

## INCIDÊNCIA DE VÍRUS ENTÉRICOS EM AMOSTRAS AMBIENTAIS NA BACIA HIDROGRÁFICA DO RIO TEGA – RS

*Heloísa Giron<sup>1\*</sup>; Flaviane Eva Magrini<sup>1</sup>; Taison Anderson Bortolin<sup>2</sup>  
Suelen Paesi<sup>1</sup>; Vania Elisabete Schneider<sup>2</sup>.*

**Resumo** – A contaminação de corpos hídricos por vírus entéricos é bem comprovada e a disseminação das partículas virais é uma das principais causas de enfermidades na população. Adenovírus e norovírus são agentes etiológicos causadores de gastroenterites, são vírus não envelopados que são eliminados pelas fezes humanas e animais infectados podendo permanecer viáveis por longos períodos no ambiente. O presente estudo visou à detecção molecular de adenovírus e norovírus e a análise de sua correlação com parâmetros físico-químicos de recursos hídricos localizados na bacia hidrográfica do Rio Tega, RS. Foram analisadas 7 amostras coletadas em março de 2013 em diferentes pontos da bacia por Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) e RT-PCR (Transcriptase reversa). Nestas amostras, não foram detectadas a presença de ambos os vírus em todas as amostras analisadas, indicando que o vírus não está presente em águas superficiais dos pontos escolhidos ou os níveis de contaminação estão abaixo dos detectáveis pela metodologia aplicada. A não detecção de partículas virais também pode ter ocorrido pela possível presença de inibidores de PCR na água, tais como a concentração de metais e restos orgânicos encontrados e outras impurezas que influenciam na amplificação do genoma viral.

**Palavras-Chave:** Qualidade da água, norovírus, adenovírus.

### ENTERIC VIRUSES INCIDENCE IN ENVIRONMENTAL SAMPLES FROM TEGA RIVES'S WATERSHED - RS

**Abstract** - The water sources contamination by enteric virus are well known and the viral particles dissemination is one of the main causes of population illness. Adenovirus and Norovirus are etiological agents who cause gastroenteritis, they are non-enveloped viruses and they are eliminated on infect human and animals faeces. These viruses can remain infectious for a long time in environment. The aim of this study was to molecular detecting adenovirus and norovirus and to analysis the correlation of these viruses with physicochemical parameters in water sources located on Tega River Watershed. Seven samples were collected on March 2013 in different places on the watershed and analyzed by Polimerase Chain Reaction (PCR) and RT-PCR (Reverse Transcriptase). On these samples, viruses were not detected, indicating that the virus is not present in surface water on chosen points or the contamination levels are below the detectable level by the methodology applied. The failure to detect viral particles also may be due to the possible presence of PCR inhibitors in the water, such as the metals concentration and organic debris and other impurities found that influence the viral genome amplification.

**Keywords:** analysis of water, norovirus, adenovirus.

<sup>1</sup>Universidade de Caxias do Sul – Laboratório de Diagnóstico Molecular

<sup>2</sup>Universidade de Caxias do Sul – Instituto de Saneamento Ambiental

\*Autor correspondente: heloysa\_g@hotmail.com

## INTRODUÇÃO

Os vírus entéricos são microrganismos presentes no trato gastrointestinal capazes de causar infecções associadas a quadros de vômitos e diarreia em indivíduos suscetíveis por transmissão via fecal-oral. Estes vírus são excretados junto com os dejetos humanos e animais em grandes quantidades, sendo capazes de contaminar direta ou indiretamente águas destinadas ao consumo humano (Wyn-Jones e Sellwood (2001); Leclerc *et al.* 2002).

A avaliação microbiológica da qualidade da água é feita através da análise de coliformes fecais (Who, 2008), os quais são utilizados como indicativos da possibilidade de existência de microrganismos patogênicos, responsáveis pela transmissão de doenças de veiculação hídrica. Porém, estes métodos tem se mostrado insuficientes, pois estes microrganismos podem não atestar o risco de infecção por outros patógenos, tais como os vírus (Wu et al., 2011).

