doutorado em Ciências da Saúde) – Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde – Rede Centro-Oeste: Convênio Universidade de Brasília, Universidade Federal de Goiás e Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Goiânia, 2008.
- ARAUJO, I.T.; FIALHO, A.M.; DE ASSIS, R.M.; ROCHA, M.; GALVÃO, M.; CRUZ, C.M.; FERREIRA, M.S.; LEITE, J.P.G. Rotavirus strain diversity in Rio de Janeiro, Brazil: characterization of VP4 and VP7 genotypes in hospitalized children. **Journal of Tropical Pediatrics**, v. 48, n. 4, p. 214-218, 2002.

ARIAS, C.F.; DECTOR, M.A.; SEGOVIA, L.; LÓPEZ, T.; CAMACHO, M.; ISA, P.; ESPINOSA, R.; LÓPEZ, S. RNA silencing of rotavirus gene expression. **Virus Research**, v. 102, n. 1, p. 43-51, 2004.

ARRAJ, A.; BOHATIER, J.; LAVERAN, H.; TRAORE, O. Comparison of bacteriophage and enteric virus removal in pilot scale activated sludge plants. **Journal of Applied Microbiology**, v. 98, n. 2, p.516-524, 2005.

ARRAJ, A.; BOHATIER, J.; AUMERAN, C.; BAILLY, J.L.; LAVERAN H; TRAORE, O. An epidemiological study of enteric viruses in sewage with molecular characterization by RT-PCR and sequence analysis. **Journal of Water and Health**, v. 6, n. 3, p. 351-358, 2008.

ARSLAN, D.; LEGENDRE, M.; SELTZER, V.; ABERGEL, C.; CLAVERIE, J.M. Distant mimivirus relative with a larger genome highlights the fundamental features of Megaviridae. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 108, n. 42, p. 17486-17491, 2011.

ASSIS, A.S.F.; VALLE, D.A.; ANTUNES, G.R.; TIBIRIÇA, S.H.C.; ASSIS, R.M.S.; LEITE, J.P.G.; CARVALHO, I.P.; ROSA E SILVA, M.L. Rotavirus epidemiology before and after vaccine introduction. **Jornal de Pediatria**, v. 89, n. 5, p. 470-476, 2013.

ASSIS, A.S.F.; CRUZ, L.T.; FERREIRA, A.S.; BESSA, M.E.; PINTO, M.A.O.; VIEIRA, C.B.; OTENIO, M.H.; MIAGOSTOVICH, M.P.; ROSA E SILVA, M.L. Relationship between viral detection and turbidity in a watershed contaminated with group A rotavirus. **Environmental Science and Pollution Research International**, v. 22, n. 9, p. 6886-6897, 2015.

AW, T.G.; GIN, K.Y.H. Environmental surveillance and molecular characterization of human enteric viruses in tropical urban wastewaters. **Journal of Applied Microbiology**, v. 109, n. 2, p. 716-730, 2010.

BANYAI, K.; KISFALI, P.; BOGDAN, Á.; MARTELLA, V.; MELEGH, B.; ERDMAN, D.; SZUCS, G. Adenovirus gastroenteritis in Hungary, 2003-2006. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, 28, n. 8, p. 997-999, 2009.

BARKER, S.F.; PACKER, M.; SCALES, P.J.; GRAY, S.; SNAPE, I.; HAMILTON, A.J. Pathogen reduction requirements for direct potable reuse in Antarctica: evaluating human health risks in small communities. **Science of Total Environment**, v. 461-462, n. 1, p. 723-733, 2013.

BARRELLA, K.M.; GARRAFA, P.; MONEZI, T.A.; HÁRSI, C.M.; SALVI, C.; VIOLANTE, P.A.B.C.; MEHNERT, D.U. Longitudinal study on occurrence of adenoviruses and hepatitis A virus in raw domestic sewage in the city of Limeira, São Paulo. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 40, n. 1, p. 102-107, 2009.

- BARRIL, P.A.; FUMIAN, T.M.; PREZ, V.E.; GIL, P.I.; MARTÍNEZ, L.C.; GIORDANO, M.O.; MASACHESSI, G.; ISA, M.B.; FERREYRA, L.J.; RÉ, V.E.; MIAGOSTOVICH, M.; PAVAN, J.V.; NATES, S.V. Rotavirus seasonality in urban sewage from Argentina: Effect of meteorological variables on the viral load and the genetic diversity. **Environmental Research**, v. 138, p. 409-415, 2015.
- BAXTER, C.S.; HOFMANN, R.; TEMPLETON, M.R.; BROWN, M.; ANDREWS, R.C. Inactivation of adenovirus types 2, 5, and 41 in drinking water by UV light, free chlorine, and monochloramine. **Journal of Environmental Engineering**, v. 133, n. 1, p. 95-103, 2007.
- BERK, A.J. Adenoviridae. In: Knipe DM, Howley PM (eds), **Fields Virology**, 6th. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, p. 1704-1731, 2013.
- BOFILL-MAS, S.; ALBINANA-GIMENEZ, N.; CLEMENTE-CASARES, P.; HUNDESA, K.; RODRIGUEZ-MANZANO, J.; ALLARD, A.; CALVO, M.; GIRONES, R. Quantification and stability of human adenoviruses and polyomavirus JCPyV in wastewater matrices. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, n. 12, p. 7894-7896, 2006.
- BOSCH, A.; GUIX, S.; SANO, D.; PINTÓ, R.M. New tools for the study and direct surveillance of viral pathogens in water. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 19, n. 3, p. 295-301, 2008.
- BOUGHALMI, M.; SAADI H.; PAGNIER, I.; COLSON, P.; FOURNOUS, G.; RAOULT, D. LA SCOLA, B. High-throughput isolation of giant viruses of the Mimiviridae and Marseilleviridae families in the Tunisian environment. **Intervirology**, v. 15, n. 7, p. 2000-2007, 2013.
- BRAEYE, T.; DE SCHRIJVER, K.; WOLLANTS, E.; van RANST, M.; VERHAEGEN, J. A large community outbreak of gastroenteritis associated with consumption of drinking water contaminated by river water, Belgium, 2010. **Epidemiology and Infection**, v. 143, n. 4, p. 711-719, 2015.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretária de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Informe Técnico. **Doença diarreica por rotavírus: vigilância epidemiológica e prevenção pela vacina oral de rotavírus humano (VORH)**. Brasília, DF, 2005.
- BRASIL. Estabelece as diretrizes nacionais para o saneamento básico. Lei Federal nº11.445 de 05 de janeiro de 2007. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, de 08 de janeiro de 2007, Seção 1, página 3.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Datasus. **Mortalidade proporcional por doença diarreica aguda em menores de 5 anos de idade**. Brasília, DF, 2016. Disponível em: < <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/defthtm.exe?idb2011/c06.def>>. Acesso em: 31 jul. 2016.

CALGUA, B.; MENGEWEIN, A.; GRUNERT, A.; BOFILL-MAS, S.; CLEMENTE-CASARES, P.; HUNDESA, A.; WYN-JONES, A.P.; LOPEZ-PILA, J.M.; GIRONES, R. Development and application of a one-step low cost procedure to concentrate viruses from seawater samples. **Journal of Virological Methods**, v. 153, n. 2, p. 79-83, 2008.

CALGUA, B.; RODRIGUEZ-MANZANO, J.; HUNDESA, A.; SUÑEN, E.; CALVO, M.; BOFILL-MAS, S.; GIRONES, R. New methods for the concentration of viruses from urban sewage using quantitative PCR. **Journal of Virological Methods**, v. 187, n. 2, p. 215-221, 2013a.

CALGUA, B.; FUMIAN, T.M.; RUSINOL, M.; RODRIGUEZ-MANZANO, J.; MBAYED, V.A.; BOFILL-MAS, S.; MIAGOSTOVICH, M.P.; GIRONES, R. Detection and quantification of classic and emerging viruses by skimmed-milk flocculation and PCR in river water from two geographical areas. **Water Research**, v. 47, n. 8, p. 2797-2810, 2013b.

CAMPOS, R.K.; BORATTO, P. V.; ASSIS, F. L.; AGUIAR, E.R.G.R.; SILVA, L.C.F.; ALBARNAZ, J.D.; DORNAS, F. P.; TRINDADE, G. S.; FERREIRA, P. P., MARQUES, J. T.; ROBERT, C.; RAOULT, D.; KROON, E.G.; LA SCOLA, B.; ABRAHÃO, J. S. Samba virus: a novel mimivirus from a giant rain forest, the Brazilian Amazon. **Virology Journal**, v. 11:95, p. 1-11, 2014.

CANTALUPO, P.G.; CALGUA, B.; ZHAO, G.; HUNDESA, A.; WIER, A.D.; KATZ, J.P.; GRABE, M.; HENDRIX, R.W.; GIRONES, R.; WANG, D.; PIPAS, J.M. Raw sewage harbors diverse viral populations. **MBio**, v. 2, n. 5, p. e00180-11, 2011.

CARDUCCI, A.; CASINI, B.; BANI, A.; ROVINI, E.; VERANI, M.; MAZZONI, F.; GIUNTINI, A. Virological control of groundwater quality using biomolecular tests. **Water Science and Technology**, v. 47, n. 3, p. 261-266, 2003.

CARDUCCI, A.; MORICI, P.; PIZZI, F.; BATTISTINI, R.; ROVINI, E.; VERANI, M. Study of the viral removal efficiency in a urban wastewater treatment plant. **Water Science and Technology**, v. 58, n. 4, p. 893-897, 2008.

CARTER MJ. Enterically infecting viruses: pathogenicity, transmission and significance for food and waterborne infection. **Journal of Applied Microbiology**, v. 98, n. 6, p. 1354-1380, 2005.

CARVALHO-COSTA, F.A.; ASSIS, R.M.; FIALHO, A.M.; BÓIA, M.N.; ALVES, D.P.; MARTINS, C.M.; LEITE, J.P. Detection and molecular characterization of group A rotavirus from hospitalized children in Rio de Janeiro, Brazil, 2004. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 101, n. 3, p. 291-294, 2006.

CARVALHO-COSTA, F.A.; ARAÚJO, I.T.; ASSIS, R.M.S.; FIALHO, A.M.; MARTINS, C.M.M.A.; BÓIA, M.N.; LEITE, J.P.G. Rotavirus genotype distribution after vaccine introduction, Rio de Janeiro, Brasil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 15, n. 1, p. 95-97, 2009.

CHO, H.G.; LEE, S.G.; KIM, W.H.; LEE, J.S.; PARK, P.H.; CHEON, D.S.; JHEONG, W.H.; JHO, E.H.; LEE, J.B.; PAIK, S.Y. Acute gastroenteritis outbreaks associated with ground-waterborne norovirus in South Korea during 2008–2012. **Epidemiology and Infection**, v. 142, n. 12, p. 2604-2609, 2014.

CLAVERIE, J.M.; OGATA, H.; AUDIC, S.; ABERGEL, C.; SUHRE, K.; FOURNIER, P.E. Mimivirus and the emerging concept of “giant” virus. **Virus Research**, v. 117, n. 1, p. 133-144, 2006.

CONAMA, Conselho Nacional do Meio Ambiente. Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências. Resolução nº 357, de 17 de março de 2005. **Diário Oficial {da} República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 18 de março de 2005, Seção 1, páginas 58-63.

