

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO – UFES
CENTRO TECNOLÓGICO – CT
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA AMBIENTAL –
PPGEA

SUSANNE MARIANI LOSS

VÍRUS ENTÉRICOS E INDICADORES BACTERIOLÓGICOS DE
POLUIÇÃO FECAL EM AMOSTRAS DE ÁGUA NA REGIÃO DA
ILHA DAS CAIEIRAS, NA BAÍA DE VITÓRIA, ES

VITÓRIA, 2012

SUSANNE MARIANI LOSS

**VÍRUS ENTÉRICOS E INDICADORES BACTERIOLÓGICOS DE
POLUIÇÃO FECAL EM AMOSTRAS DE ÁGUA NA REGIÃO DA ILHA
DAS CAIEIRAS, NA BAÍA DE VITÓRIA, ES.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental do Centro Tecnológico da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Engenharia Ambiental na área de Saneamento.

Orientador: Prof^a Dr^a Regina de Pinho Keller

VITÓRIA, 2012

SUSANNE MARIANI LOSS

**VÍRUS ENTÉRICOS E INDICADORES BACTERIOLÓGICOS DE POLUIÇÃO FECAL
EM AMOSTRAS DE ÁGUA NA REGIÃO DA ILHA DAS CAIEIRAS, NA BAÍA DE
VITÓRIA, ES.**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Engenharia Ambiental na área de Saneamento.

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Regina de Pinho Keller
Universidade Federal do Espírito Santo
Orientadora

Prof. Dr. Sérgio Túlio A. Cassini
Universidade Federal do Espírito Santo
Examinador Interno

Profa. Dr^a. Maria Tereza Pepe Razollini
Universidade de São Paulo
Examinador Externo

Dados Internacionais de Catalogação-na-publicação (CIP)
(Biblioteca Central da Universidade Federal do Espírito Santo, ES, Brasil)

L881v Loss, Susanne Mariani, 1984-
Vírus entéricos e indicadores bacteriológicos de poluição fecal em amostras de água na região da Ilha das Caieiras, na Baía de Vitória, ES. / Susanne Mariani Loss. – 2012.
121 f. : il.

Orientadora: Regina de Pinho Keller.
Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental) –
Universidade Federal do Espírito Santo, Centro Tecnológico.

1. Estuários. 2. Microbiologia - Aspectos ambientais. 3. Água poluída por vírus. 4. Coliformes. 5. Enterococcus. I. Keller, Regina de Pinho. II. Universidade Federal do Espírito Santo. Centro Tecnológico. III. Título.

CDU: 628

*À Deus,
Aos meus queridos pais, e
Ao meu amado marido.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço imensamente a Deus, Uno e Trino, tão presente em minha vida! Obrigada por todas as bênçãos que recebo diariamente!!!

Agradeço aos meus amados pais, Carlos e Dine, que sempre fizeram tudo por mim e me deixarão de herança algo que nunca me será tomada: minha formação acadêmica! Obrigada por tudo o que me ensinaram e por serem tão presentes na minha vida. A vitória é de vocês também!

Agradeço ao meu marido, Handrey, sem o qual nada disso teria sido possível! Amor, você foi fundamental nesta conquista!!! Obrigada por ter participado de tudo isso, com toda a sua amizade, paciência, companheirismo e, principalmente, amor. Te amo!

Agradeço à minha orientadora, Regina Keller, por toda a dedicação, paciência, determinação, confiança e puxões de orelha, muito válidos por sinal! Obrigada por cada minuto dedicado a mim!!!

Agradeço aos meus queridos amigos do projeto, Karol, Rodrigo e Sara, que sempre seguraram a minha mão e me deram força!

Agradeço aos meus amigos do LABSAN, que formam uma grande família de desesperados! Elaine, Georgette, Bruna, Paulão, Andréia, Jairo, Renata, Ademir, Helenice, Seu Paulo e Marcinha!

Agradeço ao Instituto Oswaldo Cruz (IOC/Fiocruz), em especial à pesquisadora Marize Miagostovich, do Laboratório de Virologia Comparada e Ambiental, pelo apoio na realização deste trabalho.

Agradeço aos meus amigos da CESAN, e em especial ao meu chefe Nestor Gorza, por todo suporte, carinho, compreensão e torcida!

Agradeço aos examinadores dessa dissertação, pela disponibilidade em contribuir para o enriquecimento deste trabalho.

Obrigada a todos os meus amigos e familiares que direta e indiretamente contribuíram para esta minha conquista!

Agradeço à UFES, por todo o suporte, e à CAPES, pela bolsa de mestrado.

Super obrigadaaaa!

“A persistência é o caminho do êxito.”

Charles Chaplin

RESUMO

A Ilha das Caieiras está localizada em uma das regiões mais carentes no município de Vitória/ES, a Grande São Pedro. Esta região é densamente povoada e é conhecida como um bolsão de pobreza da capital, com a população sobrevivendo, principalmente, da coleta e comercialização de frutos do mar do manguezal localizado em seu entorno. Estudos realizados anteriormente na região mostraram que a água deste estuário está contaminada com microrganismos patogênicos provenientes, principalmente, de esgotos domésticos lançados sem prévio tratamento.

O objetivo deste trabalho foi avaliar a presença de vírus entéricos (adenovírus – AdV, rotavírus – RV e norovírus GII – NoV) e indicadores bacterianos de poluição fecal (coliformes termotolerantes e enterococos) em amostras de água de quatro pontos deste importante estuário da Ilha das Caieiras. O monitoramento ocorreu de janeiro de 2011 a julho de 2012 (19 meses) e utilizou-se as técnicas moleculares PCR Qualitativa e PCR em Tempo Real (qPCR), para detecção de vírus entéricos, e membrana filtrante, para análise de bactérias, além de avaliação de parâmetros físico-químicos da água.

Os resultados das análises microbiológicas da água nos pontos estudados (P1, P2, P3 e P4) demonstraram a presença de coliformes termotolerantes, com médias geométricas de $1,66 \times 10^2$, $1,31 \times 10^2$, $2,29 \times 10^3$ e $3,13 \times 10^2$ UFC / 100 mL de água, respectivamente. Para enterococos, as médias encontradas foram $6,30 \times 10^1$ UFC / 100 mL em P1, $5,56 \times 10^1$ UFC / 100 mL em P2, $1,89 \times 10^3$ UFC / 100 mL em P3 e $1,62 \times 10^3$ UFC / 100 mL em P4. Os vírus entéricos foram detectados nos quatro pontos de monitoramento pelas duas técnicas moleculares utilizadas, com valores máximos de $2,00 \times 10^3$, $5,24 \times 10^4$ e $1,50 \times 10^4$ CG / 100 mL para AdV, RV e NoV, respectivamente, quantificados por qPCR. A frequências de detecção de vírus nas amostras de água do estuário variou de 21 – 27% para AdV, 42 – 53% para RV e 10 – 42% para NoV GII.

Neste estudo foi possível verificar que o estuário da Ilha das Caieiras apresenta-se contaminado devido, possivelmente, aos lançamentos de esgoto *in natura* e/ou de lixiviados de áreas rurais. A ação antropogênica sobre este manguezal é evidente e preocupante, pois se reflete na qualidade ambiental deste meio, na saúde da população e na economia da região.

Palavras chave: Estuário, Vírus Entéricos, Coliformes Termotolerantes, Enterococos, Água.

ABSTRACT

The Ilha das Caieiras is located in one of the poorest regions in Vitória / ES, the Grande São Pedro. This region is densely populated and is known as a pocket of poverty in the capital, with a population surviving mainly on the collection and marketing of seafood mangrove located in their surroundings. Previous studies have shown that the region of this estuary water is contaminated with pathogenic microorganisms from mainly domestic sewage released without prior treatment.

The aim of this study was to evaluate the presence of enteric viruses (adenovirus - AdV, rotavirus - RV and norovirus GII - NoV) and bacterial indicators of fecal pollution (fecal coliform and enterococci) in water samples from four sites of this important Ilha das Caieiras' estuary. Monitoring occurred from January 2011 to July 2012 (19 months) and used molecular techniques Qualitative PCR and Real Time PCR (qPCR) for detection of enteric viruses, and membrane filter for analysis of bacteria, and assessment of physico-chemical parameters of the water.

The microbiological analysis of water studied sites (P1, P2, P3 and P4) showed the presence of fecal coliform, with geometric means of 1.66×10^2 , 1.31×10^2 , 2.29×10^3 and 3.13×10^2 CFU / 100 mL water, respectively. For enterococci, the averages were 6.30×10^1 CFU / 100 mL in P1, 5.56×10^1 CFU / 100 mL at P2, 1.89×10^3 CFU / 100 mL at P3 and 1.62×10^3 CFU / 100 mL at P4. Enteric viruses were detected in the four monitoring sites by both molecular techniques used, with maximum values of $2,00 \times 10^3$, $5,24 \times 10^4$ and $1,50 \times 10^4$ GC / 100 mL for AdV, NoV and RV, respectively, quantified by qPCR. The frequencies of virus detection in samples of estuarine water ranged from 21 - 27% for AdV, 42 - 53% for RV and 10 - 42% for NoV GII.

In this study we found that the estuary of the Ilha das Caieiras presents contaminated, possibly due to sewage releases fresh and / or leachate from rural areas. The anthropogenic mangrove on this is clear and worrisome because environmental quality is reflected in this environment, the health of the population and the economy of the region.

Keywords: Estuary, Enteric Virus, Fecal coliforms, enterococci and Water.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – Sistema estuarino da Baía de Vitória e da Baía do Espírito Santo. Destaque para as áreas de manguezal da Baía de Vitória. FONTE: VERONEZ et. al., 2009.

FIGURA 2 – Vista parcial de mangue do sistema estuarino da Ilha das Caieiras, da Baía de Vitória.

FIGURA 3 – Subdivisão da Grande São Pedro, denominada de Região VII pela Prefeitura Municipal de Vitória. FONTE: PREFEITURA MUNICIPAL DE VITÓRIA (2010).

FIGURA 4 – Representação esquemática das bactérias de vida livre, patogênicas e do grupo coliforme: Coliformes Totais (CT) e Coliformes Termotolerantes (C. Termo). FONTE: VON SPERLING, 2005. Adaptado.

FIGURA 5 – Possíveis rotas de transmissão de vírus entéricos a partir de fezes humanas. Fonte: RAO & MELNICK apud. BOSCH, 1998. Adaptado.

FIGURA 6 – Partícula de Adenovírus, destacando a fibra associada a cada base do Penton, permitindo que o vírus se ligue às células humanas usando o receptor espécie-específico. FONTE: < [http://www.iavireport.org/archives/2007/Pages/IAVI-Report-11\(1\)-and-the-winner.aspx](http://www.iavireport.org/archives/2007/Pages/IAVI-Report-11(1)-and-the-winner.aspx)>

FIGURA 7 – Representação esquemática de um norovírus. Fonte: <http://www.foodpoisonjournal.com/food-poisoning-information/fda-approves-of-first-early-detection-norovirus-test/>

FIGURA 8 – Partícula de rotavírus. Localização de proteínas e visualização tridimensional. FONTE: http://www.reoviridae.org/dsRNA_virus_proteins/Rotavirus.htm

FIGURA 9 – Pontos de coleta de amostra na Baía de Vitória.

FIGURA 10 – Pontos de coleta das amostras de água na região da Ilha das Caieiras, Vitória ES: (a) P1, (b) P2, (c) P3 e (d) P4.

FIGURA 11 – Monitoramento da turbidez (UNT) da água do estuário da Ilha das Caieiras e valores de precipitação (mm – acumulado de cinco dias anteriores às coletas), do período de janeiro de 2011 e julho de 2012.

FIGURA 12 – Monitoramento da salinidade (‰) da água do estuário da Ilha das Caieiras e valores de precipitação (mm – acumulado de cinco dias anteriores às coletas), do período de janeiro de 2011 e julho de 2012.

FIGURA 13 – Monitoramento da condutividade (mS) da água do estuário da Ilha das Caieiras e valores de precipitação (mm – acumulado de cinco dias anteriores às coletas), do período de janeiro de 2011 e julho de 2012.

FIGURA 14 – Resultados do parâmetro Sólidos Dissolvidos Totais (SDT) para o período de monitoramento de janeiro/2011 a julho/2012.

FIGURA 15 – – Densidade de coliformes termotolerantes (UFC / 100 mL) na água do estuário da Ilha das Caieiras, em Vitória / ES, e valores de precipitação (mm – acumulado de cinco dias anteriores às coletas), do período de janeiro de 2011 e julho de 2012.

FIGURA 16 – Densidade de *Enterococcus sp.* (UFC / 100 mL) na água do estuário da Ilha das Caieiras, em Vitória / ES, e valores de precipitação (mm – acumulado de cinco dias anteriores às coletas), do período de janeiro de 2011 e julho de 2012.

FIGURA 17 – Detecção em gel de agarose de produto da nested-PCR para Adenovírus (banda de 173pb). M: Marcador de peso molecular de 100pb; Da segunda à quinta coluna: Bandas referentes às repetições do Ponto 1 nos meses de março, abril, maio e junho de 2011. Sexta coluna: Controle positivo; Sétima coluna: Controle negativo.

FIGURA 18 – Detecção em gel de agarose de produto da nested-PCR para Rotavírus (banda de 346pb). M: Marcador de peso molecular de 100pb; Da segunda à quinta coluna: Bandas referentes às amostras de P1, P2, P3 P4, de agosto de 2011, respectivamente. Sexta coluna: Controle positivo; Sétima coluna: Controle negativo. Amostras de agosto de 2011.

FIGURA 19 – Detecção em gel de agarose de produto da Semi-nested PCR para Norovírus (banda de 201pb). M: Marcador de peso molecular de 100pb; Da segunda à quarta coluna: Bandas referentes às amostras de P1, P2 e P3, de abril de 2011, respectivamente. Quinta coluna: Controle positivo; Sexta coluna: Controle negativo. Amostras de abril de 2011.

FIGURA 20 – Zona de lançamento de água de drenagem urbana, mas atualmente contaminada pela descarga de esgoto *in natura* proveniente de ligações clandestinas. Em A e B é observada a presença de crianças sobre a manilha de lançamento; em C é mostrado o ponto de lançamento de água de drenagem / esgoto no “valão”; em D é possível visualizar a presença de crianças em contato primário com a água contaminada.

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – Enquadramento dos valores microbiológicos preconizados pela Diretiva 2006/7/CE para área costeira e de transição.

TABELA 2 – Doenças causadas por vírus entéricos humanos com veiculação hídrica.

TABELA 3 – Descrição e coordenadas geográficas dos pontos de coleta das amostras de água (P1, P2, P3 e P4).

TABELA 4 – Concentração final dos reagentes para síntese de cDNA.

TABELA 5 – Sequências dos oligonucleotídeos iniciadores.

TABELA 6 – Composição dos mixes da 1ª PCR e Nested PCR para adenovírus (AdV), rotavírus (RV) e norovírus (NoV), com concentrações finais dos reagentes.

TABELA 7 – Programas utilizados para reações da 1ª PCR de AdV, RV e NoV.

TABELA 8 – Programas utilizados para reações de nested PCR de AdV e RV e semi-nested PCR de NoV.

TABELA 9 – Primers e Sondas de AdV, RV e NoV para PCR Real Time.

TABELA 10 – Concentrações finais dos reagentes da qPCR para AdV, RV e NoV.

TABELA 11 – Estatística descritiva (média, mediana, mínimo, máximo) dos parâmetros analisados (temperatura, pH, turbidez, salinidade, condutividade e sólidos dissolvidos totais) nos quatro pontos de monitoramento, no período de janeiro de 2011 a julho de 2012 (n = 19).

TABELA 12 – Resultados por estatística descritiva (média geométrica, mediana, mínimo e máximo) da densidade de coliformes termotolerantes e *Enterococcus* sp., em UFC / 100 mL, nos quatro pontos de monitoramento, no período de outubro de 2011 a julho de 2012.

TABELA 13 – Resultado do monitoramento das amostras de água analisadas no período de janeiro de 2011 a julho de 2012, para adenovírus, rotavírus e norovírus. Análise por PCR Qualitativa e Quantitativa.

TABELA 14 – Resumo dos resultados obtidos nas amostras de água analisadas no período de janeiro de 2011 a julho de 2012, para adenovírus (AdV), rotavírus (RV) e norovírus (NoV). Análise por PCR Qualitativa e Quantitativa.

TABELA 15 – Resultado do monitoramento das amostras de água analisadas por PCR Qualitativa, no período de janeiro de 2011 a julho de 2012, para adenovírus, rotavírus e norovírus.

TABELA 16 – Resultado da quantificação de adenovírus, rotavírus e norovírus em amostras de água (cópias genômicas em 100 mL de amostra) dos quatro pontos de monitoramento (P1, P2, P3 e P4), no período de janeiro de 2011 a janeiro de 2012.

TABELA 17 – Estatística descritiva (média geométrica, mediana, máxima e mínima) dos resultados da qPCR para adenovírus, rotavírus e norovírus em P1, P2, P3 e P4, no período de janeiro de 2011 a janeiro de 2012.

TABELA 18 – Síntese dos resultados das amostras de água dos quatro pontos analisados, no período de janeiro de 2011 a janeiro de 2012, para adenovírus (AdV), rotavírus (RV) e norovírus (NoV), utilizando as técnicas PCR Qualitativa (PCR) e PCR Quantitativa (qPCR).

TABELA 19 – Resultados obtidos na detecção de adenovírus (AdV), rotavírus (RV) e norovírus (NoV) em amostras ambientais. Estudos realizados em diversos países.

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 – Uso da água salobra classe 1 e suas condições e padrões de coliformes termotolerantes, de acordo com a Resolução CONAMA no 357/2005.

QUADRO 2 – Categorias de classificação da água e suas condições e padrões microbiológicos, de acordo com a Resolução CONAMA 274/2000.

