

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

SANDRA SOARES MARTINS

“ADENOVÍRUS E ROTAVÍRUS COMO INDICADORES BIOLÓGICOS  
EM ÁGUAS RESIDUÁRIAS DE ESGOTOS SANITÁRIOS APÓS  
PASSAGEM POR TRATAMENTO POR PROCESSO ANAERÓBIO E  
DISPOSIÇÃO CONTROLADA NO SOLO”

Dissertação apresentada ao Instituto  
de Biologia para obtenção do Título  
de Mestre em Genética e Biologia  
Molecular na área de Microbiologia.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Silvia Viccari Gatti

Campinas  
2006

SANDRA SOARES MARTINS

“ADENOVÍRUS E ROTAVÍRUS COMO INDICADORES BIOLÓGICOS  
EM ÁGUAS RESIDUÁRIAS DE ESGOTOS SANITÁRIOS APÓS  
TRATAMENTO POR PROCESSO ANAERÓBIO E DISPOSIÇÃO  
CONTROLADA NO SOLO”

Este exemplar corresponde à redação final  
da tese defendida pelo(a) candidato (a)  
*Sandra Soares Martins*  
e aprovada pela Comissão Julgadora.

*Maria Silvia Viccari Gatti*

Orientadora: Profa. Dra. Maria Silvia Viccari Gatti

Tese apresentada ao Instituto de  
Biologia para obtenção do Título de  
Mestre em Genética e Biologia  
Molecular na área de Microbiologia.

Campinas  
2006

**M366a**

**Martins, Sandra Soares**

Adenovírus e rotavírus como indicadores biológicos em águas residuárias de esgotos sanitários após tratamento por processo anaeróbio e disposição controlada no solo / Sandra Soares Martins. Campinas, SP: [s.n.], 2006.

Orientadora: Maria Silvia Viccari Gatti  
Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas.  
Instituto de Biologia.

1. Adenovírus. 2. Rotavírus. 3. esgotos sanitários.  
4. esgotos – tratamento.

5. Gatti, Maria Silvia Viccari.  
Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia.  
III. Título.

Campinas, 22 de agosto de 2006.

**BANCA EXAMINADORA**

Profa. Dra. Maria Silvia Viccari Gatti (Orientadora)

  
Assinatura

Dr. Wagner Bettiol

  
Assinatura

Prof. Dr. Tomomasa Yano

  
Assinatura

Prof. Dr. Marcelo Brocchi

\_\_\_\_\_  
Assinatura

Prof. Dr. Jorge Veja

\_\_\_\_\_  
Assinatura

Uma pessoa de bem é uma maioria de um.

*Sabedoria milenar chinesa.*

Dedico este trabalho à Maíra, filha amada, e à Elaine, minha irmã querida de todas as horas. O calor das suas vibrações amorosas foi minha sustentação nos momentos mais difíceis.

## AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Maria Silvia Viccari Gatti pelo respeito à minha vontade ao autorizar-me a desenvolver este projeto, embora o tema não fosse de interesse das linhas de pesquisa de seu laboratório. Agradeço-a por assumir minha orientação ao meio do percurso, num gesto natural de seu senso de responsabilidade, da dignidade da sua postura docente, de seu profissionalismo e lealdade.

Ao Prof. Dr. Bruno Coraucci Filho pelo convite para participar da etapa final do projeto temático “Pós-tratamento de efluente anaeróbico: tratamento no solo pelo método de escoamento superficial e por irrigação sub superficial em vala de filtração modificada”, financiado pela FAPESP, processo 99/12759-2.

À Profa. Dra. Dolores Ursula Mehnert pela proposta deste projeto de mestrado, como pesquisa complementar ao projeto temático. Agradeço pelos treinamentos efetuados pessoalmente por ela em seu laboratório, no Instituto de Ciências Biomédicas da USP; pelas correções e orientações no relatório à Fapesp e por ter cedido uma amostra padrão de adenovírus tipo 5 humano.

Ao Dr. Ronaldo Stefanutti pelas providências iniciais do desenvolvimento do projeto quanto à aquisição de reagentes e equipamentos, assim como pelo transporte nas viagens de coleta.

À Fapesp pelo financiamento do projeto.

Ao CNPq pelas bolsas de iniciação científicas concedidas às alunas de Ciências Biológicas Priscila Aparecida Tonetto e Maria Clara Duarte Fregolente, por meio do Prosab 3. Ambas deram importante contribuição a este trabalho ao executarem os testes de infecção viral em culturas celulares.

Aos componentes do Conselho Departamental do Departamento de Microbiologia e Imunologia por acatarem a proposta da Profa. Dra. Maria Silvia Viccari Gatti de que cursasse o mestrado no curso de Pós - Graduação em Genética e Biologia Molecular, do Instituto de Biologia da Unicamp, dada minha condição de funcionária deste Departamento.

Aos professores que compuseram a banca de qualificação, Drs. Wanderley Dias da Silveira, Charlotte Mariana Hàrsi e Clarice Weiss Arns.

Ao Ricardo Stahlschmidt Pinto Silva por ter se disposto a rastrear um profissional da área biológica com experiência em virologia, que aceitasse se aventurar na árdua interface vírus-saneamento.

À Ana Lúcia Rodrigues da Soledade pelo excelente trabalho na cultura de células e, mais importante que isso, agradeço à Aninha por todas as lágrimas que ela enxugou.

Aos queridos amigos do Laboratório de Virologia, que fizeram e fazem de nosso ambiente de trabalho um local de aconchego, confiança e alegria: Carolina, Daniel, Daniele, Guilherme, Izabel, Eric, Maria Clara, Rovilson, Stefani e Verena.

Ao querido amigo Rovilson Gilioli pela orientação na compra e instalação de equipamentos.

Ao Prof. Dr Domingos da Silva Leite pela confiança ao dispor a estrutura de seu laboratório para a realização dos testes de PCR e RT-PCR. Esse agradecimento estende-se aos seus alunos e companheiros de trabalho que pacientemente “socializaram” as escalas de uso de vários equipamentos: Claudia, Erivaldo, Geórgio, Maria Claudia, Mirtis e Monique.

À DuPont do Brasil S.A. pela doação de Vertrel<sup>®</sup> XF, através da Srta Alessandra Capobianco.

À Verônica Magalhães pela companhia nas viagens de coleta à Limeira, e à Marta Siviero Guilherme Pires pela confiança em mim depositada.

À Valéria Pauli pelo treinamento em *semi-nested*-RT-PCR para detecção de rotavírus e pela hospitalidade da equipe da Profa. Dra. Dolores U. Mehnert: à bióloga Telma A. Monezi e às alunas Ximena e Fabiana.

À minha mãe, Sebastiana Soares Martins, uma brasileira de grande coragem, por ter assumido meu lar na fase de trabalho mais pesado, nas difíceis semanas que antecederam a partida da minha filha para os Estados Unidos. A Tianinha é um grande exemplo de amor pelo trabalho e determinação de lutar, mesmo quando o horizonte não tem luz.

Ao meu irmão Allan, Espírito abnegado, que se dedica silenciosa, amorosa e naturalmente à família, sem jamais pedir nada em troca. Meu irmão amado é o grande responsável pela minha formação no ensino superior e por quem rogo a Deus a oportunidade de um dia poder retribuir-lhe à altura.

Ao meu pai, Vitor Martins, o exemplo incontestado de amor ao estudo e a busca incessante de conhecimento. Agradeço pela sua retidão moral, pelo exemplo de jamais

pagar o mal com o mal e, ainda, pelo farol que acendeu em minha vida ao educar-me sob as luzes da Doutrina Espírita.

À Mãe pela paciência nas minhas ausências e na correria do dia-a-dia. Por todas as tardes que passou comigo no laboratório. Pelos finais de semana sem passeio para o preparo do manuscrito desta dissertação. E acima de tudo pelos conselhos que me deu, do alto da sua maturidade de Espírito imortal, diante das dificuldades a transpor. Seus abraços e seus olhares de compreensão jamais serão esquecidos.

À Elaine, que ora irmã, ora mãe, ora filha, é um Sol que ilumina minha vida. Meu ouvido de todas as horas, meus braços quando não tenho mais forças, o esteio divino que me nutre e me encoraja para as lutas de todo dia.

Ao imenso carinho e as vibrações das minhas queridas amigas Maria Teresa, Kellye, Josiane e Ana Rita na fase final de construção deste manuscrito.

À Deus a oportunidade valorosa de aprendizado que ora se encerra. Mais do que um ensaio científico num olhar limitado da realidade da matéria plasmada, este projeto foi uma escola de luz que me permitiu avançar no conhecimento de mim mesma, superando limites, desfazendo ilusões, valorizando amizades que se mostraram fortalezas. Sou imensamente grata a Ele por dar-me a oportunidade de chegar ao final desta pequena tarefa com a alma lapidada pelos tropeços e descaminhos que ferem, porém fazem-nos amadurecer.

## SUMÁRIO

Abstract.....	x
Resumo.....	xi
I – Introdução.....	1
II – Objetivo.....	19
III – Material e Métodos.....	19
1. O Sistema de tratamento anaeróbio e disposição controlada de água residuária no solo.....	19
2. Coleta das amostras.....	20
3. Concentração das amostras e preparação dos eluatos virais.....	21
4. Detecção de adenovírus.....	22
5. Ensaios de infectividade viral em linhagem Hep-2.....	25
6. Detecção de rotavírus.....	26
IV – Resultados.....	31
V – Discussão.....	41
VI – Conclusões.....	47
VII – Referências.....	48
Lista de abreviaturas.....	59
Lista de Figuras, Tabelas e Quadros.....	60

## **ABSTRACT**

Urban sewage treatment by an anaerobic process with overland flow system is a cheap alternative to reuse domestic effluents in agriculture. In this procedure, wastewater remains in an anaerobic pond for seven days, and then it is spilled from the top of a 40-meter extension slope covered with Tifton 85 (*Cynodon* sp) grass in order to surface flow and percolate until it reaches groundwater. The objective of this work is to determine if this procedure could be effective in removing and/or inactivating human adenoviruses (HAdV) and rotaviruses (RV) in a test unit in Limeira - SP, Brazil. Samples were collected every seven days from different spots in four sampling events totalizing one liter of wastewater. Sampling points were chosen at the raw sewage (EB), on the surface of the slope at 0, 10, 20, 30, 35 and 40 meters, and down one meter from the surface of the slope at the 30- and 35-meter points (30-1 and 35-1). Other points upslope were used at a distance of 2 meters (T1) and 0.5 meters (T2), beyond a 3-meter depth and 1-meter distant spot (LF). All samples were concentrated from a 1000 to 5000 times by filtration through electropositive microporous membrane followed by ultracentrifugation. HAdV detection was performed by both PCR and nested PCR. RV detection was accomplished by both RT-PCR and duplex semi-nested PCR. The positive samples for HAdV were inoculated in HEp-2 cells, and confirmation of the virions was performed by PCR. HAdV were detected in 29 of the 35 samples tested including in all samples both from the EB and from the surface of the slope. HAdV tested positive in the two T2, in one LF, and in the four samples underneath the slope. In HEp-2 cells HAdV virions were detected at the EB and at 0, 30, 35, and 40 meters on the surface of the slope. Spots 30-1 and LF were tested in HEp-2 cells, resulting negative to the presence of infective viral particles, although they tested HAdV positive. These results attest to the inefficiency of the proposed system of sewage treatment in removing and/or inactivating HAdV; however, maintaining the methodology used in this research, HAdV proves to be the appropriate viral indicator in this system. In relation to RV, no conclusions can be extracted since just one sample from the EB was RV-positive (G1 and G2 mixture). Finally, before reuse in agriculture, the effluents from the anaerobic pond should be disinfected to eliminate these viruses.

## RESUMO

O tratamento de esgoto sanitário em lagoa de decantação anaeróbia e disposição controlada de água residuária no solo é uma alternativa de baixo custo para o reuso de águas residuárias na agricultura. Nele, o esgoto sanitário é depositado em uma lagoa de decantação anaeróbia com retenção hidráulica de sete dias, após o que a água residuária é conduzida para rampa de solo franco argilo-arenoso, com cobertura vegetal de gramínia *Cynodon* sp, para disposição por escoamento superficial, seguindo-se sua infiltração e percolação. O objetivo desse trabalho foi verificar a eficiência desse sistema na eliminação e/ou inativação de adenovírus humanos (HAdV) e rotavírus (RV). Amostras de 1L de água residuária foram obtidas em quatro coletas, em intervalos de sete dias, na entrada do esgoto bruto (EB), no ponto de aplicação na rampa (0m) e nos pontos da sua superfície após 10, 20, 30, 35m e 40m. Sob a rampa, a 1m de profundidade e distantes 30m (30-1) e 35m (35-1), dois pontos foram amostrados. Antes do ponto 0m, pontos de testemunha a 1m de profundidade e distantes 2m (T1) e 0,5m (T2) da rampa, e um ponto do lençol freático (LF) a 3m de profundidade, também foram coletados. As águas residuárias foram concentradas de 1.000 a 5.000 vezes por filtração e eluição em membrana eletropositiva e ultracentrifugação. Nos eluatos obtidos, após extração de DNA, a presença de HAdV foi pesquisada por PCR e *nested*-PCR. Para a detecção de RV usou-se RT-PCR e duplo-semi-*nested*-PCR. Eluatos HAdV positivos foram inoculados em células HEp-2 e após até cinco passagens a presença de HAdV foi confirmada por PCR.. HAdV foram detectados em 29 das 35 amostras analisadas, sendo positivos todos os pontos de EB e da superfície da rampa. Em profundidade, sob a rampa, quatro amostras foram positivas, além de outras duas em T2 e uma em LF, o que demonstra a percolação desses vírus no solo com contaminação do LF. Quando testadas em células HEp-2, nas amostras do EB e dos pontos 0, 30, 35 e 40m a presença de vírions foi determinada, enquanto nos pontos 30-1m e LF os HAdV não foram infectivos. Esses resultados permitem concluir que o sistema não foi eficiente para remover e/ou inativar HAdV. Por outro lado, pode-se afirmar que os HAdV são indicadores virais adequados para esse sistema, desde que mantida a metodologia aqui empregada. Uma amostra de EB foi positiva para RV (genótipos G1 e G2), resultado esse que não permite qualquer conclusão. Para o reuso da água residuária advinda desse sistema impõe-se a associação de processos de desinfecção para a eliminação de HAdV.

## *I. INTRODUÇÃO*

A água no planeta Terra está distribuída nos oceanos e continentes de maneira bastante desigual. Sabe-se que 97% é água salgada, que constitui oceanos e mares continentais, e que a água doce não é necessariamente de fácil acesso, representando 3% do montante planetário. SHIKLOMANOV (1998) relata que esse pequeno percentual de água doce está distribuído nas calotas polares e glaciares (79%), lençóis freáticos e aquíferos (20%) e que apenas 1% está disponível para o consumo humano. Dessa alíquota 52% são águas de lagos, 38% possuem sólidos em suspensão, 1% circula nos rios, 8% constituem a água atmosférica e 1% está associado aos organismos vivos.

As necessidades humanas de água são complexas e representam em primeiro lugar uma demanda fisiológica. Cerca de 60% a 70% do peso de um ser humano é constituído de água. Nos níveis bioquímico e celular a água atua como solvente, sendo necessária para o funcionamento do organismo. Ela também é utilizada na preparação de alimentos, cozimento, no banho, toalete, lavagem em geral e muitos usos dependem da cultura local, regional ou nacional. Em muitos países a água também é utilizada em atividades religiosas que são produto de culturas milenares, envolvendo milhares de pessoas (TUNDISI, 2003 a).

O consumo de água no mundo vem aumentando nas últimas décadas e, em contrapartida, a disponibilidade dos recursos hídricos por habitante vem caindo neste período. A água não é um bem renovável e fatores como o desmatamento das áreas de mananciais e das matas ciliares e o esvaziamento ou contaminação de poços artesianos e lençóis freáticos alteram a natural reposição no ciclo hidrológico. A interferência humana direta por meio da industrialização crescente e aumento das populações urbanas, com a conseqüente poluição das calhas naturais, também provocaram uma drástica redução da água disponível. Dados que abrangem o período entre 1950 e 2000, num levantamento comparativo entre África, Ásia, Américas do Norte e Latina e Europa, mostram que a disponibilidade anual de água por habitante caiu de 178.300 m<sup>3</sup> em 1950 para 58.300 m<sup>3</sup> em 2000. Especificamente na América Latina esses valores sofreram variação nos últimos 50 anos e a disponibilidade anual de água por habitante, que era de 105 m<sup>3</sup> em 1950, caiu para 28,3 m<sup>3</sup> em 2000 (AYIBOTELE, 1992).

No Brasil há grandes discrepâncias entre o oferecimento natural de água e a densidade populacional. A região norte possui 68,5% dos recursos hídricos, enquanto abriga 6,8% da população nacional, ao passo que a região sudeste oferece 6% de recursos hídricos para 42,6% da população brasileira (TUNDISI, 2003b).

A visão da civilização sobre a água se transformou mais recentemente passando de um recurso natural abundante para um produto comercial cada vez mais valorizado que, inclusive, é gerador de conflitos e faz parte dos itens de segurança nacional a serem considerados pelos governos em todo o mundo.

A potabilidade da água determina a finalidade de seu uso. A água potável é destinada ao abastecimento doméstico para consumo humano, criação animal, indústrias alimentícias e farmacêuticas e para as atividades hospitalares e de saúde. A água não potável é recomendada para recreação, uso industrial (caldeiras, resfriamento, transporte), limpeza de ruas e praças, geração de energia, reabilitação de corpos de água (riachos, rios), recarga de reservas naturais (lençol freático, aquífero) e irrigação (agrícola e paisagística) (HESPANHOL, 1999).

A distribuição dos recursos hídricos no mundo, por finalidade de uso, atende primeiro a agricultura (70%), seguindo-se a indústria (22%) e, por fim, o uso doméstico (8%) (TUNDISI, 2003b). A associação entre a diminuição de água disponível para consumo e a grande demanda de água para uso agrícola estimulou o movimento de entidades e pesquisadores envolvidos com estas questões no sentido de fazer-se o reuso de água residuária na agricultura. Água residuária é qualquer despejo ou resíduo líquido com potencialidade de causar poluição (Prossiga, 2006). Já reuso é a utilização da água por mais de uma vez, após passar ou não por um tratamento adequado. O reuso planejado da água faz parte do Programa Hidrológico Internacional da UNESCO, com os objetivos de proteção da saúde pública, manutenção da integridade dos ecossistemas e uso sustentado da água. O reuso direto planejado é aquele em que o efluente é tratado e encaminhado diretamente para o ponto de descarga, seja para reutilização desta água na indústria ou na irrigação agrícola ou de parques e jardins (CETESB, 2006).

O reuso da água, no entanto, oferece riscos de contaminação do solo, lençol freático e aquífero com produtos químicos e biológicos. Com relação à contaminação biológica, originária de esgotos domésticos, os agentes infecciosos que podem ser veiculados são

protozoários, ovos de helmintos, fungos, bactérias e vírus, sendo alguns deles patogênicos ao homem e outros animais (RAPHAEL, SATTAR, SPRINGTHORPE, 1985), gerando risco de contaminação ambiental do solo, lençol freático e aquífero. Por outro lado, investimentos e estudos têm sido feitos visando aplicar sistemas de tratamento efetivos e não agressivos ao ambiente, para as águas residuárias, assim como para o estabelecimento de organismos indicadores da contaminação microbiológica (SALGOT *et al.*, 2001).

No Brasil alguns sistemas de tratamento de esgotos simples, de baixo custo de instalação e manutenção, e que causam baixo impacto ambiental têm sido estudados como alternativa para pequenas comunidades humanas (CAMPOS, 1999). Entre esses sistemas encontram-se as lagoas de decantação facultativas e as anaeróbias e a técnica milenar de escoamento superficial da água de esgoto no solo para reuso na agricultura.

Lagoa de decantação anaeróbia consiste em um tanque profundo, da ordem de 4 a 5 metros, requerendo uma área correspondentemente menor do que as demais (VON SPERLING, 1996). O esgoto bruto que nela é lançado contém grande carga orgânica em relação ao seu volume (CERQUEIRA, 2004), de maneira que a taxa de consumo de oxigênio é muito superior à taxa de entrada de oxigênio, garantindo a instalação de bactérias anaeróbias (metanogênicas, acidogênicas, acetogênicas), de maneira a criar um ambiente de anaerobiose (VON SPERLING, 1996). O processo anaeróbio traz vantagens como: geração de menor volume de lodo, visto que a maior parte do substrato degradado é transformado em biogás, permitindo aproveitamento de energia através do metano; não exige muitos equipamentos mecânicos e o processo é favorecido pelas condições ambientais do país (SILVA, 2003). Apesar de tratar-se de excelente opção para a remoção de poluentes orgânicos, produz efluente com ausência de oxigênio dissolvido, com concentração indesejável de amônia e sulfetos, exigindo uma etapa posterior de tratamento (CERQUEIRA, 2004). Além disso, apresenta como característica desfavorável a remoção ineficiente de patógenos, matéria orgânica e nutrientes, não atingindo os limites preconizados pela Resolução CONAMA nº 20, de 18 de junho de 1986, artigo 21, que estabelece a qualidade mínima de um efluente para o mesmo ser lançado em um corpo hídrico (SILVA, 2003).