A presença de vírus entéricos em amostras ambientais pode servir como marcadores de contaminação fecal em águas superficiais e subterrâneas, auxiliando no diagnóstico da poluição ambiental oriunda da ocupação humana e atividade pecuária. Os vírus entéricos são geralmente mais resistentes que outros microrganismos em matrizes ambientais, pois permanecem viáveis durante meses na água, resistindo às condições ambientais adversas e aos processos de tratamento com desinfecção por cloração e UV (Mehnert, 2003).

Dentre os vírus entéricos, Adenovírus e norovírus tem sido indicados para monitoramento da contaminação fecal. Os adenovírus constituem a família *Adenoviridae*, são icosaédricos, não-envelopados e possuem genoma de DNA de fita dupla. Os adenovírus humanos têm distribuição mundial, e são responsáveis por causar, entre outras enfermidades, diarreias e conjuntivites relacionadas ao consumo ou contato com água contaminada (Jiang, 2001). Os norovírus pertencem à família *Caliviridae*, com simetria icosaédrica, não envelopado, de 26 a 35 nanômetros de diâmetro. Contém um genoma de RNA (ácido ribonucléico) de fita simples com polaridade positiva (Kapikian *et al.* 1996). Primeiramente foi isolado em surto de gastroenterite em alunos e professores de uma escola primária de Norwalk, Ohio, Estados Unidos (Munford *et al.* 2008). Os norovírus são a causa mais frequente de surtos de gastroenterites não bacteriana que ocorrem em comunidades, escolas, hospitais, instituições, acampamentos, navios de cruzeiro, casas de repouso, universidades e famílias (Munford *et al.* 2008).

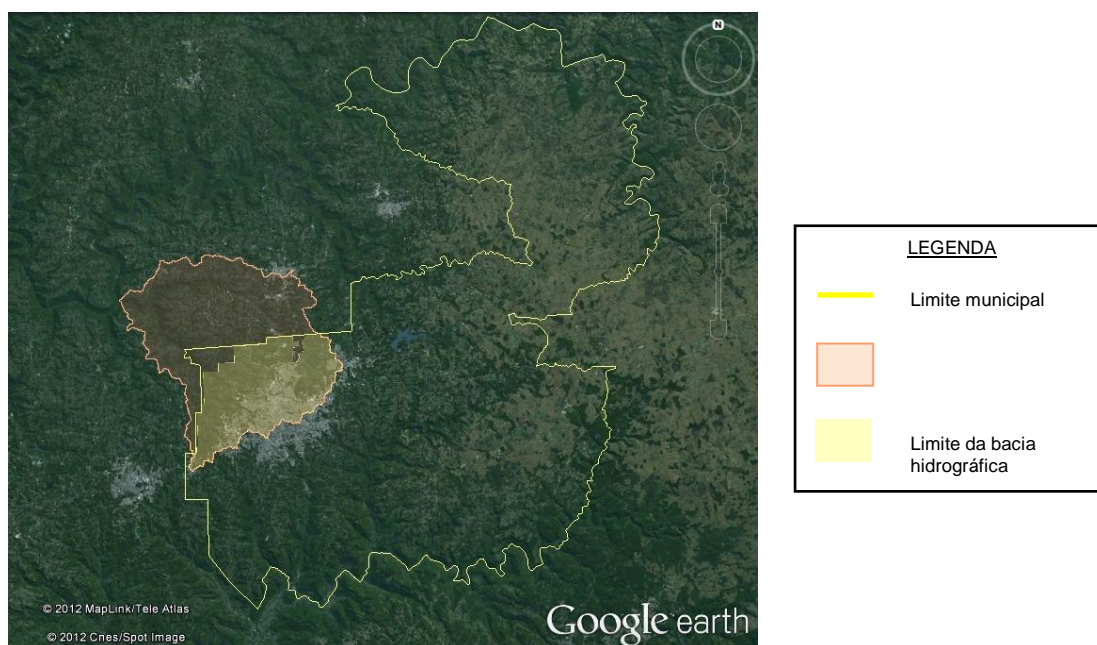
O município de Caxias do Sul abrange uma população de 450 mil habitantes e apresenta áreas distintas com elevada urbanização além de uma área rural voltada essencialmente a olericultura e fruticultura. A utilização da água para diversas atividades requer estudos de monitoramento os quais se tornam importantes instrumentos para acompanhamento sistemático dos aspectos qualitativos das águas, visando à produção de informações para auxiliar na verificação de impactos ocasionados pelas atividades antrópicas. A maioria das bacias hidrográficas localizadas em Caxias do Sul, possui suas nascentes na área urbana. Especialmente a bacia hidrográfica do Rio Tega, possui suas nascentes localizadas em uma região caracterizada pela intensa atividade industrial e elevada concentração populacional, o que justifica o estudo e monitoramento visando a caracterização da qualidade da água.