LISTA DE SIGLAS

AdV = Adenovírus

AstVs = Astrovírus

AWQC = Ambient Water Quality Criteria (Critérios de Qualidade de Água Ambiental)

°C = grau Celsius

CDA = Caldo Dextrose Azida

cDNA = DNA complementar

CE = Conselho Europeu

CEE = Comunidade Económica Européia

CESAN = Companhia Espírito Santense de Saneamento

CG = Cópias Genômicas

CIRM = Comissão Interministerial para os Recursos do Mar

cm = centímetro

CONAMA = Conselho Nacional do Meio Ambiente

CT = Coliformes Totais

CWA = Clean Water Act (Lei da Água Limpa)

DEA = Departamento de Engenharia Ambiental

DMSO = Dimetilsulfóxido

DNA = Ácido Desoxirribonucléico

DNTP - Desoxirribonucleotídeos Trifosfatados

DO = Densidade Óptica

E. coli = Escherichia coli

EPA = Environmental Protection Agency (Agência de Proteção Ambiental dos EUA)

ES = Espírito Santo

GI ao GV = Genogrupos

GI-GERCO = Grupo de Integração do Gerenciamento Costeiro

GPS = Global Positioning System (Sistema de Posicionamento Global)

INCAPER = Instituto Capixaba de Pesquisa, Assistência Técnica e Extensão Rural

kb = quilobase

L = Litro

LABSAN = Laboratório de Saneamento

M = Molar

mg = miligrama

mL = mililitro

mM = milimolar

mS/cm = milisiemens por centímetro

μ L = microlitro

μ m = micrometro

μ M = micromolar

μ g = micrograma

n = número de amostras

nm = nanômetro

PMV = Prefeitura Municipal de Vitória

NMP = Número Mais Provável

NoV = Norovírus

NSP = Non-Structural Protein (Proteína Não Estrutural)

OMS = Organização Mundial da Saúde

ORF = Open Reading Frames

P1 = Ponto 1

P2 = Ponto 2

P3 = Ponto 3

P4 = Ponto 4

pb = par de base

PCR = Polymerase Chain Reaction (Reação em Cadeia Polimerase)

pH = Potencial de Hidrogênio

PNGC = Plano Nacional de Gerenciamento Costeiro

PNRM = Política Nacional de Recursos do Mar

qPCR = PCR em Tempo Real (Quantitativa)

RNA = Ácido Ribonucléico

RV = Rotavírus

s = segundo

SaVs = Sapovírus

SDT = Sólidos Dissolvidos Totais

SRSV = Small Round Structured Viruses

TE =Tris/EDTA

TBE =Tris/Borato/EDTA

U =Unidade

UFC = Unidade Formadora de Colônia

UFES =Universidade Federal do Espírito Santo

UR = Umidade Relativa do Ar

USEPA =United States Environmental Protection Agency

UV = Luz Ultravioleta

VP = Viral Protein (Proteína Viral)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	23
2. OBJETIVOS	25
2.1. OBJETIVO GERAL	25
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	25
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	26
3.1. BAÍA DE VITÓRIA – O SISTEMA ESTUARINO E O MANGUEZAL.....	26
3.2. ILHA DAS CAIEIRAS.....	29
3.3. A CONTAMINAÇÃO DA ÁGUA E A LEGISLAÇÃO VIGENTE.....	31
3.4. MICRORGANISMOS INDICADORES DE POLUIÇÃO	37
3.4.1. Bactérias indicadoras de contaminação fecal em ambientes marinhos	37
3.4.2. Vírus entéricos	40
3.4.2.1. <i>Adenovírus</i>	43
3.4.2.2. <i>Norovírus</i>	44
3.4.2.3. <i>Rotavírus</i>	46
3.5. DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE MICRORGANISMOS EM AMBIENTES AQUÁTICOS	48
3.5.1. Detecção e quantificação de bactérias bioindicadoras de poluição fecal	48
3.5.2. Detecção e quantificação de vírus entéricos	50
4. METODOLOGIA	52
4.1. PONTOS DE COLETA DE ÁGUA	52
4.2. COLETA AMSTRAL.....	55
4.3. ARMAZENAMENTO E TRANSPORTE	55
4.4. ANÁLISES LABORATORIAIS	55
4.4.1. Análises Físico-Químicas das Amostras de Água	56
4.4.2. Análises Microbiológicas das Amostras de Água	56
<i>4.4.2.1. Detecção e Quantificação de Coliformes Termotolerantes</i>	56
<i>4.4.2.2. Detecção e Quantificação de Enterococcus sp</i>	57
<i>4.4.2.3. Detecção, Qualificação e Quantificação de Vírus Entéricos</i>	58
<i>4.4.2.3.1. Concentração das amostras de água</i>	58
<i>4.4.2.3.2. Extração dos ácidos nucléicos</i>	59

4.4.2.3.3. <i>Síntese de DNA complementar (cDNA)</i>	60
4.4.2.3.4. <i>Deteção por PCR Qualitativa</i>	61
4.4.2.3.5. <i>Visualização dos produtos da PCR Convencional em gel de agarose</i>	64
4.4.2.3.6. <i>Quantificação por PCR Real Time</i>	64
4.4.2.3.7. <i>Cálculo para Conversão em Número de Cópias Genômicas/ml – qPCR</i>	66
4. 5. CONTROLE DE QUALIDADE DOS RESULTADOS	67
4.6. ANÁLISES ESTATÍSTICAS	68
5. RESULTADOS	68
5.1. ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS	68
5.2. ANÁLISES BACTERIOLÓGICAS	73
5.3. DETECÇÃO DE VÍRUS ENTÉRICOS	76
6. DISCUSSÃO	84
6.1. QUALIDADE FÍSICO-QUÍMICA DA ÁGUA	84
6.2. PRESENÇA DE COLIFORMES TERMOTOLERANTES E <i>Enterococcus sp.</i> NA ÁGUA	86
6.3. PRESENÇA DE VÍRUS ENTÉRICOS NA ÁGUA	92
7. CONCLUSÃO	104
8. RECOMENDAÇÕES	106
9. REFERÊNCIAS	106

1. INTRODUÇÃO

A expansão da população mundial e a formação dos grandes centros urbanos tem contribuído para a deterioração do meio ambiente, com o desmatamento de florestas, aterramento de manguezais, poluição do ar, contaminação dos corpos d'água. A geração de águas residuárias nestes centros também é um problema de magnitude crescente, pois a maioria das cidades dos países em desenvolvimento não possui sistema de tratamento de esgoto abrangente, sendo o efluente, então, lançado *in natura* nos corpos d'água próximos. Desta forma, a contaminação dos rios, lagos e mares compromete a qualidade ambiental e se configura em um problema de Saúde Pública, pois contribui para proliferação de vetores e aumento no número de casos de doenças de veiculação hídrica.

No Brasil, o saneamento básico está longe de ser adequado para atender ao crescimento econômico e populacional observado no país nos últimos anos. Segundo resultados da última Pesquisa Nacional de Saneamento Básico – PNSB (2008), a quase totalidade dos municípios brasileiros tem serviço de abastecimento de água em pelo menos um distrito (99,4%). Entretanto, quanto à qualidade e eficiência do serviço de esgotamento sanitário, os dados da pesquisa para o conjunto do País mostram que houve um avanço muito pequeno na coleta de esgoto sanitário. Na pesquisa realizada em 2000, 52,2% dos municípios tinham serviço de coleta, já em 2008 esse percentual passou para 55,1% dos municípios apresentando esse serviço (IBGE, 2011).

Com a falta de infra-estrutura adequada, o esgoto gerado nos grandes centros urbanos está sendo lançado em corpos d'água próximos sem qualquer tipo de tratamento prévio, contaminando áreas importantes como rios, córregos e os manguezais. O lançamento de esgoto causa impactos ambientais significativos, além de problemas de saúde e sociais na população que vive da pesca ou da caça/coleta de mariscos ou que utilizam o ambiente como forma de lazer.

Em Vitória, capital do Espírito Santo, a ocupação desordenada ocorrida em diversas áreas do município provocou grande deterioração de seus aspectos naturais, principalmente a degradação das áreas costeiras. A Ilha das Caieiras, pertencente ao complexo demográfico da Grande São Pedro, é um exemplo disso. Nesta região destacam-se as atividades pesqueira e de caça/coleta de mariscos e o seu processamento, realizadas por cooperativas como dos catadores e das desfiadeiras de siri. Estas atividades representam a principal fonte de renda de muitas famílias da

região, que também possui grande número de restaurantes especializados em frutos do mar, atraindo pessoas de toda a Grande Vitória (PMV, 2012). Contudo, a falta de infra-estrutura e de saneamento nos bairros adjacentes ao manguezal, além da falta de informação dos moradores da região, têm contribuído com a contínua degradação deste importante ecossistema. A poluição de rios que deságuam na Baía de Vitória, como os rios Santa Maria da Vitória e Bubu, que recebem efluentes contaminados ao longo de seus leitos, também contribui para a degradação da qualidade dos manguezais na baía (JESUS, 2004; HABTEC, 1997).

A poluição dos corpos d'água tem reduzido a qualidade da água e dos mariscos dela extraídos, além de elevar a taxa de incidência de surtos de doenças de veiculação hídrica, como a diarreia, na população (AN et al. 2002; APPLETON, 2000; BARRELLA et al., 2009; BOSH, 1998; FORMIGA-CRUZ et al., 2002; UHNOO et al., 1984). Os vírus entéricos humanos, patógenos mais comuns associados a gastroenterites em todas as idades, são responsáveis por numerosos surtos não-bacterianos transmitidos pela água e por alimento contaminados por fezes. Os vírus envolvidos nestes surtos são, geralmente, os rotavírus (RVs), norovírus (NoVs), adenovírus (AdVs), sapovírus (SaVs) e astrovírus (AstVs) que, após a sua replicação no trato gastrointestinal humano, são excretados junto com as fezes. Os vírus são a causa de morbidades e mortalidades em todo o mundo e podem ser transmitidos pelo ar, água, alimentos e pelo contato direto com fluidos corporais contaminados. Eles podem penetrar no organismo por diversas vias, como pelo trato respiratório e pela rota fecal-oral. A resistência destes microrganismos às condições adversas do ambiente faz com que a transmissão via fecal-oral seja facilitada (ALLARD et al., 1992; ESTES & COHEN, 1989; KOOPMANS et al., 2002; KOOPMANS & DUIZER, 2004; KUKKULA et al., 1997; VAN HEERDEN et al., 2005; WHO, 2006)

Os testes comumente realizados para monitoramento ambiental detectam bactérias entéricas, mas não detectam vírus. Desta forma, a água e os mariscos podem ser considerados livres de contaminação bacteriana, mas esconder a contaminação por vírus entéricos provenientes de esgotos. Como a Baía de Vitória e o manguezal da Ilha das Caieiras recebem grande aporte de esgoto *in natura* proveniente das áreas circunvizinhas, a detecção da presença de microrganismos indicadores de poluição fecal é importante para verificar a qualidade de suas águas e estudar possíveis organismos causadores de doenças, determinando, assim, a qualidade sanitária destes ambientes. Neste trabalho foram realizadas análises da presença de bactérias

bioindicadoras de poluição fecal (Coliformes Termotolerantes e *Enterococcus sp.*) e detecção, quantificação e qualificação de vírus entéricos (adenovírus, rotavírus e norovírus). No país ainda há poucos estudos sobre a qualidade virológica da água de estuários, sendo a realização deste trabalho importante, então, para servir de base para futuros trabalhos sobre esta temática.

A prefeitura de Vitória iniciou, em parceria com a Companhia Espírito Santense de Saneamento – CESAN, um projeto de implantação de sistema de esgotamento sanitário que beneficiará cerca de vinte e dois bairros da região, incluindo a Ilha das Caieiras, as regiões de Santo Antônio, São Pedro e bairros adjacentes. Este projeto iniciou-se em 2008, e a previsão é de 100% de cobertura de esgoto tratado até 2012 em todos os bairros do município. Desta forma, é importante ter o registro da atual condição sanitária dos estuários da cidade para futura avaliação da amortização dos impactos dos esgotos domésticos lançados na Baía de Vitória antes e após a implantação do sistema de tratamento de esgoto.

2. OBJETIVOS

2.1. GERAL

Detectar e quantificar vírus entéricos e indicadores bacteriológicos de poluição fecal em amostras de água na região da Ilha das Caieiras, na Baía de Vitória, ES.

2.2. ESPECÍFICOS

- Avaliar a qualidade microbiológica da água do estuário da baía de Vitória, na região da Ilha das Caieiras, a partir da detecção de bactérias indicadoras de poluição fecal (Coliformes Termotolerantes e *Enterococcus sp.*);

- Avaliar a presença de vírus entéricos (adenovírus, rotavírus e norovírus) na água utilizando-se a técnica de biologia molecular PCR Convencional;
- Quantificar a carga viral de adenovírus, rotavírus e norovírus presentes na água do estuário da região da Ilha das Caieiras utilizando a técnica de biologia molecular PCR *Real Time* (PCR em Tempo Real);
- Comparar os resultados das análises microbiológicas encontrados com os parâmetros físico-químicos avaliados no estuário.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. BAÍA DE VITÓRIA – O SISTEMA ESTUARINO E O MANGUEZAL

A Baía de Vitória (Figura 1) localiza-se na costa Atlântica da América do Sul, no Brasil, entre as coordenadas S20°15'/W040°22' e S20°20'/W040°16', fazendo parte de um complexo sistema estuarino tropical localizado no estado do Espírito Santo. Esta Baía abriga diversas ilhas: a principal, hoje denominada Ilha de Vitória; Ilha das Cobras; Ilha da Fumaça; Ilha das Pombas; Ilha da Pólvora e Ilha do Cal. Muitas de suas ilhas originais perderam esta característica de individualidade, tendo sido incorporadas à ilha principal. É o caso da antiga Ilha do Príncipe; outras, menores, tiveram destino semelhante (NUNES, 2005).

Este sistema estuarino é formado pelo deságue de vários rios, sendo o rio Santa Maria da Vitória (Rio Santa Maria) de médio porte, e os rios Formate-Marinho, Bubu, Aribiri, Córrego Piranema e o Canal da Costa de pequeno porte. A vazão média anual do rio Santa Maria, principal contribuinte de água doce para a Baía de Vitória, é de 15,7 m³/s, com médias mensais variando entre 8,1 e 25,6 m³/s (SANTOS, 1994). Contudo, o rio Santa Maria está em situação de degradação, recebendo grande aporte de nutrientes de esgotos domésticos e industriais e efluentes das atividades agropecuária do seu entorno (CAUS & GORZA, 2008).

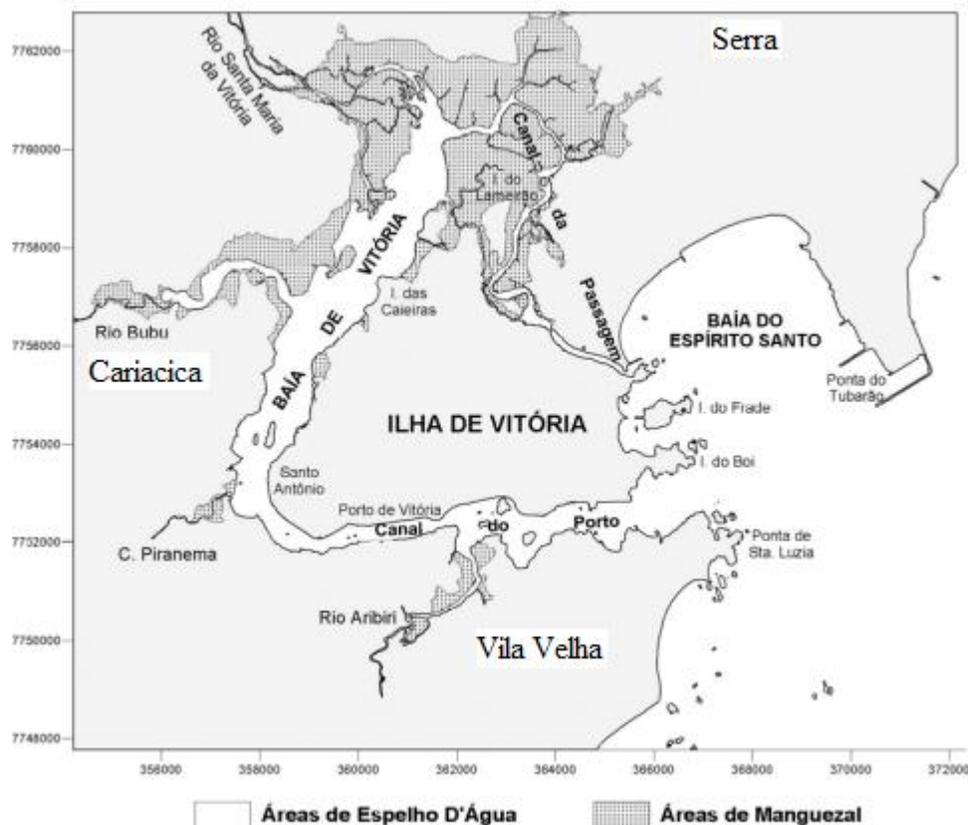


FIGURA 1 – Sistema estuarino da Baía de Vitória e da Baía do Espírito Santo. Destaque para as áreas de manguezal da Baía de Vitória.

FONTE: VERONEZ et. al., 2009.

Comparando-se a vazão do Rio Santa Maria, estima-se que a soma da vazão média anual de todos os outros contribuintes não ultrapasse $3,0 \text{ m}^3/\text{s}$. Dentre estes, o rio Marinho é o que tem a maior contribuição, enquanto que os rios Bubu e Aribiri são córregos que desembocam na baía, com pequenas bacias contribuintes, bastante influenciados pela maré e com manguezais em suas desembocaduras (RIGO, 2004).

A Baía de Vitória estende-se desde a desembocadura do Rio Santa Maria da Vitória até a Baía do Espírito Santo, contendo o Porto de Vitória e seu canal de acesso. A largura varia desde 1,60 km na região da Ilha das Caieiras, onde a profundidade é menor (cerca de 4 m na parte mais profunda) até 160 m em frente ao Morro do Penedo na região do Porto de Vitória, onde a profundidade alcança 24 m (RIGO, 2004). Em muitos pontos ao longo da Baía são encontradas

áreas de manguezal, tanto nos municípios de Vitória, Cariacica, Vila Velha e Serra, destacando-se a porção norte do município de Vitória.

O manguezal é um ecossistema costeiro que ocorre em regiões tropicais e subtropicais, ocupando as áreas entremarés. Sua vegetação é adaptada às condições limitantes de salinidade, substrato inconsolidado e pouco oxigenado e freqüente submersão pelas marés (SOARES, 1997). Este ecossistema é considerado área de preservação permanente, segundo a Lei Federal nº. 4.771/65, e reserva biológica “em toda a sua extensão”, segundo a Resolução CONAMA nº 004/85, do Ministério do Meio Ambiente (ALMEIDA, 2007). Entretanto, estes ecossistemas vêm sofrendo com impactos ambientais decorrentes de aterros e de lançamento contínuo de efluentes domésticos e industriais devido à expansão populacional das cidades. Até meados da década de 1970, a região noroeste de Vitória resumia-se a uma pequena colônia de pescadores chamada Ilha das Caieiras e, a partir de 1977, com o aumento da migração para cidade, essa região se tornou alternativa de moradia para os imigrantes que estavam em busca de melhores empregos e condições de vida (KLUG *et. al.*, 2002). Em diversas partes da Baía, os manguezais foram aterrados e transformados em bairros, com grande ocupação populacional.