O sistema de pós-tratamento é por escoamento superficial em rampa de solo, por meio de disposição controlada. Trata-se de uma técnica de disposição final, tratamento e

reuso pelo reator solo-planta das características físico-químicas do efluente aplicado. É, ainda, uma forma de devolver elementos químicos aos seus reservatórios naturais: o nitrogênio e o carbono retornam à atmosfera, na forma de  $N_2$  e  $CO_2$  e o fósforo ao solo (SILVA, 2003). O efluente com alta concentração N-amoniacoal pode ser aplicado para irrigação agrícola, uma vez que este tipo de efluente é de grande proveito em um sistema solo-planta que absorve as formas de nitrogênio iônicas ( $NH_4^+$  e  $NO_3^-$ ) (STEFANUTTI, 1991). O efluente ao infiltrar no solo sofre o tratamento de percolação, que possibilita a adsorção e a atividade de microrganismos, que convertem a matéria orgânica em matéria mineralizada (nutrientes), que se incorpora no solo e fica à disposição das plantas. A água percola para níveis mais profundos do solo, até atingir o lençol freático, recarregando-o (SILVA, 2003). O termo infiltração significa o processo pelo qual a água é absorvida pelo solo, e percolação se refere ao processo pelo qual a água entra no solo e nas formações rochosas até o lençol freático (TUNDISI, 2003b).

O tratamento de efluentes secundários através do sistema de disposição no solo tem as vantagens de: reusar a água rica em nutrientes para irrigação agrícola e paisagística, fazer o condicionamento do solo através dos sólidos carregados; exigir pequeno investimento e ter baixo custo de operação; consumir baixa quantidade de energia e, na maioria dos casos, não há descarga de efluente nos corpos hídricos (SILVA, 2003). Há ainda a vantagem da remoção de patógenos devido à ação dos raios ultravioletas, da dessecação e da ação de predadores biológicos no solo (WHO, 1989).

Para o tratamento de águas contaminadas com agentes biológicos é preciso que o monitoramento destes contaminantes seja feito por indicadores confiáveis. No Estado de São Paulo, a Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental – CETESB - faz uso de 43 indicadores de qualidade de água, entre características físicas, químicas, hidrobiológicas, microbiológicas e ecotoxicológicas. Para a característica da poluição microbiológica os indicadores bacterianos são os coliformes fecais, *Clostridium perfringens* e estreptococos fecais; os indicadores parasitológicos são *Cryptosporidium* sp. e *Giardia* sp. (CETESB, 2001). Não há ainda a definição na legislação brasileira ou mundial, de um indicador da contaminação viral.

O critério de escolha de um indicador deve levar em consideração o seu hospedeiro natural, sua forma de eliminação no ambiente e o percurso por ele realizado. Também é

preciso levar em consideração as características físico-químicas e biológicas do agente patogênico a ser escolhido como indicador, as células ou órgão alvo da infecção e sua via de contaminação. Deve ser veiculado pelo ambiente e nele apresentar resistência aos fatores ambientais, mantendo sua capacidade infectiva após este contato. Também deve ser de fácil identificação e quantificação (SCHWARTZBROD, 1995).

Os vírus entéricos são alvo da preocupação dos estudos sobre a eficiência dos sistemas de tratamento de esgoto e de reuso da água quando a fonte poluente é as fezes humanas. Pela expressão “vírus entéricos” compreende-se o grupo de vírus que tem o trato gastrointestinal como via de penetração no organismo, com replicação nas células intestinais, ou que usam essas células como porta de entrada para o organismo. Neste grupo estão a maioria dos picornavírus, entre eles os enterovírus (poliovírus, echovírus, Coxsackievírus) e os vírus da hepatite A, os adenovírus, os vírus da hepatite C e os vírus causadores de gastroenterites, como os rotavírus, calicivírus e astrovírus (SCHWARTZBROD, 1995). A rota de transmissão desses vírus no ambiente começa pela disposição das fezes humanas diretamente na terra ou nos esgotos, ou em aterros sanitários. Por ação da infiltração da água da chuva ou da água diluente dos esgotos, os vírus, antes contidos nas fezes, são arrastados para rios, lagoas, lagos, lençóis freáticos, estuários e oceanos. O homem pode ser contaminado por vírus entéricos por diferentes vias: ingestão de água contaminada retirada de rios, lagos e águas subterrâneas (GERBA, 1999); consumo de moluscos filtradores contaminados; durante atividades recreativas em oceanos, estuários, rios e lagos e, ainda, dispersos por meio da irrigação de plantios agrícolas (USEPA, 1984).

A busca de um indicador biológico para a identificação de vírus que possam estar presentes nos esgotos e águas residuárias com contaminação com fezes humanas, dados os pré-requisitos citados anteriormente, deve centrar seus esforços nos vírus entéricos humanos. Eles infectam o trato gastrointestinal, têm via de contaminação fecal-oral, são veiculados pela água e, no ambiente, apresentam resistência a vários fatores ambientais.

De acordo com NASSER, TCHORCH e FATTAL (1993), a manutenção de agentes patogênicos humanos durante o processo de tratamento de água e esgoto varia muito, passando, numa escala crescente, pelos grupos mais suscetíveis, as bactérias, seguida pelos vírus, cistos de protozoários e por fim, ovos de helmintos. Um indicador já determinado para as bactérias são os coliformes, hoje subdivididos em coliformes termo-tolerantes

(antes chamados fecais) e coliformes totais (DONAIRE, 2001). Os indicadores bacterianos apresentam vantagens e desvantagens. Dentre as vantagens está o fato da maioria dos processos de tratamento químico e biológico reduzir significativamente a quantidade de bactérias. Também foram desenvolvidos testes diagnósticos para a detecção e quantificação dos coliformes totais e fecais que são rápidos, práticos e baratos, permitindo assim sua aplicação nas plantas de tratamento para controle de qualidade dos processos (DANIEL, 2001). Há duas desvantagens na adoção de indicadores bacterianos como único parâmetro do controle da eficiência do tratamento de água e esgoto. A primeira está no fato de que nem todas as bactérias são eliminadas, como é o caso de bactérias do gênero *Salmonella*. A segunda vem da constatação de que as bactérias são mais susceptíveis aos fatores ambientais e aos processos de tratamento de efluentes, quando comparadas com vírus e helmintos (MARTINS *et al.*, 1986).

Alguns autores argumentam que os indicadores bacterianos são insatisfatórios para a avaliação da presença viral e para a determinação da eficiência dos tratamentos de desinfecção na eliminação dos vírus entéricos (MARTINS *et al.*, 1983; NASSER *et al.*, 1993; SCHWARTZBROD, 1995). As pesquisas na busca de indicadores da contaminação viral se deparam com algumas dificuldades. Os vírus apresentam grande resistência aos fatores ambientais e aos processos de tratamento, o que desloca a atenção para o desenvolvimento, ou aperfeiçoamento, dos processos de tratamento e desinfecção que possam contemplar a eliminação ou inativação das partículas virais indesejáveis, evitando-se, assim, a infecção de humanos.

As partículas virais eliminadas nas fezes estão freqüentemente ligadas com partículas de matéria fecal (WILLIAM, 1985). Os vírus que têm capsídeo protéico de estrutura simples, como os poliovírus e vírus da hepatite A, agregam-se espontaneamente, formando estruturas pseudocristalinas (SCHWARTZBROD, 1995). Estas são altamente resistentes à ação mecânica e de agentes desinfectantes, e tendem a sedimentar por adsorção a partículas sólidas dos agregados de biomassa móveis, ou dos estacionários que vão compor o lodo do fundo das lagoas de decantação. O mesmo não é esperado para os chamados vírus complexos, cujos capsídeos, compostos por diferentes proteínas que não possuem características conformacionais que permitem a autoagregação e assim não formam estruturas pseudocristalinas.

A desinfecção é particularmente afetada por esta agregação e, embora os desinfetantes tenham considerável força de penetração, os vírions localizados no centro dos agregados ficam protegidos de sua ação (SCHWARTZBROD, 1995). Quando estão ligados a matéria orgânica particulada, sua resistência à inativação por cloração é aumentada, o que foi demonstrado para poliovírus quando presentes em meio à matéria fecal (HEJKAL *et al.*, 1979) e no esgoto (HARAKEH, BUTLER, 1985). Muitos vírus estão presentes em quantidades pequenas no ambiente, e embora detectáveis, facilitando assim uma análise qualitativa da presença viral, há dificuldades para a sua quantificação, exigindo tecnologias de custo inviável para a rotina das plantas de tratamento, como a técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real.

A frequência da circulação dos vírus no ambiente é um item a ser considerado ao tentar eleger um indicador viral da contaminação do ambiente por esgotos e água residuária provenientes de populações humanas. Um bom indicador será aquele que não apresente sazonalidade, circulando o ano todo no ambiente e no hospedeiro.

De maneira geral, o controle da contaminação por vírus, protozoários e helmintos ainda não tem parâmetros definidos (SANTAMARÍA, TORANZOS, 2003) e correlações entre a detecção de coliformes e a contaminação por vírus patogênicos para o homem não foram estabelecidas (SALGOT *et al.*, 2001). Por outro lado, mais de 140 tipos de vírus patogênicos para o homem podem ser veiculados pelo ambiente aquático (SCHWARTZBROD, 1995), o que representa um risco à saúde pública, e podem levar a doenças diarréicas causadas por rotavírus, astrovírus, calicivírus, norovírus e adenovírus, ou mesmo a hepatites causadas por enterovírus (GERBA, ROSE, SINGH, 1985; ROSE, GERBA, 1991; SCHWARTZBROD, 1995).

Segundo SCHWARTZBROD (1995), os vírus candidatos a indicadores de contaminação da água residuária são, necessariamente, os não envelopados. Dentre eles, dois grandes grupos se destacam: a família *Picornaviridae*, com os enterovírus, poliovírus, Cocksackievírus, e os vírus da hepatite A; e os agentes de gastroenterites que provocam quadros agudos de diarreia: rotavírus, adenovírus, astrovírus, calicivírus e norovírus.

No Brasil, há vários relatos sobre contaminação viral em amostras do ambiente, realizados principalmente em águas de córregos e esgotos no município de São Paulo.

CHRISTOVÃO, CANDEIAS e IARIA (1967) analisou 11 amostras de águas de córregos para irrigação de hortas do município de São Paulo e em cinco delas foram identificados enterovírus, caracterizados como poliovírus tipos I e III e Coxsackievírus A7 e A16. MARTINS *et al.* (1983) analisaram 55 amostras de esgoto em uma estação de tratamento de esgotos na cidade de São Paulo que recebia 12% do total do esgoto urbano do município. Nos testes realizados para a identificação de enterovírus foram obtidos isolados virais de 433 amostras virais, das quais 70,7% foram poliovírus, 19,2% foram echovírus, 7,6% foram Coxsackievírus e em 2,5% das amostras os vírus não puderam ser identificados. Em um estudo retrospectivo de dez anos, MARTINS *et al.* (1986) pesquisaram a presença de enterovírus e enterobactérias do gênero *Salmonella* em amostras de esgoto e água tratada em estações de tratamento de esgotos na região metropolitana da cidade de São Paulo. Com o monitoramento desses agentes patogênicos em nove plantas de tratamento de água da Grande São Paulo desde 1976, foram detectados enterovírus (poliovírus tipo 2 e Coxsackievírus A16) em amostras nas quais o cloro residual estava na concentração de 1,5 a 1,6 mg/L e as características de turbidez, pH, cor e concentração de alumínio estavam todas dentro dos limites permitidos. Nessas amostras de água analisadas, positivas para enterovírus, estavam ausentes bactérias do grupo dos coliformes fecais e *Salmonella*, demonstrando que o indicador bacteriano não foi suficiente para aferir a qualidade da água. Outros estudos realizados na cidade de São Paulo, com amostras de água de esgoto e de córrego, mostraram não haver correlação entre a presença de bactérias do grupo dos coliformes e os enterovírus (STEWIEN, 1979), assim como os rotavírus (MEHNERT, 1988).

Utilizando o método de detecção da infecção viral por imunoperoxidase direta, MEHNERT e STEWIEN (1993) estudaram 84 amostras de esgoto bruto coletadas na estação de tratamento de esgotos Edu Chaves e de água dos córregos Tremembé e Pirajussara, na cidade de São Paulo, ao longo de dois anos. Detectaram rotavírus em 20% das amostras de esgoto bruto e em 34% das amostras de água de córrego. Esse estudo demonstrou que a circulação destes vírus na cidade de São Paulo ocorreu durante o ano todo, embora com dois picos, na primavera e no verão, períodos mais úmidos e quentes do ano. O cuidado em não subestimar a presença dos rotavírus fez com que MEHNERT *et al.* (1997) testassem um protocolo para a concentração do esgoto bruto em duas etapas: a

primeira, por filtração e eluição em membrana eletropositiva; e a segunda, por ultracentrifugação. Para tanto, foi semeada, experimentalmente, a amostra protótipo de rotavírus SA-11, previamente cultivada em células MA-104 e com título de  $3,5 \times 10^4$  unidades formadoras de foco em 50  $\mu$ L de meio Eagle MEM. Esse volume de meio de cultura celular contendo os vírus foi adicionado em oito litros de esgoto bruto ou água de córrego poluído por esgotos que, por sua vez, tinham sido previamente autoclavados a 121 °C durante uma hora e resfriados até a temperatura ambiente. Após infecção em células MA104 o resultado, determinado pelo teste de imunoperoxidase direta, foi a recuperação de 81% da quantidade de rotavírus inicialmente aplicada.

MEHNERT e STEWIEN (1993) afirmam que as concentrações de vírus em águas de córregos, esgotos e águas de abastecimento público são pequenas. VAN HEERDEN *et al.* (2005) detectaram a presença de adenovírus em água tratada para consumo humano e em água de rio na África do Sul. E, embora no primeiro caso o número de partículas infectivas fosse bem menor que no segundo, elas estariam em quantidade suficiente para causar infecção. Alguns autores afirmam que a dose mínima para a infecção também seria baixa, ao redor de 50 vírions para enterovírus (SCHWARTZBROD, 1995), ou mesmo uma única unidade para os rotavírus (GRAHAN, DUFOUR, ESTES, 1987).

A remoção de patógenos virais pelo tratamento de água residuária pela associação de lagoa de decantação anaeróbia e disposição controlada no solo por escoamento superficial é pouco conhecida.

Os fatores que podem afetar o movimento das partículas virais no solo em direção ao lençol freático são: o tipo de vírus, a taxa de precipitação pluviométrica, a taxa hidráulica de escoamento e, sobretudo, as características do solo quanto ao tipo, pH, presença de cátions e de compostos orgânicos solúveis (GOYAL, GERBA, 1979; GERBA, BITTON, 1984; YATES, GERBA, 1998).

STRAUB, PEPPER e GERBA (1995), estudando a contaminação do solo por vírus, realizaram pesquisa em fazenda cujo solo fora irrigado com lodo de esgoto durante sete anos, digerido anaerobicamente. Foram detectados, por PCR, enterovírus em 87,5% das amostras, demonstrando transporte de vírus no solo tanto horizontal quanto verticalmente, provocado pelo escoamento da irrigação e pelas chuvas. HURST *et al.* (1980), em experimento com poliovírus tipo 1, echovírus tipo 1 e amostras do solo, determinaram que

o arraste das partículas virais no solo aconteceu com deslocamento de 10 cm a cada 10 dias. Definindo as unidades formadoras de placas (UFP) antes da semeadura das partículas virais no solo, e inoculando as amostras obtidas do solo em linhagem de células BGM, verificaram que a taxa de inativação dos poliovírus 1 e echovírus 1 semeados e infiltrados no solo, ficou entre 0,04 e 0,15  $\log_{10}$  unidades por dia. Por outro lado, amostras de solo em que a aplicação viral diluída na água de esgoto bruto passou por um processo de secagem, a taxa de decaimento das partículas infectivas foi maior, de 0,11 e 0,52  $\log_{10}$ . Esse trabalho permitiu definir que o dessecamento influencia consideravelmente na capacidade dos virions de manter sua infectividade. GERBA *et al.* (1981), testaram a capacidade de adsorção de 10 tipos de vírus (Coxsackievírus B3 e B4, echovírus tipos 1 e 7, poliovírus tipo 1 e os bacteriófagos ØX174, f2, MS-2, T2 e T4) frente a nove diferentes tipos de solo. Chegaram à conclusão que a adsorção de todos os vírus testados, frente a todos os diferentes solos, esteve entre 98,0% e 99,9%, indicando o solo como um filtro vantajoso para pós-tratamento de efluentes de água residuária.

Os adenovírus e rotavírus apresentam algumas das características necessárias a um indicador biológico adequado no tratamento de águas residuárias. Os rotavírus têm uma via de transmissão fecal-oral e são eliminados nas fezes de oito a 40 dias após a infecção, o que se constitui em longo período de eliminação nas fezes e, portanto, nos esgotos sanitários. Os rotavírus são o primeiro agente causador de gastroenterite viral em importância mundial, acometendo principalmente crianças até 24 meses de idade. Esses vírus apresentam baixa dose infectante, com apenas um vírion pode levar à infecção no homem (GRAHAN, DUFOUR, ESTES, 1987). O fato de poderem estar presentes em água potável, convencionalmente tratada (MCDANIELS *et al.*, 1983; SATTAR, RAPHAEL, SPRINGTHORPE, 1984; PANCORBO *et al.*, 1987) sugere que o monitoramento da presença desses vírus nas estações de tratamento de água deva ser considerado. Esses vírus são responsáveis por um número estimado de 440.000 mortes de crianças por diarreia no mundo anualmente (PARASHAR *et al.*, 2003) e 4.000 mortes por ano no Brasil (Pesquisa FAPESP, 2006) e estão, comprovadamente, presentes em água residuária (RAPHAEL, SATTAR, SPRINGTHORPE, 1985; PANCORBO *et al.*, 1987).

Os rotavírus apresentam sazonalidade em países de clima tropical. Os rotavírus ocorrem no hemisfério norte nos meses mais frios do ano enquanto que no hemisfério sul

isto se dá nos meses mais secos. No Brasil, em particular, a circulação dos rotavírus na população humana assume características peculiares, pois nas regiões centro-oeste, sudeste e sul ocorrem surtos nos meses mais secos enquanto que nas regiões norte e nordeste nenhum padrão de sazonalidade foi observado (LINHARES, 2000). No município de Campinas, SP, foram registrados dois surtos de rotavírus nos anos de 2003 e 2004, com picos nos meses de agosto e setembro, de baixa umidade relativa do ar e baixa precipitação pluviométrica (MARTINI, I. J., dados não publicados), confirmando observações anteriores com relação aos surtos de rotavírus na região sudeste. Essas informações podem indicar que os rotavírus, ao contrário dos adenovírus, podem não ser indicadores adequados para a verificação de contaminação do ambiente por fezes de origem animal ou do homem. No entanto, esses vírus têm sido utilizados como marcadores biológicos sendo detectados em água potável convencionalmente tratada (MCDANIELS *et al.*, 1983; SATTAR, RAPHAEL, SPRINGTHORPE, 1984; PANCORBO *et al.*, 1987), em esgotos e águas tratadas (RAPHAEL, SATTAR, SPRINGTHORPE, 1985; PANCORBO *et al.*, 1987), inclusive no Brasil (MEHNERT, STEWIEN, 1993).

FISCHER, STEINSLAND e VALENTINER-BRANTH (2002) constataram a estabilidade e manutenção dos rotavírus em amostras de fezes estocadas sob temperatura tropical entre 30 e 35 °C por dois meses e meio na Guiné Bissau. Somente após esse período as amostras foram congeladas e, em parte delas, os vírus foram novamente detectados por *nested*-RT-PCR, mostrando que a integridade do RNA viral se manteve nas condições adversas de ausência de refrigeração. Ainda, do total de amostras estudadas, 11 delas não tiveram seus genótipos definidos na Guiné Bissau e, por isso, foram submetidas à inoculação em culturas de células MA104 no laboratório dinamarquês. Cinco, dentre as 11 amostras inoculadas, foram positivas, representando 45% das amostras testadas na cultura celular, o que se configura num resultado incomum para amostras de rotavírus armazenadas em condições que não são as convencionalmente recomendadas. Este fato demonstra, em parte, a persistência dos rotavírus quando mantidos nas fezes. Os rotavírus são resistentes a solventes lipídicos e estáveis em ampla faixa de pH (3,5 a 10,0). A infectividade viral é mantida após tratamento com éter e clorofórmio, suportando sucessivos congelamentos e descongelamentos, mas essa é perdida após o tratamento com agentes quelantes como o EDTA e o EGTA, assim como pela ação do etanol 95% (v/v) (ESTES, 2001).