CONAMA, Conselho Nacional do Meio Ambiente. Dispõe sobre as condições e padrões de lançamento de efluentes. Resolução nº 430, de 13 de maio de 2011. **Diário Oficial {da} República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 16 de maio de 2011, Seção 1, páginas 89.

COPAM e CERH. Conselho Estadual de Políticas Ambientais e Conselho Estadual de Recursos Hídricos do estado de Minas Gerais. Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências. Deliberação normativa conjunta COPAM/CERH nº 01, de 05 de maio de 2008. **Diário do Executivo**, Minas Gerais, 20 de maio de 2008.

COSTA, P.S.S.; CARDOSO, D.D.P.; GRISI, S.J.F.E. Rotavirus A e sua profilaxia vacinal. **Revista de Patologia Tropical**, v. 34, n. 1, p. 1-16. 2005.

CUMINO, A.C.; GIORDANO, M.O.; MARTINEZ, L.C.; MEDEOT, S.I.; PAVAN, J.V.; YUDOWSKY, S.; ISA, M.B.; DEPETRIS, A.R.; NATES, S.V. Culture amplification in human colon adenocarcinoma cell line (CaCo-2) combined with an ELISA as a supplementary assay for accurate diagnosis of rotavirus. **Journal of Virological Methods**, v. 76, n. 1-2, p. 81-85, 1998.

DESAI, R.; OLIVEIRA, L.H.; PARASHAR, U.D.; LOPMAN, B.; TATE, J.E.; PATEL, M.M. Reduction in morbidity and mortality from childhood diarrhoeal disease after species A rotavirus vaccine introduction in Latin America – A Review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 106, n. 8, p. 907-911, 2011.

DESSELBERGER, U.; MANKTELOW, E.; LI, W.; CHEUNG, W.; ITURRIZA-GÓMARA, M.; GRAY, J. Rotaviruses and rotavirus vaccines. **British Medical Bulletin**, v. 90, n. 1, p. 37-51, 2009.

DEY, R.S.; GHOSH, S.; CHAWLA-SARKAR, M.; PANCHALINGAM, S.; NATARO, J.P.; SUR, D.; MANNA, B.; RAMAMURTHY, T. Circulation of a novel pattern of infections by enteric adenovirus serotype 41 among children below 5 years of age in Kolkata, India. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 49, n. 2, p. 500-505, 2011.

DO CARMO, G.M.I.; YEN, C.; CORTES, J.; SIQUEIRA, A.A.; DE OLIVEIRA, W.K.; CORTEZ-ESCALANTE, J.J.; LOPMAN, B.; FLANNERY, B.; DE OLIVEIRA, L.H.; CARMO, E.H., PATEL, M. Decline in diarrhea mortality and admissions after routine childhood rotavirus immunization in Brazil: a time-series analysis. **Plos Medicine**, v. 8, n. 4, p. e1001024, 2011.

DORNAS, F.P.; SILVA, L.C.; DE ALMEIDA, G.M.; CAMPOS, R.K.; BORATTO, P.V.; FRANCO-LUIZ, A.P.; LA SCOLA, B.; FERREIRA, P.C.; KROON, E.G.; ABRAHAO, J.S. Acanthamoeba polyphaga mimivirus Stability in Environmental and Clinical Substrates: Implications for Virus Detection and Isolation. **PLoS One**, v. 9, n. 2, p. e878111, 2014a.

DORNAS, F.P.; RODRIGUES, F.P.; BORATTO, P.V.M.; SILVA, L.C.F.; FERREIRA, P.C.P.; BONJARDIM, C.A.; TRINDADE, G.S.; KROON, E.G.; LA SCOLA, B.; ABRAHÃO, J.S. Mimivirus circulation among wild and domestic mammals, Amazon region, Brasil. **Emerging Infectious Disease**, v. 20, n. 3, p. 469-472, 2014b.

DORNAS, F.P.; KHALIL, J.Y.; PAGNIER, I.; RAOULT, D.; ABRAHAO, J.; LA SCOLA, B. Isolation of new Brazilian giant viruses from environmental samples using a panel of protozoa. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, n. 6, p. 1086, 2015.

DORNAS, F.P. **Estudos de prospecção, caracterização e ensaios sorológicos de vírus gigantes: analisando amostras ambientais brasileiras, soros de humanos e outros vertebrados**. 2016. 179f. Tese (Doutorado em Microbiologia) - Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2016.f

D'SOUZA, R.M.; HALL, G.; BECKER, N.G. Climatic factors associated with hospitalizations for rotavirus diarrhoea in children under 5 years of age. **Epidemiology and Infection**, v. 136, n. 1, p. 56-64, 2007.

DULGHEROFF, A.C.D.; FIGUEIREDO, E.F.; MOREIRA, L.P.; MOREIRA, K.C.; MOURA, L.M.S.; GOUVÊA, V.S.; DOMINGUES, A.L.S. Distribution of rotavirus genotypes after vaccine introduction in the Triângulo Mineiro region of Brazil: 4-Year follow-up study. **Journal of Clinical Virology**, v. 55, n. 1, p. 67-71, 2012.

DULGHEROFF, A.C.B.; FIGUEIREDO, E.F.; GOUVÊA, V.S.; DOMINGUES, A.L.S. Changes in epidemiology of rotavirus in the Triângulo Mineiro region of Brazil: lack of two consecutive rotavirus seasons. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 47, n. 12, p. 1091-1095, 2014.

ELMAHDY, E.M.; FONGARO, G.; SCHISSI, C.D.; PETRUCIO, M.M.; BARARDI, C.R. Enteric viruses in surface water and sediment samples from the catchment area of Peri Lagoon, Santa Catarina State, Brazil. **Journal of Water and Health**, v. 14, n. 1, p. 142-154, 2016.

EMMANUEL, E.; PIERRE, M.G.; PERRODIN, Y. Groundwater contamination by microbiological and chemical substances released from hospital wastewater: Health risk assessment for drinking water consumers. **Environment International**, v. 35, n. 4, p. 718-726, 2009.

ESPINOSA, A.C.; MAZARI-HIRIART, M.; ESPINOSA, R.; MARURI-AVIDAL, L.; MÉNDES, E.; ARIAS, C.F. Infectivity and genome persistence of rotavirus and astrovirus in groundwater and surface water. **Water Research**, v. 42, n. 10-11, p. 2618-2628, 2008.

ESPINOSA, A.C.; ARIAS, C.F.; SÁNCHEZ-COLÓN, S.; MAZARI-HIRIART, M. Comparative study of enteric viruses, coliphages and indicator bacteria for evaluating water quality in a tropical high-altitude system. **Environmental Health**, v. 8:49, p. 1-10, 2009.

ESTES, M.K.; GREENBERG, H.B. Rotaviruses. In: Knipe DM, Howley PM (eds), **Fields Virology**, 6th. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 1347-401, 2013.

FARTHING, M.; SALAM, M.A.; LINDBERG, G.; DITE, P.; KHALIF, I.; SALAZAR-LINDO, E.; RAMAKRISHNA, B.S.; GOH, K.; THOMSON, A.; KHAN, A.G.; KRABSHUIS, J.; LEMAIR, A. Acute diarrhea in adults and children: a global perspective. **Journal Clinical of Gastroenterology**, v. 47, n. 1, p. 12-20, 2013.

FERGUSON, A.S.; LAYTON, A.C.; MAILLOUX, B.J.; CULLIGAN, P.J.; WILLIAMS, D.E.; SMARTT, A.E.; SAYLER, G.S.; FEIGHERY, J.; MCKAY, L.D.; KNAPPETT, P.S.K.; ALEXANDROVA, E.; ARBIT, T.; EMCH, M.; ESCAMILLA, V.; AHMED, K.M.; ALAM, J.; STREATFIELD, P.K.; YUNUS, M.; van GEEN, A. Comparison of fecal indicators with pathogenic bacteria and rotavirus in groundwater. **Science of the Total Environment**, v. 431, p. 314-322, 2012.

FERREIRA, F.F.M.; GUIMARÃES, F.R.; FUMIAN, T.M.; VICTORIA, M.; VIEIRA, C.B.; LUZ, S.; SHUBO, T.; LEITE, J.P.G.; MIAGOSTOVICH, M.P. Environmental dissemination of group A rotavirus: P-type, G-type and subgroup characterization. **Water Science and Technology**, v. 60, n. 3, p. 633-642, 2009.

FILHO, E.P.; FARIA, N.R.C.; FIALHO, A.M.; ASSIS, R.S.; ALMEIDA, M.M.S.; ROCHA, M.; GALVÃO, M.; SANTOS, F.B.; BARRETO, M.L.; LEITE, J.P.G. Adenoviruses associated with acute gastroenteritis in hospitalized and community children up to 5 years old in Rio de Janeiro and Salvador, Brazil. **Journal of Medical Microbiology**, v. 56, n. 3, p. 313-319, 2007.

FONG, T-T.; LIPP, E.K. Enteric viruses of humans and animals in aquatic environments: health risks, detection, and potential water quality assessment tools. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 69, n. 2, p. 357-371, 2005.

FONG, T.T.; PHANIKUMAR, M.S.; XAGORARAKI, I.; ROSE, J.B. Quantitative detection of human adenoviruses in wastewater and combined sewer overflows influencing a Michigan river. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 76, n. 3, p. 715-723, 2010.

FONGARO, G.; SILVA, H.D.; ELMAHDY, E.M.; MAGRI, M.E.; SCHISSI, C.D.; MOREIRA, M.; LANNA, M.C.S.; SILVEIRA-LACERDA, E.P.; BARARDI, C.R.M. Enteric viruses as contaminants and bioindicators in environmental samples: a review. **Virus Reviews and Research**, v. 20, n. 2, p. 1-13, 2015.

FORMIGA-CRUZ, M.; HUNDESA, A.; CLEMENTE-CASARES, P.; ALBINANA-GIMENEZ, N.; ALLARD, A.; GIRONES, R. Nested multiplex PCR assay for detection of human enteric viruses in shellfish and sewage. **Journal of Virological Methods**, v. 125, n. 2, p. 111-118, 2005.

FOUQUE, E. TROUILHÉ, M.C.; THOMAS, V.; HARTEMANN, P.; RODIER, M.H.; HÉCHARD, Y. Cellular, biochemical, and molecular changes during encystment of free-living amoebae. **Eukaryot Cell**, v. 11, n. 4, p. 382-387, 2012.

FREITAS, E.R.L.; BORGES, A.M.T.; FIACCADORI, F.S.; SOUZA, M.B.L.D.; CARDOSO, D.D.P. Molecular characterization of adenovirus detected from fecal samples obtained from children in the Central West region of Brazil. **Archives of Virology**, v. 155, n. 10, p. 1693-1696, 2010.

FUMIAN, T.M.; LEITE, J.P.G.; CASTELLO, A.A.; GAGGERO, A.; CAILLOU, M.A.L.; MIAGOSTOVICH, M.P. Detection of rotavirus A in sewage samples using multiplex qPCR and an evaluation of the ultracentrifugation and adsorption-elution methods for virus concentration. **Journal of Virological Methods**, v. 170, n. 1-2, p. 42-46, 2010.