Os manguezais são reconhecidos como ecossistemas-chave, sendo considerados verdadeiros celeiros biológicos, abrigando espécies típicas desses sistemas, podendo ainda ser tratados como recurso renovável finito, quando se considera a sua produção natural, ou como um recurso não renovável, quando substituídos por aterros, lixões, empreendimentos imobiliários ou distritos industriais (MACIEL, 1991).

A vegetação é o traço mais típico dos manguezais (figura 2). Segundo Carmo (apud RIGO, 2004), estes manguezais são constituídos por *Rhizophora mangle* (aproximadamente 60%), *Laguncularia racemosa* (aproximadamente 30%) e *Avicennia schaueriana* (aproximadamente 10%), não havendo zanação rígida destas espécies. As características estruturais e funcionais das florestas de mangue são determinadas pela interação de características ambientais, que atuam em escalas global, regional e local. Todavia, estas áreas vem sendo submetidas a forte influência de atividades humanas. Segundo Nunes (2005), as alterações antrópicas dos contornos do sistema estuarino da Baía de Vitória provocaram a perda de 40% da área de manguezal e 10% da área de espelho d'água deste ambiente.



FIGURA 2 – Vista parcial de mangue do sistema estuarino da Ilha das Caieiras, da Baía de Vitória.

3.2. ILHA DAS CAIEIRAS

A Ilha das Caieiras localiza-se no município de Vitória, limitada ao norte e a oeste com a Baía de Vitória, ao sul e a leste com os bairros de Santo André e São Pedro, respectivamente. De acordo com a Prefeitura Municipal de Vitória, a Ilha das Caieiras está inserida na Região VII (figura 3), fazendo parte do complexo demográfico da “Grande São Pedro”. A região VII compreende 10 bairros (Comdusa, Conquista, Ilha das Caieiras, Nova Palestina, Redenção, Resistência, São José, Santo André, São Pedro e Santos Reis), numa área aproximada de 3.600.782 m². A Grande São Pedro é a região mais carente de Vitória e de povoação mais recente, com o surgimento dos bairros a partir da ocupação do lixão da cidade e da invasão de áreas de manguezal, no final da década de 70 (PREFEITURA DE VITÓRIA, 2010).

A ocupação da Ilha das Caieiras teve início na década de 20 do século passado. O bairro tem suas raízes na implantação da fábrica de cal Boa Esperança e no transporte do café produzido nas fazendas de Santa Leopoldina que, utilizando os rios Santa Maria e Bubu, desembocava frente à Ilha, fazendo desta um ponto de parada antes de alcançar o Porto de Vitória. A origem do nome do bairro se deve a dois fatores característicos: um geográfico e outro histórico. Geograficamente, no início de sua ocupação, a área estava cercada por manguezais que por

ocasião das marés altas lhe conferia um aspecto insular. Historicamente, a expressão “caieiras” significa fábrica de cal ou forno onde se calcina a pedra calcária para se fazer a cal (PREFEITURA DE VITÓRIA, 2010).



FIGURA 3 – Subdivisão da Grande São Pedro, denominada de Região VII pela Prefeitura Municipal de Vitória.

FONTE: PREFEITURA MUNICIPAL DE VITÓRIA (2010).

A ocupação desordenada da Grande São Pedro afetou diretamente a Ilha das Caieiras, provocando uma grande deterioração dos aspectos naturais da área, principalmente a degradação

do manguezal, reduzindo-se a biodiversidade e a qualidade de vida da população do entorno (PMV, 2012).

Atualmente, a região da Ilha das Caieiras é referência capixaba em frutos do mar, com diversos restaurantes especializados em mariscos e com grande parcela da população vivendo da pesca e caça/coleta de peixes, siris, sururus, etc. Contudo, a região estuarina recebe grande aporte de esgoto doméstico *in natura*, sendo de grande importância sanitária conhecer a qualidade microbiológica da água de onde são retirados os mariscos que são servidos como alimentos.

3.3. A CONTAMINAÇÃO DA ÁGUA E A LEGISLAÇÃO VIGENTE

O lançamento de esgoto *in natura* em corpos d'água tem se mostrado um problema global, principalmente nos grandes centros urbanos, visto que o esgoto doméstico pode conter organismos patogênicos, liberados nas fezes de pessoas infectadas, e contaminar o meio ambiente. Alguns microrganismos podem sobreviver a longos períodos no ambiente e representam riscos para a saúde pública, relacionados a surtos de doenças de veiculação hídrica, como a diarreia e a hepatite A. Em países em desenvolvimento, a diarreia é o principal problema de saúde pública (BARRELLA et al., 2009; SUBEKATI et al., 2002; UNICEF & WHO, 2009).

As áreas costeiras são potencialmente afetadas pelo influxo de águas contaminadas, tais como rios ou esgoto sem tratamento ou com tratamento ineficiente (RIOU et al., 2007). Como estas regiões são povoadas, a qualidade sanitária do ambiente aquático em zonas costeiras é importante, pois a população tem contato direto ou indireto com a água, seja para recreação, cultivo de moluscos ou outras atividades pesqueiras. Assim, é necessário o constante monitoramento da contaminação nesses locais, visto que a poluição fecal representa um risco elevado à saúde pública. Embora a detecção de indicadores bacteriológicos de contaminação fecal seja simples, sua ocorrência não correlaciona necessariamente à presença de patógenos virais, nem podem fornecer informações da potencial origem da contaminação ambiental (CALGUA et al., 2008; RIGOTTO, 2009).

A costa brasileira abriga um mosaico de ecossistemas de alta relevância ambiental. Ao longo do litoral brasileiro podem ser encontrados manguezais, restingas, dunas, praias, ilhas, costões

rochosos, baías, brejos, falésias, estuários, recifes de corais e outros ambientes importantes do ponto de vista ecológico, todos apresentando diferentes espécies de animais e vegetais. Os manguezais, de expressiva ocorrência na zona costeira, cumprem funções essenciais na reprodução biótica da vida marinha, mas a construção de casas nestas áreas de alta sensibilidade ambiental e a falta de saneamento básico degradam os ambientes naturais através da poluição orgânica, deposição de sedimentos e deterioração dos habitats naturais. Enfim, os espaços litorâneos possuem riquezas significativas de recursos naturais e ambientais, mas a intensidade do processo de ocupação desordenada vem colocando em risco todos os ecossistemas presentes na costa litorânea do Brasil (GEO BRASIL, 2002; IBAMA, 2012).

Em termos de políticas públicas, apesar de uma série de iniciativas anteriores envolvendo a proteção dos ecossistemas costeiros, em diferentes áreas de atuação do estado (uso e ocupação do solo, saneamento, meio ambiente), o tema passou a ter maior importância no cenário nacional com a promulgação da Constituição de 1988, que declarou a zona costeira como Patrimônio Nacional. A primeira tentativa no estabelecimento de um plano de gestão da zona costeira partiu de uma iniciativa da Comissão Interministerial para os Recursos do Mar (CIRM), em 1980, que instituiu a Política Nacional de Recursos do Mar (PNRM), que visava legalizar a integração entre as diversas políticas nacionais setoriais relacionadas ao ambiente oceânico e costeiro. Mais tarde, em 1988, foi instituído o marco legal da gestão costeira, com a promulgação da lei nº 7.661/88 que institui o Plano Nacional de Gerenciamento Costeiro, PNGC, regulamentada pelo Decreto nº 5.300/2004. Este Decreto prevê o zoneamento de usos e atividades na zona costeira, dando prioridade à conservação e proteção dos manguezais, entre outros. Apesar de sua regulamentação ocorrer somente em 2004, duas versões PNGC I e PNGC II foram apresentadas, nos anos de 1990 e 1997, respectivamente. O PNGC I incluía Planos de Ação que abrangia os planos de manejo de microbacias, a serem desenvolvidos pelos estados e municípios, com a participação das comunidades costeiras e implantados em nível local. O PNGC II introduziu como uma importante orientação, a acentuação do nível de atuação federal, pouco contemplada no plano anterior. No escopo do PNGC II, incluiu-se a criação do Grupo de Integração do Gerenciamento Costeiro (GI-GERCO), coordenado pelo Ministério do Meio Ambiente (PEREZ et al., 2009).

No Brasil, o manguezal é protegido por legislação federal, devido à importância que representam para o ambiente marinho. Este ecossistema é considerado área de preservação permanente (Lei Federal nº. 4.771, 15/09/65) e reserva biológica, “em toda a sua extensão” (Resolução

CONAMA, nº 004, 18/09/85). Em 1986, a Prefeitura de Vitória/ES criou a Reserva Biológica Municipal Ilha do Lameirão (Lei 3326/86) sendo posteriormente transformada em Estação Ecológica Ilha do Lameirão (Lei 3377/86), no intuito de preservar e proteger ecossistemas e recursos naturais ao norte da Baía de Vitória.

Visando garantir a qualidade dos corpos d'água, instituiu-se no Brasil a Resolução CONAMA nº 357/2005, que dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e outras providências. Conforme esta legislação, a água da área de manguezal da Ilha das Caieiras é salobra, enquadrada como corpo d'água classe 1 e com uso destinado à recreação de contato primário, pesca, entre outros. Para esta Resolução, “o enquadramento dos corpos de água deve estar baseado não necessariamente no seu estado atual, mas nos níveis de qualidade que deveriam possuir para atender às necessidades da comunidade” (BRASIL, 2005).

O Art. 21 da Resolução CONAMA nº 357/2005 preconiza as condições e padrões de coliformes termotolerantes em água salobras de classe 1, conforme quadro 1 a seguir.

USO DA ÁGUA SALOBRA CLASSE 1	CONDIÇÕES E PADRÕES DE COLIFORMES TERMOTOLERANTES
Recreação de contato primário	Deverá ser obedecida a Resolução CONAMA no 274, de 2000.
Cultivo de moluscos bivalves destinados à alimentação humana	A média geométrica da densidade de coliformes termotolerantes, de um mínimo de 15 amostras coletadas no mesmo local, não deverá exceder 43 por 100 mililitros, e o percentil 90% não deverá ultrapassar 88 coliformes termotolerantes por 100 mililitros. Esses índices deverão ser mantidos em monitoramento anual com um mínimo de 5 amostras.
Para a irrigação de hortaliças que são consumidas cruas e de frutas que se desenvolvam rentes ao solo e que sejam ingeridas cruas sem remoção de película	Não deverá ser excedido o valor de 200 coliformes termotolerantes por 100 mL.
Irrigação de parques, jardins, campos de esporte e lazer, com os quais o público possa vir a ter contato direto	Não deverá ser excedido o valor de 200 coliformes termotolerantes por 100 mL.
Demais usos	Não deverá ser excedido o limite de 1.000 coliformes termotolerantes por 100 mililitros em 80% ou mais de pelo menos 6 amostras coletadas durante o período de um ano, com frequência bimestral.

QUADRO 1 – Uso da água salobra classe 1 e suas condições e padrões de coliformes termotolerantes, de acordo com a Resolução CONAMA nº 357/2005.

Segundo a Resolução CONAMA n° 357/2005, *E. coli* poderá ser determinada em substituição ao parâmetro coliformes termotolerantes de acordo com limites estabelecidos pelo órgão ambiental competente (BRASIL, 2005).

Considerando as águas que são destinadas à recreação, a Resolução CONAMA 274/2000 dispõe sobre a qualidade requerida para balneabilidade (recreação de contato primário). Nesta resolução, a água tem sua condição avaliada nas categorias própria e imprópria, sendo as águas consideradas próprias subdivididas conforme o quadro 2 (artigo 2° §1°) (BRASIL, 2000).

CATEGORIAS	CONDIÇÕES E PADRÕES MICROBIOLÓGICOS DA ÁGUA
Excelente	Quando em 80% ou mais de um conjunto de amostras obtidas em cada uma das cinco semanas anteriores, colhidas no mesmo local, houver, no máximo, 250 coliformes fecais (termotolerantes) ou 200 <i>Escherichia coli</i> ou 25 enterococos por 100 mililitros.
Muito Boa	Quando em 80% ou mais de um conjunto de amostras obtidas em cada uma das cinco semanas anteriores, colhidas no mesmo local, houver, no máximo, 500 coliformes fecais (termotolerantes) ou 400 <i>Escherichia coli</i> ou 50 enterococos por 100 mililitros.
Satisfatória	Quando em 80% ou mais de um conjunto de amostras obtidas em cada uma das cinco semanas anteriores, colhidas no mesmo local, houver, no máximo 1.000 coliformes fecais (termotolerantes) ou 800 <i>Escherichia coli</i> ou 100 enterococos por 100 mililitros.

QUADRO 2 – Categorias de classificação da água e suas condições e padrões microbiológicos, de acordo com a Resolução CONAMA 274/2000.

Entretanto, os padrões referentes aos enterococos aplicam-se, somente, às águas marinhas (artigo 3° da Resolução CONAMA 274/2000).

Assim, as águas serão consideradas impróprias quando no trecho avaliado for verificada uma das seguintes ocorrências (§ 4°):

a) não atendimento aos critérios estabelecidos para as águas próprias;

- b) valor obtido na última amostragem for superior a 2500 coliformes fecais (termotolerantes) ou 2000 *Escherichia coli* ou 400 enterococos por 100 mililitros;
- c) incidência elevada ou anormal, na Região, de enfermidades transmissíveis por via hídrica, indicada pelas autoridades sanitárias;
- d) presença de resíduos ou despejos, sólidos ou líquidos, inclusive esgotos sanitários, óleos, graxas e outras substâncias, capazes de oferecer riscos à saúde ou tornar desagradável a recreação;
- e) pH < 6,0 ou pH > 9,0 (águas doces), à exceção das condições naturais;
- f) floração de algas ou outros organismos, até que se comprove que não oferecem riscos à saúde humana;
- g) outros fatores que contra-indiquem, temporária ou permanentemente, o exercício da recreação de contato primário.

Nestas Resoluções brasileiras, os indicadores virais ainda não foram incluídos. Entretanto, a Portaria Federal do Ministério da Saúde nº 2914 de 12/12/2011, que revogou a Portaria Federal do Ministério da Saúde nº 518 de 2004, manteve a recomendação de que seja realizado o monitoramento de vírus entéricos no(s) ponto(s) de captação de água proveniente(s) de manancial(is) superficial(is) de abastecimento, com o objetivo de subsidiar estudos de avaliação de risco microbiológico (Art. 29º).

Dentre as principais normas internacionais para qualidade das águas recreacionais destacam-se as legislações americana e europeia. Nos Estados Unidos foi criada Clean Water Act (CWA – Lei da Água Limpa), cujo objetivo é proteger e recuperar as águas para a natação e outras atividades recreativas, e assim proteger o público de doenças associadas com microrganismos na água. Historicamente, a Agência de Proteção Ambiental dos EUA (EPA, sigla do inglês U.S. Environmental Protection Agency) recomenda critérios de qualidade de água ambiental (Ambient Water Quality Criteria – AWQC) baseados em densidades de bactérias indicadoras de contaminação fecal. Na década de 1960, o governo federal recomendou coliformes termotolerantes como critério-base da qualidade da água ambiental para recreação. Em 1986, a EPA passou a recomendar a bactéria *Escherichia coli* (*E. coli*) e os enterococos como critérios-base, utilizados atualmente (EPA, 2010). O AWQC para bactérias estabelece o limite

bacteriológico em águas marinhas para recreação de contato primário, considerando que os “coliformes termotolerantes devem ser usados como organismos indicadores para avaliar a adequação microbiológica de águas recreacionais” (EPA, 1986).

Na Europa, a Diretiva 2006/7/CE, de 15 de Fevereiro de 2006, da Comunidade Económica Europeia (CEE), relativa à gestão da qualidade das águas balneares e que revoga a Diretiva 76/160/CEE, preconiza as concentrações bacteriológicas permitidas para águas de recreação de contato primário (CEE, 2006). A norma europeia, assim como a legislação brasileira, estabelece classes de qualidade da água e adota mais de um parâmetro para cada uma delas. As águas são classificadas como Excelente Qualidade, Boa Qualidade, Qualidade Suficiente e Medíocre e os valores para as contagens microbiológicas baseiam-se no conjunto de dados recolhidos sobre a qualidade das águas balneares para o último período de avaliação registrado. Os conjuntos de dados utilizados nas avaliações da qualidade das águas balneares devem consistir sempre em, pelo menos, 16 amostras, ou, nas circunstâncias especiais, em 12 amostras (CEE, 2006). Os valores apresentados na tabela 1 são aqueles estabelecidos para águas costeiras e de transição.

TABELA 1 – Enquadramento dos valores microbiológicos preconizados pela Diretiva 2006/7/CE para área costeira e de transição.

	A	B	C	D	E
	Parâmetro	Qualidade excelente	Qualidade boa	Qualidade suficiente	Métodos de análise de referência
1	Enterococos intestinais em ufc/100 ml	100 (*)	200 (*)	185 (**)	ISO 7899-1 ou ISO 7899-2
2	<i>Escherichia coli</i> em ufc/100 ml	250 (*)	500 (*)	500 (**)	ISO 9308-3 ou ISO 9308-1

(*) Com base numa avaliação de percentil 95. Ver anexo II.

(**) Com base numa avaliação de percentil 90. Ver anexo II.

Fonte: CEE, 2006.

A Directiva 2006/7/CE, no Artigo 14º, determina que, para fins de revisão da atual legislação, a Comissão europeia deverá apresentar um relatório ao Parlamento Europeu e ao Conselho contendo “outros progressos científicos, analíticos e epidemiológicos pertinentes para os parâmetros relativos à qualidade das águas balneares, incluindo no que se refere aos vírus”.

Assim, espera-se que próxima revisão da Directiva sobre balneabilidade contemple o monitoramento da presença de vírus em água.

3.4. MICRORGANISMOS INDICADORES DE POLUIÇÃO

Os microrganismos são largamente distribuídos na natureza e sua abundância e diversidade podem ser usadas como um indicador para qualificação da água (OKPOKWASILI e AKUJOBI, 1996). A presença de patógenos microbianos em águas poluídas representa um fator de risco considerável para a saúde pública em geral, levando a surtos de doenças de veiculação hídrica e uma alta incidência de morbidade e mortalidade, principalmente em países em desenvolvimento. Os principais patógenos que comumente ocorrem na água e no esgoto são os vírus, as bactérias, os protozoários e os helmintos, sendo que a maioria destes patógenos entéricos é excretada junto à matéria fecal, contamina o meio ambiente e, em seguida, infecta novos hospedeiros pela ingestão de água e/ou alimentos contaminados. Esta forma de contaminação é conhecida como via fecal-oral (SUBEKTI et al., 2002; TOZE, 1999).

As bactérias do grupo coliformes termotolerantes e enterococos fecais são largamente utilizados como indicadores de contaminação fecal da água por humanos e outros animais homeotermos (BORDALO, 1993).