A infecção por rotavírus produz alterações histopatológicas restritas ao intestino delgado, que são mais pronunciadas nas porções do jejuno e do íleo. Nesses sítios de ocorrência da multiplicação viral, nota-se hiperplasia das glândulas do intestino associada ao encurtamento, atrofia e desnudamento dos vilos intestinais (CROUCH, WOODE, 1978; GOMEZ, 1997). Tais alterações configuram-se como consequência de um processo de descamação ocasionado por uma rápida e extensa infecção das células epiteliais diferenciadas, evento que promove redução da área superficial de absorção. Na tentativa de repovoamento das regiões afetadas, são recrutadas células imaturas incapazes de absorverem nutrientes (THEIL *et al.*, 1978), fato diretamente responsável pela ocorrência de diarreia nas infecções por rotavírus, pois essas células acabam por promover depressão nas atividades de dissacaridases e outras enzimas intestinais, interferindo negativamente nos processos de absorção de Na<sup>+</sup> e água e no transporte ativo de glicose (GOMEZ, 1997). Também são observadas alterações intracelulares decorrentes das infecções por rotavírus dentre as quais a distensão das cisternas do retículo endoplasmático, o inchamento das mitocôndrias e irregularidades dos microvilos, que configuram-se como mais freqüentes (HOLMES *et al.*, 1975). Este conjunto de modificações estruturais e funcionais nos meios intra e extracelulares culmina com significativa queda na absorção intestinal, vômitos ocasionais, desidratação e comprometimento do metabolismo e do desenvolvimento do hospedeiro, merecendo destaque o ganho de peso deficitário (GOMEZ, 1997).

Os rotavírus foram descritos em 1973 e, pelo fato de apresentarem morfologia semelhante a dos membros da família *Reoviridae*, foram nomeados, inicialmente, como orbivírus e *reovirus-like* (BISHOP *et al.*, 1974). Posteriormente, foi sugerida a denominação rotavírus em decorrência da semelhança morfológica das partículas virais à roda (*rota*, em latim), quando da sua observação em microscópio eletrônico (FLEWETT *et al.*, 1974). Atualmente, de acordo com o ICTV (*International Committee on Taxonomy of Viruses*), os rotavírus são classificados como pertencentes à família *Reoviridae* e ao gênero Rotavirus, estando divididos em cinco espécies (RV-A a RV-E), com duas outras adicionais (RV-F e RV-G). Classificações anteriores delimitavam distintos “grupos” virais intitulados A a G (BRIDGER, 1994; SAIF, JIANG *et al.*, 1994; KAPIKIAN, CHANOCK, 1996), estes reunidos nos conjuntos “Grupo A”- abrangendo os rotavírus pertencentes ao grupo A e “Grupo não-A”-que incluía os grupos restantes (B a G).

Os rotavírus pertencentes à espécie A (RV-A) apresentam maior variedade de hospedeiros, tendo sido encontrados em humanos, bovinos, ovinos, eqüinos, primatas, suínos e aves, dentre inúmeros outros animais. RV-B foram detectados em humanos, bovinos, ovinos, suínos e ratos; enquanto os RV-C foram descritos em humanos, suínos e furões. RV-D, RV-F e RV-G estão exclusivamente associados a aves e os RV-E, por sua vez, foram encontrados somente em suínos (KAPIKIAN, CHANOCK, 1996).

Os rotavírus caracterizam-se por apresentarem partículas icosaédricas, com diâmetro entre 70 e 80 nm ou 100nm, são não envelopados e têm um genoma composto de 11 segmentos de RNA dupla-fita (dsRNA). Os segmentos genômicos codificam para um grupo de seis proteínas estruturais (VPs, *viral proteins*), encontradas nas partículas virais, e outras cinco proteínas não-estruturais (NSPs, *non-structural proteins*) presentes somente em células infectadas e não observadas em partículas maduras (KAPIKIAN, CHANOCK, 1996).

A estrutura viral é composta por três camadas protéicas que constituem o capsídeo externo, o capsídeo interno e o “core”, os quais se comunicam por meio de um complexo de canais (tipos I, II e III) à superfície externa da partícula. A glicoproteína VP7 é o principal constituinte da camada protéica mais externa e o segundo elemento mais abundante na partícula, sendo codificada pelos segmentos 7, 8 ou 9, de acordo com a linhagem viral (KAPIKIAN, CHANOCK, 1996). Essa estrutura também é responsável pela determinação de sorotipos virais, designados pela letra G (glicoproteína) seguida de algarismos de 1 a 14 (G1 a G14), pelo fato de apresentar diferentes determinantes antigênicos, identificados por ensaios de neutralização com anti-soro hiperimune (HOSHINO, KAPIKIAN, 1994). Os genotipos G são definidos por variações no segmento genômico que codifica para VP7, podendo acarretar alterações dos epítomos nas proteínas finais com ausência de correspondência com o respectivo sorotipo (ESTES, 2001).

Outra proteína presente no capsídeo externo é denominada VP4 e possui forma alongada e ápice bilobado, encontrando-se alojada na abertura dos canais do tipo II por meio de uma porção globular basal. Trata-se de uma hemaglutinina protease-sensível, codificada pelo quarto segmento genômico, que apresenta sítios de clivagem para a enzima tripsina que produz, por meio da digestão, os fragmentos VP5\* e VP8\* responsáveis por aumentar a infectividade da partícula (KAPIKIAN, CHANOCK, 1996; VAN

REGENMORTEL, 2000). Por induzir a formação de anticorpos neutralizantes, a proteína VP4 determina para diferentes sorotipos para RV-A (ESTES, COHEN, 1989), denominados pela letra P (protease-sensível), seguida de algarismos arábicos entre cochetes. São conhecidas seqüências genotípicas de P cuja correlação com os diferentes sorotipos não foi inteiramente elucidada. Estudos por hibridização com sondas e seqüenciamentos permitiram a definição de 20 ou 21 genotipos P, designados P[1] a P[21] (RAO, GOWDA, REDDY, 2000). Em hospedeiros humanos os sorotipos mais comuns são G1 a G4 e os genotipos mais comuns são P[4] e P[8]. XU, HARBOUR e MCCRAE (1990), demonstraram pela primeira vez os resultados obtidos na amplificação e tipagem do ácido nucléico dos rotavírus a partir de amostras de fezes por testes de semi-*nested*-PCR, de alta sensibilidade e especificidade. A combinação G1P[8] é a mais comum RV identificados em hospedeiros humanos de tal forma que foi eleita para compor a vacina monovalente Rotarix (GlaxoSmithKline) (GLASS, PARASHAR, 2006).

A camada intermediária da partícula viral (capsídeo interno) é constituída pela proteína VP6, codificada pelo sexto segmento genômico e detentora dos determinantes antigênicos relativos à separação dos rotavírus de RV-A a RV-G (ESTES, COHEN 1989). Trata-se do elemento mais abundante na partícula viral, desempenhando um papel fundamental na estrutura do vírion, dadas as importantes interações que estabelece com as proteínas VP4, VP7 (do capsídeo externo) e VP2 (do *core* protéico). Pelo fato de ser a proteína viral mais imunogênica e de apresentar epítomos conservados é tida como o principal alvo antigênico em ensaios diagnósticos (ESTES *et al.*, 1987; KAPIKIAN, CHANOCK, 1996).

O *core* protéico é a camada mais interna que envolve o genoma composto por 11 segmentos de RNA dupla-fita, sendo formado a partir das proteínas estruturais VP1, VP2 e VP3. As proteínas VP1 apresentam quatro motivos conservados que também se encontram presentes em RNA polimerases dependentes de RNA, sugerindo sua participação como parte da transcriptase presente nas partículas virais (ESTES, COHEN 1989; COHEN *et al.*, 1989). A VP2, por sua vez, pode se ligar ao RNA e tem se mostrado essencial para a atividade da enzima replicase, enquanto o peptídeo VP3 caracteriza-se como uma guanidiltransferase (KAPIKIAN, CHANOCK, 1996). De maneira geral, pode-se dizer que

as proteínas constituintes do core são responsáveis por atividades de transcriptase e replicase (ESTES, 2001).

Todo o conjunto de proteínas estruturais e não-estruturais é codificado por segmentos genômicos presentes no “core” protéico, os quais apresentam pesos moleculares que variam de  $0,2 \times 10^6$  a  $2,2 \times 10^6$  daltons e tamanhos entre 663 e 3.302 pares de bases (ESTES, COHEN 1989; KAPIKIAN, CHANOCK, 1996; VAN REGENMORTEL, 2000). As diferentes espécies de rotavírus apresentam um típico padrão eletroforético de migração de seus 11 segmentos em eletroforese em gel de poliacrilamida (EGPA), o que permite associar a disposição das bandas às espécies dentro do gênero Rotavirus. Os padrões de migração variam em diferentes linhagens dentro de uma mesma espécie. Há uma grande variabilidade nos perfis de migração que se deve, em grande parte, à natureza segmentada do genoma dos rotavírus, proporcionando rearranjos genéticos ao longo de infecções mistas *in vivo* e *in vitro* culminando, por fim, com a geração de diversidade genética e genômica (VARGHESE *et al.*, 2004).

Em função da ampla variedade de hospedeiros que apresenta e, conseqüentemente, da maior incidência dos rotavírus RV-A, estudos e metodologias relativos a essa espécie são mais freqüentes. O diagnóstico obtido por eletroforese em gel de poliacrilamida-EGPA (ESTES, COHEN, 1989) identifica os 11 segmentos genômicos dos rotavírus e permite definir a espécie pelo padrão de migração das bandas. Além desse teste, vários outros podem ser utilizados: visualização direta da partícula viral por microscopia eletrônica (BISHOP *et al.*, 1974); hibridização *in situ* por meio de transcritos RNAss marcados (FLORES *et al.*, 1983); RNA de interferência (CAMPAGNA *et al.*, 2005) e os testes por PCR (XU, HARBOUR, MCCRAE, 1990) e imuno-PCR (ADLER *et al.*, 2005), além dos testes imunoenzimáticos utilizando soros monoclonais e policlonais (COULSON *et al.*, 1987).

GOUVÊA *et al.* (1990) desenvolveram o teste de RT-PCR para amplificação e tipagem dos rotavírus com base na seqüência gênica que codifica a proteína VP7, localizada nos segmentos 7, 8 ou 9. Sob pressão seletiva do hospedeiro essa proteína apresenta alterações dos epítomos que expressam diferentes genótipos.

Os adenovírus humanos (HAdV) também possuem quesitos que os tornam candidatos a possíveis indicadores virais de contaminação de águas residuárias. Têm

resistência a fatores químicos e físicos do ambiente (GIRONES *et al.*, 1993; ENRIQUEZ, HURST, GERBA, 1995) e o subgênero F (sorotipos 40 e 41) têm rota de transmissão fecal-oral (FLEWETT *et al.*, 1975; LEVY, FRAENKEL-CONRAT, OWENS, 1994), podendo ser veiculados pela água, e estão em segundo lugar no mundo como agentes de gastroenterites (SOARES *et al.*, 2002).

A ausência de sazonalidade dos adenovírus em amostras de esgoto e de água de córrego urbano já foi demonstrada por GIRONES *et al.* 1995. As partículas dos adenovírus são mais estáveis que os poliovírus e outros enterovírus (ENRIQUEZ, HURST, GERBA, 1995), e apresentam relativa resistência a solventes orgânicos e ácidos, apresentando estabilidade quando estão dentro da célula. São inativados a 56 °C durante 10 minutos e quando purificados perdem rapidamente sua infectividade (OLIVEIRA, 1994).

Os adenovírus circulam no ambiente durante todo o ano. PINA *et al.* (1998) detectaram adenovírus circulando em 93% das amostras de água de esgoto e em 65% das amostras de água de rio colhidas nos anos de 1995 e 1996, em Barcelona, Espanha. No Brasil, SOARES *et al.* (2002) analisaram amostras de fezes de crianças menores de cinco anos com diarreia aguda (n=1.422), detectando, por ensaio imunoenzimático, a presença de adenovírus entéricos do subgênero F (sorotipos 40 e 41) em 1,55 % das amostras e adenovírus não entéricos em 3,31% do total analisado. Três cidades da região sudeste foram estudadas, sendo duas do estado do Rio de Janeiro (Rio de Janeiro e Niterói) e uma de Minas Gerais (Juiz de Fora), e uma cidade da região sul, do estado do Paraná (Londrina) e, em nenhuma delas, foi observada distribuição sazonal dos vírus ao longo do ano, estando presentes em todos os meses e nas quatro cidades.

Os adenovírus foram descritos pela primeira vez por ROWE *et al.* (1953), a partir de adenóides humanas mantidas em culturas *in vitro* e de secreções humanas do trato respiratório superior inoculadas em cultura de células de origem humana (OLIVEIRA, 1994). Esses vírus estão classificados pelo ICTV como pertencentes à família *Adenoviridae*, que tem quatro gêneros: os Mastadenovirus (bovinos, eqüinos, canídeos, murinos, suínos, símios, humanos e outros), os Aviadenovirus (aves), os Atadenovirus (ovinos, bovinos, caprinos, cervídeo, camaleão, cobra etc) e os Siadenovirus (sapos e aves).

A maioria dos estudos da estrutura viral foi realizada com HAdV tipos 2 e 5 (SHENK, 1996), demonstrando que são vírus não envelopados, com capsídeo e

núcleocapsídeo protéico de simetria icosaédrica, com diâmetro entre 70 e 100 nm e coeficiente de sedimentação em cloreto de céσιο (CsCl) de 1,32 a 1,35 g/mL. O capsídeo é formado por 252 capsômeros, dos quais 240 são estruturas denominadas hexon que formam as 20 faces triangulares, e 12 são estruturas denominadas penton, que formam os vértices do icosaedro (OLIVEIRA, 1994). O hexon é uma proteína trimérica, formada por moléculas do polipeptídeo II fortemente associadas (HORWITZ, MAIZEL, SCHARFF, 1970). O penton é formado pelo polipeptídeo IV, projetando um trímero desse polipeptídeo que se constitui na fibra (VAN OSSTRUM, BURNETT, 1985). Uma única fibra se projeta da base do penton dos Mastadenovirus e duas ocorrem no gênero Aviadenovirus. A fibra tem tamanho variável de 10 a 33 nm de comprimento, possuindo 2 nm de diâmetro e termina em uma esférula de 4 nm (OLIVEIRA, 1994). A estabilidade desses vírus no ambiente é determinada pelas suas características estruturais, ou seja, capsídeo protéico, o arranjo conformacional do hexon e a estabilidade do conjunto formado pelo penton e a fibra.

O genoma dos adenovírus é constituído de DNA dupla-fita linear, que codifica uma DNA-polimerase-DNA-dependente. A região do DNA que codifica o hexon possui uma parte variável que define pela antigenicidade viral e outra região muito conservada que define pela estrutura do capsídeo viral. Os adenovírus humanos apresentam seis subgêneros, denominados de A até F, com 51 sorotipos distribuídos entre eles (ICTV).

Quanto à epidemiologia dos HAdV, a transmissão da infecção e a ocorrência de doença variam de esporádica a epidêmica e há, frequentemente, uma correlação bem definida entre o sorotipo viral e a idade da população susceptível. A transmissão fecal-oral contribui para aumentar as infecções em crianças. Inicialmente, a dispersão viral deve ocorrer pela via respiratória, mas a permanência prolongada dos vírus no intestino faz com que as fezes sejam a fonte mais comum de vírus, durante a infecção aguda e nos episódios de recorrências intermitentes. Soma-se a este fato o grande número de infecções por HAdV assintomáticas. É importante destacar aqueles tipos relacionados com a gastroenterite, causada pelos vírus do subgênero B e F, sendo sete os subtipos do subgênero B (3, 7, 11, 14, 21, 34, 35) e dois subtipos do subgênero F (40 e 41), relacionados a este quadro. (HORWITZ, 1996).

Os HAdV dos subgêneros A a E podem ser cultivados em células de origem humana (HEK, HeLa, KB, HEp-2 e HEK-293). O efeito citopático (ECP) nos cultivos celulares aparece nas primeiras 5 a 6 horas pós-infecção, desde que haja alta concentração da base do penton, mas sem que ocorra multiplicação viral. O ciclo viral dura em média de 48 a 96 horas, no fim do qual o ECP pode ser evidenciado de forma bem característica, denominados de “agregados de cachos de uva” ou “rede de pescador”. Os HAdV fastidiosos, pertencentes ao subgênero F (HAdV 40 e HAdV 41), multiplicam-se relativamente em células HEK-293.

A PCR tem sido utilizada para a detecção dos vírus entéricos em amostras de origem ambiental desde o início da década de 1990 (ABBASZADEGAN *et al.*, 1993; TSAI *et al.*, 1994; GAJARDO *et al.*, 1995; DUBOIS *et al.*, 1997). Sua alta sensibilidade permite que quantidades muito pequenas de ácido nucléico viral sejam detectadas e sua alta especificidade garante que as espécies alvo sejam identificadas com precisão (WYN-JONES, SELLWOOD, 2001). VAN HEERDEN *et al.* (2005) quantificaram adenovírus entéricos (sorotipos 40 e 41) em água de rio na África do Sul, utilizando o método de amplificação em cadeia da polimerase com quantificação em tempo real, ou *real-time-PCR*, obtendo valores da ordem de  $4,24 \times 10^{-5}$  a  $1,01 \times 10^{-2}$ .

A região do genoma viral codificadora do hexon é altamente conservada e foi a escolhida por ALLARD, ALBINSSON e WADELL (1992) para nortear o desenho de oligonucleotídeos iniciadores da PCR, de maneira a identificar todos os 51 sorotipos de adenovírus de humanos.

Quatro questões são postas no reuso de águas residuárias de esgoto sanitário, na irrigação ou na recarga de aquíferos. A primeira é a eficiência do solo como filtro na remoção de partículas virais (GERBA *et al.*, 1981; SCHIJVEN, HASSANIZADEH, 2000; SANTAMARÍA, TORANZOS, 2003). A segunda refere-se até onde estas partículas podem infiltrar e percolar no solo atingindo lençóis freáticos (SCANDURA, SOBSEY, 1997). A terceira é se a passagem pelo ambiente da lagoa de decantação anaeróbia e pelo solo interferem na capacidade de gerar infecção das partículas virais. A quarta é a determinação da relação entre contaminação de produtos agrícolas e segurança em saúde pública (BLANC, NASSER, 1996; ORON, 1996).

O presente trabalho mantém seu foco nas três primeiras questões, e tem como OBJETIVO analisar se os adenovírus humanos (HAdV) e rotavírus da espécie A (RV-A) podem ser usados como indicadores no sistema de tratamento de águas residuárias em lagoa de decantação anaeróbia, seguido de escoamento superficial no solo, quanto à eficiência na remoção e ou inativação desses vírus, permitindo assim o reuso de águas residuárias, advindas do sistema, para a irrigação.

Para validar essa proposta os testes e condutas de escolha foram:

1. A detecção de adenovírus de humanos por PCR e *nested*-PCR, e ensaios de infectividade viral em linhagem celular.
2. A detecção de rotavírus da espécie A por RT-PCR, seguido de genotipagem para G1, G2, G3, G4.

## ***II. MATERIAL E MÉTODOS***

### ***1. O Sistema de tratamento anaeróbio e disposição controlada de água residuária no solo.***

O sistema estudado foi instalado na Estação de Tratamento de Esgoto (ETE) do bairro Graminha, município de Limeira–SP, Brasil, administrada pela Concessionária Águas de Limeira S.A., onde se localiza uma planta piloto de tratamento de esgotos sanitários. A ETE recebe esgoto bruto (EB) de um bairro residencial da cidade de Limeira, o qual passa por um pré-tratamento constituído de gradeamento para remoção de sólidos grosseiros e areia. Em seqüência o efluente é conduzido para o tratamento primário por lagoa anaeróbia, operada com tempo de detenção hidráulico de sete dias.

As determinações físico-químicas indicam que a lagoa anaeróbia não atinge os padrões de lançamento da legislação brasileira, justificando assim a adoção de um processo de pós-tratamento (VON SPERLING, NASCIMENTO, 1999). Como pós-tratamento do sistema é utilizada a disposição controlada da água residuária no solo através de uma rampa de escoamento superficial, com declividade de 3,5% com cobertura vegetal de gramínea

Tifton-85 (*Cynodon sp.*) (Figura 1). O tipo de solo é franco argiloso-arenoso (SILVA, 2003).

O efluente é conduzido por gravidade até a cabeceira da rampa através de um sistema de sifão e tubulação PAD de 2” e distribuído por um tudo de PVC DN100 perfurado e colocado no início da rampa. O efluente é aplicado com taxa hidráulica de 0,25 m<sup>3</sup>/m.h, em períodos de 10 horas de aplicação e frequência de cinco dias por semana. A rampa é operada com tempo de detenção hidráulico de 170 minutos.

Para a coleta de amostras de água residuária foram instaladas ao longo da rampa de escoamento superficial estações de monitoramento de líquido percolado a 1,0 m de profundidade, dispostas em quatro pontos distintos, sendo dois destes anteriores à área de aplicação de efluentes, denominados de pontos de testemunha T1 e T2. No seu entorno a rampa possui instalados poços de monitoramento da qualidade da água do lençol freático (LF), situado a 3,0 m de profundidade, conforme a norma ABNT, NBR13895 de junho de 1997 (Figura 1).