O controle e avaliação da variação temporal da qualidade da água de um recurso hídrico possibilita um planejamento urbano mais integrado com as questões ambientais e de abastecimento público. Dessa forma o objetivo deste trabalho foi detectar a presença de vírus entéricos em uma bacia essencialmente urbana impactada por despejos de esgotos domésticos e industriais oriundos da população do município de Caxias do Sul.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### 1. Localização da Área de Estudo

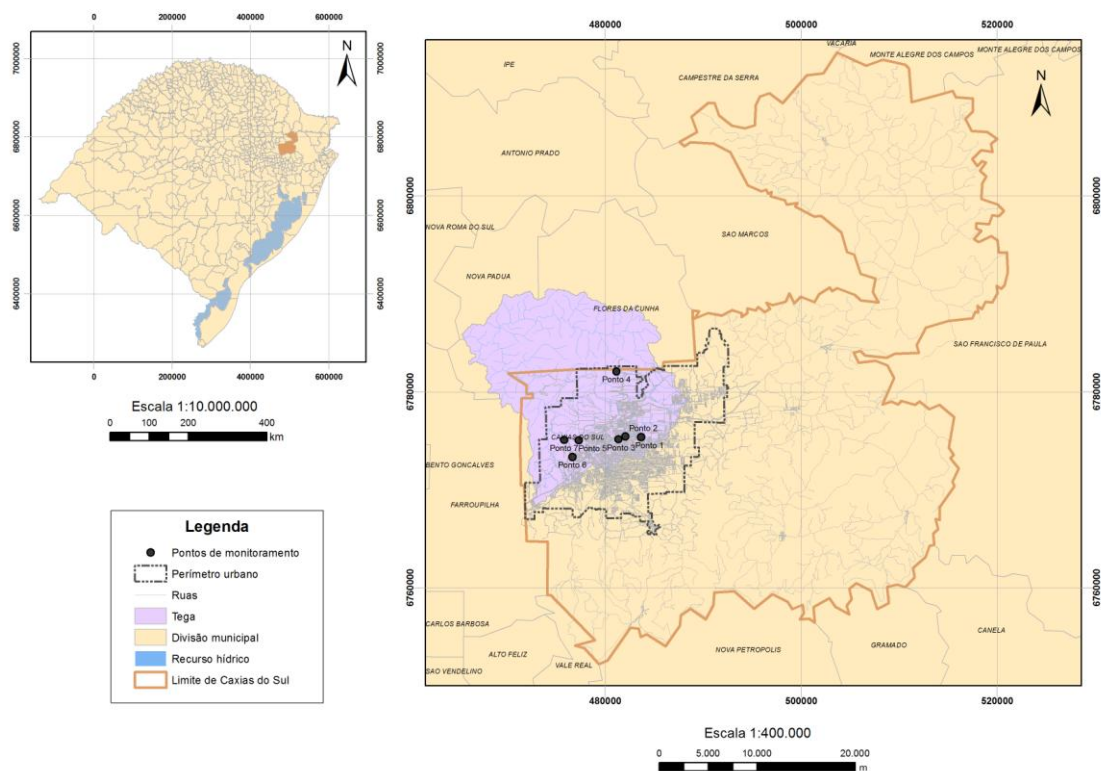
A bacia do Rio Tega insere-se na Bacia Hidrográfica Taquari-Antas, localizada na Região Hidrográfica do Guaíba, e é uma das mais importantes bacias do município de Caxias do Sul. O Rio Tega nasce no perímetro urbano de Caxias do Sul e, após um percurso de 34 km, tem sua foz no rio das Antas, no limite dos municípios de Flores da Cunha e Nova Pádua. Os principais afluentes do Rio Tega são os arroios Herval, Dal Bó, Samuara e Maestra e o Rio Curuçu. A bacia do Rio Tega apresenta perímetro de 116,81 km e drena uma área de 294,76 km<sup>2</sup>, sendo que cerca de 40% da área da bacia do rio Tega está inserida no perímetro urbano de Caxias do Sul. A figura 1 apresenta a localização da bacia.