3.4.1. Bactérias indicadoras de contaminação fecal em ambientes marinhos

Os microrganismos indicadores mais utilizados são os coliformes termotolerantes, *Escherichia coli* e os enterococos (ORTEGA et al., 2009). Segundo Bosch (1998), um bom indicador deve preencher os seguintes requisitos: (i) deve ser associado com a origem dos patógenos e deve estar ausente em áreas não poluídas, (ii) deve ocorrer em maior número do que o patógeno, (iii) não deve se multiplicar fora de hospedeiro, (iv) deve ser pelo menos tão resistentes à inativação natural e artificial como o patógeno viral, (v) deve ser detectado por meio de procedimentos simples, rápido e barato, e (vi) não deve ser patogênico.

A concepção de coliformes como indicadores bacteriológicos da qualidade da água é baseada na premissa de que estes microrganismos estão presentes em grande quantidade nas fezes de humanos e de outros animais homeotermos, e que se as fezes entrarem em contato com a água é provável que estas bactérias estarão presentes, mesmo após a diluição significativa. Com poucas exceções, os coliformes em si não são considerados um risco para a saúde, mas sua presença indica que a poluição fecal pode ter ocorrido e patógenos podem estar presentes no meio (STEVENS et al., 2003).

O grupo coliforme compreende bactérias gram-negativas, fermentadoras de lactose, não formadoras de esporos e que se desenvolvem a 37 °C. O grupo dos coliformes termotolerantes (anteriormente denominados coliformes fecais) consiste num subgrupo no qual os organismos toleram temperaturas de até 44,5 °C, com destaque para o gênero *Escherichia*, amplamente estudado por sua utilização como indicadores de contaminação fecal. Na Figura 4 pode-se observar a representação esquemática da distribuição dos microrganismos do grupo coliforme em relação às bactérias de vida livre e patogênicas.

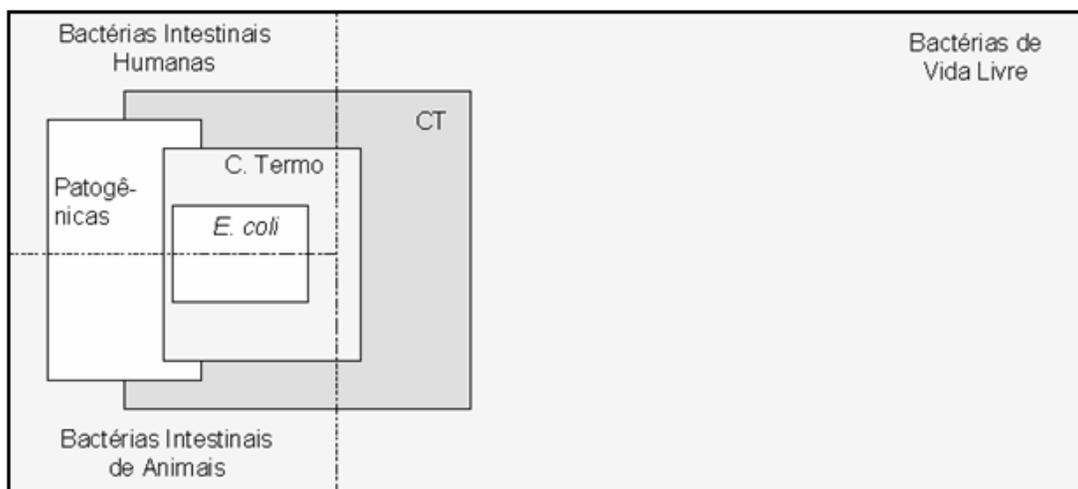


FIGURA 4 – Representação esquemática das bactérias de vida livre, patogênicas e do grupo coliforme: Coliformes Totais (CT) e Coliformes Termotolerantes (C. Termo).

FONTE: VON SPERLING, 2005. Adaptado.

A espécie *Escherichia coli* é um específico indicador de contaminação por fezes de humanos ou animais, visto que sua origem é seguramente fecal. Como este microrganismo está diretamente relacionado a esgotos municipais ou chorume animal, *E. coli* é um importante indicador

bacteriológico da qualidade da água, especialmente em águas que recebem descarga de esgoto. Entretanto, outras bactérias do grupo coliforme também podem ocorrer na água como resultado de escoamento do solo ou do crescimento em decomposição vegetal (NEIL, 2004). *E. coli* também é um indicador da presença de organismos entéricos patogênicos, tendo em vista que a detecção específica e direta destes microrganismos em amostras de água é difícil, em razão de suas baixas concentrações e maior especificidade de metodologia de análise. Contudo, *E. coli* pode não ser um indicador sensível do risco de doenças transmitidas pela água. A presença destes microrganismos é mais representativa da poluição fecal do que outros coliformes, visto que ocorrem em maior número no material fecal e não possuem outra fonte no ambiente (STEVENS et al., 2003; VON SPERLING, 2005).

Assim como as bactérias do grupo coliforme, as bactérias do gênero *Enterococcus sp.* estão presentes normalmente na flora do trato gastrintestinal de humanos e animais homeotermos, além de estarem amplamente distribuídas na natureza (HE & JIANG, 2005). Estas bactérias podem ser encontradas em áreas com contaminação fecal e persistem no meio devido à sua alta tolerância a diversas condições ambientais, sendo, por isso, utilizadas como indicadores de contaminação fecal em águas marinhas. Este grupo é bastante heterogêneo e inclui mais de trinta espécies diferentes, sendo duas espécies patogênicas em humanos: *Enterococcus faecalis* (*E. faecalis*) e *E. faecium*, com infecções ocasionais sendo causadas por *E. durans*, *E. gallinarum*, *E. casseliflavus*, *E. avium*, *E. hirae*, *E. mundtii* e *E. raffinosus* (CUPÁKOVÁ & LUKÁSOVÁ, 2003; DEVRIESE et al., 1993; PATEL et al., 1998; HE & JIANG, 2005; PANGALLO et al., 2008; SVEC & SEDLÁÈEK, 1999; TEJEDOR JUNCO et al., 2011).

Os enterococos têm capacidade de crescer na presença de 6,5% de cloreto de sódio, a pH 9,6 e nas temperaturas de 10 e 45°C, e podem sobreviver por períodos mais longos em ambientes adversos, quando comparados aos coliformes termotolerantes. Entretanto, a luz, principalmente a ultravioleta, a temperatura, a salinidade e a competição tem efeitos deletérios tanto em enterococos quanto em coliformes (BORDALO, 1993; OKPOKWASILI e AKUJOBI, 1996; EL-SHARKAWI et al., 1989; EVISON, 1989; LIM e FLINT, 1989; GONZALES et al., 1990; MEZRIOUI et al., 1995(FIGUERAS et al., 1997).). Pangallo et al. (2008) observaram que os enterococos ambientais raramente contêm fatores de virulência e, portanto, não são considerados uma ameaça à saúde humana.

Noble e colaboradores (2003) monitoraram a qualidade microbiológica de amostras de água provenientes da costa da Califórnia (EUA), mas os resultados não permitiram concluir qual microrganismo (coliformes totais, termotolerantes ou enterococos) era mais adequado para o monitoramento da qualidade da água naquela região. Quando comparados aos coliformes termotolerantes, os enterococos são capazes de sobreviver por mais tempo no ambiente marinho e são mais resistentes aos processos de tratamento de efluentes, havendo boa correlação deste microrganismo com a presença de bactérias patogênicas presentes na água. Por este motivo, o estado da Califórnia (EUA) incorporou a enumeração de enterococos aos métodos tradicionais para determinação da qualidade de água recreacional (CHOI & JIANG, 2005; NOBLE et al., 2003).

3.4.2. Vírus entéricos

A presença de bactérias indicadoras não está necessariamente correlacionada à presença de vírus, que são mais estáveis do que as bactérias no ambiente. Como resultado, a água pode ser considerada livre de contaminação bacteriana, mas pode estar contaminada com vírus entéricos derivados de esgoto (CALGUA et al., 2008; SDIRI-LOULIZI et al., 2010).

Os vírus de maior relevância encontrados em ambientes contaminados por esgoto sanitário são os vírus entéricos humanos (OMS, 2006). Existem 150 tipos de vírus entéricos humanos transmitidos pela rota fecal-oral e alguns são excretados em grande quantidade (aproximadamente 10^8 a 10^{11} partículas/g de fezes) (RAO & MELNICK apud BARRELLA et al., 2009; UHNOO et al., 1984). As práticas atuais de tratamento de água não conseguem assegurar a completa remoção de patógenos virais e estes estão presentes em grande número no esgoto bruto. O tipo de tratamento empregado para tratamento do esgoto determina a concentração de patógenos no efluente final (RAO & MELNICK apud BOSCH, 1998). Os vírus associados aos sólidos presentes nos efluentes de águas residuárias são descarregados em ambientes aquáticos e se acumulam nos sedimentos, onde persistem por mais tempo do que na coluna de água (SMITH et al., 1978).

Devido ao seu pequeno tamanho (80 nm), os vírus são muito difíceis de serem removidos por filtração e, por isso, muitos pesquisadores recomendam a captura de vírus da água por carga eletrostática. Tipicamente, a remoção de tais exige redução do pH da água de modo que os vírus

se tornam positivamente carregadas. Estes vírus com carga positiva são passados através de um filtro de carga negativa, que retém os vírus (SOLO-GABRIELE et al., 2008).

Os vírus entéricos estão associados com muitos surtos de gastroenterites de veiculação hídrica e são de grande importância para a saúde pública. Além de gastroenterites, também são responsáveis por hepatites, conjuntivites, meningites e outros agravos à saúde (tabela 2) e alguns podem persistir no ambiente por longos períodos por serem resistentes a condições desfavoráveis (HEDBERG & OSTERHOLM apud GILGEN et al., 1997). Após se replicarem no trato gastrointestinal do hospedeiro, os vírus entéricos são excretados no esgoto e podem ser dispostos no meio ambiente (esgoto *in natura* ou após processo de tratamento) (BLOCK & SCHWARTZBROD, apud GILGEN et al., 1997).

A persistência, a infecciosidade e o tempo de sobrevivência dos vírus no ambiente dependem de vários fatores, como temperatura, luz solar (UV), umidade relativa do ar (UR), pH, tipo de superfície, adsorção a sólidos, características estruturais das partículas (tamanho e ausência de envelope) e presença de nutrientes e outros microrganismos (SAIR et al., 2002; AZADPOUR et al., 2003; FONG & LIPP, 2005).

TABELA 2 – Doenças causadas por vírus entéricos humanos de veiculação hídrica.

GÊNERO	NOME POPULAR	DOENÇAS CAUSADAS
<i>Enterovirus</i>	Poliovírus	Paralisia, meningite, febre
	Ecovírus	Meningite, febre, doenças respiratórias, agitação, Gastroenterite
<i>Hepatovirus</i>	Hepatite A	Hepatite
<i>Rotavirus</i>	Rotavírus humano	Gastroenterite
	Adenovírus humano	Gastroenterite, doenças respiratórias, conjutivites
<i>Mastadenovirus</i>	Calicivírus humano	Gastroenterite
<i>Calicivirus</i>	Norovírus	Gastroenterite, febre
	Hepatite E	Hepatite
	Astrovírus humano	Gastroenterite
<i>Astrovirus</i>	Parvovírus humano	Gastroenterite
<i>Parvovirus</i>	Coronoavírus humano	Gastroenterite, doenças respiratórias
<i>Coronavirus</i>	Torovírus humano	Gastroenterite
<i>Torovirus</i>		

FONTE: BOSCH, 1998. Adaptado.

O destino dos patógenos entéricos quando atingem o meio ambiente pode assumir muitas rotas potenciais. Os seres humanos estão expostos a vírus entéricos através de várias rotas: mariscos

cultivados em águas contaminadas, alimentos cultivados em terra irrigada com águas residuárias e / ou fertilizadas com esgotos, águas de lazer poluídas com esgoto e água potável contaminada (figura 5). Geralmente, as infecções transmitidas pela água são adquiridas pela ingestão de água contaminada ou marisco.

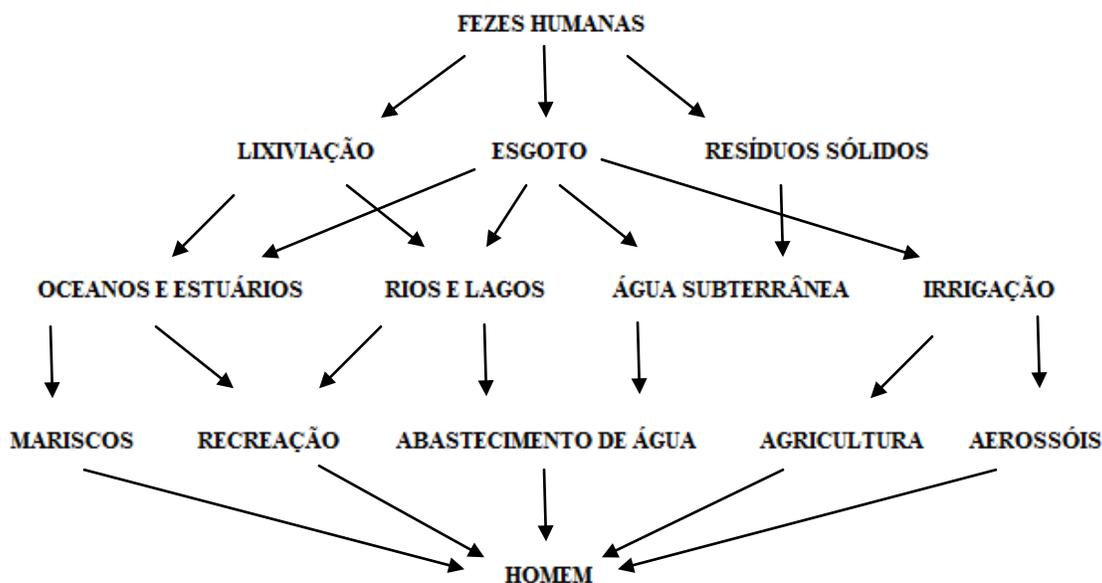


FIGURA 5 – Possíveis rotas de transmissão de vírus entéricos a partir de fezes humanas.
Fonte: RAO & MELNICK apud. BOSCH, 1998. Adaptado.

Ao contrário da qualidade bacteriológica, a qualidade virológica da água não é rotineiramente analisada em muitos países. Isso se dá em razão da disponibilidade de métodos de concentração viral de baixa eficiência de recuperação e de métodos de detecção pouco sensíveis, onerosos e de complexa implantação.

Entre os vírus entéricos mais importantes, transmitidos ao homem pela água e alimentos, estão os norovírus, rotavírus, adenovírus, astrovírus, enterovírus e os vírus da hepatite A e E (LEES, 2000).

3.4.2.1. Adenovírus

O adenovírus (AdV) é um vírus de simetria icosaédrica, sem envelope, pertencente à família *Adenoviridae*, e que infecta uma ampla gama de espécies de vertebrados (DAVISON et al. 2003; ICTV apud GARRAFA, 2009). Com aproximadamente 80 nm de diâmetro, este vírus é o único com seu material genético condicionado em dupla fita de DNA, dentre os vírus entéricos patogênicos (LEES, 2000; HE & JIANG, 2005). A sua estrutura externa é formada por 252 capsômeros, sendo 240 hexons, que formam as faces do icosaedro, e 12 pentons, que formam os vértices (figura 6). O penton consiste em duas estruturas distintas: a base e a fibra. A fibra associada a cada base do Penton permite que o vírus se ligue às células humanas usando o receptor espécie-específico do adenovírus (JIANG, 2006).

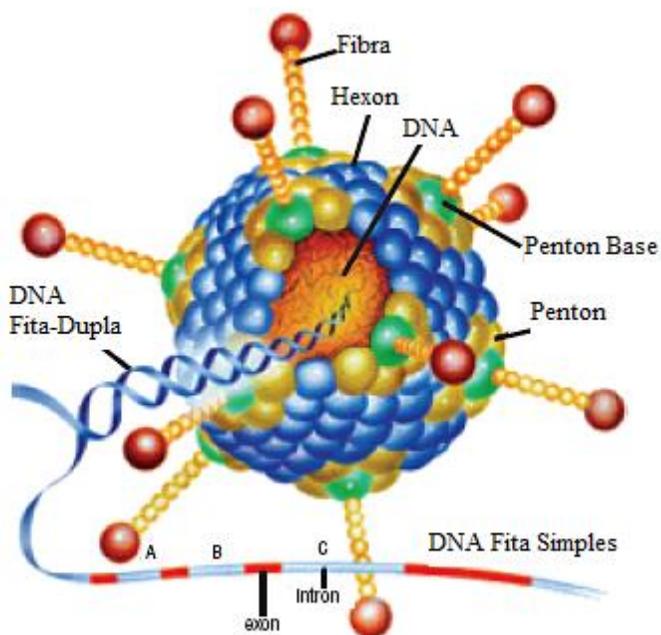


FIGURA 6 – Partícula de Adenovírus, destacando a fibra associada a cada base do Penton, permitindo que o vírus se ligue às células humanas usando o receptor espécie-específico.

FONTE: < [http://www.iavireport.org/archives/2007/Pages/IAVI-Report-11\(1\)-and-the-winner.aspx](http://www.iavireport.org/archives/2007/Pages/IAVI-Report-11(1)-and-the-winner.aspx)>

Foram identificados 51 sorotipos diferentes de adenovírus humanos (HAdV), classificados em seis subgêneros (subgêneros de A ao F) com base em vários critérios bioquímicos e biofísicos (MURPHY et al.; WADELL et al. apud ALLARD, 2001). Os adenovírus são altamente

prevalentes na população humana (VOGELS et al., 2003) e a transmissão pode ser por contato direto de pessoa para pessoa, principalmente entre as crianças, em que a rota fecal-oral é mais comum. Também é possível a transmissão por aerossol (via aérea) em locais com aglomerados populacionais. Os HAdV são responsáveis por infecções persistentes e ocorrência de surtos associados à exposição à água potável e recreacionais contaminadas (KUKKULA et al., 1997; VAN HEERDEN et al., 2005). Após os rotavírus, os adenovírus são os mais importantes patógenos virais causadores de gastroenterites em crianças (ALLARD et al., 1992; CRABTREE et al., 1997; FONG & LIPP, 2005; HÁRSI et al., 1995).

Os adenovírus também são responsáveis por doenças no trato respiratório, gastrointestinal e urinário, infecções oculares e, ocasionalmente, pode levar a doenças mais graves que afetam o cérebro, coração, rins ou fígado, especialmente em indivíduos imunodeficientes (GONÇALVES & DE VRIES, 2006; KOJAOGHLANIAN et al., 2003). Segundo pesquisa realizada por Allard e colaboradores (2001), as infecções por adenovírus ocorrem durante todo o ano, e há pouca ou nenhuma variação sazonal.