FUMIAN, T.M.; LEITE, J.P.G.; ROSE, T.L.; PRADO, T.; MIAGOSTOVICH, M.P. One year environmental surveillance of rotavirus specie A (RVA) genotypes in circulation after the introduction of the Rotarix vaccine in Rio de Janeiro, Brazil. **Water Research**, v. 45, n. 17, p. 5755-5763, 2011.

FUMIAN, T.M.; VEIRA, C.B.; LEITE, J.P.G.; MIAGOSTOVICH, M.P. Assessment of burden of virus agents in an urban sewage treatment plant in Rio de Janeiro, Brazil. **Journal of Water and Health**, v. 11, n. 1, p. 110-119, 2013.

GALL, A.M.; MARIÑAS, B.J.; LU, Y.; SHISLER, J.L. Waterborne Viruses: A Barrier to Safe Drinking Water. **PLOS Pathogens**, v. 11, n. 6, p. e1004867, 2015.

GALLAY, A.; DE VALK, H.; COURNOT, M.; LADEUIL, B.; HEMERY, C.; CASTOR, C.; BON, F.; MÉGRAUD, F.; LE CANN, P.; DESENCLOS, J.C. A large multi-pathogen waterborne community outbreak linked to faecal contamination of a groundwater system, France, 2000. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 12, n. 6, p. 561-570, 2006.

GASSILLOUD, B.; SCHWARTZBROD, L.; GANTZER, C. Presence of Viral Genomes in Mineral Water: a Sufficient Condition To Assume Infectious Risk? **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n. 7, p. 3965-3969, 2003.

GERBA, C.P. Indicator Microorganisms. In: Maier, R.M.; Pepper, I.L.; Gerba, C.P. (eds), **Environmental Microbiology**, 2nd. San Diego: Academic Press, 485-499, 2009.

GERBA, C.P.; PEPPER, I.L. Municipal Wastewater Treatment. In: Pepper, I.L.; Gerba, C.P.; Gentry, T.J. (eds.), **Environmental Microbiology**, 3th. San Diego: Academic Press, 583-606, 2014.

GIRONES, R. Tracking viruses that contaminate environments. **Microbe**, v. 1, n. 1, p. 19-25, 2006.

GIRONES, R.; FERRÚS, M.A.; ALONSO, J.L.; RODRIGUEZ-MANZANO, J.; CALGUA, B.; CORRÊA, A.B.; HUNDESA, A.; CARRATALA, A.; BOFILL-MAS, S. Molecular detection of pathogens in water - The pros and cons of molecular techniques. **Water Research**, v. 44, n. 15, p. 4325-4339, 2010.

GLASS, R.I.; PARASHAR, U.; PATEL, M.; GENTSCH, J.; JIANG, B. Rotavirus vaccines: Successes and challenges. **Journal of Infection**, v. 68, n. Suppl.1, p. S9-S18, 2014.

GREENBERG, H.B.; ESTES, M.K. Rotaviruses: From pathogenesis to vaccination. **Gastroenterology**, v. 136, n. 6, p. 1939-1951, 2009.

GREER, A.L.; DREWS, S.J.; FISMAN, D.N. Why "winter" vomiting disease? Seasonality, hydrology, and norovirus epidemiology in Toronto, Canada", **Eco Health**, v. 6, n. 2, p. 192-199, 2009.

GUIMARÃES, F.R.; FERREIRA, F.F.M.; VIEIRA, C.B.; FUMIAN, T.M.; SHUBO, T.; LEITE, J.P.G.; MIAGOSTOVICH, M.P. Molecular detection of human astrovirus in an urban sewage treatment plant in Rio de Janeiro, Brazil. **Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 103, n. 8, p. 819-823, 2008.

GURGEL, R.G.; ALVAREZ, A.J.; RODRIGUES, A.; RIBEIRO, R.R.; DOLABELLA, S.S.; MOTA, N.L.; SANTOS, V.S.; ITURRIZA-GOMARA, M.; CUNLIFFE, N.A.; CUEVAS, L.E. Incidence of rotavirus and circulating genotypes in Northeast Brazil during 7 Years of National Rotavirus Vaccination. **Plos One**, v. 9, n. 10, p. 1-8, 2014.

GUZMÁN, C.; JOFRE, J.; BLANCH, A.R.; LUCENA, F. Development of a feasible method to extract somatic coliphages from sludge, soil, and treated biowaste. **Journal of Virological Methods**, v. 144, n. 1-2, p. 41-48, 2007.

HAAS, C.; ROSE, J.; GERBA, C. **Quantitative Microbial Risk Assessment**. John Wiley & Sons, New York, 1999.

HAKANSSON, A.; ZHIVOTOVSKY, B.; ORRENIUS, S.; SABHARWAL, H.; SVANBORG, C. Apoptosis induced by a human milk protein. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 92, n. 17, p. 8064-8068, 1995.

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

HAMZA, I.A.; JURZIK, L.; STANG, A.; SURE, K.; UBERLA, K.; WILHELM, M. Detection of human viruses in rivers of a densely-populated area in Germany using a virus adsorption elution method optimized for PCR analyses. **Water Research**, v. 43, n. 10, p. 2657-2668, 2009.

HARAMOTO, E.; KATAYAMA, H.; OGUMA, K.; OHGAKI, S. Recovery of naked viral genomes in water by virus concentration methods. **Journal of Virological Methods**, v. 142, n. 1-2, p. 169-173, 2007.

HARAMOTO, E.; KATAYAMA, H.; UTAGAWA, E.; OHGAKI S. Recovery of human norovirus from water by virus concentration methods. **Journal of Virological Methods**, v. 160, n. 1-2, p. 206-209, 2009.

HASS CN, ROSE JB, GERBA CP, REGLI R. Risk assessment of viruses in drinking water. **Risk analysis**, v. 13, n. 5, p. 545-552, 1993.

HASSINE-ZAAFRANE, M.; KAPLON, J.; SALEM, I.B.; SDIRI-LOULIZI, K.; SAKLY, N.; POTHIER, P.; AOUNI, M.; AMBERT-BALAY, K. Detection and genotyping of group A rotaviruses isolated from sewage samples in Monastir, Tunisia between April 2007 and April 2010. **Journal of Applied Microbiology**, v. 119, n. 5, p. 1443-1453, 2015.

HATA, A.; KITAJIMA, M.; KATAYAMA, H. Occurrence and reduction of human viruses, F-specific RNA coliphage genogroups and microbial indicators at a full-scale wastewater treatment plant in Japan. **Journal of Applied Microbiology**, v. 114, n. 2, p. 545-554, 2013.

HE, X.Q.; CHENG, L.; ZHANG, D.Y.; XIE, X.M.; WANG, D.H.; WANG, Z. One-year monthly survey of rotavirus, astrovirus and norovirus in three sewage treatment plants (STPs) in Beijing, China and associated health risk assessment. **Water Science and Technology**, v. 64, n. 6, p. 1202-1210, 2011.

HEIM, A.; EBNET, C.; HARSTE, G.; PRING-AKERBLOM, P. Rapid and quantitative detection of human adenovirus DNA by real-time PCR. **Journal of Medical Virology**, v. 70, n. 2, p. 228-239, 2003.

HMAIED, F.; JEBRI, S.; SAAVEDRA, M.E.; YAHYA, M.; AMRI, I.; LUCENA, F.; HAMDI, M. Comparison of Two Concentration Methods for the Molecular Detection of Enteroviruses in Raw and Treated Sewage. **Current Microbiology**, v. 72, n. 1, p. 12-18, 2016.

HYSER, J.M.; ESTES, M.K. Rotavirus Vaccines and Pathogenesis: 2008. **Current Opinion in Gastroenterology**, v. 25, n. 1, p. 36-43, 2009.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Pesquisa Nacional de Saneamento Básico 2008**. Rio de Janeiro, 2010. 219 p. Disponível em: http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/condicaodevida/pnsb2008/PNSB_2008.pdf. Acesso em: 02 out. 2016.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Atlas de Saneamento 2011**. Rio de Janeiro, 2011. 268 p. Disponível em: http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/atlas_saneamento/default_zip.shtm. Acesso em: 02 out. 2016.

ITURRIZA-GÓMARA, M.; WONG, C.; BLOME, S.; DESSELBERGER, U.; GRAY, J. Molecular characterization of VP6 genes of human rotavirus isolates: correlation of genogroups with subgroups and evidence of independent segregation. **Journal of Virology**, v. 76, n. 13, p. 6596-6601, 2002.

IYER, L.M.; ARAVIND, L.; KOONIN, E.V. Common origin of four diverse families of large eukaryotic DNA viruses. **Journal of Virology**, v. 75, n. 23, p. 11720-11734, 2001.

JAMWAL, P.; MITTAL, A.K.; MOUCHEL, J.M. Efficiency evaluation of sewage treatment plants with different technologies in Delhi (India). **Environmental and Monitoring Assessment**, v. 153, n. 1-4, p. 293-305, 2009.

JEBRI, S.; JOFRE, J.; BARKALLAH, I.; SAIDI, M.; HMAIED F. Presence and fate of coliphages and enteric viruses in three wastewater treatment plants effluents and activated sludge from Tunisia. **Environmental Science and Pollution Research International**, v. 19, n. 6, p. 2195-2201, 2012.

JIANG S.C. Human Adenoviruses in Water: Occurrence and Health Implications: A critical Review. **Environmental Science Technology**, v. 40, n. 23, p. 7132-7140, 2006.

JIANG, S.C.; HAN, J.; HE, J.W.; CHU, W.. Evaluation of four cell lines for assay of infectious adenoviruses in water samples. **Journal of Water and Health**, v. 7, n. 4, p. 650-656, 2009

JONES, M.S.; HARRACH, B.; GANAC, R.D.; GOZUM, M.M.A.; DELA CRUZ, W. P., RIEDEL, B.; PAN, C.; DELWART, E.L.; SCHNURR, D.P. New adenovirus species found in a patient presenting with gastroenteritis. **Journal of Virology**, v. 81, n. 11, p. 5978-5984, 2007.

JUIZ DE FORA. **Diagnóstico da situação do saneamento básico e de seus impactos nas condições de vida da população**. Tomo III - Diagnóstico dos serviços de esgotamento sanitário. Juiz de Fora, MG, 2013. Disponível em: http://www.planodesaneamento.pjf.mg.gov.br/pdf/tomo_iii_diagnostico_esgoto.pdf Acesso em 20 out. 2016.

JUIZ DE FORA. **Plano de Saneamento Básico de Juiz de Fora**. 2014. Juiz de Fora, MG, 180 p. Disponível em: http://www.planodesaneamento.pjf.mg.gov.br/pdf/produto_08.pdf. Acesso em: 05 out. 2016.

JURCKAZ-KUREK, A.; GAŚIOR, T.; NEJMAN-FALEŃCZYK, B.; BLOCH, S.; DYDECKA, A.; TOPKA, G.; NECEL, A.; JAKUBOWSKA-DEREDAS, M.; NARAJCZYK, M.; RICHERT, M.; MIESZKOWSKA, A.; WRÓBEL, B.; WĘGRZYN, G.; WĘGRZYN, A. Biodiversity of bacteriophages: morphological and biological properties of a large group of phages isolated from urban sewage. **Scientific Reports**, v. 6:34338, p. 1-17, 2016.

KATAYAMA, H.; SHIMASAKI, A.; OHGAKI, S. Development of a virus concentration method and its application to detection of enterovirus and norwalk virus from coastal seawater. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 3, p. 1033-1039, 2002.