**Figura 1** - Localização da bacia hidrográfica do Rio Tega em relação ao município de Caxias do Sul. Fonte: Elaborado pelos autores com base em Google Earth, 2012.

### 2. Coleta

As amostras de água foram coletadas em 7 pontos da bacia (Figura 2 e tabela 1), em março de 2013, seguindo os métodos descritos no Guia Nacional de Coleta e Preservação de Amostras (ANA, 2011).



**Figura 2** - Mapa de localização dos pontos de amostragem na bacia hidrográfica do Rio Tega

Tabela 1: Coordenadas geográficas dos pontos de amostragens da rede de monitoramento de bacias urbanas de Caxias do Sul.

Bacias/Pontos	Coordenadas geográficas
	Latitude / Longitude
P1 –	483656 / 6775382
P2 –	482075 / 6775468
P3 –	481361 / 6775140
P4 -	481148 / 6782095
P5 –	477299 / 67750556
P6 –	476655 / 6773365
P7 –	475780 / 6775086

### 3. Concentração viral

As amostras foram submetidas ao método de concentração por filtração à vácuo, através da metodologia descrita por Katayama *et al.* (2002). Primeiramente, 500 mL de água foram adicionados à 0,6 g de  $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ , agitado e o pH foi ajustado em 5.0. Após, a mistura foi filtrada em membrana (0,45 $\mu$ m e 47mm) com o auxílio de bomba à vácuo. As partículas virais presentes na amostra foram adsorvidas pela membrana. Em seguida, a membrana foi lavada com 87,5 mililitros de  $H_2SO_4$  (0,5mM e pH3), desacoplando os cátions. O filtrado foi descartado. A seguir, realizou-se a etapa de eluição que consistiu na lavagem da membrana com 2,5 mL de NaOH (1mM e pH 10,5).

O filtrado resultante foi neutralizado com 12,5µL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (50mM) e 12,5µL de tampão Tris-EDTA 100x. O volume final de 2,5mL foi acondicionado em microtubos e congelado a -20°C.

#### 4. Obtenção dos controles

O controle positivo de norovírus foi obtido a partir de amostra clínica de fezes provenientes de um laboratório privado de análises clínicas de Caxias do Sul, RS. O controle de adenovírus foi cedido gentilmente pelo Laboratório de Microbiologia Molecular da Universidade Feevale, Novo Hamburgo, RS. Para os controles também foram realizados os métodos de concentração viral descrito acima. Ainda, foi realizado um controle para verificar a presença de inibidores de PCR nas amostras de água. As amostras dos 10 pontos coletados foram contaminadas com amostra clínica de fezes positiva para norovírus e realizado o método de concentração viral.

#### 5. Extração do genoma viral

A extração do RNA e DNA viral deu-se por meio do “kit” de extração (RTP® DNA/RNA *Virus Mini Kit* – Invitex®) e protocolo descrito pelo fabricante.