Estudos realizados por Enriquez et al. (1995), Gerba et al. (2002a) e Gerba et al. (2002b) concluíram que os adenovírus são estáveis, resistentes a temperaturas e radiação ultravioleta e podem sobreviver por períodos prolongados no meio ambiente.

3.4.2.2. Norovírus

Norovírus (NVs) é a denominação oficial do gênero de vírus previamente descrito como Norwalk-like vírus, pertencem à família *Caliciviridae* e possuem simetria icosaédrica (figura 7). Até recentemente os NVs eram conhecidos como calicivírus, devido a sua relação com a família *Caliciviridae*, e também como Small Round Structured Viruses (SRSV), devido suas características morfológicas. Estes vírus medem entre 27 e 30 nm, não são envelopados e nem cultiváveis e possuem estrutura simples: um capsídeo e o ácido nucléico. O material genético está contido em uma fita simples de RNA, organizada em três “quadros de leitura aberta” (*open reading frames* – ORF), no qual ORF1 codifica proteínas não estruturais, ORF2 codifica a principal proteína estrutural (VP1) e ORF3 codifica uma proteína pequena do capsídeo associada à estabilidade de VP1 (ATMAR & ESTES, 2006; BEURET, 2002; KOOPMANS et al., 2002; GARRAFA, 2009; LIU et al., 2007).

Com base em comparações com as seqüências genéticas da RNA polimerase dependente de RNA e com proteínas do capsídeo, os norovírus foram subdivididos em cinco genogrupos (GI ao GV). Os dois maiores genogrupos, GI e GII, incluem os norovírus mais comuns e diversos (ANDO et al., 2000; PANG et al., 2005; ZHENG et al., 2006).

Os norovírus são responsáveis pela maioria dos surtos de diarreia não-bacteriana em todas as idades e também têm sido associados aos surtos causados por água e alimentos contaminados. Estes vírus podem ser transmitidos de forma direta, pelo contato pessoa-pessoa, ou indiretamente, via água, alimentos e ambientes contaminados. Aparentemente, a transmissão entre pessoas é a rota mais comum de infecção (KOOPMANS et al., 2002; KOOPMANS & DUIZER, 2004).

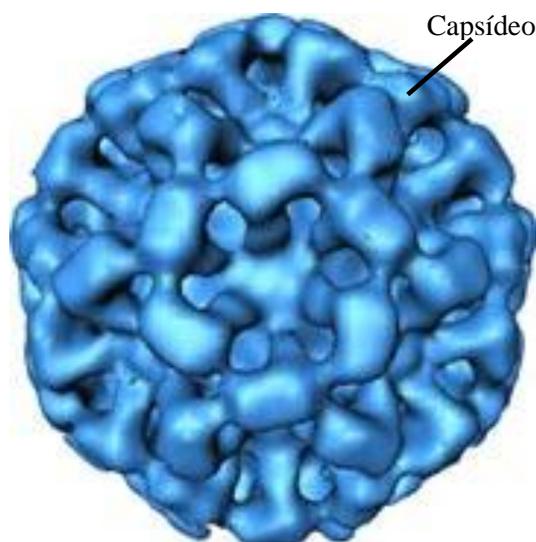


FIGURA 7 – Representação esquemática de um norovírus.

Fonte: <http://www.foodpoisonjournal.com/food-poisoning-information/fda-approves-of-first-early-detection-norovirus-test/>

Altamente infecciosos e estáveis, os norovírus são mais resistentes às técnicas de desinfecção que a maioria das bactérias e outros agentes virais, tais como níveis de cloro inferiores a 10 ppm, congelamento por anos e aquecimento a 60°C por 30 minutos. Entretanto, a temperatura de cozimento (ebulição ou acima) é, provavelmente, adequada para inativação dos norovírus e da maioria dos vírus entéricos patogênicos. Entre os vírus entéricos, os norovírus são os mais resistentes à inativação por cloro, permanecendo viáveis em águas tratadas com cloro em

concentrações de 3,75 mg/L a 6,26 mg/L, normalmente usadas no tratamento de água potável. Também podem persistir no meio ambiente, sendo proposto que podem circular no ambiente em pequeno número em uma população até que um indivíduo infectado contamine uma fonte comum de água ou alimento, resultando em surto explosivo (APPLETON, 2000; BARRELLA, 2008; LEBARON et al, 1990).

3.4.2.3. Rotavírus

Os rotavírus (RV) pertencem à família Reoviridae, gênero *Rotavirus*, cuja morfologia é esférica, semelhante a uma roda radiada (do latim “*rota*”, significa roda) (figura 8). Estes vírus não são envelopados e possuem simetria cúbica, com diâmetro de aproximadamente 72 nm (FAUQUET et al. apud NISHIDA, 2009; GLASS et al., 2006).

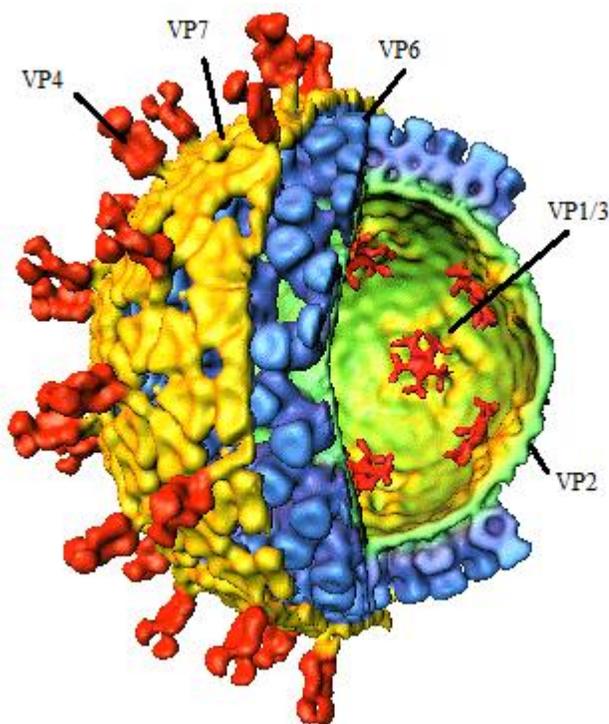


FIGURA 8 – Partícula de rotavírus. Localização de proteínas e visualização tridimensional.

FONTE: <http://www.reoviridae.org/dsRNA_virus_proteins/Rotavirus.htm>

Os vírus pertencentes a este grupo possuem um capsídeo icosaédrico de 3 camadas protéicas, não envelopadas, com 60 espículas protéicas e seu material genético é um RNA de fita dupla, constituído de 11 segmentos e tamanho aproximado de 18.000 pares de base. Das doze proteínas dos rotavírus, seis são estruturais, denominadas VP (do inglês “viral protein”), sendo elas VP1, VP2, VP3, VP4, VP6 e VP7, e outras seis não estruturais, NSP (no inglês “Non-structural protein”), a NSP1, NSP2, NSP3, NSP4, NSP5 e NSP6 (ESTES & KAPIKIAN apud NISHIDA, 2009; GLASS et al., 2006). A camada mais interna, core, é formada pela proteína VP2 e envolve o genoma viral. A camada intermediária, capsídeo interno, é composta pela proteína VP6, enquanto que a camada mais externa, capsídeo externo, é constituída pelas proteínas VP4 e VP7 (ESTES apud CIARLE & ESTES, 1999).

Os rotavírus são classificados em sete sorogrupos de A a G, reconhecidos com base na especificidade antigênica da proteína VP6. O grupo A é o mais comum dos rotavírus humanos e é ainda classificado em sorotipos e/ou genotipos. Os sorotipos G ou P são determinados pela reatividade do vírus em ensaios de neutralização com base nas proteínas VP7 ou VP4 do capsídeo, respectivamente. Os genotipos P ou G são determinados por seqüenciamento, amplificação ou hibridização dos genes 4 ou 9 que codificam as proteínas VP4 ou VP7 (KAPIKIAN & CHANOCK apud TAVARES et al., 2005). O grupo A é o mais importante na patologia humana e está associado a quadros graves de gastroenterites em crianças e lactentes, enquanto os grupos B e C são responsabilizados por surtos de gastroenterites em crianças e adultos. Todos os sete grupos infectam uma variedade de animais, sendo já evidenciado o potencial zoonótico do rotavírus (ESTES & COHEN, 1989).

A via de transmissão do rotavírus é fecal-oral, contando com importante participação do ambiente, água, alimentos e fômites. Além disso, este vírus possui elevada resistência às condições ambientais, permanecendo viável por 60 ± 16 dias em esgoto comum, ou até mesmo infectantes em temperaturas tão altas quanto $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ (FAUQUET et al. apud NISHIDA, 2009; WHO, 2006).

Os rotavírus são os responsáveis pela maioria dos casos de diarreia aguda em crianças com menos de cinco anos de idade, associado a 111 milhões de episódios diarreicos anuais e estimadas 870.000 mortes de crianças com idade inferior a 3 anos, em países em

desenvolvimento, por ano (KAPIKIAN & CHANOCK apud SCHWARZ et al., 2002; PARASHAR et al., 2003; PARASHAR et al., 2006).

3.5. DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE MICRORGANISMOS EM AMBIENTES AQUÁTICOS

Os agentes patogênicos presentes na água estão diretamente ligados à presença de fezes de indivíduos e ou animais doentes. Testar uma amostra de água para verificar a presença de patógenos é uma forma de determinar sua qualidade sanitária, todavia as análises de laboratório seriam de extrema complexidade para verificação de cada possível agente patogênico, além de custoso e de demandar tempo para a execução das séries testes. Entretanto, alguns microrganismos podem ser usados como indicadores da eficiência das medidas de controle ou como índices para potencial presença de microrganismos patogênicos (WHO, 2008). Esses microrganismos devem possuir uma série de características, dentre elas, estar presente em grande quantidade em fezes humanas e de animais de sangue quente, não se multiplicar em águas naturais e ser detectável por métodos laboratoriais simples e rápidos. Assim, bioindicadores são bastante utilizados na rotina de controle de qualidade da água em todo o mundo.

3.5.1. Detecção e quantificação de bactérias bioindicadoras de poluição fecal

A detecção e a quantificação de bactérias do grupo coliforme, como os coliformes termotolerantes e *Escherichia coli*, e enterococos, em águas ambientais, são comumente realizadas por órgãos de controle ambiental, visto que é preconizado na legislação brasileira para monitoramento da qualidade sanitária.

Tipicamente, os testes para coliformes termotolerantes e *E. coli* são realizados a partir da fermentação por tubos múltiplos, baseada na fermentação da lactose com produção de ácido e gás após 48 horas, e pelo método da membrana filtrante, também baseada na fermentação da lactose.

A técnica de membrana filtrante para detecção e quantificação de coliformes termotolerantes em água, utilizada no presente estudo, é uma metodologia reprodutível, pode ser utilizada para grandes volumes de água e, em geral, os resultados podem ser obtidos mais rapidamente em comparação com a técnica de tubos múltiplos. Nesta técnica podem ser utilizados diversos meios, como o M ENDO MF, para coliformes totais, e Caldo M-FC, para coliformes termotolerantes (APHA, 1992).

As bactérias do grupo coliforme possuem a enzima β -D-galactosidase que permite a degradação de ortho-nitrophenyl- β -D-galactopyranoside (ONPG), produzindo o produto amarelado onitrophenol. A *E. coli* possui a habilidade de clivar a methylumbelliferyl- β -glucuronide (MUG), resultando na formação do produto fluorescente 4-methylumbelliferone. Assim, utilizando estas características, a detecção destes microrganismos em amostras ambientais pode ser realizada por um método mais rápido, o Colilert, desenvolvido pela IDEXX, e que detecta simultaneamente coliformes totais e *E. coli* na água em 24 horas de incubação, com sensibilidade e especificidades equivalentes as do tubo múltiplo e da membrana filtrante (ECKNER, 1998; NOVEL & NOVEL, 1976).

Os enterococos, assim como os coliformes e *E. coli*, também são utilizados como indicadores de contaminação fecal. A metodologia de detecção de enterococos em amostras de água também pode ser realizada pela técnica de Tubos Múltiplos e por membrana filtrante. Para tubos múltiplos é utilizado Caldo Dextrose Azida (CDA), com incubação de 24 ou 48 horas, e posterior teste confirmativo com ágar m-*Enterococcus* (APHA, 1992).

Para a análise de enterococos em água utilizando a metodologia membrana filtrante, o Standard Methods (2009) recomenda a utilização dos meios mE seguido de EIA (composto de ferro e esculina). Para confirmação do teste, podem ser utilizados os meios caldo infusão de cérebro-coração, ágar infusão de cérebro-coração e ágar bile esculina (APHA, 2009)..

Uma metodologia mais rápida para detecção e quantificação de enterococos em água foi desenvolvida pela IDEXX, o Enterolert. Este método tem alta sensibilidade para detecção de enterococos em amostras de água (ECKNER, 1998) e não tem apresentado diferenças significativas entre os resultados por este método e por membrana filtrante (FRICKER & FRICKER, 1996).

3.5.2. Detecção e quantificação de vírus entéricos

A detecção de vírus em ambientes aquáticos depende de métodos que sejam capazes de detectar pequenas quantidades de partículas virais em grandes volumes de água. Segundo Bosch (1998), as etapas básicas da análise virológica da água são de amostragem, concentração, descontaminação / remoção de inibidores e de detecção de vírus específicos. A concentração das amostras de água é uma etapa crítica, pois o vírus pode estar presente em um número tão baixo que é necessário reduzir o volume da amostra a ser analisados.

Muitos estudos foram publicados sobre os métodos de concentração e purificação de vírus em amostras de água (ABBASZADEGAN et al., 1993; JAYKUS et al., 1996; SCHWAB et al., 1995, 1996; SHIEH et al., 1995). Na década de 90, quando as técnicas moleculares foram desenvolvidas e aplicadas para detecção de vírus, muitos estudos focaram na purificação das amostras e remoção de inibidores da PCR na etapa de concentração. Contudo, estas técnicas foram desenvolvidas para serem aplicadas após o método de concentração convencional, de adsorção e eluição de membrana positiva usando extrato de carne. Katayama e colaboradores (2002) desenvolveram um método de concentração de amostras com lavagem ácida entre as etapas de adsorção e eluição em membrana negativa. A vantagem deste método sobre a técnica convencional é que a amostra concentrada pode ser submetida a RT-PCR sem purificação adicional, mesmo após a ultraconcentração em centrífuga (KATAYAMA et al., 2008).

A etapa de extração de ácidos nucléicos desenvolvida por Boom et. al. (1990) mostrou-se sensível, rápida, reprodutível e simples, não requerendo equipamentos especializados e conhecimento em bioquímica. Além disso, o risco de contaminação pessoal por patógenos é pequeno e o risco de contaminação entre amostras também (BOOM et al., 1990).

Alguns autores recomendam que as amostras, após passarem pela etapa de extração de ácidos nucléicos, sejam tratadas para a conversão de RNA em DNA (Etapa Síntese de DNA Complementar), visto que este é mais estável, com menor risco de degradação (ITURRIZA-GOMARA et al., 1999).

O método ideal de detecção de vírus em água deve ser rápido, sensível, altamente preciso, de fácil execução, podendo ser executado em número elevado e de baixo custo. Atualmente, tecnologias mais rápidas e sensíveis são utilizadas na detecção de vírus em amostras ambientais e clínicas. O uso de técnicas moleculares, como a Reação em Cadeia pela Polimerase – PCR e

hibridização de ácidos nucleicos para detecção de vírus entéricos em amostras de água, vem sendo bem documentado nos últimos anos.

A PCR tornou-se um importante método para a detecção rápida, sensível e específico para agentes bacterianos e virais na última década. Esta técnica consiste na amplificação *in vitro* do DNA alvo utilizando-se enzimas polimerases termoestáveis (por exemplo, a enzima Taq). Este método é utilizado para detectar microrganismos patogênicos em diferentes ambientes e é eficiente também na detecção de vírus de difícil cultivo ou incultiváveis. A PCR também pode ser usada como uma ferramenta analítica de indicação de potenciais de surtos de doenças (TOZE, 1999; TSAI et al., 1994). Esta detecção tradicional de DNA amplificado baseia-se na eletroforese do ácido nucleico na presença de brometo de etídio e na visualização ou análise na densidade das bandas com auxílio da luz ultravioleta (MACKAY et al., 2002).

Mais recentemente, uma derivação da técnica, denominada PCR Real Time (ou PCR em tempo real ou qPCR) também foi aplicado para quantificar a presença de microrganismos em amostras ambientais, no esgoto bruto e no esgoto tratado (HARAMOTO et al., 2010; HE & JIANG, 2005; LA ROSA et al., 2010). Este método utiliza a atividade 5' nuclease da Taq polimerase para clivar uma sonda de hibridização durante a fase de extensão da PCR, descrito primeiramente por Holland et al. (1991), permitindo o monitoramento em tempo real. Este método melhora a precisão e a sensibilidade da PCR tradicional, acrescentando uma sonda fluorescente de modo que o gene-alvo possa ser detectado e quantificado (KALININA et al., 1997; HEID et al., 1996). A qPCR detecta acúmulo de amplicon durante os ciclos de reação, havendo uma relação quantitativa entre a quantidade da amostra inicial e a quantidade de produto nos ciclos. Os dados são, então, medidos na fase exponencial da reação de qPCR com auxílio de um software, enquanto que os métodos tradicionais de PCR usam gel de Agarose ou outros métodos de detecção pós-PCR, que não são tão precisos (APPLIED BIOSYSTEMS, 20-?). A qPCR realiza ciclos com tempo reduzido e eliminou os procedimentos de detecção da Pós-PCR, pois a manipulação do amplicon pós-amplificado não é necessária (este método é descrito como “fechado” ou sistema homogêneo) (HEID et al., 1996; MACKAY et al., 2002).

O estudo da presença de microrganismos patogênicos tem relevante significado sanitário, considerando-se a atual situação do saneamento básico encontrado nos estornos da Baía de Vitória e Ilha das Caieiras. Neste trabalho serão utilizadas as técnicas de PCR convencional e

PCR Real Time para detecção, identificação qualitativa e quantificação de vírus na água desta região. A detecção de bactérias e vírus entéricos na água pode ser um importante indicador epidemiológico e demonstrar de modo indireto a ocorrência de doença de veiculação hídrica na população.

4. METODOLOGIA

4.1. PONTOS DE COLETA DE ÁGUA

O estudo foi realizado no estuário da Baía de Vitória, na área adjacente à região da Grande São Pedro, no município de Vitória – ES (figura 9) e foi constituído das seguintes etapas: (1) coleta de amostras de água em quatro pontos do sistema estuarino da Baía de Vitória (P1, P2, P3 e P4) e (2) monitoramento da qualidade da água a partir de análises físico-químicas, detecção de bactérias indicadoras de poluição fecal (Coliformes Termotolerantes e *Enterococcus*) e de vírus entéricos (adenovírus, norovírus e rotavírus).