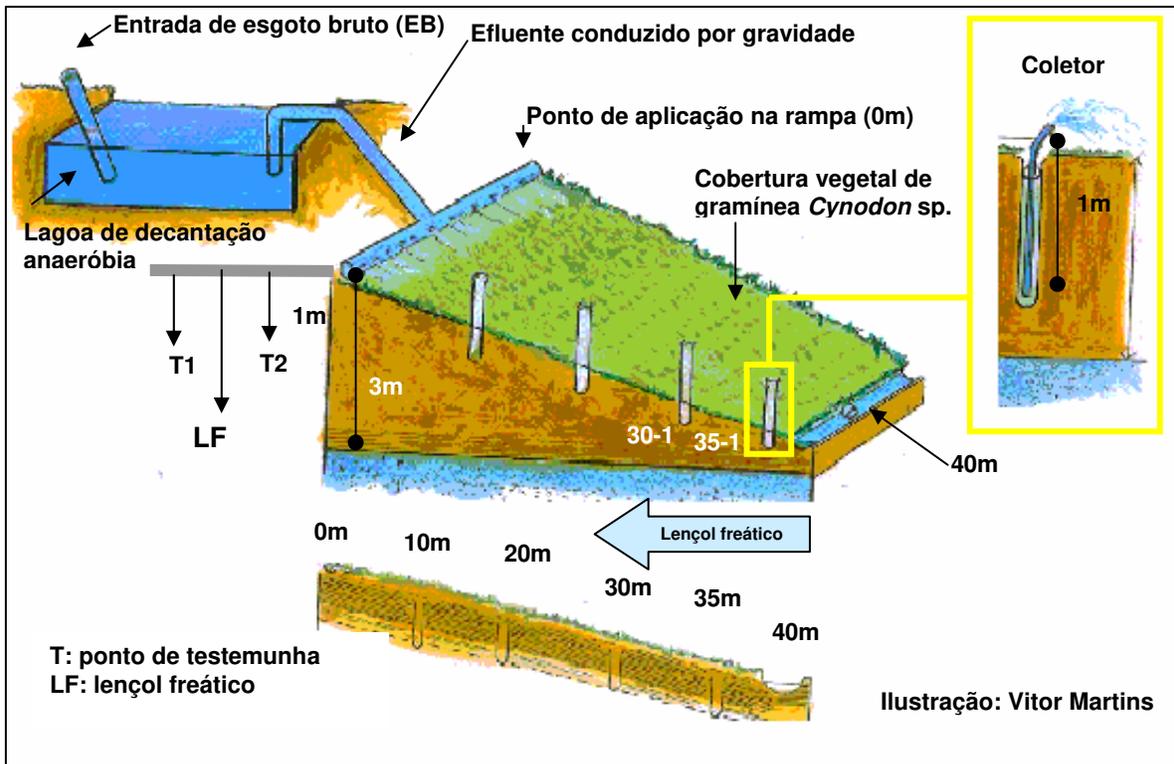
## ***2. Coleta das amostras.***

Foram feitas três coletas de material para análise nos pontos T1 e T2, LF e a 0, 10, 20, 30 e 40 m da superfície da rampa. Outros dois pontos, a 1m de profundidade e a 30 (30-1) e 35 (35-1) m do início da rampa também foram utilizados para a coleta de amostras (Figura 1; Quadro 1).

## ***3. Coleta das amostras.***

Foram feitas três coletas de material para análise nos pontos T1 e T2, LF e a 0, 10, 20, 30 e 40 m da superfície da rampa. Outros dois pontos, a 1m de profundidade e a 30 (30-1) e 35 (35-1) m do início da rampa também foram utilizados para a coleta de amostras (Figura 1; Quadro 1).

As coletas foram feitas levando-se em consideração o momento da entrada do esgoto bruto



**Figura 1:** Esquema do sistema de tratamento de águas residuárias em lagoa de decantação anaeróbia e disposição controlada no solo. Os pontos “30-1” e “35-1” estão localizados a 1m de profundidade e a 30 e 35 m do início da rampa.

(EB) na estação de tratamento e o tempo de permanência do mesmo na lagoa de decantação anaeróbia (sete dias), antes da disposição dessa água residuária no solo. As amostras de EB foram coletadas com sete dias de antecedência em relação à coleta de água residuária da rampa, em cada coleta.

Em cada ponto foi coletado um litro de água residuária que foi acondicionado em garrafa de vidro esterilizada e imediatamente armazenado em caixa de isopor com gelo para o transporte até o laboratório. As amostras foram mantidas sob refrigeração por até 24 horas antes de serem processadas. As três coletas foram realizadas em intervalos de uma semana entre elas nos meses de janeiro e fevereiro de 2002.

**Quadro 1:** Coletas e pontos amostrados no sistema.

Coleta	Tempo (dias)	Amostragem											
		Esgoto bruto	Controles do sistema*			Pontos de coleta de água residuária na rampa de disposição controlada (m)							
			EB	T1	T2	LF	0	10	20	30	30 p=1**	35	35 p=1**
C1	0	X											
C2	7	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
C3	14	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
C4	21		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X

EB: esgoto bruto.

T1 e T2: pontos de testemunha, antes da tubulação de aplicação de efluentes.

LF: lençol freático, a 3m de profundidade.

(\*): ABNT, NBR13895 de junho de 1997.

(\*\*): coleta a 1m de profundidade (p).

#### 4. *Concentração das amostras e preparação dos eluatos virais.*

As amostras foram concentradas por filtração, tomando-se o cuidado de iniciar o processo pelas amostras possivelmente menos contaminadas, ou seja, as do lençol freático (LF) e as dos pontos T1 e T2, de maneira que as amostras mais contaminadas, provenientes do início da rampa e do EB fossem as últimas a tomar contato com os filtros. O volume de cada amostra foi medido em proveta de vidro antes e depois da filtração. Este procedimento permite detectar o ponto de saturamento da membrana, o que determina o final da filtração e o desligamento da bomba. O pH das amostras foi medido e ajustado para valores entre 6,0 e 6,5 com solução de HCl 1N, condição necessária para a adsorção das partículas virais na membrana filtrante. Para a filtração, as membranas de pré-filtragem e filtragem foram adicionadas aos filtros, umedecidas com água destilada esterilizada, para ativar a carga da membrana, e o sistema de pressão positiva foi acionado à pressão de 12 kgF/cm<sup>2</sup>, gerada por bomba compressora (Fanen Ltda, modelo CA, Brasil). O processo da filtração iniciou-se pela passagem da amostra de água residuária pelo pré-filtro de microfibras de vidro borossilicato com resina de ligação acrílica AP-20 (Millipore<sup>®</sup>) para retenção de partículas maiores de 8 µm. Em seguida, as partículas virais foram removidas por separação mecânica e adsorção eletrocinética, passando pela membrana celulósica, com alta eletropositividade, atóxica, com poros submicrônicos Zeta Plus 60S (Cuno Latina Ltda) (SCHWARTZBROD, 1995).

A eluição do material aderido à membrana foi realizada com 50 mL de solução de extrato de carne (Beef Extract, Bacto<sup>®</sup>, DIFCO, MD, EUA) a 3% com 0,05M de glicina (Mallinckrodt Baker, Inc., Phillipsburg, USA), pH 9,0, previamente autoclavado a 120 °C por 15 minutos sob pressão de 1 atm. O eluente foi recolhido em béquer esterilizado, mantendo-se o contato por 10 minutos e acrescentando-se imediatamente solução de HCl 1N ao eluato até atingir o pH 7,0. Os eluatos foram armazenados a -20 °C. Ao final da eluição a membrana filtrante e o pré-filtro foram colocados em contato com solução de hipoclorito de sódio a 5% durante 30 minutos para descontaminação e, em seguida, descartados. Um conjunto novo de membrana e pré-filtro foi sempre instalado no filtro de inox para as novas amostras a serem concentradas.

Com o objetivo de retirar-se o excesso de proteínas em suspensão, introduzido pelo eluente (extrato de carne), os eluatos foram descongelados e concentrados por ultracentrifugação a 180.000 x g durante 2 horas a 4 °C, utilizando-se rotor SW41 em ultracentrífuga (Beckman, modelo L8-80 M, Palo Alto, CA, EUA). O sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspendido em 100 µL de solução de salina fosfatada 0,15M, tamponada, pH 7,4.

Para minimizar a presença de possíveis compostos solúveis que poderiam ser citotóxicos ou inibidores das ações enzimáticas da transcriptase reversa e da DNA-polimerase, os eluatos foram misturados em microtubos com Vertrel<sup>®</sup> X.F (1,1,1,2,3,4,4,5,5,5-decafluorpentano-HFC-43 10MEE a 100% p.p. (DuPont De Nemours & CO, Wilmington, EUA) em partes iguais. Em seguida os tubos foram agitados em vórtex por 5 minutos e centrifugados por 10 minutos a 12.000 x g a 4 °C (Eppendorf, modelo 5402) (MEHNERT *et al.*, 1997, QUEIROZ *et al.*, 2000). Durante todo o procedimento o material em preparação ficou em contato com banho de gelo. Os sobrenadantes contendo as partículas virais foram coletados, com o cuidado de não se pipetar a interface, e esse material foi denominado de eluato viral, que foi estocado a -20 °C.

## 5. *Detecção de adenovírus.*

Foi utilizada a reação em cadeia da polimerase, como descrito por ALLARD *et al.* (1990) e por ALLARD, ALBINSSON e WADELL (1992), com modificações (SANTOS *et al.*, 2000).

A extração do DNA dos eluatos foi realizada com TRIzol® LS Reagent (Invitrogen), seguindo as recomendações do fabricante. Foram pipetados 300µL de eluatos e aos mesmos foram acrescentados 900µL de TriZOL®, etapa essa realizada em capela de fluxo laminar do tipo classe 2A. Cada tubo teve seu conteúdo homogeneizado e deixou-se esta mistura descansando à temperatura ambiente por 5 minutos para, em seguida, acrescentar-se 240µL de clorofórmio (Merck) e agitar vigorosamente por 15 segundos. Após, os tubos foram mantidos à temperatura ambiente por 2 minutos e centrifugados por 15 minutos a 12.000 x g a 4 °C (Eppendorf, modelo 5402). O sobrenadante foi pipetado e armazenado a -20 °C para futuro teste para detecção de adenovírus tomando-se o cuidado de manter a interface intacta.

Para a precipitação do DNA foram acrescentados 360µL de etanol absoluto (Merck) e os tubos foram invertidos, homogeneizados e mantidos à temperatura ambiente por 2 a 3 minutos. Após centrifugação a 2.000 x g durante 5 minutos a 4°C (Eppendorf, modelo 5402) a fase aquosa superior foi removida cuidadosamente e descartada. Para a lavagem do DNA acrescentou-se 1,2 mL de solução alcoólica de citrato de sódio (Merck) 0,1M em etanol (Merck) 10% e manteve-se durante 30 minutos à temperatura ambiente, com agitações periódicas. Os tubos foram centrifugados novamente a 2.000 x g durante 5 minutos a 4 °C (Eppendorf, modelo 5402) e esse procedimento se repetiu por mais duas vezes. Adicionou-se 1,5 mL de etanol (Merck) 75% e manteve-se por 15 minutos à temperatura ambiente, com agitações periódicas. O DNA foi precipitado centrifugando-se os tubos a 2.000 x g durante 5 minutos a 4 °C (Eppendorf, modelo 5402). Os tubos foram secos emborcando-os dentro da capela de fluxo laminar sobre gaze esterilizada, monitorando visualmente o processo por 5 a 10 minutos. O DNA extraído foi solubilizado em 30µL de solução de NaOH 8mM (Mallinckrodt Baker, Inc., Phillipsburg, USA), homogeneizando-se suavemente com a pipeta, e, em seguida, foi armazenado a -20 °C.

A extração de DNA de adenovírus humano tipo 5 (HAd5), obtidos por infecção em culturas de células HEP-2, foi realizada com 40µL de solução de NaOH 8mM, que foi armazenada a -70 °C para uso como controle positivo nos ensaios de PCR. Essa amostra foi gentilmente cedida pela Profa. Dra. Dolores U. Mehnert do Instituto de Biociências da USP/SP. Como controle negativo nessas reações, foi usada água tratada com 10% de dietilpírocarbonato (DEPC, Invitrogen).

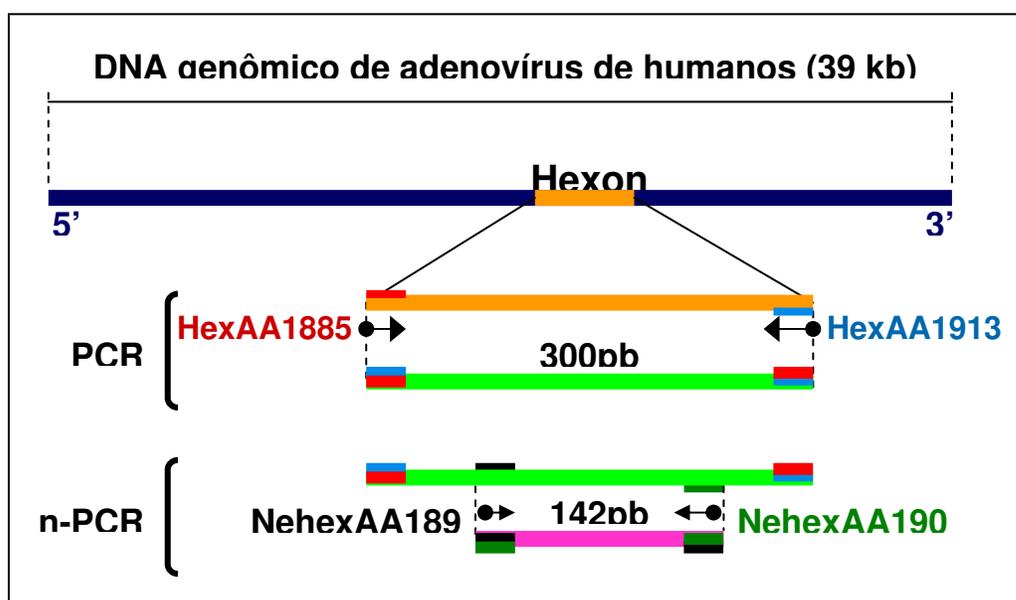
A reação em cadeia da polimerase (PCR) utilizou seqüências de oligonucleotídeos iniciadores sintetizados pela Invitrogen e foi realizada segundo recomendações de ALLARD, ALBINSSON e WADELL (1992). Estes oligonucleotídeos identificam a região conservada que codifica o hexon, comum para todos os subgêneros do gênero Mastadenovírus. A primeira amplificação foi realizada utilizando-se o par de iniciadores hexAA1885 e hexAA1913 (Quadro 2, Figura 3). As reações foram feitas preparando-se uma solução de reagentes (*master mix*) contendo 10 mM de tampão de reação, 200 µM de cada dNTP (dATP, dCTP, dTTP, dGTP), 80nM de cada iniciador, 1nM de MgCl<sub>2</sub>, 2,5 unidades de *Tth*-DNA-polimerase (originária de *Thermus thermophilus*, *Biotools*) (GREEN, LEWIS, 1995). Para um volume final de solução de 50µL, 5µL de DNA extraído foi acrescido. O primeiro ciclo de denaturação foi feito durante 4 minutos a 94°C, seguido de 40 ciclos de 94°C por 1 minuto, 56°C por 1 minuto para o anelamento dos iniciadores e 72°C por 45 segundos para a extensão. Ao final dos ciclos de amplificação, foram programados mais 7 minutos a 72°C para a extensão final das moléculas de DNA amplificadas, seguido de temperatura de resfriamento de 4 °C por tempo indeterminado.

O nested-PCR foi realizado nas mesmas condições, usando-se o par de iniciadores nehexasAA1893 e nehexasAA1905 (Quadro 2, Figura 2) e juntando-se à solução de reação 1 µL de DNA amplificado no PCR.

Os produtos obtidos foram visualizados em gel de agarose a 1,5% em tampão TAE (Tris 40mM, ácido acético 20mM, EDTA 0,5 M, pH 8,0), em cuba de eletroforese horizontal, com corrida eletroforética de 80 minutos sob tensão de 80 volts. O DNA foi impregnado com brometo de etídeo na concentração de 0,5 µg/mL para contrastação sob ação de luz ultravioleta e o gel foi foto-documentado com o equipamento *Image Master* (Pharmacia Biotech).

**Quadro 2:** Oligonucleotídeos iniciadores para amplificação de adenovírus por reação de polimerização em cadeia, segundo ALLARD *et al.*(1991); ALLARD, ALBINSSON e WADELL (1992)

Iniciador	Posição	Seqüência de nucleotídeos (5' – 3')	Sorotipo/ Região viral	Tam(pb)
hexAA1885	18.858–18.883	GCCGCAGTGGTCTTACATGCACATC	Ad2 (hexon)	300 pb
hexAA1913	19.136-19.158	CAGCACGCCGCGGATGTCAAAGT	Ad40 (hexon) Ad41 (hexon)	
nehexAA1893	18.937–18.960	CCACCGAGACGTACTTCAGCCTG	Ad2 (hexon)	
nehexAA1905	19.051-19.079	TGTACGAGTACGCGGTATCCTCGCGGTC		



**Figura 2.** Representação esquemática das reações de PCR e n-PCR a partir da seqüência de nucleotídeos da região codificadora do hexon no genoma dos adenovírus de humanos. Fonte: ALLARD, ALBINSSON e WADELL (1992) (com modificações).

#### 6. *Ensaios de infectividade viral em linhagem HEp-2.*

Células de linhagem de carcinoma de laringe humana (HEp-2) foram cultivadas em placas de 24 concavidades com meio Eagle-MEM contendo 10% de soro fetal bovino, penicilina (100 UI/ml), estreptomicina (100 µg/ml) e deoxicolato de anfotericina B (Fungizona®, 2,5 µg/ml). As culturas foram incubadas em estufa de CO<sub>2</sub> (5%) a 37°C durante 48 horas para a formação de monocamada semi confluenta. Cada eluato viral,

obtido conforme descrito no item 3, foi filtrado em membrana de 0,45 µm (Millex, Millipore®) e testado em quadruplicata em volumes de 50 µl. Após uma hora a 37 °C com agitação periódica para a adsorção viral, o inóculo foi descartado e a cada concavidade acrescentou-se 1,0 ml de meio Eagle-MEm sem soro fetal bovino. As placas foram incubadas a 37 °C, com 5% de CO<sub>2</sub>, durante 5 dias, sem troca do meio.

Como controle positivo fez-se a inoculação de 50 µl de HAdV-5 e como controle negativo manteve-se concavidades apenas com meio de cultura. O monitoramento do efeito citopático (ECP) foi feito com leituras de 24, 48, 72, 96 e 120 horas. Foram feitas até cinco passagens cegas para cada amostra, e de cada uma delas foi feita a extração de DNA para os testes de PCR. As passagens só paravam antes da 5ª se apresentavam ECP característico da infecção de HEp-2 pelos adenovírus, e com teste positivo em PCR e *nested*-PCR. Os volumes dos testes para cada amostra foram coletados, agrupados em um *pool*, congelados e descongelados três vezes para posterior extração do DNA viral. Cada *pool* foi novamente inoculado nas mesmas condições, nas passagens subsequentes.

Nesses testes foram escolhidos eluatos de pontos estratégicos do sistema, como o EB, o ponto de entrada do EB, ou seja, a 0m e na saída (40m) da rampa e a 30-1 (a 30m de distância do ponto de aplicação na rampa e a 1m de profundidade).

## ***7. Detecção de rotavírus.***

Para a detecção de rotavírus da espécie A (RV-A) foram realizados os testes de RT-PCR, seguindo as orientações de GOUVEA *et al.* (1990, 1991), e no *nested*-PCR foram detectados os genótipos G1, G2, G3 e G4 (QUEIROZ *et al.*, 2001) dada sua alta frequência no hospedeiro humano.

Primeiramente, para a extração do RNA dupla-fita viral foram pipetados 300µl de eluato aos quais se acrescentou 900µl de Trizol® LS Reagent (Invitrogen). Esse conteúdo foi homogeneizado e posteriormente mantido à temperatura ambiente por 5 minutos. Seguiu-se a adição de 240µl de clorofórmio, agitação manual vigorosa por 15 segundos e incubação à temperatura ambiente por 2 minutos. A suspensão foi centrifugada a 12.000 x g por 15 minutos a 4 °C (Eppendorf, modelo 5402), sendo a fase aquosa (superior) transferida para outro tubo. A precipitação do dsRNA viral foi feita com 700µl de álcool

isopropílico (Merck) e subsequente incubação à temperatura ambiente por 10 minutos. Em seguida, centrifugou-se a 12.000 x g por 5 minutos à temperatura ambiente (rotor FA-MICRO 2.0/1.5 ml, centrífuga Sorvall MC12) e o sobrenadante foi removido de maneira a não tocar as paredes ou o fundo do tubo. Foram adicionados, então, 900µl de solução de etanol gelado a 75% (Merck) e a suspensão submetida a agitação em vortex por um minuto. Seguiu-se centrifugação a 9.700 x g por 5 minutos à temperatura ambiente (rotor FA-MICRO 2.0/1.5 ml, centrífuga Sorvall MC12), sendo o sobrenadante retirado cuidadosamente com pipeta sem tocar as paredes e fundo do tubo, que foi então emborcado sobre gaze esterilizada, em fluxo laminar, para secagem durante 10 minutos. O RNA total precipitado foi ressuspenso em 30µl de H<sub>2</sub>O deionizada esterilizada tratada com 10% de DEPC (Invitrogen), incubado a 56 °C em banho-maria por 15 minutos e estocado a -20 °C.