#### 6. Reação em cadeia de polimerase (PCR)

Para o norovírus, obteve-se o *cDNA* a partir do RNA viral. Para a obtenção de *cDNA* foi utilizado o “kit” *High-capacity cDNA reverse transcriptase (Invitrogen™)* de acordo com a reação: 4,2µL de água ultrapura, 2µL de 10x *RT Buffer* (tampão), 2µL de 10x *RT Random Primers*, 0,8µL de 25 *dNTP Mix* (100mM) e 1µL de *MultiScribe™ Reverse Transcriptase* totalizando 10µL aos quais foram adicionados 10µL da amostra concentrada. A amplificação foi realizada em termociclador (*Tonederm – Tonegen Genetics*), de acordo com a rotina de desnaturação a 25°C por 10 minutos, anelamento a 37°C por 120 minutos, extensão a 85°C por 5 minutos e um ciclo infinito a 4°C. Para detecção de norovírus, a reação em cadeia de polimerase foi realizado por meio do “kit” *Acess RT-PCR System (Promega)* sem o uso da *AMV RT* (enzima reverse transcriptase). A reação ocorreu com 14,98µL de água ultrapura, 5µL de *AMV/TFL buffer 5x*, 0,5µL de *dNTP Mix* a 20mM, 0,13µL de cada *primer* (MON 431 à MON 434 Tabela 2), 1µL de Sulfeto de Magnésio (25mM) e 0,5µL de *TFL – DNA Polimerase*, totalizando 22,5µL, aos quais foram adicionados 2,5µL de amostra de *cDNA*. A amplificação foi realizada em termociclador (*Tonederm – Tonegen Genetics*), de acordo com a seguinte rotina: 94°C por 2 min, 40 ciclos de 94°C por 30 seg, 50°C por 1:30min, 60°C por 30 seg, extensão final a 68°C por 7 minutos e um ciclo infinito à 4°C.

Para adenovírus a reação em cadeia de polimerase também foi realizada por meio do “kit” *Acess RT-PCR System (Promega)* sem o uso da *AMV RT* (enzima reverse transcriptase), com os mesmos volumes e com a utilização dos *primers* (VTB2- HAdVCf e VTB2- HAdVCr Tabela 2). A amplificação foi realizada em termociclador (*Tonederm – Tonegen Genetics*), de acordo com a seguinte rotina: 94°C por 2 min, 40 ciclos de 94°C por 30 seg, 54°C por 1:30min, 60°C por 30 seg, extensão final a 68°C por 7 minutos e um ciclo infinito à 4°C.

**Tabela 2:** Sequência de oligonucleotídeos (primers) utilizados.

Vírus	Nome	Sequência	Polaridade	Tamanho da amplificação
Norovírus	MON 431	5' TGGACIAGRGGICCYAAAYCA 3'	RNA sense	213pb
Norovírus	MON 432	5' TGGACICGYGGICCYAAAYCA 3'	RNA sense	
Norovírus	MON 433	5' GGAYTCATCCAYCTGAACAT 3'	<i>cDNA</i> sense	
Norovírus	MON 434	5' GAASCGCATCCARCGGAACAT 3'	<i>cDNA</i> sense	
Adenovírus	VTB2- HAdVCf*	5'-GAGACGTAAGTTCAGCCTGAAT-3'	Sense	101pb
Adenovírus	VTB2-HAdVCr*	5'-GATGAACCGCAGCGTCAA-3'	Reverse	

\* Primers cedidos pelo Laboratório de Microbiologia Molecular da Universidade Feevale, Novo Hamburgo, RS.

## 7. Eletroforese em gel de agarose

Após a reação, o produto do PCR foi analisado por eletroforese em gel de agarose 1% com tampão TBE 1X com adição de GelRed (Uniscience) (corante) e posterior visualização em luz ultravioleta.

## 8. Análise físico-química

Além da análise de concentração viral, foram analisados os seguintes parâmetros: temperatura da amostra; pH a 25°C; Oxigênio dissolvido, Sólidos totais dissolvidos, demanda bioquímica de oxigênio, Demanda química de oxigênio, *Escherichia coli* e coliformes termotolerante, Chumbo Total, Cobre total, Cromo total, Níquel total e zinco total pela metodologia de análise do Standard Methods for Examination of Water and Wastewater (APHA, 2012),