As coletas de água no estuário foram realizadas em quatro pontos pré-definidos e georreferenciados por GPS (tabela 3). As coletas nos pontos P1, P2 e P3 foram realizadas entre os meses de janeiro de 2011 e julho de 2012, enquanto que no P4 as coletas ocorreram nos meses de maio de 2011 a julho de 2012. Os pontos P1, P2 e P3 foram estudados anteriormente por Justino (2009), mas ao longo da pesquisa identificou-se a necessidade de verificar a qualidade da água do estuário na saída do Rio Bubu (P4), pois o local servia para extração de ostra para comercialização. Para acesso aos locais de coleta foi utilizando barco a motor.

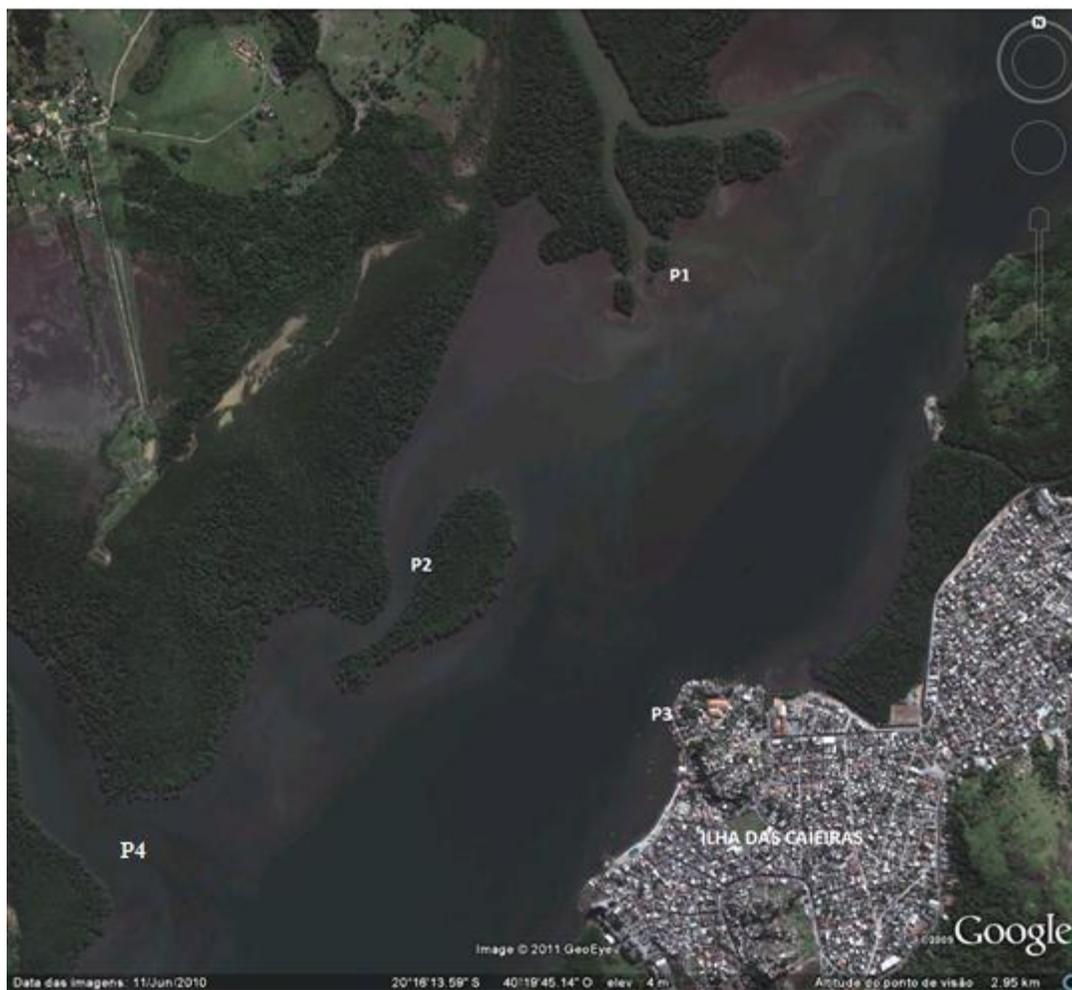


FIGURA 9 – Pontos de coleta de amostra na Baía de Vitória.

TABELA 3 – Descrição e coordenadas geográficas dos pontos de coleta das amostras de água (P1, P2, P3 e P4).

PONTO	DESCRIÇÃO	COORDENADAS
P1	Manguezal próximo à foz do rio Santa Maria da Vitória	S 20°15'641 W 40°19'960
P2	Próximo ao manguezal da ilha na Baía de Vitória	S 20°16'262 W40°20'632
P3	Próximo ao Cais da Ilha das Caieiras	S 20°16'597 W 40°20'217
P4	Manguezal próximo à foz do rio Bubu	S 20°16'525 W 40°21'086

A coleta inicia-se no Ponto 1 (P1), seguindo para o Ponto 2 (P2), Ponto 4 (P4) e é finalizada no Ponto 3 (P3), no cais da Ilha das Caieiras. Os pontos podem ser observados na figura 10.

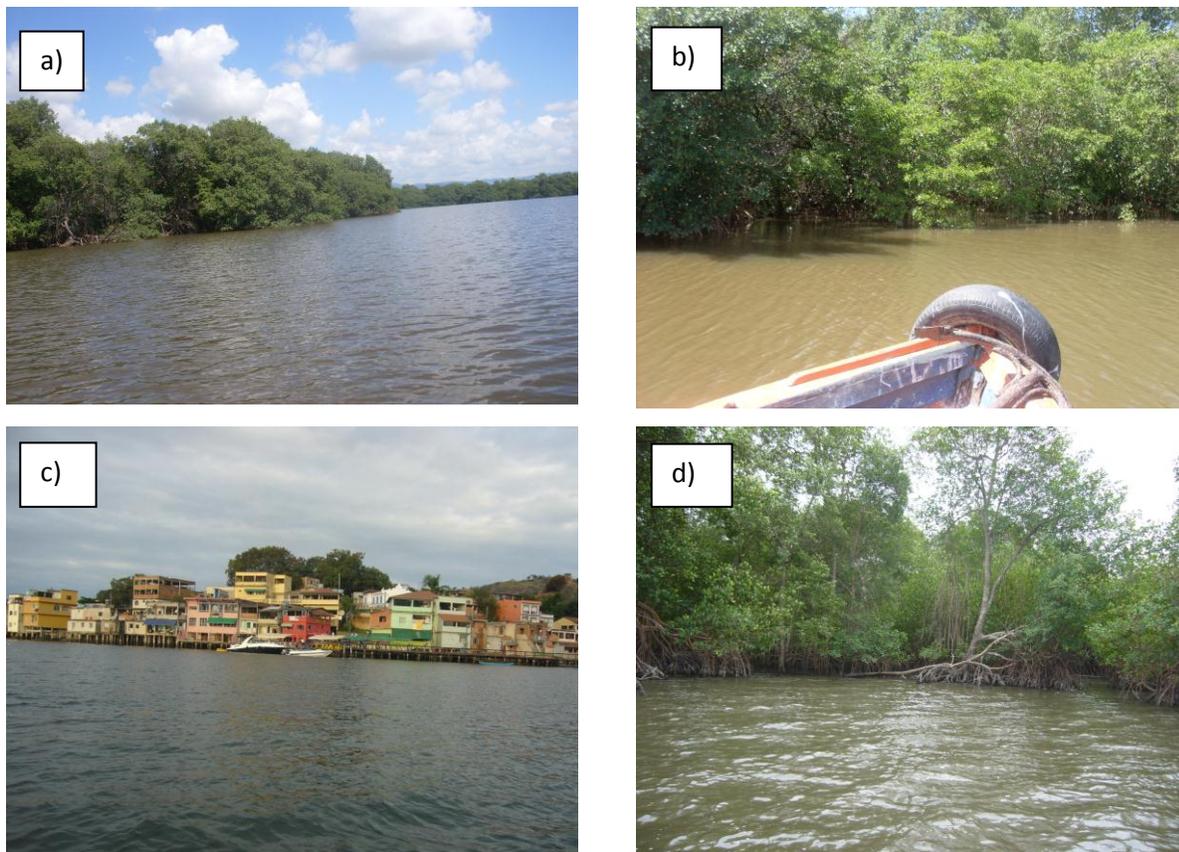


FIGURA 10 – Pontos de coleta das amostras de água na região da Ilha das Caieiras, Vitória ES: (a) P1, (b) P2, (c) P3 e (d) P4.

O ponto 1 localiza-se próximo a desembocadura do Rio Santa Maria da Vitória, em uma região cercada por vegetação típica de manguezal. O ponto 2 também está cercado por vegetação e não recebe fluxo direto de água doce de nenhum rio da região. O ponto 3 é o mais próximo da zona antrópica, localizado no cais do bairro Ilha das Caieiras, e é o ponto mais distante da desembocadura dos rios da região. O ponto 4 localiza-se na foz do rio Bubu, mas em uma zona de maior influência da água salobra. Nos pontos 1 e 2 há o crescimento de sururu e no ponto 4 há o crescimento de ostra, ambos extraídos para comercialização na Ilha das Caieiras. Estes pontos são visitados diariamente por pescadores da região.

4.2. COLETA AMOSTRAL

Em cada ponto foram coletados 2 L litros de amostra de água estuarina, aproximadamente 15 cm abaixo da superfície, no período matutino. As coletas tiveram periodicidade mensal, entre os meses de janeiro de 2011 a julho de 2012, totalizando 72 amostras, no período matutino, com a altura da maré de 0,8 a 1,2 m, enchente, para permitir a coleta de mariscos e sedimento que foram analisados em outros trabalhos.

4.3. ARMAZENAMENTO E TRANSPORTE

Após serem coletadas, as amostras de água foram armazenadas protegidas da luz e sob refrigeração em caixa térmica, e transportadas para o Laboratório de Saneamento (LABSAN), para posterior análise. As amostras que não foram processadas no momento em que chegaram ao laboratório foram mantidas em refrigerador a 4°C por, no máximo, 2 horas.

4.4. ANÁLISES LABORATORIAIS

As análises físico-químicas e microbiológicas da água foram realizadas no LABSAN, da UFES, com exceção da quantificação do material viral nas amostras, que foi realizada na Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), localizada no Rio de Janeiro/RJ. As amostras foram transportadas em gelo seco, dentro de caixa térmica, para que permanecessem resfriadas e conservadas até a realização das análises em laboratório.

4.4.1. Análises Físico-Químicas das Amostras de Água

As análises físico-químicas realizadas foram: pH, condutividade, turbidez, cor aparente, cor verdadeira, sólidos totais, sólidos dissolvidos, oxigênio dissolvido, salinidade e temperatura.

A temperatura da água nos pontos de coleta foi medida *in loco*, utilizando-se um termômetro de mercúrio. O termômetro foi mergulhado na água, a aproximadamente 15 cm da superfície, até a estabilização da temperatura.

As medições de pH foram realizadas utilizando-se pHmetro de bancada DM-22, eletrodo Digmed, e para análise de condutividade foi utilizado o Condutivímetro Jenco Eletronics, 1671.

A turbidez das amostras de água foi medida por um turbidímetro microprocessado (Alfakit) e a salinidade por salinômetro manual de precisão 0~100% (1000 a 1.070SG), modelo 211, marca Biobrix.

A análise de oxigênio dissolvido foi realizada pelo método de Winkler, a partir da titulação de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ na amostra de água com adição de ácido sulfúrico concentrado e suspensão de amido.

As análises de Sólidos Totais foram realizadas de acordo com as recomendações do Standard Methods for Water and Wastewater (APHA; AWA; WEF, 2005). Foram feitas análise de Sólidos Dissolvidos Totais (SDT) para resíduos filtráveis.

A precipitação acumulada do período de monitoramento foi obtida a partir de planilhas de controle operacional disponibilizadas pelo Instituto Capixaba de Pesquisa, Assistência Técnica e Extensão Rural – INCAPER.

4.4.2. Análises Microbiológicas das Amostras de Água

4.4.2.1. Detecção e Quantificação de Coliformes Termotolerantes

A detecção e a quantificação de Coliformes Termotolerantes nas amostras de água foram realizadas a partir da metodologia por Membrana Filtrante (APHA, 2005).

As diluições das amostras foram feitas conforme o nível de contaminação esperado para cada ponto. As diluições para cada ponto foram:

P1: diluições 10^{-1} , 10^{-2} e sem diluição;

P2: diluições 10^{-1} , 10^{-2} e sem diluição;

P3: diluições 10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3} ;

P4: diluições 10^{-1} , 10^{-2} e sem diluição.

As amostras diluídas foram filtradas em membrana de nitrocelulose quadriculada, de 47 mm de diâmetro e porosidade de $0,45\mu\text{M}$ (Unifil).

Após a filtração, as membranas foram transferidas para placas de Petri contendo meio Agar m-FC (Difco) e incubadas em incubadora a $44,5 \pm 0,2$ °C por 24 horas. Após o período de incubação, as colônias foram contadas (crescimento de colônias azuis indica a presença de coliformes termotolerantes; colônias atípicas podem se apresentar de cor amarela e incolor) e o resultado foi obtido a partir da fórmula 1 e expresso em Unidade Formadora de Colônia em 100 ml de amostra (UFC / 100mL).

$$\text{UFC/100 mL} = \frac{\text{número de colônias típicas} \times \text{diluição}}{100} \quad (1)$$

4.4.2.2. Detecção e Quantificação de *Enterococcus* sp.

A detecção e a quantificação de *Enterococcus spp.* nas amostras de água foram realizadas a partir da metodologia por Membrana Filtrante, padronizada pela CETESB.

Os meios utilizados para análise de enterococos foram mE e EIA, da Difco, conforme Norma Técnica L5.212, da Companhia Ambiental do Estado de São Paulo – CETESB (1993) e recomendado pelo Standard Methods (2009).

As diluições das amostras de água foram feitas conforme o nível de contaminação esperado para cada ponto, sendo:

P1: diluições 10^{-1} , 10^{-2} e sem diluição;

P2: diluições 10^{-1} , 10^{-2} e sem diluição;

P3: diluições 10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3} ;

P4: diluições 10^{-1} , 10^{-2} e sem diluição.

As amostras diluídas foram filtradas em membrana de nitrocelulose quadriculada, de 47 mm de diâmetro e porosidade de 0,45µM (Unifil).

Após a filtração, as membranas foram transferidas para placas de Petri contendo meio mE (Difco) e incubadas em incubadora a $41,0 \pm 0,5$ °C por 48 horas. Após o período de incubação, a membrana contendo colônias de coloração típica (de rosa a vermelho-escuro) foi transferida para o meio Ágar EIA (Ferro Esculina Agar), sendo mantida a 41°C durante 20 minutos. As colônias típicas de enterococos desenvolveram precipitado preto ou marrom avermelhado em decorrência da hidrólise da esculina presente no meio EIA. A contagem das colônias é feita usando luz fluorescente e lente de aumento, e, assim calcula-se a densidade de enterococos na amostra examinada.

Os resultados da análise de enterococos em água foram obtidos a partir da fórmula 2 e expressos em Unidade Formadora de Colônia em 100 mL de água (UFC / 100 mL).

$$\text{UFC/100 mL} = \frac{\text{número de colônias típicas}}{100} \times \text{diluição} \quad (2)$$

4.4.2.3. Detecção, Qualificação e Quantificação de Vírus Entéricos

A detecção de vírus entéricos na água ocorreu em 4 etapas: concentração/eluição, extração de ácidos nucleicos, síntese de DNA complementar (cDNA) e amplificação do material genético por PCR Convencional e PCR Real Time.

4.4.2.3.1. Concentração das amostras de água

A concentração das amostras de água para posterior detecção de vírus foi realizada pela técnica de adsorção-eluição em membrana carregada negativamente, conforme metodologia proposta por Katayama, Shimasaki e Ohgaki (2002), com modificações.

Nesta etapa, 1 L da amostra de água, medido em proveta, foi disposto em um becker de 2 L e adicionado 1 L do tampão Tris/Ca⁺² 0,01 M pH 7,2. Após homogeneização em agitador magnético, a solução passou por filtração em membrana de éster de celulose de poro 1,2 µm, 142 mm de diâmetro (Millipore), para remoção de partículas sólidas grosseiras, utilizando recipiente

de pressão para dispensação (Millipore). O material filtrado teve seu pH ajustado para 3,0 a 3,5 com HCl 10 N e novamente passou por filtração em membrana em éster de celulose carregada negativamente, mas com poro de 0,45 μm (Millipore). O filtrado foi descartado e a membrana foi lavada com H_2SO_4 0,5 mM e, posteriormente, eluída com 10 mL de NaOH 10mM. O eluato resultante foi neutralizado com H_2SO_4 50 mM e TE 100X.

Após transferência para tubos Amicon Ultra-15 (50 KDA, Millipore), as amostras de água foram submetidas à técnica de ultrafiltração. As amostras foram submetidas à centrifugação a 6700xg, a 4°C, por cinco minutos e, em seguida, adicionou-se 10 mL de água Milli-Q, repetindo-se a centrifugação até que o volume da amostra atingisse aproximadamente 400 μL .

Após a segunda centrifugação, completou-se o volume da amostra com água Milli-Q para 800 μL e foi feita a distribuição em dois tubos eppendorf de 1,5 mL (duplicata). As amostras foram submetidas à extração de ácidos nucleicos imediatamente, ou armazenadas em freezer a -80°C.

4.4.2.3.2. Extração dos ácidos nucleicos

A extração de ácidos nucleicos foi realizada a partir da metodologia proposta por Boom e colaboradores (1990). O método se baseia na adsorção dos ácidos nucleicos em micropartículas de sílica com auxílio do tiocianato de guanidina/EDTA como agente de lise celular e dissociação da ribonucleoproteína viral.

Após a etapa de ultraconcentração descrita no tópico anterior, adicionou-se 1 mL de solução tampão L6 aos 400 μL da amostra, contidas em tubo eppendorf de 1,5 mL, e homogeneizou-se com o Vortex. Após aproximadamente cinco minutos à temperatura ambiente, foram adicionados 10 μL de sílica, homogeneizou-se e a amostra foi incubada por 20 minutos em agitador orbital, a temperatura ambiente. A amostra foi, então, centrifugada e o sobrenadante descartado. Ao pellet resultante foram adicionados 500 μL de tampão L2 e o material foi homogeneizado e centrifugado, com descarte do sobrenadante novamente.