KATAYAMA, H.; HARAMOTO, E.; OGUMA, K.; YAMASHITA, H.; TAJIMA, A.; NAKAJIMA, H.; OHGAKI, S. One year monthly quantitative survey of noroviruses, enteroviruses, and adenoviruses in wastewater collected from six plants in Japan. **Water Research**, v. 42, n. 6-7, p. 1441-1448, 2008.

KINDLER, E.; TROJNAR, E.; HECKEL, G.; OTTO, P.H.; JOHNE, R. Analysis of rotavirus species diversity and evolution including the newly determined full-length genome sequences of rotavirus F and G. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 14, p. 58-67, 2013.

KITAJIMA, M.; IKER, B.C.; PEPPER, I.L.; GERBA, C.P. Relative abundance and treatment reduction of viruses during wastewater treatment processes - identification of potential viral indicators. **Science of the Total Environment**, v. 488-489, p. 290-296, 2014.

KIULIA, N.M.; HOFSTRA, N.; VERMEULEN, L.C.; OBARA, M.A.; MEDEMA, G.; ROSE, J.B. Global Occurrence and Emission of Rotaviruses to Surface Waters. **Pathogens**, v. 4, n. 2, p. 229-255, 2015.

KO, G.P.; CROMEANS, T.L.; SOBSEY, M.D. UV inactivation of adenovirus type 41 measured by cell culture mRNA RT-PCR. **Water Research**, v. 39, n. 15, p. 3643-3649, 2005.

KOTLOFF, K.L.; NATARO, J.P.; BLACKWELDER, W.C.; NASRIN, D.; FARAG, T.H.; PANCHALINGAM, S.; WU, Y.; SOW, S.O.; SUR, D.; BRIEMAN, R.F.; FARUQUE, A.S.G.; ZAIDI, A.K.M.; SAHA, D.; ALONSO, P.L.; TAMBOURA, B.; SANOGO, D.; ONWUCHEKWA, U.; MANNA, B.; RAMAMURTHY, T.; KANUNGO, S.; OCHIENG, J.B.; OMORE, R.; OUNDO, J.O.; HOSSAIN, A.; DAS, S.K.; AHMED, S.; QURESHI, S.; QUADRI, S.; ADEGBOLA, R.A.; ANTONIO, M.; HOSSAIN, M.J.; AKINSOLA, A.; MANDOMANDO, I.; NHAMPOSSA, T.; ACÁCIO, S.; BISWAS, K.; O'REILLY, C.E.; MINTZ, E.D.; BERKELEY, L.Y.; MUHSEN, K.; SOMMERFELT, H.; ROBINS-BROWNE, R.M.; LEVINE, M.M. Burden and aetiology of diarrhoeal disease in infants and young children in developing countries (the Global Enteric Multicenter Study, GEMS): a prospective, case-control study. **Lancet**, v. 382, n. 9888, p. 209-222, 2013.

KUKKULA, M.; ARSTILA, P.; KLOSSNER, M.L.; MAUNULA, L.; BONSDORFF, C.H.V.; JAATINEN, P. Waterborne outbreak of viral gastroenteritis. **Scandinavian Journal of Infectious Diseases**, v. 29, p. 415-418, 1997.

LA SCOLA, B.; AUDIC, S.; ROBERT, C.; JUNGANG, L.; DE LAMBALLERIE, X.; DRANCOURT, M.; BIRTLES, R.; CLAVERIE, J.M.; RAOULT, D. A giant virus in amoebae. **Science**, v. 299, n. 5615, p. 2033, 2003.

LA SCOLA, B.; DESNUES, C.; PAGNIER, I.; ROBERT, C.; BARRASSI, L.; FOURNOUS, G.; MERCHAT, M.; SUZAN-MONTI, M.; FORTERRE, P.; KOONIN, E.; RAOULT, D. The virophage as a unique parasite of the giant mimivirus. **Nature**, v. 455, n. 7209, p. 100-104, 2008.

LA SCOLA, B. Looking at protists as a source of pathogenic viruses. **Microbial Pathogenesis**, v. 77, p. 131-135, 2014.

LANZIERI, T.M.; LINHARES, A.C.; COSTA, I.; KOLHE, D.A.; CUNHA, M.H.; ORTEGA-BARRIA, E.; COLINDRES, R.E. Impact of rotavirus vaccination on childhood deaths from diarrhoea in Brazil. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 15, n. 3, p. e206-210, 2011.

LEGENDRE, M.; AUDIC S.; POIROT O.; HINGAMP P.; SELTZER V.; BYRNE D.; LARTIGUE A.; LESCOT M.; BERNADAC A.; POULAIN J.; ABERGEL C.; CLAVERIE J.M. mRNA deep sequencing reveals 75 new genes and a complex transcriptional landscape in Mimivirus. **Genome Research**, v. 20, n. 5, p. 664-674, 2010.

LENNON, G.; CASHMAN, O.; LANE, K.; CRYAN, B.; O'SHEA, H. Prevalence and Characterization of Enteric Adenoviruses in the South of Ireland. **Journal of Medical Virology**, v. 79, n. 10, p. 1518-1526, 2007.

LEWIS, G.D.; METCALF, T.G. Polyethylene glycol precipitation for recovery of pathogenic viruses including hepatitis A and human rotavirus from oyster, water, and sediments. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 54, n. 8, p. 1983-1988, 1988.

MAGALHÃES, G.F.; NOGUEIRA, P.A.; GRAVA, A.F.; PENATI, M.; SILVA, L.H.P.S.; ORLANDI, P.P. Rotavirus and Adenovirus in Rondônia. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 102, n. 5, p. 555-557, 2007.

MAO, X.; GU, J.; SUN, Y.; XU, S.; ZHANG, X.; YANG, H.; REN, F. Anti-proliferative and anti-tumour effect of active components in donkey milk on A549 human lung cancer cells. **International Dairy Journal**, v. 19, n. 11, p. 703-708, 2009.

MARQUES, R.G. **Ocorrência de coliformes e Salmonela em águas de irrigação de hortaliças nos municípios de Goiânia e Aparecida de Goiânia, Goiás**. Goiás: UFG. 2003. Dissertação (Mestrado em Medicina Tropical) - Universidade Federal de Goiás, Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, Goiânia, 2003.

MARTINELLI, D.; PRATO, R.; CHIRONNA, M.; SALLUSTIO, A.; CAPUTI, G.; CONVERSANO, M.; DEGLIATTI, M.C.; D'ANCONA, F.P.; GERMINARIO, C.A.; QUARTO, M. Large outbreak of viral gastroenteritis caused by contaminated drinking water in Apulia, Italy, May-October 2006. **Euro Surveillance**, v. 12, n. 4, p. E070419.1, 2007.

MASCARENHAS, J.D.P. **Caracterização molecular de genótipos de rotavírus do grupo A em Belém, Pará, no período de 1990 a 2003**: estudo em neonatos, crianças diarreicas de 0-3 anos e ensaio clínico com vacinas. 2006. 160f. Tese (Doutorado em Biologia Parasitária) - Curso de Pós-Graduação em Biologia Parasitária, Instituto Oswaldo Cruz – FIOCRUZ, Rio de Janeiro, 2006.

MATTHEWS, R.E.F. The classification and nomenclature of viruses. **Intervirology**, v. 11, n. 3, p. 133-135, 1979.

MATTHIJNSSENS, J.; CIARLET, M.; HEIMAN, E.; ARIJS, I.; DELBEKE, T.; MCDONALD, S.M.; PALOMBO, E.A.; ITURRIZA-GOMARA, M.; MAES, P.; PATTON, J.T.; RAHMAN, M.; VAN RANST, M. Full Genome-Based Classification of Rotaviruses Reveals a Common Origin between Human Wa-Like and Porcine Rotavirus Strains and Human DS-1-Like and Bovine Rotavirus Strain. **Journal of Virology**, v. 82, n. 7, p. 3204-3219, 2008a

MATTHIJNSSENS, J.; CIARLET, M.; RAHMAN, M.; ATTOUI, H.; BÁNYAI, K.; ESTES, M.K.; GENTSCH, J.R.; ITURRIZA-GÓMARA, M.; KIRKWOOD, C.D.; MARTELLA, V.; MERTENS, P.P.C.; NAKAGOMI, O.; PATTON, J.T.; RUGGERI, F.M.; SAIF, L.J.; SANTOS, N.; STEYER, A.; TANIGUCHI, K.; DESSELBERGER, U.; RANST, M.V. Recommendation for the classification of group A rotaviruses using all 11 genomic RNA segments. **Archives of Virology**, v. 153, n. 8, p. 1621-1629, 2008b.

MATTHIJNSSENS, J.; CIARLET, M.; MCDONALD, S.M.; ATTOUI, H.; BÁNYAI, K.; BRISTER, J.R.; BUESA, J.; ESONA, M.D.; ESTES, M.K.; GENTSCH, J.R.; ITURRIZA-GÓMARA, M.; JOHNE, R.; KIRKWOOD, C.D.; MARTELLA, V.; MERTENS, P.P.C.; NAKAGOMI, O.; PARREÑO, V.; RAHMAN, M.; RUGGERI, F.M.; SAIF, L.J.; SANTOS, N.; STEYER, A.; TANIGUCHI, K.; PATTON, J.T.; DESSELBERGER, U.; RANST, M.V. Uniformity of rotavirus strain nomenclature proposed by the Rotavirus Classification Working Group (RCWG). **Archives of Virology**, v. 156, n. 8, p. 1397-1413, 2011.

MATTHIJNSSENS, J.; OTTO, P.H.; CIARLET, M.; DESSELBERGER, U.; VAN RANST, M.; JOHNE, R. VP6-sequencebased cutoff values as a criterion for rotavirus species demarcation. **Archives of Virology**, v. 157, n. 6, p. 1177-1182, 2012.

MENA, K.D.; GERBA, C.P. Waterborne Adenovirus. **Reviews of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 198, p. 133-167, 2009.

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

MELLOU, K.; KATSILOULIS, A.; POTAMITI-KOMI, M.; POURNARAS, S.; KYRITSI, M.; KATSIAFLAKA, A.; KALLIMANI, A.; KOKKINOS, P.; PETINAKI, E.; SIDEROGLOU, T.; GEORGAKOPOULOU, T.; VANTARAKIS, A.; HADJICHRISTODOULOU, C. A large waterborne gastroenteritis outbreak in central Greece, March 2012: challenges for the investigation and management. **Epidemiology and Infection**, v. 142, n. 1, p. 40-50, 2014.

MENG, Z.D.; BIRCH, C.; HEATH, R.; GUST, I. Physicochemical stability and inactivation of human and simian rotaviruses. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 53, n. 4, p. 727-730, 1987.

MEZZANOTTE, V.; ANTONELLI, M.; CITTERIO, S.; NURIZZO, C. Wastewater disinfection alternatives: Chlorine, Ozone, Peracetic Acid, and UV Light. **Water Environment Research**, v. 79, n. 12, p. 2373-2379, 2007.

MIAGOSTOVICH, M.P.; FERREIRA, F.F.M.; GUIMARAES, F.R.; FUMIAN, T.M.; DINIZ-MENDES, L.; LUZ, S.L.B.; SILVA, L.A.; LEITE, J.P.G. Molecular Detection and Characterization of Gastroenteritis Viruses Occurring Naturally in the Stream Waters of Manaus, Central Amazonia, Brazil. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, n. 2, p. 375-382, 2008.