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

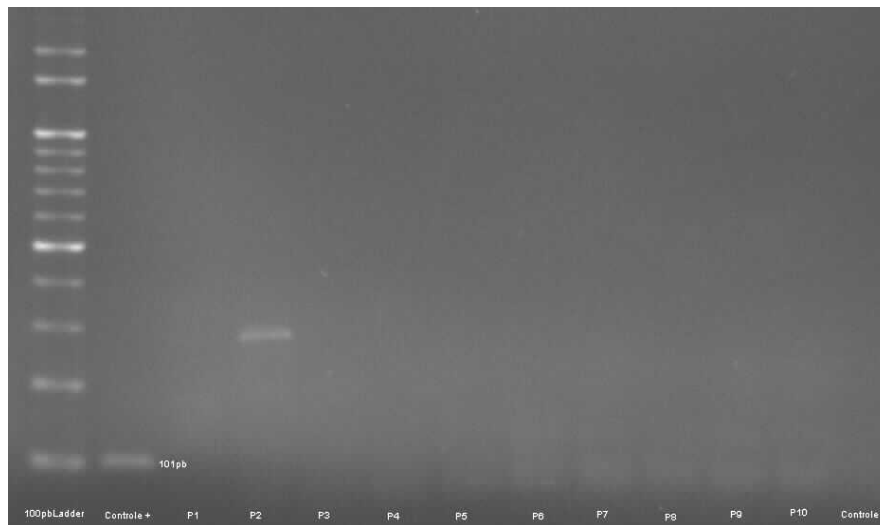
Os resultados da análise físico-química e biológica dos sete pontos amostrados durante a campanha de março de 2013 na bacia hidrográfica do Rio Tega são apresentados na Tabela 3.

**Tabela 3:** Resultados físico, químicos e biológicos da amostragem realizada

Parâmetros	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7
pH a 25°C	7,28	7,38	7,12	7,24	7,76	6,91	7,54
Oxigênio dissolvido (mg O <sub>2</sub> /L)	9,76	7,93	1,56	18,5	9,91	2,45	10,78
Sólidos totais dissolvidos (mg/L)	205	258	343	267	254	261	218
Demanda química de oxigênio (mg O <sub>2</sub> /L)	35	39	157	128	54	39	31
Demanda bioquímica de oxigênio (mg O <sub>2</sub> /L)	17,5	18,9	96,8	87,7	18,25	17,5	5,21
<i>Escherichia coli</i> (NMP/100mL)	4,90E+04	3,30E+05	3,90E+05	4,60E+03	4,00E+03	3,30E+03	7,90E+03
Coliformes termotolerantes (NMP/100mL)	2,40E+05	7,90E+05	5,40E+06	1,30E+04	1,70E+04	1,30E+04	3,30E+04
Chumbo Total (mg Pb/L)	0,118	0,118	0,118	0,118	0,118	0,118	0,118
Cobre total (mg Cu/L)	0,275	0,15	0,073	1,858	0,308	0,023	0,463
Cromo total (mg Cr/L)	3,934	1,751	0,04	3,894	0,273	0,04	0,179
Níquel total (mg Ni/L)	2,558	1,292	0,053	1,967	0,195	0,053	0,27
Zinco total (mg Zn/L)	0,137	0,083	0,087	1,824	0,322	0,062	0,282

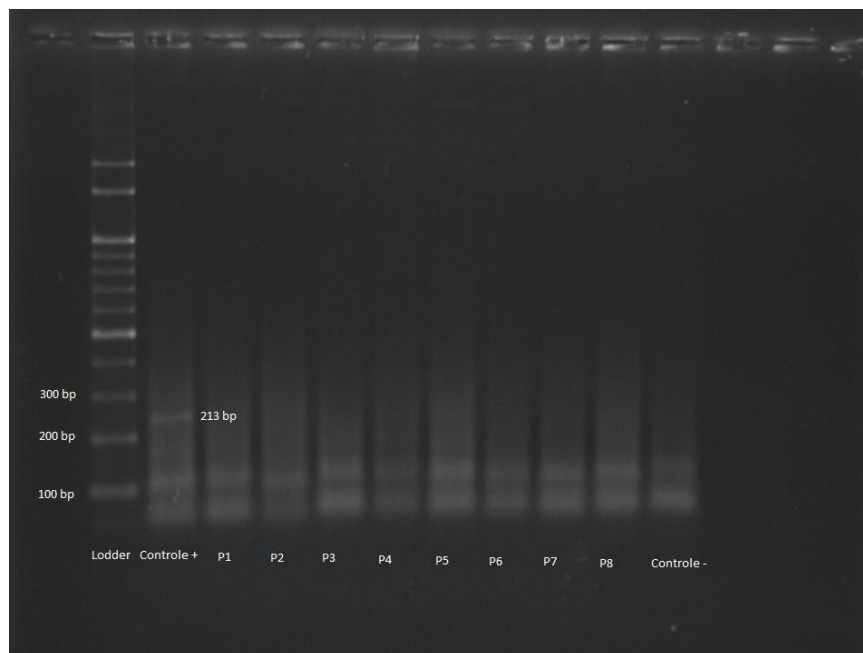
Pela análise dos resultados apresentados anteriormente, verifica-se que o Rio Tega apresenta elevado grau de poluição nos pontos amostrados. A poluição mostra-se mais crítica nos pontos 2, 3, 4 e 6, inseridos nas áreas com maior presença de indústrias e concentração populacional. Registram-se concentrações elevadas de matéria orgânica em termos de DBO e DQO e, por consequência, baixas concentrações de oxigênio dissolvido, além de elevado número de coliformes. Nesses pontos também foi verificada concentração elevada de metais, especialmente cobre, cromo, níquel e zinco, possivelmente oriunda de atividades galvanotécnicas