Ao sedimento foram adicionados 500 μL de álcool 70% (gelado), seguido de homogeneização e centrifugação, com descarte do sobrenadante. Este procedimento foi repetido usando-se acetona P. A. gelada.

Após o descarte do sobrenadante, incubou-se a amostra em banho-maria por 15 minutos a 56°C, com a tampa do eppendorf aberta para evaporar a acetona. Posteriormente, adicionou-se 30 µL de TE 1X (pH 7,4), homogeneizou-se e novamente incubou-se em banho-maria por 15 minutos a 56°C (eppendorf fechado).

Para finalizar, a amostra foi centrifugada e o sobrenadante foi coletado e passado para tubo eppendorf de 0,5 mL, para uso futuro.

4.4.2.3.3. Síntese de DNA complementar (cDNA)

O material genético extraído foi submetido à reação de transcrição reversa para a obtenção do DNA complementar (cDNA). Este procedimento é fundamental para a realização das outras etapas, pois o DNA é mais estável que o RNA, tornando o armazenamento e a conservação do material genético mais seguro contra perda das informações genéticas.

O DNA complementar foi sintetizado a partir de ácido nucléico extraído das amostras P1, P2, P3 e P4, segundo o protocolo proposto por Iturriza-Gomara e colaboradores (1999), com modificações.

Em um tubo eppendorf foram adicionados 5 µL de ácido nucléico extraído e 1 µL de DMSO. Esta mistura foi submetida a 97°C por sete minutos, para a desnaturação do material genético, e mantida em gelo por 2 minutos. Em seguida, foi adicionado um mix de reação contendo água Milli-Q, tampão (10X Buffer, Invitrogen), DNTPs (Invitrogen), MgCl₂ (Invitrogen), iniciador randômico hexanucleotídico pdN6™ (Amersham Biosciences) e enzima Transcriptase Reversa Superscript II (Invitrogen), totalizando 20 µL de mix, conforme tabela 4.

TABELA 4 – Concentração final dos reagentes para síntese de cDNA.

REAGENTE	CONCENTRAÇÃO FINAL
Água Milli-Q	q. s. p.
10X Buffer	1X
DNTPs	200 μ M
MgCl ₂	2,5 mM
Primer pdN6	20 mU
Enzima Transcriptase Reversa Superscript II	60 U

Este material foi incubado à 42°C por uma hora e, posteriormente, a 95°C por 10 minutos. O cDNA foi armazenado em freezer a -20°C para posterior amplificação específica dos vírus pesquisados.

4.4.2.3.4. Detecção por PCR Qualitativa

O DNA presente nas amostras foi quantificado a partir da Densidade Óptica (DO), determinada pela absorvância da amostra nos comprimentos de onda 260 e 280 nm, utilizando-se espectrofotômetro Ultrospec 100. Com a análise da DO foi possível determinar, de forma aproximada, o volume de cDNA, em μ L, a ser utilizado na amplificação por PCR convencional. Cerca de 1 μ g de DNA foi utilizado na 1ª PCR (MEY et al., 2006).

Os iniciadores utilizados nas reações da 1ª PCR, Nested PCR e Semi-Nested PCR, seus amplicons e seqüências de oligonucleotídeos estão na tabela 5 abaixo.

TABELA 5 – Sequências dos oligonucleotídeos iniciadores.

VÍRUS	REAÇÃO	INICIADOR	SEQÜÊNCIA (5'→3')	AMPLICON (PB)
AdV	1ª PCR	Hex1	GCCSCARTGGKCWTACATGCACATC	301
		Hex2	CAGCACSCCICGRATGTCAAA	
	Nested PCR	NeHex 3	GCCCGYGCMACIGAIACSTACTTC	171
		NeHex 4	CCYACRGCCAGIGTRWAICGMRCYTTGTA	
RV	1ª PCR	RV1	GTCACATCATAACAATTCTAATCTAAG	1059
		RV2	CTTTAAAAGAGAGAATTTCCGTCTG	
	Nested PCR	RV3	TGTATGGTATTGAATATACCAC	346
		RV4	ACTGATCCTGTTGGCCAWCC	
NoV	1ª PCR	SRII-1	CGCCATCTTCATTCACAAA	514
		SRII-2	TWCTCYTTYTATGGTGATGATGA	
	Semi-Nested PCR	SRII-2	TWCTCYTTYTATGGTGATGATGA	203
		SRII-3	TTWCCAAACCAACCWGCTG	

FONTE: JUSTINO, 2009. Adaptado.

A amplificação de ácidos nucléicos na PCR Qualitativa para detecção de adenovírus, rotavírus e norovírus foi realizada a partir do cDNA sintetizado. O volume de cDNA equivalente a 1 µg de DNA foi adicionado ao mix de reação (tabela 6) e cobertos por 30µL de óleo mineral. A amplificação dos fragmentos virais ocorreu no termociclador PTC-100, versão 7.0, MJ Research.

TABELA 6 – Composição dos mixes da 1ª PCR e Nested PCR para adenovírus (AdV), rotavírus (RV) e norovírus (NoV), com concentrações finais dos reagentes.

		TAMPÃO 10X	DNTP	MgCl ₂	PRIMER	ENZIMA TAQ POLYMERASE
AdV	1ª PCR AdV	1X	200µM	1,5 mM	0,4µM	1U
	Nested PCR	1X	200µM	1,5mM	0,4 µM	1U
RV	1ª PCR RV	1X	200µM	1,5mM	0,24 µM	2U
	Nested PCR	1X	200µM	3,5mM	0,24 µM	2U
NoV	1ª PCR NoV	1X	200µM	2,5mM	0,4 µM	1,25U
	Semi-Nested	1X	200µM	2,0mM	0,4 µM	1,25U

Na amplificação de fragmentos de DNA de adenovírus foram utilizados os iniciadores Hex 1 e Hex 2, na 1ª PCR, e NeHex 3 e NeHex 4, na Nested PCR, encontrados na região conservada do gene hexon, previamente descritos por Allard e colaboradores (2001). Para análise de rotavírus, foram utilizados os iniciadores RV 1 e RV 2, na 1ª PCR, e RV 3 e RV 4, na Nested PCR, encontrados em região conservada do gene VP7 para rotavírus do grupo A, previamente descritos por Hafliger e colaboradores (1997). Na 1ª PCR de norovírus foram utilizados os iniciadores SR11-1 e SR11-2, enquanto que na Semi-Nested PCR utilizou-se SR11-2 e SR11-3, encontrados em região conservada do gene da RNA polimerase para o Genogrupo II (GII), previamente descritos por Hafliger e colaboradores (1997). Devido à prevalência mundial de GII frente ao GI, apenas GII foi pesquisado neste trabalho (LEES, 2000).

As reações de amplificação dos fragmentos virais e AdV, RV e NoV foram realizadas no termociclador utilizando os programas previamente descritos por Allard et al. (2001) e Hafliger et al. (1997), conforme tabela 7, para 1ª PCR, e tabela 8, para nested e semi-nested PCR. Após a reação da 1ª PCR de cada vírus, um microlitro de seu produto foi utilizado em reação de nested-PCR correspondente.

TABELA 7 – Programas utilizados para reações da 1ª PCR de AdV, RV e NoV.

ETAPA	PROGRAMA AdV	PROGRAMA RV	PROGRAMA NoV
Desnaturação	94°C/ 5min	94°C/ 5min	94°C/5min
Anela e extende	94°C/ 20s 60°C/ 20s (35 x) 72°C/ 30s	94°C/ 20s 60°C/20s (35 x) 72°C/ 30s	94°C/ 30s 50°C/1min (40 x) 72°C/ 30s
Extensão final	72°C/ 7min	72°C/ 7min	72°C/ 7min

FONTES: ALLARD et al. (2001); HAFLIGER et al. (1997). Adaptado.

TABELA 8 – Programas utilizados para reações de nested PCR de AdV e RV e semi-nested PCR de NoV.

ETAPA	PROGRAMA AdV	PROGRAMA RV	PROGRAMA NoV
Desnaturação	94°C/ 5min	94°C/ 5min	94°C/5min
Anela e extende	94°C/ 20s 60°C/ 20s (35 x) 72°C/ 30s	94°C/30s 60°C/30s (35 x) 72°C/1min	94°C/ 30s 50°C/1min (40 x) 72°C/ 30s
Extensão final	72°C/ 7min	72°C/ 5min	72°C/ 7min

FONTES: ALLARD et al. (2001); HAFLIGER et al. (1997). Adaptado.

4.4.2.3.5. Visualização dos produtos da PCR Convencional em gel de agarose

Os produtos da PCR Convencional foram visualizados por eletroforese em gel de agarose 1,8%, contendo 0,5µg/ml de brometo de etídeo, em tampão TBE 1X, por 1h a 100V. Foi utilizado marcador de peso molecular de 100 pb da marca Fermentas e corante azul. O gel foi visualizado em transiluminador de luz ultravioleta e fotografado por câmera digital, para registro do resultado.

4.4.2.3.6. Quantificação por PCR Real Time

A quantificação do genoma dos vírus presentes nas amostras utilizando a técnica da PCR real time foi realizada com o auxílio do Kit TaqMan Universal PCR Master Mix Kit (Applied Biosystems). As análises da qPCR foram realizadas em colaboração com o Laboratório de Virologia Ambiental do Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro / RJ.

As reações foram realizadas no termociclador para PCR Real Time ABI 7500 (Applied Biosystems, Califórnia EUA).

Os desenhos das sondas e dos primers utilizados em cada reação da qPCR para adenovírus, rotavírus e norovírus estão apresentados na tabela 8 a seguir.

Para a amplificação e quantificação de fragmento específico de adenovírus foram adicionados 5,0 µL de cDNA à mistura de reação, contendo master mix (Life Technologies), água DNase free, primers e sondas. As concentrações dos primers e sondas estão especificadas na tabela 9. A qPCR foi realizada na região conservada do gene hexon do vírus, de acordo com o ensaio descrito por Hernroth e colaboradores (2002). O protocolo original usa duas sondas diferentes (5'FAM e 3'TAMRA), a fim de assegurar a amplificação e detecção de todos os tipos de adenovírus (MUSCILLO et al., 2008).

As reações da qPCR para AdV ocorreram a 50 °C por 2 minutos (ativação), 95 °C por 10 minutos (desnaturação), 40 ciclos de 95 °C por 15 segundos cada, finalizando a 60 °C por 1 minuto (anelamento e extensão) (HERNROTH et al, 2002).

TABELA 9 – Primers e Sondas de AdV, RV r NoV para PCR Real Time.

VÍRUS	PRIMERS / SONDA	SEQUÊNCIA (5'→3')
AdV (HERNROTH et al. 2002)	AdF	CWTACATGCACATCKCSGG
	AdR	CRCGGGCRAAYTGCACCAG
	AdP	FAM-CCGGGCTCAGGTACTCCGAGGCGTCCT-TAMRA
RV (ZENG et. al. 2008)	NSP3-F	ACCATCTWCACRTRACCCTCTATGAG
	NSP3-R	GGTCACATAACGCCCTATAGC
	NSP3-P	VIC – NONE AGTTAAAAGCTAACACTGTCAAA – MGB
NoV GII (KAGEYAMA 2003)	COG2F	CARGARBCNATGTTYAGRTGGATGAG
	COG2R	TCGACGCCATCTTCATTCACA
	RING2	VIC-TGGGAGGGCGATCGCAATCT-TAMRA

Na amplificação e quantificação da carga viral referente à rotavírus foram adicionados 5,0 µL de cDNA à mistura de reação, contendo master mix (Life Technologies), água DNase free, primers e sondas. As concentrações dos primers e sondas estão especificadas na tabela 10. Os primers

utilizados na qPCR de RV são encontrados na região conservada do gene NSP3, que codifica uma proteína não estrutural ligada ao RNA, descritos por Zeng e colaboradores (2008).

As reações para ampliação do fragmento específico para RV ocorreram a 50 °C por 2 minutos (ativação), 95 °C por 10 minutos (desnaturação), 45 ciclos de 95 °C por 15 segundos cada, finalizando a 60 °C por 1 minuto (anelamento e extensão) (ZENG et al., 2008).

Para as reações de qPCR de norovírus, os primers utilizados, COG2, foram obtidos da região altamente conservada de junção das ORF1 e ORF2 do genogrupo GII de NoV, como previamente descritos por Kageyama et al. (2003). Na amplificação e quantificação de norovírus adicionou-se 5,0 µL de cDNA à mistura de reação, contendo master mix (Life Technologies), água DNase free, primers e sondas. As concentrações dos primers e sondas estão especificadas na tabela 9.

Para a quantificação do norovírus GII foi utilizada a sonda RING2 e as reações ocorreram a 50 °C por 2 minutos (ativação), 95 °C por 10 minutos (desnaturação), 40 ciclos de 95 °C por 15 segundos cada, finalizando a 60 °C por 1 minuto (anelamento e extensão) (KAGEYAMA et al., 2003).

TABELA 10 – Concentrações finais dos reagentes da qPCR para AdV, RV e NoV.

Vírus	Primer	Sonda
AdV	22,5 µM	11,25 µM
RV	10 µM	10 µM
NoV	22,5 mM	11,25 mM

4.4.2.3.7. Cálculo para Conversão em Número de Cópias Genômicas/ml – qPCR

Os resultados da análise quantitativa das amostras de água obtidos pela técnica PCR Real Time (equipamento StepOne, Applied Biosystems) foram expressos em número de cópias genômicas por ciclo. Assim, foi necessária a conversão deste resultado expresso no programa para número de cópias genômicas por 100 mL de amostra de água, ou número de partículas virais por 100 mL de amostra de água.

O número de partículas virais foi determinado pela multiplicação do número de cópias genômicas obtidas na reação de qPCR (X) por uma constante (K), representada pelas diluições ao longo do processo desde a concentração até a qPCR, conforme fórmula 3.

$$\text{N}^\circ \text{partículas virais} = (X \times K)/10 \quad (3)$$

Para cálculo da constante, considerou-se as diluições ao longo do processo até a qPCR. Para água, K é igual a 60, referente à diluição de 5x na síntese de cDNA, 6x na extração de ácidos nucléicos e 2x na ultraconcentração. A divisão pelo fator de 10 é para converter o valor gerado por litro para a quantidade encontrada em 100 mL.

Assim, o número de partículas virais em água por 100 mL é obtida pela fórmula 4, a seguir.

$$\text{N}^\circ \text{partículas virais} = (X * 60)/10 \quad (4)$$

4. 5. CONTROLE DE QUALIDADE DOS RESULTADOS

Em todas as etapas foram utilizados controles positivos e negativos. Para realização do controle positivo, na etapa de concentração inicial, foram inoculadas nas amostras de água cerca de 400 µL de suspensão de fezes positivas, previamente preparadas à concentração de 10% em tampão Tris/HCl-CaCl₂ (0,01 M, 0,0015 M), pH 7,2, para cada um dos vírus pesquisados, a fim de verificar se a metodologia utilizada era eficiente na detecção de amostras positivas. As amostras com fezes positivas obtidas de crianças com diarreia foram cedidas por colaboradores. Como controle negativo foi utilizado água Milli-Q ao invés de amostras. Os procedimentos seguintes foram os mesmos utilizados para amostras ambientais.

Nas etapas de extração, cDNA, PCR e qPCR também foram utilizadas como controles positivos amostras previamente confirmadas como positivas, enquanto para controle negativo utilizou-se água Milli-Q ou Água RNase Free.

Para evitar possíveis contaminações, as etapas de pré-PCR (ultraconcentração, extração, síntese de cDNA e preparação de mix para PCR) e pós-PCR (PCR e leitura dos resultados) foram realizadas em salas diferentes, sem que houvesse retorno de material e pessoal da sala pós-PCR para a pré-PCR. A síntese de cDNA e a preparação de mix para as reações de PCR e qPCR foram realizadas em capelas próprias.

Para confirmação dos resultados obtidos, foram selecionadas aleatoriamente 20 % das amostras para repetição dos procedimentos a partir de nova extração de ácidos nucleicos.

4.6. ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Foi realizada estatística descritiva dos resultados obtidos utilizando o programa Excel 2007 (Office, Windows Seven) e BioEst 5.0. Para os resultados das análises físico-químicas e bacteriológicas foram avaliados: mediana, mínimo e máximo.

5. RESULTADOS

Os resultados obtidos nos 19 meses de monitoramento dos pontos de coleta de água P1, P2 e P3 e nos 15 meses de análise de P4, quanto às análises físico-químicas, bacteriológicas e virológicas, estão apresentados a seguir.

5.1. ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS

Os resultados do monitoramento da qualidade físico-química da água (turbidez, salinidade, condutividade, sólidos dissolvidos totais – SDT) estão apresentados nas figuras 11, 12, 13 e 14. O volume de precipitação acumulada dos cinco dias anteriores à coleta de cada mês foi obtido pelos dados pluviométricos cedidos pelo Instituto Capixaba de Pesquisa, Assistência Técnica e

Extensão Rural – INCAPER, foi relacionado aos valores de turbidez, salinidade e condutividade. A turbidez da água no mês de novembro de 2011 não foi medida devido à defeito no aparelho turbidímetro utilizado, enquanto a salinidade não foi verificada em maio de 2011, pois o salinômetro não estava disponível.

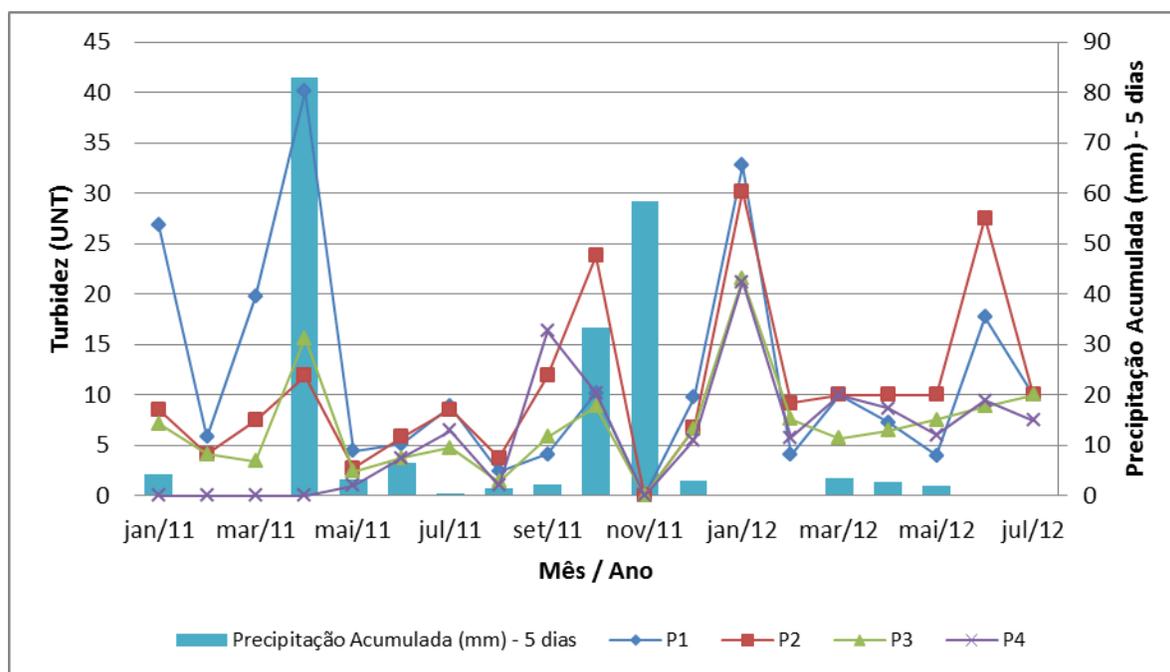


FIGURA 11 –Monitoramento da turbidez (UNT) da água do estuário da Ilha das Caieiras e valores de precipitação (mm – acumulado de cinco dias anteriores às coletas), do período de janeiro de 2011 e julho de 2012.