MIAGOSTOVICH, M.P.; GUIMARAES, F.R.; VIEIRA, C.B.; FUMIAN, T.M.; GAMA, N.P.; VICTORIA, M.; OLIVEIRA, J.M.; MENDES, A.C.O.; GASPAR, A.M.C.; LEITE, J.P.G. Assessment of Water Quality in a Border Region Between the Atlantic Forest and an Urbanized Area in Rio de Janeiro, Brazil. **Food and Environmental Virology**, v. 6, n. 2, p. 110-115, 2014.

MINAS GERAIS. Secretaria de Estado de Meio Ambiente e Desenvolvimento Sustentável. **Parecer n. 1170956/2014**, de 17 de novembro de 2014.

MINTER. Ministério do Interior. Enquadra os cursos d'água da Bacia Hidrográfica do Rio Paraíba do Sul. Portaria nº 86, de 4 de junho de 1981. **Diário Oficial {da} República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 5 de junho de 1981, Seção 1, páginas 45.

MONPOEHO, S.; MAUL, A.; BONNIN, C.; PATRIA, L.; RANARIJAONA, S.; BILLAUDEL, S.; FERRÉ, V. Clearance of human-pathogenic viruses from sludge: study of four stabilization processes by real-time reverse transcription-PCR and cell culture. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, n. 9, p. 5434-5440, 2004.

MORALES-MORALES, H.A.; VIDAL, G.; OLSZEWSKI, J.; ROCK, C.M.; DASGUPTA, D.; OSHIMA, K.H.; SMITH, G.B. Optimization of a Reusable Hollow-Fiber Ultrafilter for Simultaneous Concentration of Enteric Bacteria, Protozoa, and Viruses from Water. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n. 7, p. 4098-4102, 2003.

MORESCO, V.; VIANCELLI, A.; NASCIMENTO, M.A.; SOUZA, D.S.M.; RAMOS, A.P.D.; GARCIA, L.A.T.; SIMÕES, C.M.O.; BARARDI, C.R.M. Microbiological and physicochemical analysis of the coastal waters of southern Brazil. **Marine Pollution Bulletin**, v. 64, n. 1, p. 40-48, 2012.

MORILLO, S.G.; LUCHS, A.; CILLI, A.; COSTA, F.F.; CARMONA, R.C.C.; TIMENETSKY, M.C.S.T. Characterization of rotavirus strains from day care centers: pre- and post-rotavirus vaccine era. **Jornal de Pediatria**, v. 86, n. 2, p. 155-158, 2010.

MOYO, S.J.; HANEVIK, K.; BLOMBERG, B.; KOMMEDAL, O.; NORDBO, S.A.; MASELLE, S.; LANGELAND, N. Prevalence and molecular characterisation of human adenovirus in diarrhoeic children in Tanzania; a case control study. **BMC Infectious Diseases**, v. 14:666, p. 1-9, 2014.

MYRMEL, M.; LANGE, H.; RIMSTAD, E. A 1-Year Quantitative Survey of Noro-, Adeno-, Human Boca-, and Hepatitis E Viruses in Raw and Secondarily Treated Sewage from Two Plants in Norway. **Food and Environmental Virology**, v. 7, n. 3, p. 213-223, 2015.

NAIDOO, S.; OLANIRAN, A.O. Treated wastewater effluent as a source of microbial pollution of surface water resources. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 11, n. 1, p. 249-270, 2014.

NEMEROW, G.R.; PACHE, L.; REDDY, V.; STEWART, P.L. Insights into adenovirus host cell interactions from structural studies. **Virology**, v. 384, n. 2, p. 380-388, 2009.

OKOH, A.I.; SIBANDA, T.; GUSHA, S.S. Inadequately treated wastewater as a source of human enteric viruses in the environment. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 7, n. 6, p. 2620-2637, 2010.

OLIVEIRA, S.C.; VON SPERLING, M. Reliability analysis of wastewater treatment plants. **Water Research**, v. 42, n. 4-5, p. 1182-1194, 2008.

OMS e UNICEF. Organização Mundial da Saúde e Fundação das Nações Unidas pela Infância. **Progress on Sanitation and Drinking Water: 2015 Update and MGD Assessment**. New York, 2015.

OPAS. Organização Pan-Americana da Saúde. **Vigilancia epidemiológica de diarreias causadas por rotavirus: guía práctica**. Washington, D.C., 2007.

ORSSATTO, F.; HERMES, E.; VILAS BOAS, M.A. Eficiência de remoção de óleos e graxas de uma estação de tratamento de esgoto sanitário, Cascavel – Paraná. **Engenharia Ambiental - Espírito Santo do Pinhal**, v. 7, n. 4, p. 249-256, 2010.

PAGNIER, I.; RETENO, D.G.; SAADI, H.; BOUGHALMI, M.; GAIA, M.; SLIMANI, M.; NGOUNGA, T.; BEKLIZ, M.; COLSON, P.; RAOULT, D.; LA SCOLA, B. A decade of improvements in mimiviridae and marseilleviridae isolation from Amoeba. **Intervirology**, v. 56, n. 6, p. 354-363, 2013.

PARSHIONIKAR, S.; LASEKE, I.; FOUT, G.S. Use of propidium monoazide in reverse transcriptase PCR to distinguish between infectious and noninfectious enteric viruses in water samples. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 76, n. 13, p. 4318-4326, 2010.

PETRINCA, A.R.; DONIA, D.; PIERANGELI, A.; GABRIELI, A.M.; DEGENER, A.M.; BONANNI, E.; DIACO, L.; CECCHINI, G.; ANASTASI, P.; DIVIZIA, M. Presence and environment circulation of enteric viruses in three different wastewater treatment plants. **Journal of Applied Microbiology**, v. 106, n. 5, p. 1608-1617, 2009.

PORTES, S.A.R.; VOLOTÃO, E.M.; ROCHA, M.S.; REBELO, M.C.; XAVIER, M.P.T.P.; ASSIS, R.M.; ROSE, T.L.; MIAGOSTOVICH, M.P.; LEITE, J.P.G.; CARVALHO-COSTA, F.A. A non-enteric adenovirus A12 gastroenteritis outbreak in Rio de Janeiro, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 111, n. 6, p. 403-406, 2016.

PRADO, T.; SILVA, D.M.; GUILAYN, W.C.; ROSE, T.L.; GASPAR, A.M.C.; MIAGOSTOVICH, M.P. Quantification and molecular characterization of enteric viruses detected in effluents from two hospital wastewater treatment plants. **Water Research**, v. 45, n. 3, p. 1287-1297, 2011.

PRADO, T.; FUMIAN, T.M.; MIAGOSTOVICH, M.P.; GASPAR, A.M.C. Monitoring the hepatitis A virus in urban wastewater from Rio de Janeiro, Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 106, n. 2, p. 104-109, 2012.

PRADO, T.; GUILAYN, W.C.P.B.; GASPAR, A.M.C.; MIAGOSTOVICH, M.P. The efficiency of concentration methods used to detect enteric viruses in anaerobically digested sludge. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 108, n. 1, p. 77-83, 2013.

PRADO, T.; GASPAR, A.M.C.; MIAGOSTOVICH, M.P. Detection of enteric viruses in activated sludge by feasible concentration methods. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 45, n. 1, p. 343-349, 2014.

PUIG, M.; JOFRE, J.; LUCENA, F.; ALLARD, A.; WADELL, G.; GIRONES, R. Detection of adenoviruses and enteroviruses in polluted waters by nested PCR amplification. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 60, n. 8, p. 2963-2970, 1994.

PUSCH, D.; OH, D.Y.; WOLF, S.; DUMKE, R.; SCHRÖTER-BOBSIN, U.; HÖHNE, M.; RÖSKE, I.; SCHREIER, E. Detection of enteric viruses and bacterial indicators in German environmental waters. **Archives of Virology**, v. 150, n. 5, p. 929-947, 2005.

RABONI, S.M.; DAMASIO, G.A.; FERREIRA, C.E.O.; PEREIRA, L.A.; NOGUEIRA, M.B.; DIDAL, L.R.; CRUZ, C.R.; ALMEIDA, S.M. Acute gastroenteritis and enteric viruses in hospitalized children in southern Brazil: aetiology, seasonality and clinical outcomes. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 109, n. 4, p. 428-435, 2014.

RAJAL, V.B.; MCSWAIN, B.S.; THOMPSON, D.E.; LEUTENEGGER, C.M.; KILDARE, B.J.; WUERTZ, S. Validation of hollow fiber ultrafiltration and real-time PCR using bacteriophage PP7 as surrogate for the quantification of viruses from water samples. **Water Research**, v. 41, n. 7, p. 1411-1422, 2007a.

RAJAL, V.B.; MCSWAIN, B.S.; THOMPSON, D.E.; LEUTENEGGER, C.M.; WUERTZ, S. Molecular quantitative analysis of human viruses in California stormwater. **Water Research**, v. 41, n. 19, p. 4287-4298, 2007b.

RAO, V.C.; METCALF, T.G.; MELNICK, J.L. Development of a method for concentration of rotavirus and its recovery of rotavirus from estuarine water. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 52, n. 3, p. 484-488, 1986.

REIS, T.A.; ASSIS, A.S.; DO VALLE, D.A.; BARLETTA, V.H.; DE CARVALHO, I.P.; ROSE, T.L.; PORTES, S.A.; LEITE, J.P.; ROSA E SILVA, M.L. The role of human adenoviruses type 41 in acute diarrheal disease in Minas Gerais after rotavirus vaccination. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 47, n. 1, p. 243-250, 2016.

RETENO, D.G.; BENAMAR, S.; KHALIL, J.B.; ANDREANI, J.; ARMSTRONG, N.; KLOSE, T.; ROSSMAN, M.; COLSON, P.; RAOULT, D.; LA SCOLA, B. Faustovirus, an asfarvirus-related new lineage of giant viruses Infecting amoebae. **Journal of Virology**, v. 89, n. 13, p. 6585-6594, 2015.

RIGOTTO, C.; VICTORIA, M.; MORESCO, V.; KOLESNIKOVA, C.K.; CORRÊA, A.; SOUZA, D.S.M.; MIAGOSTOVICH, M.P.; SIMÕES, C.M.O.; BARARDI, C.R.M. Assessment of adenovirus, hepatitis A virus and rotavirus presence in environmental samples in Florianópolis, South Brazil. **Journal of Applied Microbiology**, v. 109, n. 6, p. 1979-1987, 2010.

RIGOTTO, C., HANLEY, K., ROCHELLE, P.A., DE LEON, R., BARARDI, C.R.M., YATES, M.V. Survival of adenovirus types 2 and 41 in surface and ground waters measured by a plaque assay. **Environmental Science & Technology**, v. 45, n. 9, p. 4145-4150, 2011.

ROBINSON, C.M.; SINGH, G.; LEE, J.Y.; DEHGHAN, S.; RAJAIYA, J.; LIU, E.B.; YOUSUF, M.A.; BETENSKY, R.A.; JONES, M.S.; DYER, D.W.; SETO, D.; CHODOSH, J. Molecular evolution of human adenoviruses. **Scientific Reports**, v. 3:1812, p. 1-7, 2013.