Em todas as amostras de água analisadas não houve a detecção tanto de adenovírus (Figura 3) quanto de norovírus (Figura 4), indicando que os enterovírus não estão presentes em águas superficiais dos pontos escolhidos ou os níveis de contaminação estão abaixo dos detectáveis pela metodologia aplicada.



**Figura 3:** Detecção em gel de agarose de produto de PCR para Adenovírus (banda 101pb) de 7 amostras da bacia hidrográfica do Rio Tega de Caxias do Sul.

A não detecção de partículas virais também nestes pontos amostrados pode ter ocorrido pela possível presença de inibidores de PCR na água, restos orgânicos e grande quantidade de metais pesados e outras impurezas que influenciam na amplificação do genoma viral, como observados nos dados físico-químicos analisados. Resultados contraditórios aos nossos foram encontrados por Vecchia *et al.* (2012), que encontraram a presença principalmente de adenovírus e outros vírus entéricos em amostras do Arroio Dilúvio em Porto Alegre, RS. Além disso, Outros parâmetros podem ser associados a taxa de detecção viral, tais como a temperatura da água, do ar, umidade, insolação, velocidade do vento, direção do vento e turbidez (Wong *et al.* 2009).



**Figura 4:** Detecção em gel de agarose de produto de PCR para Norovírus (banda 213pb) de 7 amostras da bacia hidrográfica do Rio Tega de Caxias do Sul.

## CONCLUSÕES

A não detecção de partículas virais indica a necessidade de se investigar novos pontos de coleta e em diversificados períodos do ano. Em paralelo, observa-se a necessidade de buscar a presença de norovírus, adenovírus e também de outros vírus entéricos nestes ambientes a fim de demonstrar que estes podem servir como marcadores de contaminação fecal em águas superficiais e subterrâneas.

## REFERÊNCIAS

- JIANG, S.C. (2001). Adenovirus as an index of human viral contamination. *U.S.EPA Workshop on Microbial Source Tracking* 5: 75-78.
- MEHNERT, D.U. (2003). Reúso de efluente doméstico na agricultura e a contaminação ambiental por vírus entéricos humanos. *Biológico* 65(1-2), pp.19-21.
- WU, J.; LONG, S.C.; DAS, D.; DORNER, S.M. (2011). Are microbial indicators and pathogens correlated? A statistical analysis of 40 years of research. *Journal of Water and Health* 9, pp.265–278.
- KATAYAMA, H., et al. (2002). Development of a virus concentration method and its application to detection of enterovirus and Norwalkvirus from coastal seawater. *Applied and Environmental Microbiology*. 68: 1033-1039.
- WOLF, S., HEWITT, J. and GREENING, GE. (2010). Viral multiplex quantitative PCR assays for tracking sources of fecal contamination. *Applied and Environmental Microbiology*, vol 76, no. 5, pg 1388-1394.
- VECHIA, AD., et al. (2012). First description of Adenovirus, Enterovirus, Rotavirus and Torque teno virus in water samples collected from the Arroio Dilúvio, Porto Alegre, Brazil. *Braz. J. Biol.*, vol. 72, no. 2, pg 323-329.
- RICHARDS, G. P.; WATSON, M. A.; FANKHAUSER, R. L. e MOROE, S (2004). Genogroup I and II Noroviruses Detected in Stool Samples by Real-Time Reverse Transcription-PCR Using Highly Degenerate Universal Primers. *Appl. Environ. Microbiol.*