Para o teste da presença de rotavírus foi realizada a reação de transcrição reversa do RNA dupla-fita viral em DNA complementar (cDNA), obtendo-se, no final da reação, o produto híbrido RNA viral-cDNA. Este produto foi submetido à PCR e os produtos obtidos (*amplicons*) foram novamente submetidos à mesma reação em teste de *nested*-PCR, usando-se iniciadores internos aos *amplicons* usados como molde (Quadro 3).

A reação de transcrição reversa (RT) foi iniciada adicionando-se a 5µl do RNA total extraído 3µl de dimetilsulfóxido (DMSO). Em seguida essa solução foi submetida à temperatura de 99 °C por 5 minutos em termociclador (Perkin Elmer Gene Amp. PCR System 9600) para denaturação do RNA dupla-fita viral. Imediatamente os tubos de reação foram transferidos para banho de gelo. Para a reação de transcrição reversa e síntese de cDNA, a partir do dsRNA extraído e denaturado, acrescentou-se solução de reação contendo tampão com 50mM de Tris-HCl (pH8,3), 7mM de KCl e 3mM de MgCl<sub>2</sub> (5x First Strand, diluído para uso, Invitrogen), dNTP 500µM (Invitrogen), DTT 10nM (Invitrogen), iniciadores consenso End-9 e Beg-9, ambos na concentração de 500nM para genotipagem G (Quadro 2, Figura 3). Foram adicionadas 200U da enzima transcriptase reversa de Moloney Murine Leukemia Virus MMLV-RT (Invitrogen) por tubo de reação, resultando na concentração de 4U/µl de enzima. O volume final da reação, 25 µl, foi atingido com H<sub>2</sub>O DEPC (Invitrogen). A síntese de cDNA ocorreu a 37 °C por 1 hora, seguida da denaturação da transcriptase reversa a 95 °C por 2 minutos e banho de gelo imediatamente após.

Os controles positivos para as reações foram as amostras de rotavírus Wa (genotipo G1), ST3 (genotipo G4), DS1 (genotipo G2) e SA11 (genotipo G3), gentilmente cedidas pela Profa. Dra. Vera Gouvêa, da Universidade Federal do Rio de Janeiro. Como controle negativo foi utilizada água desmineralizada tratada com dietilpirocarbonato (DEPC) a 10%. Os produtos de amplificação esperados, com seus respectivos pesos moleculares estão dispostos no Quadro 3.

**Quadro 3.** Oligonucleotídeos iniciadores para a detecção de rotavírus em testes de semi-nested- RT-PCR, segundo GOUVEA *et al.* (1990, 1991).

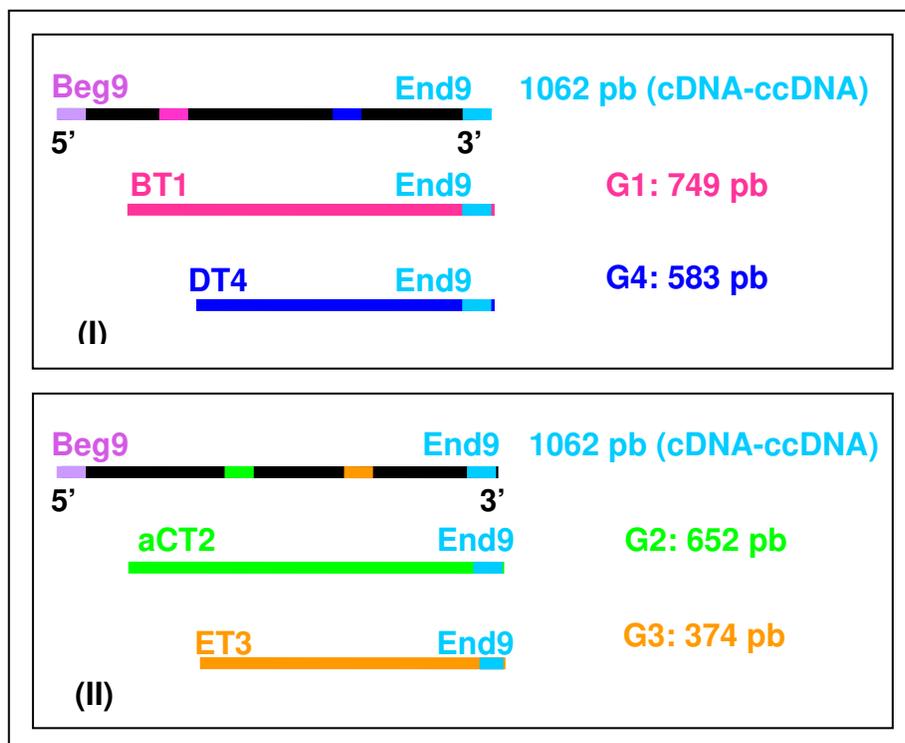
Iniciador	Posição	Seqüência de nucleotídeos (5' – 3')	Genotipo	Tamanho
Beg9	1-28	GGCTTTAAAAGAGAGAATTTCCGTCTGG	Consenso	1062 pb
End9	1062-036	GGTCACATCATAACAATTCTAATCTAAG	Consenso	1062 pb
aBT1	314-335	CAA GTA CTC AAA TCA ATG ATG G	G1	749 pb
aCT2	411-435	CAATGATATTAACACATTTTCTGTG	G2	652 pb
aET3	689-709	CGT TTG AAG AAG TTG CAA CAG	G3	374 pb
aDT4	480-498	CGTTTCTGGTGAGGAGTTG	G4	583 pb

A amplificação do cDNA referente à VP7 envolveu o preparo de nova mistura de reagentes em H<sub>2</sub>O DEPC, contendo 20 mM de Tris-HCl (pH8,4), 50 mM de KCl (Invitrogen), 2mM de MgCl<sub>2</sub> (Invitrogen), 200 µM de cada dNTP (dATP, dCTP, dTTP, dGTP) (Invitrogen), 200nM de cada iniciador End-9/Beg-9, Taq DNA polimerase 2,5U (Invitrogen). Para um volume final de solução de 50µL, 5µL de DNA extraído foi acrescido. Os ciclos e temperaturas de amplificação foram: denaturação a 95 °C por 5 minutos, seguida de 30 ciclos de 94 °C por 1 minuto, 53 °C por 2 minutos para o anelamento dos iniciadores, 72 °C por 1 minuto, extensão do amplificado a 72 °C por 7 minutos e incubação a 4 °C (Perkin Elmer Gene Amp. PCR System 9600).

Para a segunda amplificação ou semi-nested PCR, uma alíquota de 48 µl de *mix* de nested-PCR, nas mesmas condições da solução de PCR, porém com iniciadores diferentes, foi adicionada a 2 µL do produto da primeira amplificação, sendo a reação conduzida com os mesmos ciclos de amplificação e condições de temperatura acima citadas. O diferencial

do *nested*-PCR é o conjunto de iniciadores adicionados, quando se manteve o iniciador End-9 e foram acrescentados os iniciadores aBT1, aCT2, aET3 e aDT4 (Quadro 2, Figura 4), todos na concentração de 200nM.

Os resultados das extrações foram observados após corrida eletroforética em gel de agarose a 1,5%, submetido a 100 volts por 1h10min, com impregnação com solução de brometo de etídeo (5µg/ml). A presença de bandas foi visualizada por exposição à luz U.V.



**Figura 3.** Representação esquemática da reação de duplo-semi-*nested* PCR para identificação dos genótipos (I) G1 e G4, (II) G2 e G3 de rotavírus A para o gene que codifica a proteína VP7. Fonte:QUEIROZ *et al.*, 2001, com modificações.

### III. RESULTADOS.

Neste estudo da lagoa de decantação anaeróbia, o volume de 1L de esgoto bruto e de águas residuárias provenientes do sistema de disposição controlada no solo mostrou-se suficiente para atender à sensibilidade dos testes empregados para a detecção de HAdV e

rotavírus. Também o procedimento para a obtenção dos eluatos contendo partículas virais concentradas mostrou-se adequado.

O pH das amostras de água residuária variou entre 6,0 e 6,5, não sendo, portanto, necessária sua correção.

Os resultados dos testes de PCR e *nested*-PCR para HAdV estão apresentados na Tabela 1 e no Quadro 5. As amostras PCR positivas para adenovírus foram 80% do total de amostras analisadas (29/35).

Na primeira coleta (C1) apenas o esgoto bruto (EB) foi analisado, apresentando-se positivo para HAdV.

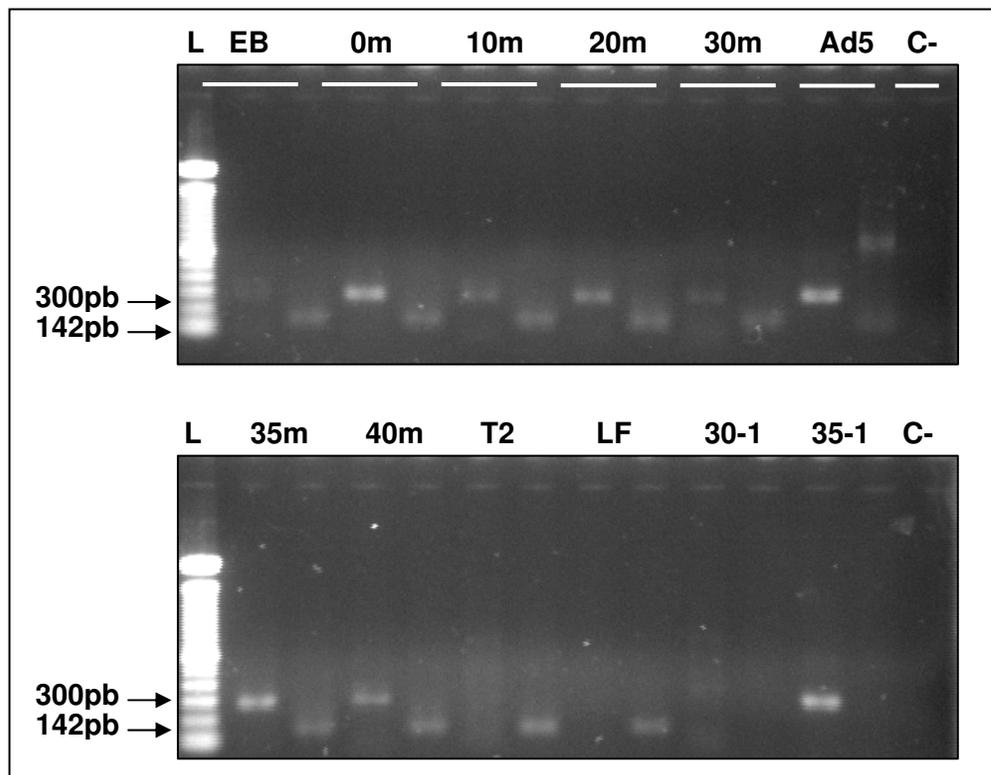
Na coleta C2, sete dias após a C1, todos os pontos do sistema foram coletados e apenas nos pontos T1 e LF não foi identificado HAdV. Na C3, mais uma vez nos pontos T1 e LF as reações de PCR e *nested*-PCR para HAdV foram negativas, mas na C4, LF e T2, esse mais próximo da entrada da rampa, já estavam com HAdV detectáveis (Figura 4). O resultado positivo para HAdV no LF sugere pela percolação do vírus no solo, possivelmente a partir da entrada do efluente na rampa. Os resultados positivos para HAdV nos pontos 30-1m e 35-1m também indicam pela percolação do vírus.

Ao longo da rampa, em todas as coletas, e em todos os pontos, detectou-se HAdV. Nos pontos de profundidade foram detectados HAdV em pelo menos uma das coletas, com exceção do ponto T1, distante a 2m do ponto de aplicação, o que sugere que a lagoa de decantação anaeróbia, associada à disposição controlada na rampa com a cobertura vegetal de *Cynodon* sp., não foi eficiente para remover as partículas de HAdV presentes na água residuária (Tabela 1, Quadro 4).

Quanto à sensibilidade dos testes de PCR e *nested*-PCR para detecção de HAdV, os resultados estão descritos a seguir. Na coleta C2, para os pontos positivos para HAdV (Quadro 5), os dois testes resultaram nos amplificadores esperados, com exceção do ponto T1, onde apenas o *nested*-PCR foi positivo. Esses resultados sugerem que, nesse ponto, a concentração de partículas virais seria pequena ou não detectável pelos métodos empregados, o que era esperado, comparativamente aos outros pontos que recebem diretamente a descarga do efluente.

Na coleta C3 os resultados foram mais heterogêneos, quando comparados com aqueles obtidos na C2. No próprio EB a PCR foi negativa e a *nested*-PCR foi positiva.

Esse resultado se repetiu nos pontos LF, 30-1m e 40m. Para EB sugere-se que a não positividade na PCR possa ser decorrente da presença de inibidores da reação. Para os dois outros pontos o número de partículas virais esperado seria pequeno. Para todos os pontos de



**Figura 4.** Gel de agarose para detecção de adenovírus humano por PCR e *nested*-PCR em amostras de água de esgoto bruto (EB) da coleta 3 e de diferentes pontos da rampa, na coleta 4. Padrão de peso molecular: marcador de DNA de 100 pb (L).

coleta da superfície os dois testes foram positivos, sugerindo que o escoamento superficial permitiu que quantidades detectáveis de HAdV continuassem presentes. Esses dados foram confirmados na C4, onde até 40m HAdV foram detectados, mas em 30m a PCR foi negativa. Com esses resultados, pode-se afirmar que das 35 amostras analisadas nos dois testes, independente da coleta e do ponto amostrado, 20 foram positivas nos dois ensaios, duas foram somente PCR positivas e oito foram apenas *nested*-PCR positivas. Em quatro amostras, LF da C2, T1 e T2 da C3 e 35-1m da C3 os dois testes foram negativos e uma única amostra foi não conclusiva.

O fato da maioria das amostras ter sido positiva para o PCR indica pela sensibilidade do método, mas também que o sistema de tratamento não diminui a quantidade de partículas virais para além da sensibilidade do método.

Para verificar se os HAdV presentes no sistema mantinham a infectividade, alguns pontos de coleta foram eleitos para terem seus eluatos aplicados em células da linhagem HEp-2, susceptíveis à infecção por esses vírus. Os resultados desses testes de infectividade estão demonstrados na Tabela 2. A amostra de EB, coletada em C1, apesar de não deixar evidente o ECP característico de HAdV até a 5ª passagem, quando testado em PCR e *nested*-PCR evidenciou a presença do DNA viral. A presença de HAdV infecciosos em EB foi confirmada na C2, porém em C3 os testes foram negativos, mesmo após quatro passagens em células. Na C2, os pontos amostrados foram 0m, 30-1m, 35-1m e 40m, além do EB. Somente nos pontos 0m e EB detectou-se HAdV infecciosos, o que poderia sugerir que, apesar do sistema não ser eficiente para a retenção de partículas virais, poderia levar a alterações que as tornasse não mais capazes de infectar suas células alvo. No entanto, quando da C3, apesar do EB ter resultados negativos para HAdV, os pontos 35m e 40m mostraram-se positivos tanto para o ECP característico desses vírus, como para os testes moleculares. Quando da C4, para o ponto 0m os dois testes foram positivos, porém a 35m não foi possível detectar a presença do HAdV infecciosos, o mesmo ocorrendo para o ponto de profundidade 30-1m. Esses resultados sugerem que a lagoa de decantação, com o sistema anaeróbio, não foi eficiente para levar HAdV a perderem sua infectividade. Porém, é possível afirmar que a percolação pelo solo induz à perda de infectividade, apesar do pequeno número de testes realizados para verificar se essa característica se mantinha naquelas partículas virais percoladas. O que pode ser observado é que nas duas amostras em teste (30-1m e LF), nenhuma delas mostrou-se infecciosa (Figura 5).

Do total de 14 amostras testadas em linhagem celular HEp-2, 13 delas eram positivas para HAdV e uma negativa nos testes moleculares. Após a infecção, apenas sete delas foram positivas para HAdV nos mesmos testes, demonstrando que os ensaios em cultura celular não podem ser o único parâmetro para avaliar o sistema. Das oito amostras com ECP característico de HAdV, duas foram negativas nos testes moleculares, demonstrando que ensaios com base apenas no efeito citopático não são confiáveis, pois geram resultados falso positivos. Por outro lado, uma amostra de LF, PCR e *nested*-PCR

negativos, manteve-se negativa nos mesmos testes após o cultivo, validando os resultados negativos anteriores.

**Tabela 1:** Resultados de PCR e *nested*-PCR para adenovírus em amostras de esgoto bruto e água residuária processadas, coletadas em diferentes pontos após a passagem por rampa de disposição controlada no solo, durante período de 21 dias, na Estação de Tratamento de Esgoto (ETE) do bairro Graminha, município de Limeira, SP, Brasil.

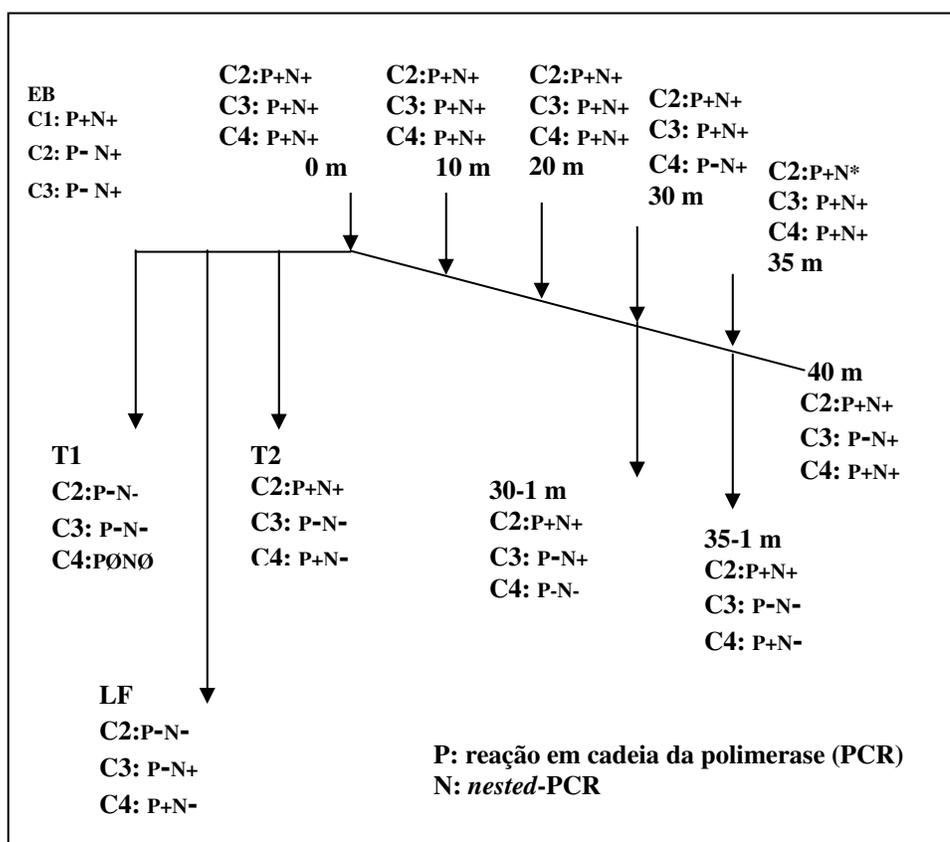
Sítio	Distância da aplicação (m)	Profundidade (m)	Presença de adenovírus detectado por PCR e <i>nested</i> -PCR em amostras de água residuária coletadas a cada 7 dias.			
			C1	C2	C3	C4
			t=0 T.A.=28°C	t=7 T.A.=34°C	t=14 T.A.=30°C	t=21 T.A.=36°C
Esgoto bruto (EB)		0	+	+	+	
Testemunha (T1)	-2,0	1		-	-	S*
Testemunha (T2)	-0,5	1		+	-	+
Lençol freático (LF)	-1,5	3		-	-	-
	0	0		+	+	+
	10	0		+	+	+
	20	0		+	+	+
Rampa	30	0		+	+	+
	30-1	1		+	+	-
	35	0		+	+	+
	35-1	1		+	-	+
	40	0		+	+	+
<b>Total</b>			1/1	10/12	8/12	8/10

C1 a C4: coleta 1 a 4; t: dia de coleta; T.A.: temperatura ambiente; S\*: amostra não coletada porque o coletor estava sem água.

As amostras de EB só apresentaram resultado positivo no *nested*-PCR, indicando duas possibilidades: a baixa concentração de partículas virais na entrada da estação de tratamento, ou a presença de compostos inibidores da PCR, apesar do processo de limpeza com Vertrel<sup>®</sup> XF. Por outro lado, as amostras do ponto 0 m, além de apresentarem PCR positivo, tinham a intensidade da banda de DNA muito maior do que as amostras de EB, que chegaram à estação de tratamento sete dias antes. Na C2 desde a amostra de EB,

passando pelas amostras dos pontos 0 m e 30 m, até o ponto de coleta do efluente da rampa, todas foram positivas para adenovírus em células HEp2 (Tabela 2).

**Quadro 4:** Resultados dos testes de PCR e *nested*-PCR para detecção de HAdV no sistema de tratamento de águas residuárias em lagoa de decantação anaeróbia e disposição controlada no solo, no período de 21 dias.