ROCK, C.; ALUM, A.; ABBASZADEGAN, M. PCR inhibitor levels in concentrates of biosolid samples predicted by a new method based on excitation-emission matrix spectroscopy. **Applied and Environmental Microbiology**; v. 76, n. 24, p. 8102-8109, 2010.

RODRÍGUEZ-DÍAZ, J.; QUERALES, L.; CARABALLO, L.; VIZZI, E.; LIPRANDI, F.; TAKIFF, H.; BETANCOURT, W.Q. Detection and characterization of waterborne gastroenteritis viruses in urban sewage and sewage-polluted river waters in Caracas, Venezuela. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, n. 2, p. 387-394, 2009.

ROSA E SILVA, M.L.; NAVECA, F.G.; CARVALHO, I.P. Epidemiological aspects of rotavirus infection in Minas Gerais, Brasil. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 5, n. 4, p. 215-222, 2001.

ROSA E SILVA, M.L.; CARVALHO, I.P.; GOUVEA, V. 1998–1999 rotavirus seasons in Juiz de Fora, Minas Gerais, Brazil: detection of an unusual G3P4 epidemic strain. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, n. 8, p. 2837-2842, 2002.

ROSARIO, K.; NILSSON, C.; LIM, Y.W.; RUAN, Y.; BREITBART, M. Metagenomic analysis of viruses in reclaimed water. **Environmental Microbiology**, v. 11, n. 11, p. 2806-2820, 2009.

ROSE, M.A.; DHAR, A.K.; BROOKS, H.A.; ZECCHINI, F.; GERSBERG, R.M. 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**, v. 40, n. 12, p. 2387-2396, 2006.

RUGGERI, F.M.; FIORE, L. Vaccine preventable viral diseases and risks associated with waterborne transmission. **Annali dell'Istituto Superiore di Sanita**, v. 48, n. 4, p. 460-472, 2012.

SAADI, H.; RETENO, D.G.; COLSON, P.; AHERFI, S.; MINODIER, P.; PAGNIER, I.; RAOULT, D.; LA SCOLA, B. Shan virus: a new mimivirus isolated from the stool of a Tunisian patient with pneumonia. **Intervirology**, v. 56, n. 6, p. 424-429, 2013.

SÁNCHEZ, G.; ELIZAQUÍVEL, P.; AZNAR, R. Discrimination of infectious hepatitis A viruses by propidium monoazide real-time RT-PCR. **Food and Environmental Virology**, v. 4, n. 1, p. 21-25, 2012.

SANO, D.; FUKUSHI, K.; YOSHIDA, Y.; OMURA, T. Detection of enteric viruses in municipal sewage sludge by a combination of the enzymatic virus elution method and RT-PCR. **Water Research**, v. 37, n. 14, p. 3490-3498, 2003.

SANO, E.; CARLSON, S.; WEGLEY, L.; ROHWER, F. Movement of Viruses between Biomes. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, n. 10, p. 5842-5846, 2004.

SANTOS, F.M.; VIEIRA, M.J.; GARRAFA, P.; MONEZI, T.A.; PELLIZARI, V.H.; HÁRSI, C.M.; MEHNERT, D.U. Discrimination of adenovirus types circulating in urban sewage and surface polluted waters in São Paulo city, Brazil. **Water Science and Technology: Water Supply**, v. 4, n. 2, p. 79-85, 2004.

SARTORI, A.M.C.; VALENTIM, J.; SOAREZ, P.C.; NOVAES, H.M. Rotavirus morbidity and mortality in children in Brazil. **Revista Panamericana de Salud Pública**, v. 23, n. 2, p. 92-100, 2008.

SAUERBREI, A.; WUTZLER, P. Testing thermal resistance of viruses. **Archives of Virology**, v. 154, n. 1, p. 115-119, 2009.

SAVICHTCHEVA, O.; OKABE, S. Alternative indicators of fecal pollution: relations with pathogens and conventional indicators, current methodologies for direct pathogen monitoring and future application perspectives. **Water Research**, v. 40, n. 13, p. 2463-2476, 2006.

SCHEID, P., BALCZUN C., SCHAUB G.A. Some secrets are revealed: parasitic keratitis amoebae as vectors of the scarcely described pandoraviruses to humans. **Parasitology Research**, v. 103, n. 10, p. 3759-3764, 2014.

SCHLINDWEIN, A.D.; RIGOTTO, C.; SIMÕES, M.O.; BARARDI, C.R.M. Detection of enteric viruses in sewage sludge and treated wastewater effluent. **Water Science and Technology**, v. 61, n. 2, p. 537-544, 2010.

SCOTT, T.M.; ROSE, J.B.; JENKINS, T.M.; FARRAH, S.R.; LUKASIK, J. Microbial Source Tracking: Current Methodology and Future Directions. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 12, p. 5796-5803, 2002.

SDIRI-LOULIZI, K.; HASSINE, M.; AOUNI, Z.; GHARBI-KHELIFI, H.; CHOUCANE, S.; SAKLY, N.; NEJI-GUEDICHE, M.; POTHIER, P.; AOUNI, M.; AMBERT-BALAY, K. Detection and molecular characterization of enteric viruses in environmental samples in Monastir, Tunisia between January 2003 and April 2007. **Journal of Applied Microbiology**, v. 109, n. 3, p. 1093-1104, 2010.

SIDHU, J.P.S.; TOZE, S.G. Human pathogens and their indicators in biosolids: A literature review. **Environment International**, v. 35, n. 1, p. 187-201, 2009.

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

SINCLAIR, R.G.; JONES, E.L.; GERBA, C.P. Viruses in recreational water-borne disease outbreaks: a review. **Journal of Applied Microbiology**, v. 107, n. 6, p. 1769-1780, 2009.

SINGH, R.P.; AGRAWAL, M. Potential benefits and risks of land application of sewage sludge. **Waste Management**, v. 28, n. 2, p. 347-358, 2008.

SKRABER, S.; GASSIOLLOU, B.; SCHWARTZBROD, L.; GANTZER, C. Survival of infectious Poliovirus-1 in river water compared to the persistence of somatic coliphages, thermotolerant coliforms and Poliovirus-1 genome. **Water Research**, v. 38, n. 12, p. 2927-2933, 2004.

SNIS. Sistema Nacional de Informações sobre Saneamento. Ministério das Cidades. **Série Histórica**. 2013. Disponível em: <http://app.cidades.gov.br/serieHistorica/>. Acesso em: 05 ago. 2015.

STRAUB, T. M.; CHANDLER, D.P. Towards a unified system for detecting waterborne pathogens. **Journal of Microbiological Methods**, v. 53, n. 2, p. 185-197, 2003.

TAMURA, K.; STECHER, G.; PETERSON, D.; FILIPSKI, A.; KUMAR, S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. **Molecular Biology and Evolution**, v. 30, n. 12, p. 2725-2729, 2013.

TAYLOR, M.J.; BENTHAM, R.H.; ROSS, K.E. Limitations of Using Propidium Monoazide with qPCR to Discriminate between Live and Dead Legionella in Biofilm Samples. **Microbiology Insights**, v. 7, p. 15-24, 2014.

TEKLEHAIMANOT, G.Z.; COETZEE, M.A.A.; MOMBA, M.N.B. Faecal pollution loads in the wastewater effluents and receiving water bodies: a potential threat to the health of Sedibeng and Soshanguve communities, South Africa. **Environmental Science and Pollution Research International**, v. 21, n. 16, p. 9589-9603, 2014.

TEMPLETON, M.R.; ANDREWS, R.C.; HOFMANN, R. Particle-associated viruses in water: impacts on disinfection processes. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, v. 38, n. 3, p. 137-164, 2008.

THURSTON-ENRIQUEZ, J.A.; HAAS, C.N.; JACANGELO, J.; GERBA, C.P. Inactivation of feline calicivirus and adenovirus type 40 by UV radiation. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n. 1, p. 577-582, 2003a.

THURSTON-ENRIQUEZ, J.A.; HAAS, C.N.; JACANGELO, J.; GERBA, C.P. Chlorine inactivation of adenovirus type 40 and feline calicivirus. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n. 7, p. 3979-3985, 2003b.

UEDA, T.; HORAN, N.J. Fate of indigenous bacteriophage in a membrane bioreactor. **Water Research**, v. 34, n. 7, p. 2151-2159, 2004.

UFJF, Universidade Federal de Juiz de Fora. Laboratório de climatologia geográfica e análise ambiental, UFJF. **Estação climatológica principal de Juiz de Fora**. Centro de Pesquisas Sociais. Banco de dados do Departamento de Geociências, 2016.

USEPA - Environmental Protection Agency of the United States. 2003. Control of pathogens and vector attraction in sewage sludge. Under 40 CFR Part 503, Appendix H - **Method for the recovery and assay of total culturable viruses from sludge**. (EPA/625/R-92/013). Disponível em: epa.gov/nrmrl/pubs/625r92013/625R92013.pdf.

VECCHIA, A.D.; RIGOTTO, C.; SOLIMAN, M.C.; SOUZA, F.G.; GIEHL, I.C.; SPILKI, F.R. Recovery rate of multiple enteric viruses artificially seeded in water and concentrated by adsorption-elution with negatively charged membranes: interaction and interference between different virus species. **Water Science and Technology**, v. 72, n. 12, p. 2291-2300, 2015.

VERMA, H.; CHITAMBAR, D.S.; VARANASI, G. Identification and Characterization of Enteric Adenoviruses in Infants and Children Hospitalized for Acute Gastroenteritis. **Journal Medical of Virology**, v. 81, n. 1, p. 60-64, 2009.

VIAU, E.; PECCIA, J. Survey of Wastewater Indicators and Human Pathogen Genomes in Biosolids Produced by Class A and Class B Stabilization Treatments. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, n. 1, p. 164-174, 2009.

VICTORIA, M.; GUIMARÃES, F.; FUMIAN, T.; FERREIRA, F.; VIEIRA, C.; LEITE, J.P.; MIAGOSTOVICH, M. Evaluation of an adsorption-elution method for detection of astrovirus and norovirus in environmental waters. **Journal of Virological Methods**, v. 156, n. 1-2, p. 73-76, 2009.

VICTORIA, M.; RIGOTTO, C.; MORESCO, V.; CORRÊA, A.A.; KOLESNOKOVAS, C.; LEITE, J.P.G.; MIAGOSTOVICH, M.P.; BARARDI, C.R.M. Assessment of norovirus contamination in environmental samples from Florianópolis City, Southern Brasil. **Journal of Applied Microbiology**, v. 209, n. 1, p. 231-238, 2010.

VIEIRA, C.B.; MENDES, A.C.D.O.; GUIMARÃES, F.R.; FUMIAN, T.M.; LEITE, J.P.G.; GASPAR, A.M.C.; MIAGOSTOVICH, M.P. Detection of enteric viruses in recreational waters of an urban lagoon in the city of Rio de Janeiro, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 107, n. 6, p. 778-784, 2012.

VIEIRA, C.B.; CORRÊA, A.B.; JESUS, M.S.; LUZ, S.L.B.; WYN-JONES, P.; KAY, K.; VARGHA, M.; MIAGOSTOVICH, M.P. Viruses Surveillance Under Different Season Scenarios of the Negro River Basin, Amazonia, Brazil. **Food and Environmental Virology**, v. 8, n. 1, p. 57-69, 2016.