HAdV: adenovírus de humanos; EB: esgoto bruto; C1 a C4: coletas 1 a 4; T1: coletor do ponto de testemunha 1; T2: coletor de ponto de testemunha 2; LF: coletor do lençol freático; Ø: ausência de amostra.

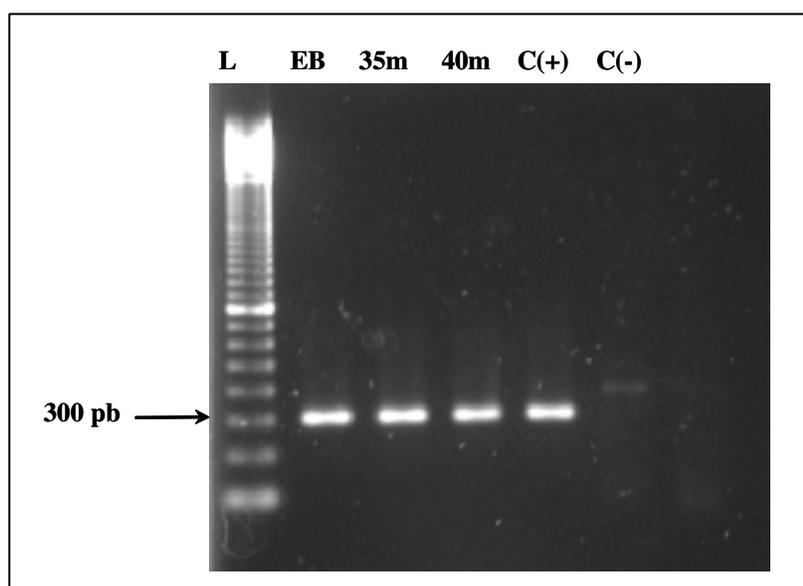
Em infecções em HEp2 foram detectados adenovírus infectivos no EB da C1 e nos pontos 35 m e 40 m da C2 (Figura 5), porém o mesmo não ocorreu com os eluatos coletados a 1 metro de profundidade.

Os resultados dos testes de RT-PCR e duplo-semi-*nested*-PCR para rotavírus estão apresentados no Quadro 5. Todos os 35 eluatos obtidos foram testados para rotavírus e

apenas um deles, EB da C3, foi positivo, evidenciando a presença de mistura de genótipos G1 (Figura 6) e G2 (Figura 7).

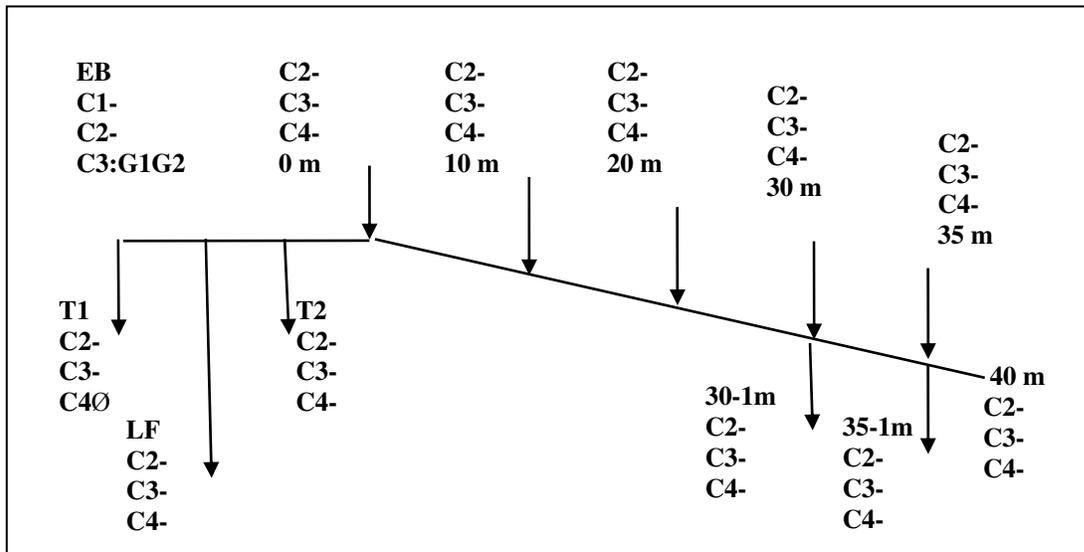
**Tabela 2.** Detecção de adenovírus por n-PCR em sobrenadante de cultivos na linhagem HEp-2 infectados por eluatos de diferentes pontos do sistema. (\* Efeito Citopático \*\* Efeito citopático não característico de adenovírus).

Coleta	Período (dias)	Pontos de coleta	Eluato (n-PCR)	ECP*/n-PCR	Nº da passagem
C1	0	EB	+	-/+	5
C2	7	LF3	-	+/-	5
		0m	+	+/+	5
		30-1m	+	-/-	5
		35-1m	+	+/-	4
		40m	+	-/-	3
		EB	+	+/+	4
C3	14	0m	+	+/+	4
		35m	+	+/+	4
		40m	+	+/+	4
		EB	+	-/-	4
C4	21	0m	+	+/+	4
		30-1m**	-	-/-	4
		35m	+	-/-	4

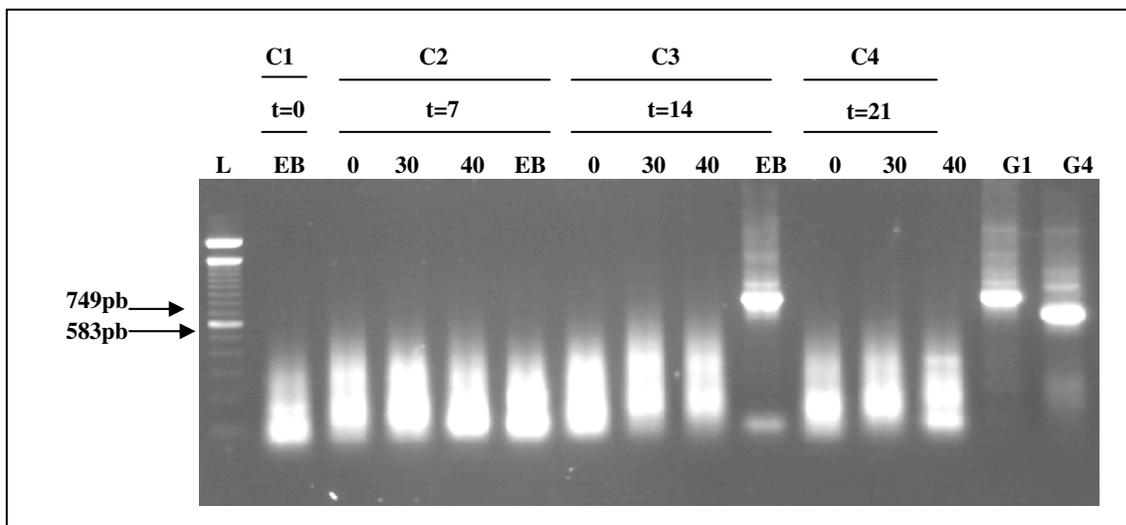


**Figura 5.** Gel de agarose para detecção de adenovírus humano por PCR em lisados de células HEp2 infectadas com amostras de esgoto bruto (EB) da coleta 1 e após passagem pela rampa de disposição controlada da coleta 2. L: padrão de peso molecular de DNA de 100pb; C(+): controle positivo de HAdV-5; C(-): água desmineralizada tratada com 10% de DEPC.

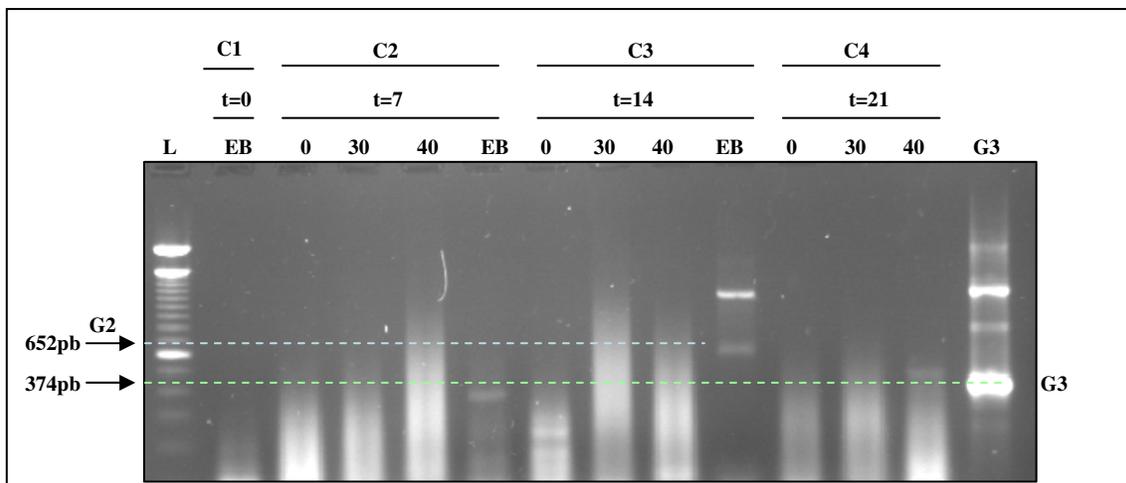
**Quadro 5:** Resultados dos testes de RT-PCR e duplo-semi-nested-PCR.PCR para detecção de rotavírus no sistema de tratamento de águas residuárias em lagoa de decantação anaeróbia e disposição controlada no solo, no período de 21 dias.



EB: esgoto bruto; C1 a C4: coletas 1 a 4; G1: RV-A genotipo 1; G2: RV-A genotipo 2; T1: coletor do ponto de testemunha 1; T2: coletor de ponto de testemunha 2; LF: coletor do lençol freático.



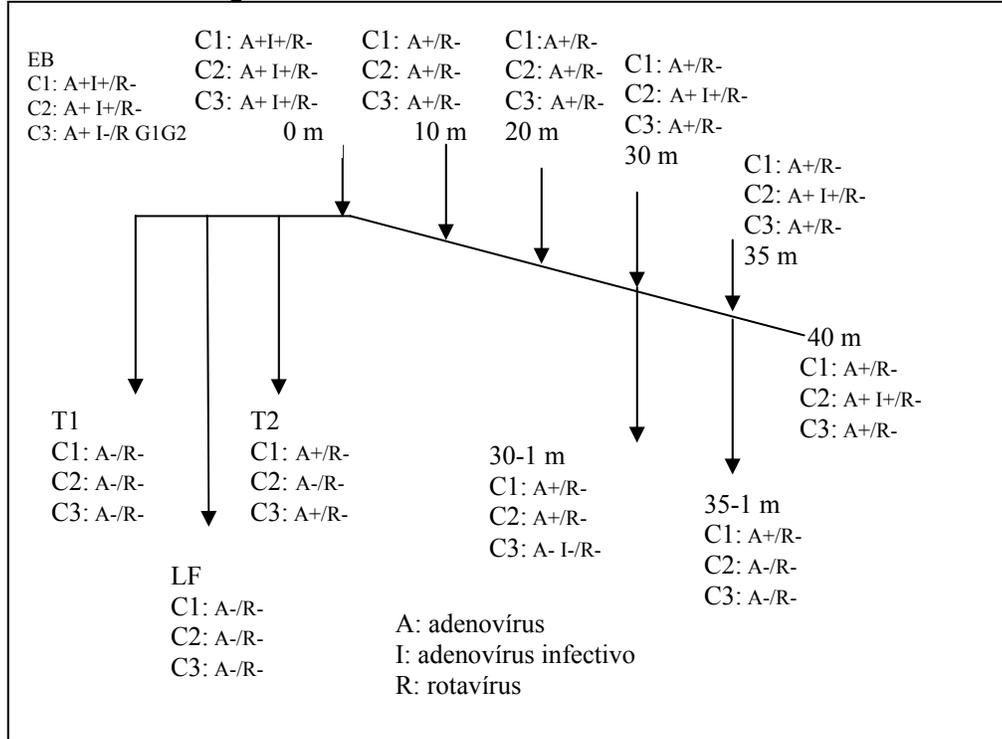
**Figura 6.** Gel de agarose para detecção de rotavírus genotipos G1 e G4 em eluatos de água residuária. L: padrão de peso molecular de DNA de 100 pb. G1: amostra de RV-A Wa; G4: amostra de RV-A ST3. C1 a C4: coletas 1 a 4; t: dia de coleta: pb: pares de base de nucleotídeos.



**Figura 7.** Gel de agarose para detecção de rotavírus A genotipos G2 e G3 em eluatos de água residuária. L: padrão de peso molecular de DNA de 100 pb. G3: amostra de RV-A SA-11 padrão. C1 a C4: coletas 1 a 4; t: dia de coleta; pb: pares de base de nucleotídeos.

Os resultados de todos os testes realizados para detecção de adenovírus e rotavírus nos eluatos virais, relacionando-os com os pontos de coleta estão sumarizados no Quadro 6.

**Quadro 6:** Resultados para adenovírus e rotavírus no sistema de tratamento de águas residuárias em lagoa de decantação anaeróbia e disposição controlada no solo, no período de 21 dias na Estação de Tratamento de Esgoto (ETE) do bairro Graminha, município de Limeira – SP, Brasil, administrada pela Concessionária Águas de Limeira S.A.



EB: esgoto bruto; C1 a C4: coletas 1 a 4; G1: RV-A genotipo 1; G2: RV-A genotipo 2; T1: coletor do ponto de testemunha 1; T2: coletor de ponto de testemunha 2; LF: coletor do lençol freático.

#### IV- DISCUSSÃO.

O objetivo desse trabalho foi analisar no sistema de tratamento de águas residuárias em lagoa de decantação anaeróbia e disposição controlada no solo da Estação de Tratamento de Esgoto (ETE) do bairro Graminha, município de Limeira–SP, Brasil, administrada pela Concessionária Águas de Limeira S.A, qual seria sua eficiência na remoção e ou inativação de adenovírus humanos (HAdV) e rotavírus da espécie A (RV-A), permitindo assim o reuso de águas residuárias, advindas do sistema, para a irrigação.

Sabe-se que o tratamento de esgotos em lagoas anaeróbias, seguida de escoamento superficial dos efluentes no solo são sistemas que vêm sendo estudados por combinarem ações

de baixo custo, com demanda de mão de obra pouco qualificada, que poderiam ser alternativas para se alcançar níveis de tratamento compatíveis com a legislação dos estados do país (CHERNICHARO *et al.*, 2001).

Duas preocupações, porém, ainda são colocadas: 1. quais seriam os vírus a serem pesquisados nos efluentes do sistema que serviriam como bons indicadores da contaminação persistente, e 2. até que ponto a disposição contínua desses efluentes no solo permitiria, por percolação, a contaminação do lençol freático (SCANDURA, SOBSEY, 1997). Alguns trabalhos já demonstraram que o solo pode funcionar como um filtro na remoção de partículas virais (GOYAL, GERBA, 1979; GERBA *et al.*, 1981; SCHIJVEN, HASSANIZADEH, 2000; SANTAMARÍA, TORANZOS, 2003). Porém, no método de disposição controlada ou escoamento superficial, ainda não há dados conclusivos que confirmem sua eficiência para a remoção e/ou inativação de vírions presentes em esgoto, que recebem fezes de humanos. Apesar de serem muitos os vírus com capacidade replicativa no intestino de humanos, alguns deles, como os RV-A e os HAdV, particularmente dos sorotipos 40 e 41, estão entre os principais agentes etiológicos dos casos de gastroenterite e diarreia aguda em crianças (ENRIQUEZ, HURST, GERBA., 1995). Uma das formas de transmissão desses vírus é a via fecal-oral, portanto, a ingestão de água e alimentos contaminados por esses agentes, pode levar a quadros de diarreia, principalmente em crianças onde complicações podem levar a febre, vômitos e desidratação (HORWITZ, 1996).

Embora esses vírus tenham potencial patogênico, muitos deles, nas concentrações encontradas em amostras do ambiente, em geral baixas, não são capazes de causar infecções em seus hospedeiros, também pelo fato de não serem infecciosos (METCALF, MELNICK, ESTES, 1995). O número baixo de partículas virais, demanda pela utilização de testes de detecção com alta sensibilidade e especificidade. Com a aplicação de métodos moleculares com essas características, a partir da década de 1990, para a detecção de partículas virais em amostras de ambiente, dois outros problemas se apresentaram: como recuperar e/ou concentrar e/ou purificar os vírus dessas amostras e como evitar e/ou eliminar inibidores das reações envolvendo as enzimas transcriptase reversa e DNA polimerase. Assim, o volume de amostra a ser coletado torna-se um fator determinante para se alcançar êxito no trabalho. As recomendações para o volume de água residuária a ser amostrado para pesquisa de

contaminação viral apresentam grandes variações, sempre combinadas com o tipo de membrana a ser usada na filtração. SCHWARTZBROD (1995) recomenda que se utilize de 1 a 20L de esgoto tratado, e um volume maior que 1L para esgoto não tratado, desde que combinado com a passagem pela membrana de pré-filtro AP25 (Millipore) de 8µm de diâmetro. POWELL *et al.* (2003) necessitaram de apenas 10 litros para detectar enterovírus, norovírus, vírus Coxsackie tipo 4 e colifagos em águas de aquífero freático. MEHNERT e STEWIEN (1993) utilizaram oito litros de água de esgoto bruto e de córregos da cidade de São Paulo e neles identificaram rotavírus em 20% das amostras de água de esgoto e em 34 % das amostras de córregos. QUEIROZ *et al.* (2001) detectaram rotavírus dos genótipos G1 a G4 em amostras de esgoto bruto e água de córregos a partir de alíquotas de 4 litros.

Nesse trabalho, a partir de 1L de esgoto e 1L de água residuária, coletados nos diferentes pontos da superfície em estudo e em profundidade, incluindo-se aí amostras do lençol freático, foram detectados HAdV em pelo menos 29 das 35 amostras coletadas sugerindo que o volume utilizado, seguido dos procedimentos para limpeza e concentração, associado ainda à metodologia empregada para a detecção viral, foi adequado. O método por nós empregado para a concentração do material foi o sugerido por SCHWARTZBROD (1995), com utilização do pré-filtro de microfibras de vidro borossilicato com resina de ligação acrílica AP-20 (Millipore®) e membrana celulósica, com alta eletropositividade, Zeta Plus 60S (Cuno Latina Ltda). Após a eluição com extrato de carne e ultracentrifugação, o precipitado foi ressuspensão para diferentes concentrações finais.

A concentração recomendada para eluatos virais obtidos a partir de água residuária é de 8.000 vezes (MEHNERT, D.U., comunicação pessoal). Nesse trabalho, os precipitados foram ressuspensos de maneira que os eluatos ficaram, ao final, entre 5.000 e 1.000 vezes concentrados, em função das características do precipitado que, em muitas amostras, foi de difícil ressuspensão. A comparação entre o volume inicial das amostras de água residuária ou esgoto bruto coletadas, o volume do eluato viral concentrado, com os resultados de PCR e *nested*-PCR para HAdV, mais uma vez confirmam pela sensibilidade dos testes realizados, pois puderam detectar o DNA viral quando em concentrações das amostras menores do que aquelas recomendadas. O elevado percentual de amostras positivas indicou pela não presença de inibidores da PCR, validando, assim, os resultados negativos.

Esses resultados demonstram ainda que a utilização do Vertrel<sup>®</sup> X.F pode ter eliminado de maneira eficiente possíveis inibidores das ações enzimáticas da transcriptase reversa e da DNA-polimerase.

O pequeno tamanho da rampa de escoamento superficial, ou seja 40m, associado à alta taxa de aplicação de efluente utilizada, impediram a infiltração e o dessecamento das partículas no solo, de maneira que a disposição na rampa mostrou-se ineficiente para a remoção dos adenovírus, como foi possível constatar nos resultados obtidos para as amostras coletadas na superfície da rampa (24/24).

HAdV foram detectados também nos pontos em profundidade T1, T2 e LF, como para 30-1m e 35-1m, que são aqueles sem contato direto com a água residuária, em pelo menos uma das coletas, mostrando que o processo de filtração do solo franco argiloso-arenoso (SILVA, 2003) não foi efetivo.

Os resultados dos testes dos eluatos para a presença dos HAdV permitem algumas considerações com relação à migração das partículas virais. Os resultados do testes do LF mostram que está havendo percolação das partículas até a profundidade de três metros, fato evidenciado na coleta 4 (Tabela 1), contaminando o lençol freático. Podemos concluir também que as partículas dos adenovírus estão migrando a partir da infiltração da água residuária aplicada sobre a rampa, uma vez que a lagoa de decantação anaeróbia tem toda sua área impermeabilizada quanto ao contato com o solo, impedindo a infiltração e percolação de água residuária para a área localizada abaixo dela.

A detecção de vírus no ponto de testemunha T2 indica que as partículas virais estão infiltrando e percolando no solo a partir do ponto de aplicação do efluente na rampa (0 m), atingindo a distância de 0,5 m e a profundidade de 1m anteriores a esse. GERBA e BITTON (1984), relataram a percolação de poliovírus, echivírus e Coxsackievírus até a profundidade de 16,8 m e a uma distância lateral maior do que 250 metros. DE SERRES *et al.* (1999) relataram a detecção do vírus da hepatite A nas profundidades de 1.000 e 1.600 metros em solo calcáreo.