VILLAR, L.M.; DE PAULA, V.S.; DINIZ-MENDES, L.; GUIMARÃES, F.R.; FERREIRA, F.F.; SHUBO, T.C.; MIAGOSTOVICH, M.P.; LAMPE, E.; GASPAR, A.M. Molecular detection of hepatitis A virus in urban sewage in Rio de Janeiro, Brazil. **Letters in Applied Microbiology**, v. 45, n. 2, p. 168-173, 2007.

VILLENA, C.; EL-SENOUSY, W.M.; ABAD, F.X.; PINTO, R.M.; BOSCH, A. Group A rotavirus in sewage samples from Barcelona and Cairo: emergence of unusual genotypes. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n. 7, p. 3919-3923, 2003.

VON SPERLING M. **Introdução ao tratamento das águas e ao tratamento de esgotos**. Belo Horizonte: Editora UFMG, 4 ed.; 472p, 2014.

WAARBEEK, H.L.G.; DUKERS-MUIJRS, N.H.T.M.; VENNEMA, H.; HOEBEA, C.J.P.A. Waterborne gastroenteritis outbreak at a scouting camp caused by two norovirus genogroups: GI and GII. **Journal of Clinical Virology**, v. 47, n. 3, p. 268-272, 2010.

WANG, H.; BROWN, S.L.; GUNA, B.; MAGESAN, G.N.; SLADE, A.H.; QUINTERN, M.; CLINTON, P.W.; PAYN, T.W. Technological options for the management of biosolids. **Environmental Science and Pollution Research International**, v. 15, n. 4, p. 308-317, 2008.

WARD, R.L.; KNOWLTON, D.R.; PIERCE, N.J. Efficiency of Human Rotavirus Propagation in Cell Culture. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 19, n. 6, p. 748-753, 1984.

WAYE, M.M.Y.; SING, C.W. Anti-viral drugs for human adenoviruses. **Pharmaceuticals**, v. 3, n. 10, p. 3343-3354, 2010.

WILHELMI, I.; ROMAN, E.; SÁNCHEZ-FAUQUIER, A. Viruses causing gastroenteritis. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 9, n. 4, p. 247-262, 2003.

WILMES, P.; SIMMONS, L.; DENEFF, V.J.; BANFIELD, J.F. The dynamic genetic repertoire of microbial communities. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 33, n. 1, p. 109-132, 2009.

WONG, K.; ONAN, B.M.; XAGORARAKI, I. Quantification of Enteric Viruses, Pathogen Indicators, and Salmonella Bacteria in Class B Anaerobically Digested Biosolids by Culture and Molecular Methods. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 76, n. 19, p. 6441-6448, 2010.

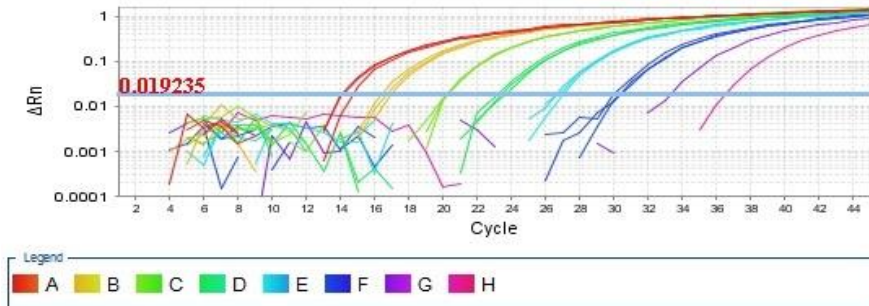
WYN-JONES, A.P.; SELLWOOD, J. Enteric viruses in the aquatic environment. **Journal of Applied Microbiology**, v. 91, n. 6, p. 945-962, 2001.

YUTIN, N.; WOLF, Y.I.; RAOULT, D.; KOONIN, E.V. Eukaryotic large nucleocytoplasmic DNA viruses: clusters of orthologous genes and reconstruction of viral genome evolution. **Virology Journal**, v. 6, n. 223, p. 1-13, 2009.

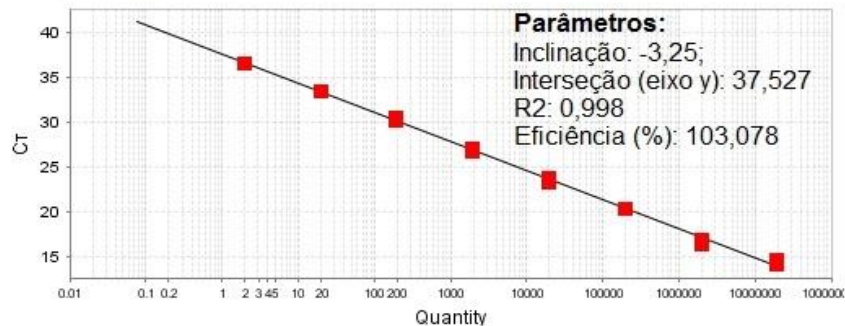
ZENG SQ, HALKOSALO A, SALMINEN M, SZAKAL ED, PUUSTINEN L, VESIKARI T. One-step quantitative RT-PCR for the detection of rotavirus in acute gastroenteritis. **Journal of Virology Methods**, v. 153, n. 2, p. 238-240, 2008.

APÊNDICE A - Curva padrão de adenovírus humanos (HAdV)

A - Curva de amplificação - HAdV



B - Curva padrão - HAdV



C - Quadro com Ct corresponde a cada ponto da curva - HAdV

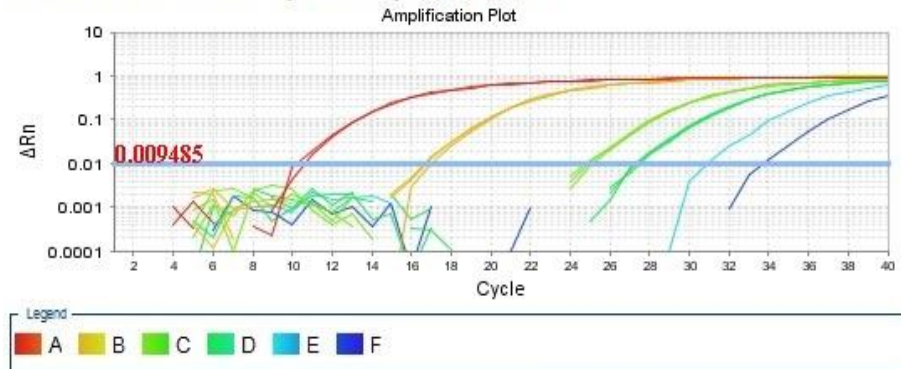
	1	2	3
A	1,96 x 10 ⁷ Ct: 14,60	1,96 x 10 ⁷ Ct: 14,08	1,96 x 10 ⁷ Ct: 14,12
B	1,96 x 10 ⁶ Ct: 16,91	1,96 x 10 ⁶ Ct: 16,32	1,96 x 10 ⁶ Ct: 16,68
C	1,96 x 10 ⁵ Ct: 20,23	1,96 x 10 ⁵ Ct: 20,26	1,96 x 10 ⁵ Ct: 20,29
D	1,96 x 10 ⁴ Ct: 23,45	1,96 x 10 ⁴ Ct: 23,27	1,96 x 10 ⁴ Ct: 23,69
E	1,96 x 10 ³ Ct: 26,96	1,96 x 10 ³ Ct: 26,73	1,96 x 10 ³ Ct: 26,64
F	1,96 x 10 ² Ct: 30,46	1,96 x 10 ² Ct: 30,10	1,96 x 10 ² Ct: 30,34
G	1,96 x 10 ¹ Ct: 33,67	1,96 x 10 ¹ Ct: 33,34	1,96 x 10 ¹ Ct: 33,78
H	1,96 x 10 ⁰ Ct: 36,36	1,96 x 10 ⁰ Ct: 36,66	1,96 x 10 ⁰ Ct: 36,54

Resultados do teste de qPCR obtidos com a curva padrão de adenovírus humano.

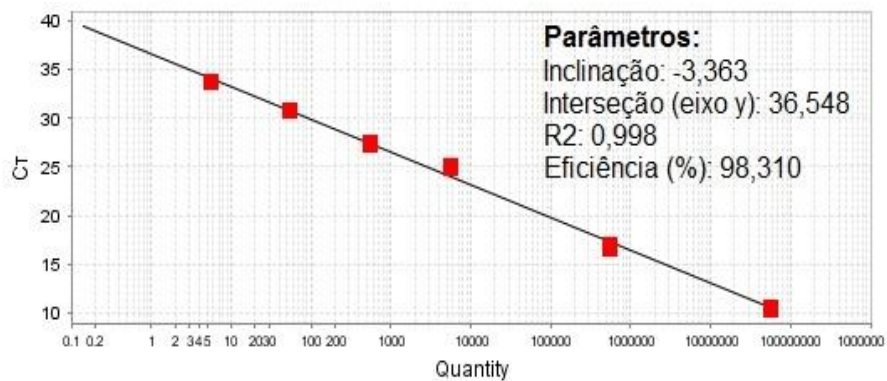
A - Curvas de amplificação em escala logarítmica; B - Curva padrão e seus parâmetros; C - Quadro com o Ct correspondente a cada ponto da curva padrão.

APÊNDICE B - Curva padrão de rotavírus do grupo A (RVA)

A - Curva de amplificação - RVA



B - Curva padrão - RVA



C - Quadro com Ct corresponde a cada ponto da curva - RVA

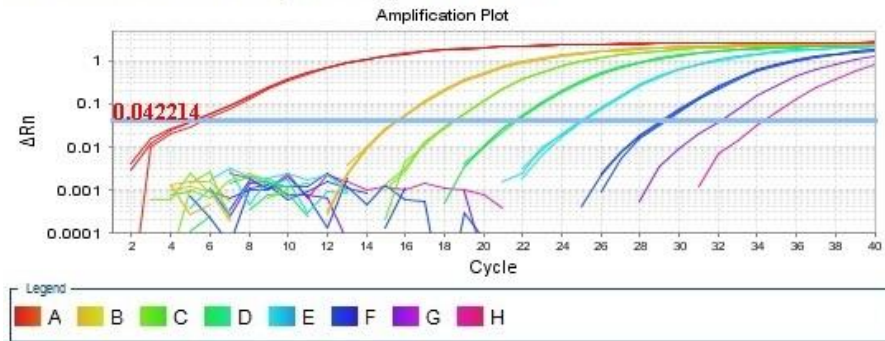
	1	2	3
A	5,53 x 10 ⁷ Ct: 10,30	5,53 x 10 ⁷ Ct: 10,58	5,53 x 10 ⁷ Ct: 10,32
B	5,53 x 10 ⁵ Ct: 16,94	5,53 x 10 ⁵ Ct: 16,62	5,53 x 10 ⁵ Ct: 16,66
C	5,53 x 10 ³ Ct: 24,84	5,53 x 10 ³ Ct: 24,29	5,53 x 10 ³ Ct: 25,12
D	5,53 x 10 ² Ct: 27,36	5,53 x 10 ² Ct: 27,40	5,53 x 10 ² Ct: 27,51
E	5,53 x 10 ¹ Ct: 30,96	5,53 x 10 ¹ Ct: 30,73	5,53 x 10 ¹ Ct: 30,64
F	5,53 x 10 ⁰ Ct: 33,56	5,53 x 10 ⁰ Ct: 33,60	5,53 x 10 ⁰ Ct: 33,74

Resultados do teste de qPCR obtidos com a curva padrão de rotavírus do grupo A.