Para a detecção de HAdV duas técnicas foram utilizadas: a PCR e a *nested*-PCR, ambas direcionadas para a região mais conservada do hexon dos HAdV (ALLARD *et al.*, 1990). De maneira geral, esses testes foram de fácil implantação. Essa escolha permite, no entanto, que todos os HAdV sejam identificados, independentemente de serem pertencentes ao subgênero F. A utilização do *nested*-PCR confirma a especificidade da PCR para HAdV, já

que os iniciadores nele utilizados são internos ao hexon desses vírus (ALLARD *et al.*, 1990; ALLARD, ALBINSSON, WADELL, 1992). No entanto, a observação dos géis de agarose na detecção de HAdV sugere por melhores resultados na PCR que na *nested*-PCR, pois os amplificados na primeira reação ficaram mais evidentes, sugerindo por maior concentração. Esse resultado não era o esperado, já que a sensibilidade do teste é dependente da primeira reação e a segunda faria a sua amplificação. Uma hipótese para esse resultado seria o número de ciclos para a amplificação, que para a PCR foi de 40 e no *nested*-PCR, 25. Testes subsequentes que pudessem confirmar essa afirmação não foram, porém, realizados.

No Quadro 5 estão os resultados para RV-A. Esses vírus foram detectados apenas em uma amostra de EB da coleta 3, sendo genotipados como G1 (Figura 6) e G2 (Figura 7), utilizando-se o protocolo de QUEIROZ *et al.*, (2001), que investiga apenas os genótipos G1, G2, G3 e G4, que são aqueles mais comuns em hospedeiros humanos (LINHARES, 2000). As reações de RT-PCR e de duplo-semi-*nested*-PCR foram de difícil implantação e ajuste, dado ao seu caráter multifatorial.

Os resultados negativos encontrados em todos os pontos de aplicação e escoamento superficial do efluente da lagoa de decantação anaeróbia, inclusive a 1m de profundidade e na saída da rampa, poderiam ter diferentes explicações. Uma delas seria decorrente do próprio teste, uma vez que, apesar de sua especificidade, os testes de RT-PCR para vírus RNAss têm mostrado maior sensibilidade que para aqueles direcionados aos vírus RNAds, que é o caso dos rotavírus. Apesar da denaturação do RNAds ocorrer em menor frequência que no RNAss, RT-PCR para rotavírus são capazes de detectar entre 10 a 1000 partículas virais (GENTSCH *et al.*, 1992), enquanto que nos ensaios para picornavírus e calicivírus são detectadas entre 1 a 10 partículas virais (METCALF, MELNICK, ESTES, 1995). Uma outra possibilidade seria que o sistema de concentração utilizado não seria eficiente para rotavírus. No entanto, MEHNERT *et al.* (1997), utilizando a amostra de rotavírus SA-11 diluída em águas de córregos e esgoto bruto, mostraram que havia recuperação das partículas virais, usando como inóculo  $3,5 \times 10^4$  partículas virais. Outra explicação seria que a passagem pela lagoa pode ser um fator determinante da eliminação dos rotavírus. Para que essa última afirmação pudesse ser confirmada seriam necessárias novas coletas e um número maior de ensaios. Por outro lado, de acordo com LINHARES (2000), os rotavírus estão em circulação nos meses de julho a dezembro na população humana da região sudeste do Brasil em maior frequência,

demonstrando uma característica de sazonalidade. As amostras por nós analisadas foram coletadas nos meses de janeiro e fevereiro, onde a eliminação desses vírus nas fezes de humanos seria pouco freqüente. Isso poderia significar concentrações muito baixas do vírus nas fezes, daí a possibilidade de sua detecção apenas no EB. Por outro lado, resultados obtidos por MEHNERT e STEWIEN (1993), com relação à detecção de rotavírus em São Paulo, entre outubro a julho, demonstraram um pico da presença de rotavírus de 63 UFP/L e 25 UFP/L nos meses de fevereiro e março, respectivamente, contra valores 3, 5 e 8 UFP/L nos demais meses do ano. Neste trabalho destaca-se o fato de que os rotavírus foram detectados em todos os meses do estudo. Assim, para obter resultados conclusivos no presente trabalho, seria necessário que fosse feita amostragem ao longo de 12 a 18 meses, o que permitiria observar se os resultados negativos são devidos às condições da lagoa de decantação anaeróbia ou são em função da circulação sazonal destes vírus em seus hospedeiros. Embora os rotavírus apresentem grande estabilidade, seria interessante confrontar a composição da lagoa com a susceptibilidade destes vírus aos componentes orgânicos e inorgânicos gerados pelo metabolismo da microbiota anaeróbia que compõe a flora da lagoa de decantação.

Com relação à eficiência do sistema para a inativação de HAdV, os resultados nos testes em cultura celular (Tabela 2, Figura 7) e em PCR (Figura 3) mostram que tanto no EB como em seis eluatos provenientes de amostras de água residuária coletadas em diferentes pontos da rampa, os HAdV foram capazes de gerar progênie viral em células HEp-2. Portanto, o processo utilizado de tratamento de águas residuárias, associado à disposição controlada do solo, mostrou-se ineficiente na inativação dos HAdV. No entanto, nos testes de infecção em linhagem de células HEp-2 nenhum dos eluatos originários de amostras de água residuária percolada no solo foi capaz de gerar infecção (Tabela 2).

Esses resultados podem sugerir que o solo estaria atuando no sentido de inativar os vírions de adenovírus. Poder-se-ia inferir ainda que, ao longo da rampa, a quantidade de partículas virais ou vírions de HAdV estaria diminuindo, a ponto de levar à não detecção pelo teste empregado, e a uma concentração final que pudesse não causar infecções no hospedeiro humano, validando, assim, o uso do sistema em estudo.

A quantificação das partículas virais é uma tarefa árdua. Os métodos existentes para os vírus em estudo são estratégias imunoenzimáticas que evidenciam a formação de focos de multiplicação viral: a imunoperoxidase direta (IPD) e imunofluorescência direta (IFD)

(MEHNERT, STEWIEN, 1993). Do total de amostras testadas na linhagem HEp-2, 50% delas teria apresentado resultado falso positivo se apenas o ECP fosse o resultado a ser considerado. Nos ensaios imunoenzimáticos para a contagem de UFP em linhagens celulares, como a IPD e a IFD, o risco de superestimar o número de partículas infectivas é grande, pois que o ECP pode não ser provocado apenas pelos HAdV. Além disso, estas técnicas são demoradas e o tempo previsto pode variar de 48 horas a alguns dias. Os eluatos que foram positivos para adenovírus em células HEp-2 tiveram que ser cultivados até a quarta ou quinta passagem das células (Tabela 2), até que apresentassem ECP, o que significa um trabalho de até três semanas para se atingir os resultados e depondo contra a praticidade nos testes de rotina, um dos objetivos buscados quando se pretende estabelecer um indicador biológico.

Com relação aos rotavírus essa dificuldade torna-se ainda maior pois, em geral, as amostras de campo, sejam elas provenientes do ambiente ou diretamente das fezes, são de difícil adaptação em linhagens celulares estabelecidas para cultivo *in vitro*. MEHNERT *et al.* (1997) realizaram um teste em que foram semeadas, experimentalmente, partículas virais da amostra protótipo de rotavírus SA-11, com título viral conhecido, em amostras de esgoto e água residuária previamente autoclavadas. Em seguida estas amostras foram filtradas, e inoculadas em culturas de células MA104. Várias passagens foram feitas, até que o ECP foi evidenciado e realizou-se a reação de IPD. A contagem das UFP permitiu concluir que houve recuperação de 81 % da quantidade de rotavírus inicialmente empregada. Estes resultados demonstram que a técnica recupera vírions presentes em amostras de origem ambiental, e permite quantificá-los. Porém, a amostra viral em questão já estava adaptada ao cultivo em cultura de células.

Atualmente a quantificação dos adenovírus e rotavírus mais rápida e confiável é por PCR em tempo real, que é uma técnica ainda cara tanto em equipamentos quanto em insumos, e por este motivo não foi usada neste trabalho. PANG *et al.* (2004) demonstraram que a técnica de PCR em tempo real é mais eficiente na detecção dos rotavírus que a *nested*-RT-PCR convencional, além de permitir a quantificação das partículas virais. Para os adenovírus, VAN HEERDEN *et al.* (2005) detectaram por PCR em tempo real quantidades muito baixas de partículas virais em águas de rio e água tratada para consumo humano, demonstrando a importância do monitoramento da presença destes vírus e da sua quantificação, dado que o risco de infecção ocorre a partir de baixas doses destes vírus (ENRIQUEZ, HURST, GERBA,

1995). A grande desvantagem para o uso da técnica de PCR em tempo real constitui-se no custo por amostra por teste.

Concluindo, considera-se que o sistema de tratamento de águas residuárias em lagoa de decantação anaeróbia e disposição controlada no solo não foi eficiente na remoção e ou inativação de adenovírus humanos. Por outro lado, estudos complementares, associando processo de desinfecção ao efluente obtido, poderiam permitir o uso da água residuária para a irrigação. Para esse sistema em análise, OGAWA (2001), mostrou que a rampa de 40 m de comprimento foi eficiente para a remoção de helmintos, porém afirma que seria necessário proceder à desinfecção do efluente para atingir os padrões recomendados pela OMS.

Os adenovírus, neste sistema, e utilizando os procedimentos técnicos aqui descritos, são indicadores virais adequados.

Com relação aos rotavírus os resultados são inconclusivos e não permitem qualquer avaliação.

#### ***IV- CONCLUSÕES.***

Utilizando o sistema de lagoa de decantação anaeróbia e disposição controlada no solo conclui-se que:

1. não houve remoção de partículas virais de adenovírus humanos;
2. ocorreu a infiltração e percolação das partículas dos adenovírus no solo até 3m de profundidade, com contaminação do lençol freático;
3. é necessário que a água residuária da lagoa de decantação anaeróbia passe por processo de desinfecção antes de ser aplicada no sistema de disposição controlada no solo, e
4. os adenovírus foram considerados bons indicadores quanto a sua persistência, e por isso podem ser indicadores virais adequados para a avaliação desse sistema.

#### ***V. REFERÊNCIAS.***

ABBASZADEGAN, M., HUBER, M. S., GERBA C. P., PEPPER I. L. Detection of enteroviruses in groundwater with the polymerase chain reaction. **Appl Envir Microbiol**, 59: 1318–1324, 1993.

ABNT – Associação Brasileira de Normas Técnicas. NBR 13969. **Tanques sépticos – Unidades de tratamento complementar e disposição final dos efluentes líquidos – Projeto, construção e operação**, 60 p., 1997.

ADLER, M., SCHULZ, S., FISHER, R., NIEMEYER, C. M. Detection of rotavirus from stool samples using a standardized immuno-PCR (“Imperacer”) method with end-point and real-time detection. **Biochem Biophys Res Commun**, 333: 1289-1294, 2005.

ALLARD, A., GIRONES, R., JUTO, P., WADELL, G. Polymerase chain reaction for detection of adenoviruses in stool samples. **J Clin Microbiol**, 28: 2659-2667, 1990.

ALLARD, A., ALBINSSON, B., WADELL, G. Detection of adenovirus in stools from healthy persons and patients with diarrhea by two-step polymerase chain reaction. **J Med Virol**, 37: 149-157, 1992.

AYIBOTELE, N. B. The world's water: Assessing the resource. Keynote paper at the International Conference on Water and Environment: Development issues for the 21<sup>st</sup> Century, January 26-31, Dublin, Ireland, 1992.

BISHOP, R. F., DAVIDSON, G. P., HOLMES, I. H., RUCK, B. J. Detection of a new virus by electron microscopy of fecal extracts from children with acute gastroenteritis. **Lancet**, 1: 149-151, 1974.

BLANC, R., NASSER, A. Effect of effluent quality and temperature on the persistence of viruses in soil. **Wat Sci Tech**, 33: 237-242, 1996.

BRIDGER, J. C. Non-group A rotaviruses. In: AZ Kapikian, ed. *Viral infections of the gastrointestinal tract*, 2<sup>nd</sup> edition. New York: Marcel Dekker, Inc.; 369-408, 1994.

CAMPAGNA, M., EICHWALD, C., VASCOTTO, F., BURRONE, O. S. RNA interference of rotavirus segment 11 mRNA reveals the essential role of NSP5 in the virus replicative cycle. **J Gen Virol**, 86: 1481-1487, 2005.

CAMPOS, J. R. Tratamento de esgotos sanitários por processo anaeróbio e disposição controlada no solo. Rio de Janeiro, ABES, Projeto PROSAB, prefácio, 1999.

CERQUEIRA, R. S. Pós-tratamento de efluente de lagoa anaeróbia por escoamento superficial no solo. Campinas, SP: [s.n.], 2004 [Tese de Mestrado – Faculdade de Engenharia Civil da Universidade Estadual de Campinas].

CETESB, São Paulo. Relatório de qualidade das águas interiores do estado de São Paulo, 2000/CETESB, São Paulo: CETESB, v.1: 214 p, 2001.

CETESB (São Paulo). Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental. **Gestão da água**: Reuso da água. Disponível em: <[www.cetesb.sp.gov.br/Agua/rios/gesta\\_reuso.asp](http://www.cetesb.sp.gov.br/Agua/rios/gesta_reuso.asp)>. Acesso em: 23 jun. 2006.

CHERNICHARO, C. A. L.; COTA, R. S.; ZERBINI, A. M.; VON SPERLING, M.; RITO, L. H. N. C. (2001). Post-treatment of anaerobic effluents in an overland flow system. *Water Science Technology*, IWA Publishing, Vol. 44, No 4, pg. 229-236.

CHRISTOVÃO, D. A., CANDEIAS, J. A. N., IARIA, S. T. Condições sanitárias das águas de irrigação de hortas do município de S. Paulo. II. Isolamento de vírus entéricos. **Rev Saúde Pública**, 1: 12-17, 1967.

COHEN, J., CHARPILLENNE, A., CHILMONCZYK, S., ESTES, M. K. Nucleotide sequence of bovine rotavirus gene 1 and expression of the gene product in baculovirus. **Virology**, 171: 131-140, 1989.

CONAMA, nº 20 de 18 de junho de 1986, publicada no D.O.V. de 30/07/86 *in*: Resolução CONAMA, 1984, 1986, SEMA, Brasília, p. 72-89, 1986.

COULSON, B. S., UNICOMB, L. E., PITSON, G. A., BISHOP, R. F. Simple and specific enzyme immunoassay using monoclonal antibodies for serotyping human rotavirus. **J Clin Microbiol**, 25: 509-515, 1987.

CROUCH, C. F., WOODE, G. N. Serial studies of virus multiplication and intestinal damage in gnotobiotic piglets infected with rotavirus. **J Med Microbiol**, 11: 325-334, 1978.

DANIEL, L. A. Processos de desinfecção e desinfetantes alternativos na produção de água potável. São Carlos: Prosab, Edital 2, 2001.

DE SERRES, G.; CROMEANS, T.L.; LEVESQUE, B.; BRASSARD, N.; BARTHE, C.; DIONNE, M.; PRUD'HOMME, H.; PARADIS, D.; SHAPIRO, C. N.; NAINAN, O. V.; GRIFFIN, D.W.; GIBSON III, C. J.; LIPP, E. K.; RILEY, K.; PAUL III, J. H.; ROSE, J. B. Molecular confirmation of hepatitis A from well-water: epidemiology and public health implications. **J. Infect. Dis.**, v.179, p.37-43, 1999.

DONAIRE, P. P. R. Desinfecção de águas utilizando Radiação Ultravioleta e Fotocatálise Heterogênea. Campinas, 2001. 130 p. [Tese de Mestrado – Faculdade de Engenharia Civil da Universidade Estadual de Campinas].

DUBOIS, E., LE GUYADER, F., HAUGARREAU, L., KOPECKA, H., CORMIER, M., POMMEPUY, M. Molecular epidemiological survey of rotaviruses in sewage by reverse transcriptase semi-nested PCR and restriction fragment length polymorphism assay. **Appl Environ Microbiol**, 63:1794–1800, 1997.

ENRIQUEZ, C. E., HURST, C. J. GERBA, C. P. Survival of the enteric adenoviruses 40 and 41 in tap, sea, and waste water. **Wat Res**, 29: 2548-2553, 1995.

ESTES, M. K., CRAWFORD, S. E., PENARANDA, M. E., PETRIE, B. L., BURNS, J. W., CHAN, W. K., ERICSON, B., SMITH, G. E., SUMMERS, M. D. Synthesis and immunogenicity of the rotavirus major capsid antigen using a baculovirus expression system. **J Virol**, 61: 1488-1494, 1987.

ESTES, M. K., COHEN, J. Rotavirus gene structure and function. **Microbiol Rev**, 53: 410-449, 1989.

ESTES, M. K. Rotaviruses and their replication. In: **Virology**. Knipe, D. M., Howley, P. M. (Ed.) Fields. 4<sup>th</sup> ed, p. 1747-1785, 2001.

FISCHER, T. K., STEINSLAND, H., VALENTINER-BRANTH, P. Rotavirus particles can survive storage in ambient tropical temperatures for more than 2 months. **J Clin Microbiol**, 40: 4763-4764, 2002.

FLEWETT, T. H., BRYDEN, A. S., DAVIES, H., WOOD, G. N., BRIDGER, J. C., DERRICK, J. M. Relation between viruses from acute gastroenteritis of children and newborn calves. **Lancet**, London, 2: 61-63, 1974.

FLEWETT, T. H., BRYDEN, A. S., DAVIES, H., MORRIS, C. A. Epidemic viral enteritis in a long-stay children's ward. **Lancet**, *1*: 4–5, 1975.

FLORES, J., BOEGGEMAN, E., PURCELL, R. H., GREEN, K. Y., GARCIA, D., SEARS, J., PEREZ-SCHAEEL, I. AVENDAÑO, L. F., RODRIGUEZ, W. B., TANIGUCHI, K., URASAWA, S., KAPIKIAN, A. Z. A dot hybridization assay for detection of rotavirus. **Lancet**, *1*: 555-559, 1983.

GAJARDO, R., BOUCHRITI, N., PINTO, R. M., BOSCH, A. Genotyping of rotaviruses isolated from sewage. **Appl Envir Microbiol**, *61*: 3460–3462, 1995.

GENTSCH, J. R., GLASS, R. I., WOODS, P., GOUVEA, V., GORZIGLIA, M., FLORES, J., DAS B. K., BHAN, M. K. Identification of group A rotavirus gene 4 types by polymerase chain reaction. **J Clin Microbiol**, *30*: 1365-1373, 1992.

GERBA, C. P., GOYAL, S. M., CECH, I., BOGDAN, G. F. Quantitative assessment of the adsorptive behavior of viruses to soils. **Envir Sci Technol**, *15*: 940–944, 1981.

GERBA, C.P., BITTON, G. Microbial pollutants: their survival and transport pattern to groundwater In: GERBA, C.P. , BITTON (Eds.). Groundwater pollution microbiology. New York: John Wiley & Sons, 1984. p.65-88.

GERBA, C. P., ROSE, J. B., SINGH, S. N. Waterborne gastroenteritis and viral hepatitis. **Crit Ver Envir Control**, *15*: 213-236, 1985.

GERBA, C. P. Virus survival and transport in groundwater. Symposium: Microbiology of Subsurface Environment. **J Industr Microbiol Biotech**, *22*: 535–539, 1999.

GIRONES, R., ALLARD, A., WADELL, G., JOFRE, J. Application of PCR to detection of the adenoviruses in polluted waters. **Wat Sci Tech**, *27*: 235-241, 1993.

GIRONES, R., PUIG, M., ALLARD, A., LUCENA, F., WADELL, G., JOFRE, J. Detection of adenovirus and enterovirus by PCR amplification in polluted waters. **Wat Sci Tech**, *31*: 351-357, 1995.

GLASS, R. I., PARASHAR, U. D. The promise of new rotavirus vaccine. **The New Engl J Med**, 354: 75 – 77, 2006.

GOMEZ, G. G. The colostrum-deprived, artificially-reared, neonatal pigs as a model animal for studying rotavirus gastroenteritis. **Front Biosci**, 2: 471-481, 1997.

GOUVEA, V., GLASS, R. I., WOODS, P., TANIGUCHI, K., CLARK, H. F., FORRESTER, B., FANG, Z. Y. Polymerase chain reaction in amplification and typing of rotavirus nucleic acid from stool specimens. **J Clin Microbiol**, 28: 276-282, 1990.

GOUVEA, V., ALLEN, J. R., GLASS, R. I., FANG, Z. Y., BREMONT, M., COHEN, J., MCCRAE, M. A., SAIF, L., SINARACHATANANT, P., CAUL, E. O. Detection of group B and C rotaviruses by polymerase chain reaction. **J Clin Microbiol**, 29: 519-523, 1991.

GOYAL, S.M., GERBA, C.P. Comparative adsorption of human enterovirus, simian rotavirus and selected bacteriophages to soils. *Appl. Environm. Microbiol.*, v.38, p. 241-247, 1979.

GRAHAN, D. Y., DUFOUR, G. R., ESTES, M. K. Minimal infective dose of rotavirus. **Arch Virol**, 92: 261-271, 1987.

GREEN, D. H., LEWIS, G. D. Enzymatic amplification of enteric viruses from wastewaters. **Wat Sci Tech**, 31: 329-336, 1995.

HARAKEH, M., BUTLER, M. J. Factors influencing the ozone inactivation of enteric viruses in effluent. **Ozone Sci Eng**, 6: 235-243, 1985.

HEJKAL, T. W., WELLINGS, F. M., LAROCK, P. A., LEWIS, A. L. Survival of poliovirus within organic solids during chlorination. **Appl Envir Microbiol**, 38: 114-118, 1979.

HESPANHOL, I. Água e saneamento básico: uma visão realista. In: Rebouças, A. C., Braga, B., Tundisi, J. G. Águas doces do Brasil: capital ecológico, uso e conservação. Academia Brasileira de Ciências, Instituto de Estudos Avançados, USP, cap. 8, p. 249-303, 1999.

HOLMES, I. H., RUCK, B. J., BISHOP, R. F., DAVIDSON, G. P. Infantile enteritis viruses: morphogenesis and morphology. **J Virol**, 16: 937-943, 1975.

HORWITZ, M. S., MAIZEL, J. V. JR., SCHARFF, M. D. Molecular weight of adenovirus type 2 hexon polypeptide. **J Virol**, 6: 569-571, 1970.

HORWITZ, M. S. Adenoviruses. In: **Virology**. Knipe, D. M., Howley, P. M. (Ed.) Fields, 3<sup>th</sup> ed., p. 2163, 1996.

HOSHINO, Y., KAPIKIAN, A. Z. Rotavirus antigens. In: FR Ramig, ed. Rotaviruses. **Curr Top Microbiol Immunol**, 185: 179-227, 1994.

HURST, C. J., GERBA, C. P., LANCE, J. C., RICE, R. C. Survival of enteroviruses in rapid-infiltration basins during the land application of wastewater. **Appl Envir Microbiol**, 40: 192-200, 1980.

INTERNATIONAL COMMITTEE ON TAXONOMY OF VIRUSES (Ny Usa). Büchen-  
osmond C (Org.). **Taxonomy and Index to Virus Classification and Nomenclature:**  
Catalogue of viruses. Disponível em:  
<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/Ictv/index.htm>>. Acesso em: 02 ago. 2006.

KAPIKIAN, A. Z., CHANOCK, R. M. Rotaviruses. In: **Virology**. Knipe, D. M., Howley, P. M. (Ed.) Fields., 3<sup>a</sup> ed. p. 1657-1708, 1996.

LEVY, J. A., FRAENKEL-CONRAT, H., OWENS, R. A. Virology, 3<sup>rd</sup> edition, pp. 185-192, 1994.

LINHARES, A. C. Epidemiologia das infecções por rotavírus no Brasil e os desafios para o seu controle. **Cad Saúde Pública**, 16: 629-646, 2000.

MARTINS, M. T., SOARES, L. A., MARQUES, E., MOLINA, A. G. Human enteric viruses isolated from influents of sewage treatment plants in São Paulo, Brazil. **Wat Sci Tech**, 15: 69-73, 1983.

MARTINS, M. T., SANCHES, P. S., MARQUES, E., MONTEIRO, C. K., MOLINA, A. G. A ten year survey of *Salmonella* and enterovirus in raw and treated water in the great S. Paulo, Brazil. **Wat Sci Tech**, 18: 53-60, 1986.

MCDANIELS, A. E., COCHRAN, K. W., GANNON, J. J., WILLIAMS, G. W. Rotavirus and reovirus stability in microorganism-free distilled and wastewaters. **Wat Res**, 17: 1349-1353, 1983.

MEHNERT, D. U. Determinação da presença e do número de rotavírus em amostras de água de esgoto e de córregos da cidade de São Paulo. São Paulo, 1988. 214 p. [Tese de Doutorado - Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo].

MEHNERT, D. U., STEWIEN, K. E. Detection and distribution of rotavirus in raw sewage and creeks in São Paulo, Brazil. **Appl Envir Microbiol**, 59: 140-143, 1993.

MEHNERT, D. U., STEWIEN, K. E., HÁRSI, C. M., QUEIROZ, A. P. S., CANDEIAS, J. M. G., CANDEIAS, J. A. N. Detection of rotavirus in sewage and creek water: efficiency of the concentration method. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, 92: 97-100, 1997.

METCALF, T. G.; MELNICK, J.L., ESTES, M.K. Environmental virology: from detection of virus in sewage and water by isolation to identification by molecular biology – a trip of over 50 years. **Annu Rev Microbiol**, v. 49, p. 461-487. 1995.

NASSER, A. M., TCHORCH, Y., FATTAL, B. Comparative survival of *E. coli*, F<sup>+</sup> bacteriophages, HAV and poliovirus 1 in wastewater and groundwater. **Wat Sci Technol**, 27: 401-407, 1993.

OGAWA, M R M. Pós-tratamento de efluente anaeróbio utilizando o método de escoamento superficial no solo: avaliação da remoção de helmintos. Campinas, SP: [s.n.], 2001 [Tese de Mestrado – Faculdade de Engenharia Civil da Universidade Estadual de Campinas].

OLIVEIRA, L. H. S. Virologia Humana. Rio de Janeiro, Ed. Cultura Médica, Cap. 21: *Adenoviridae*, p. 232-240, 1994.

ORON, G. Soil as a complementary treatment component for simultaneous wastewater disposal and reuse. **Wat Sci Technol**, 34: 243-252, 1996.

PANCORBO, O. C., EVANSHEN, B. G., CAMPBELL, W. F., LAMBERT, S., CURTIS, S. K., WOOLLEY, T. W. Infectivity and antigenicity reduction rates of human rotavirus strain Wa in fresh waters. **Appl Envir Microbiol**, 53:1803-1811, 1987.

PANG, X. L., LEE, B., BOROUMAND, N., LEBLANC, B., PREIKSAITIS, J. K., CHARLOTE, C. Increased detection of rotavirus using a real time reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) assay in stool specimens from children with diarrhea. **J Med Virol**, 72: 496-501, 2004.

PARASHAR, U. D., HUMMELMAN, E. G., BRESEE, J. S., MILLER, M. A., GLASS, R. I. Global illness and deaths caused by rotavirus disease in children. **Emerg Infect Dis**, 9: 565-572, 2003.

PINA S., PUIG, M., LUCENA F., JOFRE, J., GIRONES, R. Viral pollution in the environment and in shellfish: human adenovirus detection by PCR as an index of human viruses. **Appl Envir Microbiol**, 64: 3376-3382, 1998.

POWELL, K. L., TAYLOR, R. G., CRONIN, A. A., BARRETT, M. P., PEDLEY, S., SELLWOOD, J., TROWSDALE, S. A., LERNER, D. N. Microbial contamination of two urban sandstone aquifers in the UK. **Water Res**, 37: 339-352, 2003.

PROSSIGA (Brasil). Portal de Recursos Minerais (Comp.). **Glossário**. Disponível em: <[www4.prossiga.br/recursosminerais/glossario/glossario.html](http://www4.prossiga.br/recursosminerais/glossario/glossario.html)>. Acesso em: 01 ago. 2006.

QUEIROZ, A. P. S., SANTOS, F. M., HÁRSI, C. M., CANDEIAS, J. M. G., MONEZI, T. A., MEHNERT, D. U. Factors that can interfere with virus concentration from wastewater when using Zeta-Plus 60S filter membranes. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, 95: 713-716, 2000.

QUEIROZ, A. P. S., SANTOS, F. M., SASSAROLI, A., HÁRSI, C. M., MONEZI, T. A., MEHNERT, D. U. Electropositive filter membrane as an alternative for the elimination of PCR inhibitors from sewage and water samples. **Appl Envir Microbiol**, 67: 4614-4618, 2001.

RAO, C. D., GOWDA, K., REDDY, B. S. Y. Sequence analysis of VP4 and VP7 genes of nontypeable strains identifies a new pair of outer capsid proteins representing novel P and G genotypes in bovine rotaviruses. **Virology**, 276: 104-113, 2000.

RAPHAEL, R. A., SATTAR, S. A., SPRINGTHORPE, V. S. Long-term survival of human rotavirus in raw and treated river water. **Can J Microbiol**, 31: 124-128, 1985.

ROBERTS, L. Rotavirus vaccines second chance. **Science**, 305: 1890-1893, 2004.

ROSE, J. B., GERBA, C. P. Assessing potential health risks from viruses and parasites in reclaimed water in Arizona and Florida, USA. **Wat Sci Tech**, 23: 2091-2098, 1991.

ROWE W. P., HUEBNER R. J., GILMORE L. K., PARROT R. H., WARD T. G. Isolation of a cytopathogenic agent from human adenoids undergoing spontaneous degeneration in tissue culture. **Proc Soc Exp Biol Med**, 84: 570-573, 1953.

SAIF, L. J., JIANG, B. Nongroup A rotaviruses of humans and animals. In: RF Ramig, ed. Rotaviruses. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag. **Curr Top Microbiol Immunol**, 185: 339-371, 1994.

SALGOT, M., CAMPOS, C., GALOFRÉ, B., TAPIAS, J. C. Biological control tools for wastewater reclamation and reuse. A critical review. **Wat Sci Tech**, 40: 195-201, 2001.

SANTAMARÍA, J., TORANZOS, G. A. Enteric pathogens and soil: a short review. **Intern Microbiol**, 6: 5-9, 2003.

SANTOS, F. M., MEHNERT, D. U., VIEIRA, M., GARRAFA, P., SASSAROLI, A., HÁRSI, C. M., MONEZI, T. A. Metodologia para concentração e detecção de adenovírus presentes em amostras de água de córrego. In: I Seminário Nacional de Microbiologia Aplicada ao Saneamento. Vitória, 2000.

SATTAR, S. A., RAPHAEL, R. A., SPRINGTHORPE, V. S. Rotavirus survival in conventionally treated drinking water. **Can J Microbiol**, 30: 653-656, 1984.

SCANDURA, J. E., SOBSEY, M. D. Viral and bacterial contamination of groundwater from on-site sewage treatment systems. **Wat Sci Tech**, 35: 141-146, 1997.

SCHIJVEN, J. F., HASSANIZADEH, S. M. Removal of viruses by soil passage: overview of modeling, processes, and parameters. **Crit Rev Envir Sci Tech**, 30: 49-127, 2000.

SCHWARTZBROD, L. Effect of human viruses on public health associated with the use of wastewater and sludge in agriculture and aquaculture. World Health Organization, **Bull WHO/EOS/95**,19, 1995.

SHIKLOMANOV, I. World water resources: a new appraisal and assessment for the 21<sup>st</sup> century. IPH, Unesco, 32 p., 1998.

SHENK, T. *Adenoviridae*: The viruses and their replication. In: KNIPE, D.M.; HOWLEY, P.M. (Ed.) **Fields. Virology**. 3<sup>th</sup> ed., p. 2111-2148, 1996.

SILVA, R. S. S. Reuso agrícola do efluente de um filtro anaeróbio utilizando um sistema de irrigação por sulcos. Campinas, SP: [s.n.], 2003 [Tese de Mestrado – Faculdade de Engenharia Civil da Universidade Estadual de Campinas].

SOARES, C. C., VOLOTÃO, E. M., ALBUQUERQUE, M. C. M., SILVA, F. M., CARVALHO, T. R. B., NOZAWA, C. M., LINHARES, R. E., SANTOS, N. Prevalence of enteric adenoviruses among children with diarrhea in four Brazilian cities. **J Clin Virol**, 23: 171-177, 2002.

STEFANUTTI, R. Estudo das várias formas do nitrogênio orgânico em trinta solos representativos do Estado de São Paulo. 1991.54f. Dissertação (Mestrado em Química Analítica). Instituto de Física e Química, Universidade de São Paulo, São Carlos.

STEWIEN, K. E. Análise virológica da água: estudo comparativo entre dois métodos para concentração de vírus de água de esgoto e determinação da razão entre os números de Enterovírus e coliformes. São Paulo, 1979. 95 p. [Tese de livre docência – Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo].

STRAUB, T. M., PEPPER, I. L., GERBA, C. P. Comparison of PCR and cell culture for detection of enteroviruses in sludge-amended field soils and determination of their transport. **Appl Envir Microbiol**, 61: 2066–2068, 1995.

THEIL, K. W., BOHL, E. H., CROSS, R. F., KOHLER, E. M., AGNES, A. G. Pathogenesis of porcine rotaviral infection in experimentally inoculated gnotobiotic pigs. **Am J Vet Res**, 39: 213-220, 1978.

TSAI, Y., TRAN, B., SANGERMANO, L. R., PALMER, C. J. Detection of poliovirus, hepatitis A virus and rotavirus from sewage and ocean water by triplex reverse transcriptase PCR. **Appl Envir Microbiol**, 60: 2400–2407, 1994.

TUNDISI, J. G. A água no século XXI: enfrentando a escassez. São Carlos, SP, RiMa, IIE, cap. 1: “A água e os sistemas de sustentação à vida”, p. 1-4, 2003a.

TUNDISI, J. G. A água no século XXI: enfrentando a escassez. São Carlos, SP, RiMa, IIE, cap. 2: “O ciclo hidrológico e a distribuição da água doce no planeta”, p. 5-24, 2003b.

USEPA Manual of Methods for Virology - EPA publication, chapter 1, EPA/600/4-84/013, 1984.

VACINAS contra o rotavírus. **Pesquisa FAPESP**. São Paulo, FAPESP, nº120, p. 61, 2006.

VAN HEERDEN, J., EHLERS, M. M., HEIM, A., GRABOW, W. O. K. Prevalence, quantification and typing of adenoviruses detected in river and treated drinking water in South Africa. **J Appl Microbiol**, 99: 234-242, 2005.

VAN OSSTRUM, J. BURNETT, R. M. The molecular composition of the adenovirus type virion. **J Virol**, 56: 439-448, 1985.

VAN REGENMORTEL, M. H. V. (Ed.). Virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses: seventh report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. California: Academic Press, 2000.

VARGHESE, V., DAS, S., SINGH, NG. B., KOJIMA, K., BHATTACHARYA, S. K., KRISHNAN, T., KOBAYASHI, N., NAIK, T. N. Molecular characterization of a human rotavirus reveals porcine characteristics in most of the genes including VP6 and NSP4. **Arch Virol**, 149: 155-172, 2004.

VON SPERLING, M., NASCIMENTO, L. V. A Resolução CONAMA 20/86 e as legislações estaduais de classificação das águas e lançamento de efluentes. **20º Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental**. ABES, Rio de Janeiro, 1999.

WHO. Health guidelines for the use of wastewater in agriculture and aquaculture. Technical Report Series N° 778. WHO, Geneva, 1989.

WILLIAM, F. A. Membrane-associated viral complexes observed in stools and cell culture. **Appl Envir Microbiol**, 50: 523-526, 1985.

WYN-JONES, A. P. SELLWOOD, J. Enteric viruses in the aquatic environment. **Appl Envir Microbiol**, 91: 945-962, 2001.

XU, L., HARBOUR, D., MCCRAE, M. A. The application of polymerase chain reaction to the detection of rotaviruses in faeces. **J Virol Meth**, 27: 29-38, 1990.

YATES, M.V. GERBA, C.P. Microbial considerations in wastewater reclamation and reuse. In: ASANO, T (Ed.). Wastewater reclamation and reuse. Lancaster, PA: Technomic Publishers, p.437-88, 1998.

## LISTA DE ABREVIATURAS

ABNT: Associação Brasileira de Normas Técnicas.  
CETESB: Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental.  
CONAMA: Conselho Nacional do Meio Ambiente.  
CsCl: cloreto de céσιο.  
DEPC: dietilpirocarbonato.  
DNA: ácido desoxirribonucleico.  
dNTP: di-nucleotídeo tri-fosfato.  
DTT: ditioneitol.  
EB: esgoto bruto.  
ECP: efeito citopático.  
EDTA: ácido etilenodiamino tetra-acético.  
EGPA: eletroforese em gel de poliacrilamida.  
EGTA: ácido tetraacético etileno glicol.  
ETE: estação de tratamento de esgoto.  
FAPESP: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo.  
HAdV: adenovírus de hospedeiro humano.  
HCl: ácido clorídrico.  
ICTV: *International Committee on Taxonomy of Viruses*.  
IPD: imunoperoxidase direta.  
KCl: cloreto de potássio.  
LF: lençol freático.  
MEM: meio essencial mínimo.  
MgCl<sub>2</sub>: cloreto de magnésio.  
NaOH: hidróxido de sódio.  
NH<sub>4</sub><sup>+</sup>: íon amônio.  
NO<sub>3</sub><sup>-</sup>: íon nitrato.  
OMS: Organização Mundial de Saúde.  
PCR: reação em cadeia da polimerase.  
pH: potencial hidrogeniônico.

RNA: ácido ribonucleico.

RNAss: ácido ribonucleico simples fita.

RT: reação de transcrição reversa.

RV: rotavírus.

T1: ponto de testemunha 1.

T2: ponto de testemunha 2.

Taq DNA polimerase: DNA-polimerase de *Thermus aquaticus*.

Tris: Tris (hidroximetil)-aminometano.

UV: radiação ultravioleta.

UFP: unidade formadora de placa.

UNESCO: União das Nações Unidas para a Educação, Ciência e Cultura.

USEPA: Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos da América do Norte.

WHO: World Health Organization (OMS).

## LISTA DE FIGURAS, TABELAS E QUADROS.

- Figura 1: Esquema do sistema de tratamento de águas residuárias em lagoa de decantação anaeróbia e disposição controlada no solo. Os pontos “30-1” e “35-1” estão localizados a 1m de profundidade e a 30 e 35 m do início da rampa .....21
- Figura 2: Representação esquemática das reações de PCR e n-PCR a partir da seqüência de nucleotídeos da região codificadora do hexon no genoma dos adenovírus de humanos. Fonte: ALLARD, ALBINSSON e WADELL (1992) (com modificações).....26
- Figura 3: Representação esquemática da reação de duplo-semi-*nested* PCR para identificação dos genótipos (I) G1 e G4, (II) G2 e G3 de rotavírus A para o gene que codifica a proteína VP7. Fonte:QUEIROZ *et al.*, 2001, com modificações).....30
- Figura 4: Gel de agarose para detecção de adenovírus humano por PCR e *nested*-PCR em amostras de água de esgoto bruto (EB) da coleta 3 e de diferentes pontos da rampa, na coleta 4. Padrão de peso molecular: marcador de DNA de 100 pb (L). .....34
- Figura 5: Gel de agarose para detecção de adenovírus humano por PCR em lisados de células HEp2 infectadas com amostras de esgoto bruto (EB) da coleta 1 e após passagem pela rampa de disposição controlada da coleta 2. L: padrão de peso molecular de DNA de 100pb; C(+): controle positivo de HAdV-5; C(-): água desmineralizada tratada com 10% de DEPC.....36
- Figura 6: Gel de agarose para detecção de rotavírus genótipos G1 e G4 em eluatos de água residuária. L: padrão de peso molecular de DNA de 100 pb. G1: amostra de RV-A Wa; G4: amostra de RV-A ST3. C1 a C4: coletas 1 a 4; t: dia de coleta: pb: pares de base de nucleotídeos.....37

Figura 7: Gel de agarose para detecção de rotavírus A genótipos G2 e G3 em eluatos de água residuária. L: padrão de peso molecular de DNA de 100 pb. G3: amostra de RV-A SA-11 padrão. C1 a C4: coletas 1 a 4; t: dia de coleta; pb: pares de base de nucleotídeos.....40

Tabela 1: Resultados de PCR e *nested*-PCR para adenovírus em amostras de esgoto bruto e água residuária processadas, coletadas em diferentes pontos após a passagem por rampa de disposição controlada no solo, durante período de 21 dias, na Estação de Tratamento de Esgoto (ETE) do bairro Graminha, município de Limeira, SP, Brasil.....34

Tabela 2: Detecção de adenovírus por n-PCR em sobrenadante de cultivos na linhagem HEp-2 infectados por eluatos de diferentes pontos do sistema. (\* Efeito Citopático \*\* Efeito citopático não característico de adenovírus).....36

Quadro 1: Coletas e pontos amostrados no sistema.....22

Quadro 2: Oligonucleotídeos iniciadores para amplificação de adenovírus por reação de polimerização em cadeia, segundo ALLARD *et al.*(1991); ALLARD, ALBINSSON e WADELL (1992).....26

Quadro 3: Oligonucleotídeos iniciadores para a detecção de rotavírus em testes de *semi-nested*-RT-PCR, segundo GOUVEA *et al.* (1990, 1991).....29

Quadro 4: Resultados dos testes de PCR e *nested*-PCR para detecção de HAdV no sistema de tratamento de águas residuárias em lagoa de decantação anaeróbia e disposição controlada no solo, no período de 21 dias.....35

Quadro 5: Resultados dos testes de RT-PCR e duplo-semi-*nested*-PCR.PCR para detecção de rotavírus no sistema de tratamento de águas residuárias em lagoa de decantação anaeróbia e disposição controlada no solo, no período de 21 dias.....37

Quadro 6: Resultados para adenovírus e rotavírus no sistema de tratamento de águas residuárias em lagoa de decantação anaeróbia e disposição controlada no solo, no período de 21 dias na Estação de Tratamento de Esgoto (ETE) do bairro Graminha, município de Limeira – SP, Brasil, administrada pela Concessionária Águas de Limeira S.A.....39