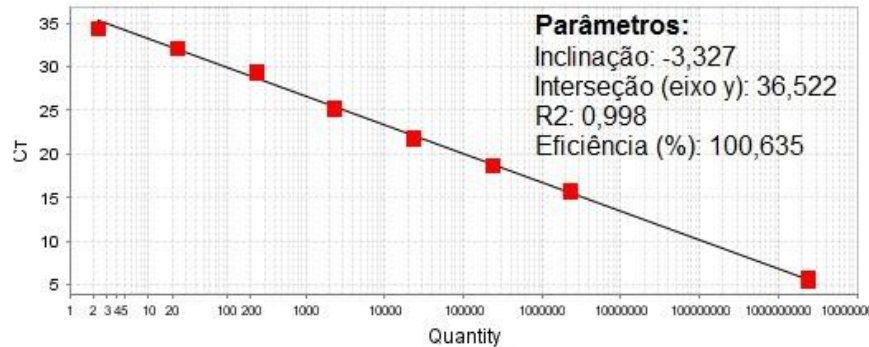
A - Curvas de amplificação em escala logarítmica; B - Curva padrão e seus parâmetros; C - Quadro com o Ct correspondente a cada ponto da curva padrão.

APÊNDICE C - Curva padrão de bacteriófago PP7

A - Curva de amplificação - PP7



B - Curva padrão - PP7



C - Quadro com Ct corresponde a cada ponto da curva - PP7

	1	2	3
A	2,83 x 10 ⁹ Ct: 5,38	2,83 x 10 ⁹ Ct: 5,32	2,83 x 10 ⁹ Ct: 5,80
B	2,83 x 10 ⁸ Ct: 15,75	2,83 x 10 ⁸ Ct: 15,66	2,83 x 10 ⁸ Ct: 15,72
C	2,83 x 10 ⁷ Ct: 18,59	2,83 x 10 ⁷ Ct: 18,61	2,83 x 10 ⁷ Ct: 18,60
D	2,83 x 10 ⁶ Ct: 21,86	2,83 x 10 ⁶ Ct: 21,73	2,83 x 10 ⁶ Ct: 21,74
E	2,83 x 10 ⁵ Ct: 25,26	2,83 x 10 ⁵ Ct: 25,13	2,83 x 10 ⁵ Ct: 25,09
F	2,83 x 10 ⁴ Ct: 29,47	2,83 x 10 ⁴ Ct: 29,23	2,83 x 10 ⁴ Ct: 29,36
G	2,83 x 10 ³ Ct: 32,26	2,83 x 10 ³ Ct: 32,17	2,83 x 10 ³ Ct: 32,36
H	2,83 x 10 ² Ct: 35,44	2,83 x 10 ² Ct: 35,56	2,83 x 10 ² Ct: 35,46

Resultados do teste de qPCR obtidos com a curva padrão de bacteriófago PP7.

A - Curvas de amplificação em escala logarítmica; B - Curva padrão e seus parâmetros; C - Quadro com o Ct correspondente a cada ponto da curva padrão.

APÊNDICE D - Produção científica durante o doutorado

Artigo aceito para publicação:

ASSIS, A.S.F.; OTENIO, M.H.; DRUMOND, B.P.; FUMIAN, T.M.; MIAGOSTOVICH, M.P.; ROSA E SILVA, M.L. Optimization of the skimmed-milk flocculation method for recovery of adenovirus from sludge. **Science of the Total Environment** (2017), <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.01.045>

Artigos publicados durante o doutorado:

ASSIS, A.S.F.; VALLE, D.A.; ANTUNES, G.R.; TIBIRIÇA, S.H.C.; ASSIS, R.M.S.; LEITE, J.P.G.; CARVALHO, I.P.; ROSA E SILVA, M.L. 2013. Rotavirus epidemiology before and after vaccine introduction. **Jornal de Pediatria**, **89(5)**:470-476.

ASSIS, A.S.F.; CRUZ, L.T.; FERREIRA, A.S.; BESSA, M.E.; PINTO, M.A.O.; VIEIRA, C.B.; OTENIO, M.H.; MIAGOSTOVICH, M.P.; ROSA E SILVA, M.L. 2015. Relationship between viral detection and turbidity in a watershed contaminated with group A rotavirus. **Environmental Science and Pollution Research International**, **22(9)**:6886-6897.

REIS, T.A.; ASSIS, A.S.; DO VALLE, D.A.; BARLETTA, V.H.; DE CARVALHO, I.P.; ROSE, T.L.; PORTES, S.A.; LEITE, J.P.; ROSA E SILVA, M.L. 2016. The role of human adenoviruses type 41 in acute diarrheal disease in Minas Gerais after rotavirus vaccination. **Brazilian Journal of Microbiology**, **47(1)**:243-250.

Cursos realizados durante o doutorado:

2015 Next generation sequencing technologies for viral metagenomic analyses. (Carga horária: 4h). Sociedade Brasileira de Virologia, SBV, Rio De Janeiro, Brasil.

2014 Treinamento GS Junior System - sequenciador. (Carga horária: 36h). Roche Diagnóstica do Brasil, ROCHE, Brasil.

2013 Curso teórico-prático de concentración de virus. (Carga horária: 16h). Regional Norte, Universidad de la Replicia Uruguay, UDELAR, Uruguai.

2013 I International bioinformatics workshop. (Carga horária: 46h). Universidade Federal da Bahia, UFBA, Salvador, Brasil.

2013 Computacional molecular evolution. (Carga horária: 90h). Technical University of Denmark, DTU, Lyngby, Dinamarca.

Participação em eventos com apresentação de pôster durante o doutorado:

ASSIS, A.S.F.; OTENIO, M.H.; DOMINGUES, A.L.S.; DRUMOND, B.P.; FUMIAN, T.M.; MIAGOSTOVICH, M.P.; ROSA e SILVA, M.L. Environmental surveillance of human adenoviruses in a wastewater treatment plant. In: XXVII Brazilian Congress of Virology & XI Mercosur Meeting of Virology, 2016, Pirenópolis. Annals of the XXVII Brazilian Congress of Virology & X Mercosur Meeting of Virology. Rio de Janeiro: Virus Reviews and Research, 2016. v.20. p.71.

ASSIS, A.S.F.; OTENIO, M.H.; FUMIAN, T.M.; MIAGOSTOVICH, M.P.; DRUMOND, B.P.; ROSA e SILVA, M.L. Impact of sewage treatment with activated sludge in human adenovirus viral load In: XXVI Brazilian Congress of Virology & X Mercosur Meeting Virology, 2015, Florianópolis. Annals of the XXVI Brazilian Congress of Virology & X Mercosur Meeting of Virology. Rio de Janeiro: Virus Reviews and Research, 2015. v.20. p.85.

ASSIS, A.S.F.; VALLE, D.A.; ROSA e SILVA, M.L. Official reports of hospitalization by ADD X detection of enteric viruses in Juiz de Fora, MG, from 2006 to 2011 In: XXII Congreso Latinoamericano de Microbiologia - ALAM 2014, 2014, Cartagena. Revista Hechos Microbiológicos. Legis S.A., 2014. v.5. p.263.

ASSIS, A.S.F.; CRUZ, L.T.; DRUMOND, B.P.; OTENIO, M.H.; VIEIRA, C.B.; MIAGOSTOVICH, M.P.; ROSA e SILVA, M.L. Detecção de rotavírus X parâmetros microbiológicos e físico-químicos de avaliação da qualidade da água In: 27^o Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2013, Natal. Anais do 27^o Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2013.

ASSIS, A.S.F.; CRUZ, L.T.; OTENIO, M.H.; PINTO, M.A.O.; BESSA, M.E.; VIEIRA, C.B.; MIAGOSTOVICH, M.P.; ROSA e SILVA, M.L. Environmental surveillance of rotavirus in drainage basin of Juiz de Fora, MG and its relation with the microbiological and physicochemical parameters In: II Simposio Latinoamericano de Virologia Ambiental. Salto, Uruguay: Regional Norte - Universidad de la Republica, 2013. p.10.

ASSIS, A.S.F.; VALLE, D.A.; REIS, T.A.V.; BARLETTA, V.H.; MUNCK, A.K.R.; TIBIRIÇA, S.H.C.; CARVALHO, I.P.; ROSA e SILVA, M.L. Putative role of enteric viruses in official reports of hospitalization by acute diarrheal disease in Juiz de Fora, MG In: XXIV Brazilian Congress of Virology & VIII Mercosur Meeting of Virology, 2013, Porto Seguro, Bahia. Virus Reviews and Research Supplement 1, 2013. v.18. p.107.

Co-orientação de trabalho de conclusão de curso durante o doutorado:

Rafaela da Silva Nicolau. Detecção de rotavírus em amostras de esgoto e lodo de esgoto coletadas em estação de tratamento de esgoto de Juiz de Fora, MG. 2015. Trabalho de Conclusão de Curso. (Graduação em Farmácia) - Universidade Federal de Juiz de Fora.

Co-orientação de alunos de iniciação científica durante o doutorado:

Mariana Costa Garcia. Pesquisa de adenovírus em estação de tratamento de esgoto. Início: 2015 – em andamento. Iniciação científica (Graduanda em Ciências Biológicas) - Pró- Reitoria de Pesquisa da Universidade Federal de Juiz de Fora.

Eduardo Gonzaga Souza. Concentração de partículas virais a partir de amostras de esgoto e de lodo de esgoto. 2015-2015. Programa de aperfeiçoamento (Graduando em Medicina) - Universidade Federal de Juiz de Fora e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior.

Thiago Oliveira Almeida. Detecção e caracterização molecular de rotavírus na Bacia Hidrográfica do Córrego São Pedro. 2012-2013. Iniciação científica (Graduando em Farmácia) - Pró- Reitoria de Pesquisa da Universidade Federal de Juiz de Fora.

Lucas Taffarel Cruz. Detecção e caracterização molecular de rotavírus na Bacia Hidrográfica do Córrego São Pedro. 2012-2013. Iniciação científica (Graduando em Farmácia) - Pro Reitoria de Pesquisa da Universidade Federal de Juiz de Fora, Pró-Reitoria de Pesquisa da Universidade Federal de Juiz de Fora.

ANEXO A - Autorização de coleta de amostras na Estação de Tratamento de Esgoto Barbosa Lage, Juiz de Fora – Minas Gerais



JUIZ DE FORA
PREFEITURA



Ofício nº 028/2013 – DRTO/CESAMA

Em 16/08/2013.

A
Profª Maria Luiza da Rosa e Silva
UFJF/JCB/DPMI

Prezada Senhora,

Em resposta a sua solicitação informamos que fica autorizado a coleta de informações conforme projeto apresentado.

Devendo para isto entrar em contato com os Gerentes para agendamento.

Lincoln – Gerente de Operação de Água – Tel: 3239-1473

André Soares – Gerente de Operação de Esgoto – Tel: 3239-1301

Atenciosamente,

MÁRCIO AUGUSTO PESSOA AZEVEDO

Diretor Técnico Operacional

CESAMA

Rio Branco, 1843 / 10º Andar - Centro - CEP: 36.013-020 - Tel: (32) 3239-1207 - Juiz de Fora - MG