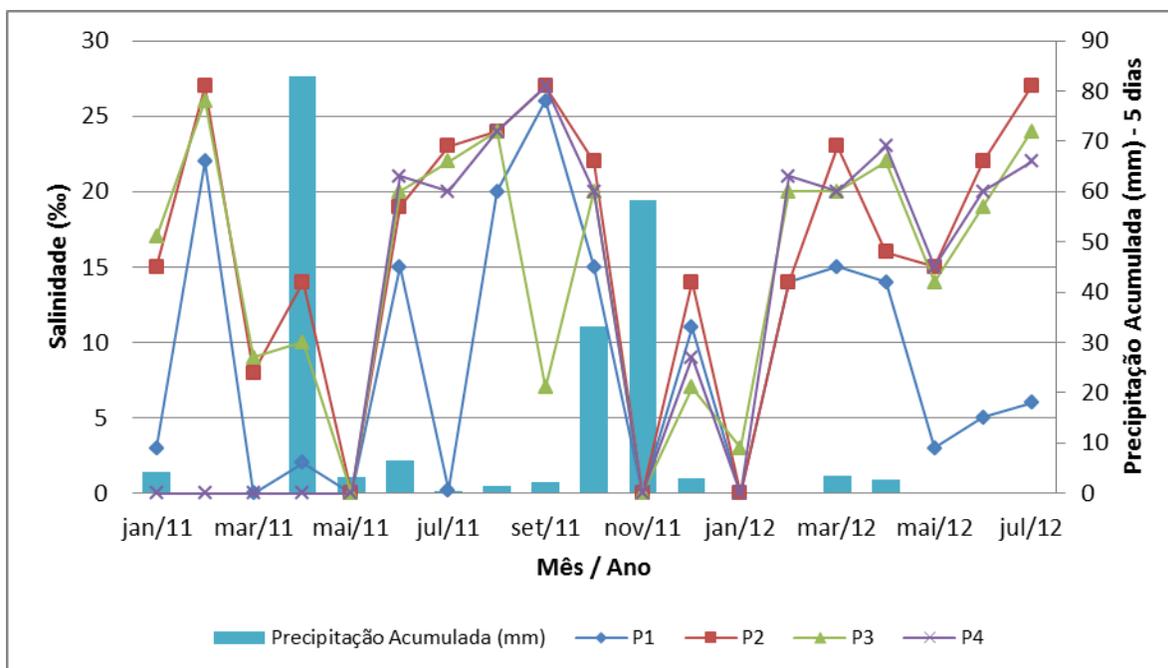


FIGURA 12 – Monitoramento da salinidade (‰) da água do estuário da Ilha das Caieiras e valores de precipitação (mm – acumulado de cinco dias anteriores às coletas), do período de janeiro de 2011 e julho de 2012.

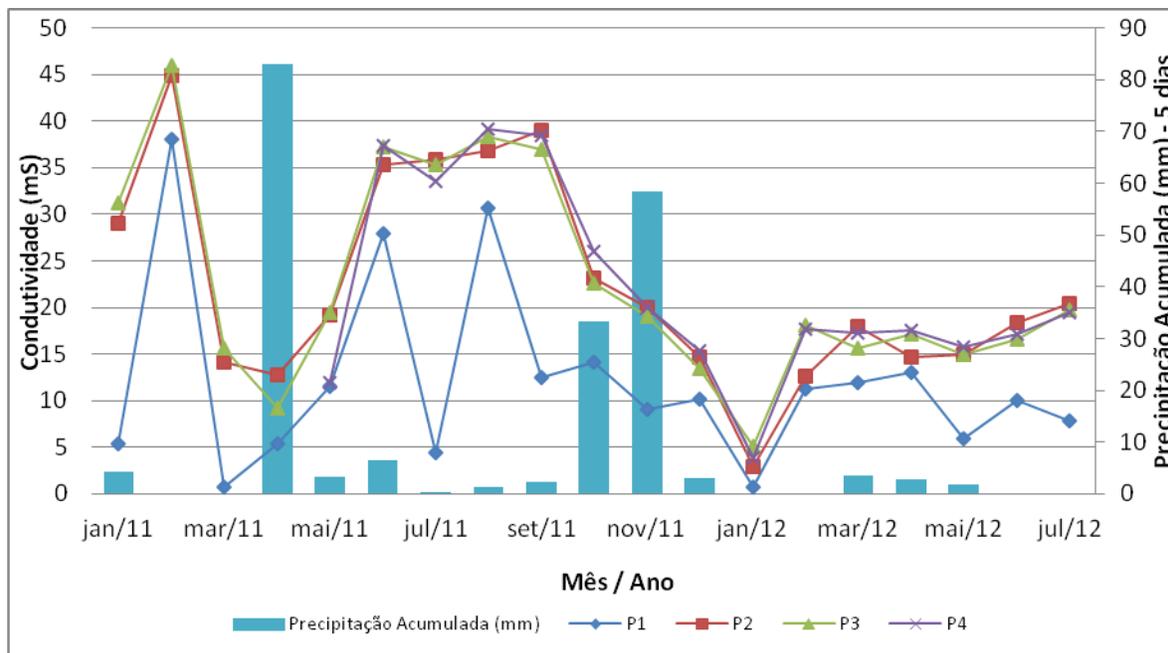


FIGURA 13 – Monitoramento da condutividade (mS) da água do estuário da Ilha das Caieiras e valores de precipitação (mm – acumulado de cinco dias anteriores às coletas), do período de janeiro de 2011 e julho de 2012.

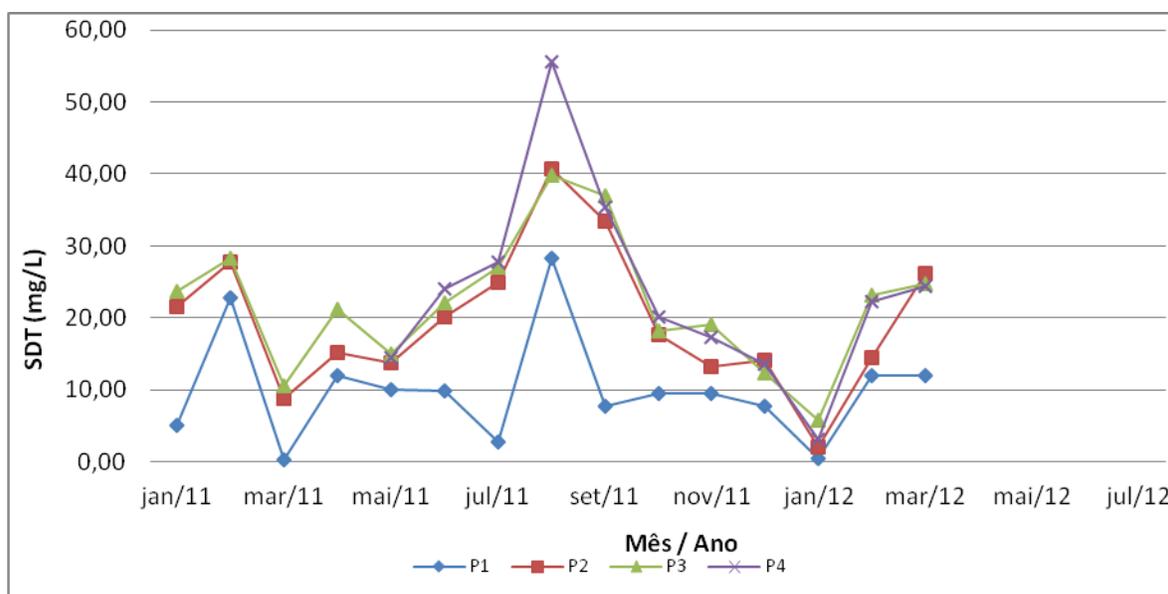


FIGURA 14 – Resultados do parâmetro Sólidos Dissolvidos Totais (SDT) para o período de monitoramento de janeiro/2011 a julho/2012.

Os parâmetros temperatura, pH, turbidez e SDT obtiveram pouca variação ao longo do período de monitoramento e não foi observada sazonalidade. O volume de precipitação acumulado nos 5 dias anteriores à cada coleta foi utilizado como parâmetro para verificar as possíveis variações físico-químicas e microbiológicas decorrentes de eventos chuvosos. Os parâmetros salinidade e condutividade elétrica da água mostraram-se mais influenciados pelo volume de precipitação que os demais parâmetros físico-químicos, sendo observada a redução da salinidade e da condutividade em períodos chuvosos.

Não foram observadas diferenças significativas entre os quatro pontos de coleta do estuário (P1, P2, P3 e P4) para os parâmetros temperatura da água ($p = 0,4359$), pH ($p = 0,6864$), turbidez ($p = 0,1681$), condutividade ($p = 0,0137$) e SDT ($p = 0,0274$). Entretanto, os valores de salinidade observados neste estudo mostraram que P1, P2, P3 e P4 possuem diferenças significativas para este parâmetro ($p = 0,0056$), devido, principalmente, a influência dos rios Santa Maria da Vitória e Bubu, que desembocam em P1 e P4, respectivamente. O lançamento de água doce nestes pontos, principalmente no Ponto 1, em que a coleta é feita mais próxima à foz do rio, diminuiu a concentração de sal do meio e, embora a distância seja pequena entre os pontos (menos de 3 Km), P1 possui menor salinidade média dentre os pontos estudados.

A média, a mediana os valores máximos e mínimos de todos os parâmetros físico-químicos analisados durante o monitoramento podem ser visualizados na tabela 11 a seguir.

TABELA 11 – Estatística descritiva (média, mediana, mínimo, máximo) dos parâmetros analisados (temperatura, pH, turbidez, salinidade, condutividade e sólidos dissolvidos totais) nos quatro pontos de monitoramento, no período de janeiro de 2011 a julho de 2012 (n = 19).

Parâmetro	Ponto de Coleta	Média aritmética	Mediana	Mínimo	Máximo
Temperatura (°C)	P1	22,2	25	22	30
	P2	22,7	26	22	29
	P3	22,1	24,5	21	29
	P4	20,8	24	22	26,5
pH	P1	7,23	7,10	6,5	8,9
	P2	7,50	7,50	6,6	8,7
	P3	7,35	7,45	6,7	8,6
	P4	7,38	7,05	6,6	9,1
Turbidez (UNT)	P1	12,17	9,76	2,38	40,12
	P2	10,66	9,16	2,72	30,2
	P3	6,87	6,44	1,36	21,5
	P4	7,62	7,47	1,02	21,2
Salinidade (‰)	P1	9,34	12,50	0	26
	P2	16,39	20,50	0	27
	P3	15,00	20,00	3	26
	P4	17,46	20,50	0	27
Condutividade (mS/cm)	P1	11,97	11,20	0,67	38,1
	P2	21,75	19,12	2,87	44,9
	P3	22,08	19,42	5,15	46
	P4	21,06	17,70	3,89	39,2
Sólidos Dissolvidos Totais (mg/L)	P1	9,87	8,57	0,37	28,27
	P2	20,45	19,62	2,01	40,64
	P3	22,13	23,46	5,78	39,73
	P4	23,22	21,22	3,14	55,64

5.2. ANÁLISES BACTERIOLÓGICAS

As variações de densidade de Coliformes Termotolerantes (CT), durante os 19 meses de monitoramento, exceto em P4, com 15 meses, estão apresentadas na figura 15, enquanto que a densidade de *Enterococcus sp.*, com 10 meses de análises, pode ser observada na figura 16. A precipitação acumulada dos 5 dias anteriores à coleta também foram mostrados.

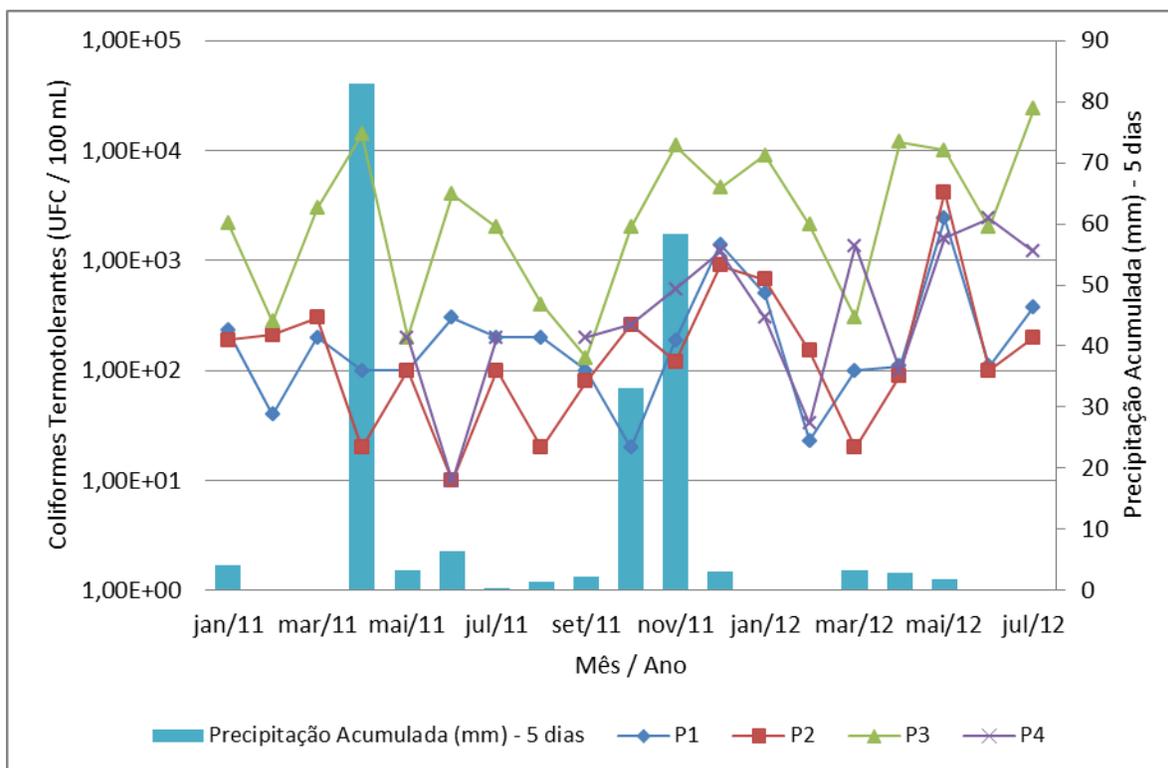


FIGURA 15 – Densidade de coliformes termotolerantes (UFC / 100 mL) na água do estuário da Ilha das Caieiras, em Vitória / ES, e valores de precipitação (mm – acumulado de cinco dias anteriores às coletas), do período de janeiro de 2011 e julho de 2012.

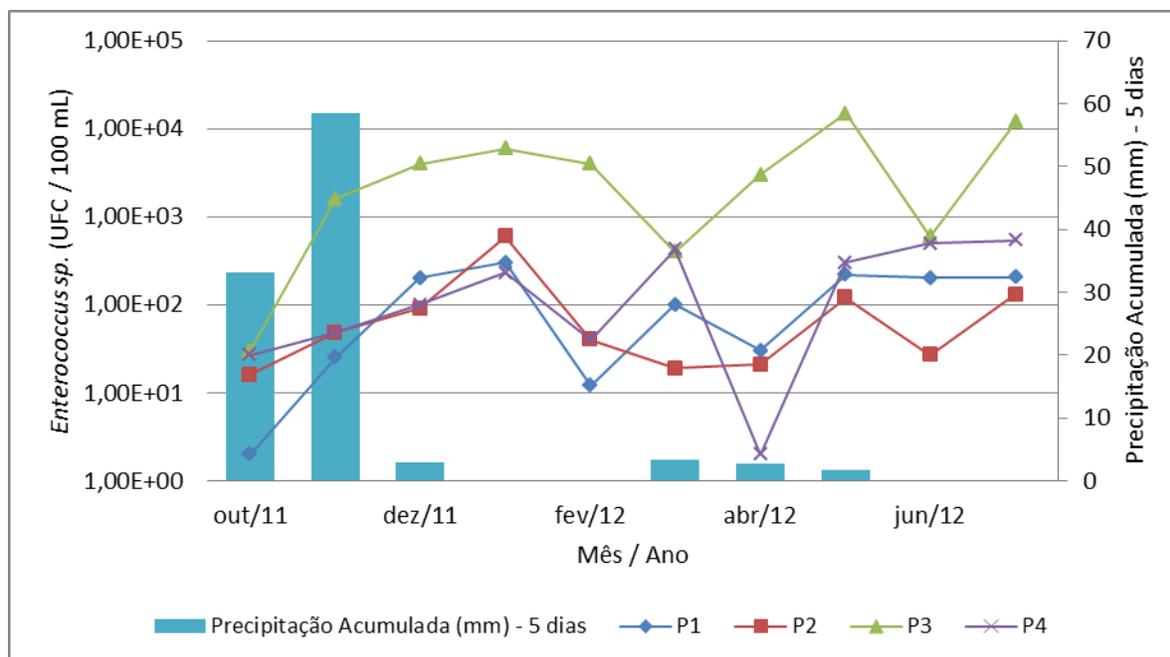


FIGURA 16 – Densidade de *Enterococcus sp.* (UFC / 100 mL) na água do estuário da Ilha das Caieiras, em Vitória / ES, e valores de precipitação (mm – acumulado de cinco dias anteriores às coletas), do período de janeiro de 2011 e julho de 2012.

Os valores obtidos para coliformes termotolerantes variaram de $1,0 \times 10^1$ UFC / 100 mL a $2,4 \times 10^4$ UFC / 100 mL, enquanto para enterococos os valores variaram de 2 a $1,5 \times 10^4$ UFC / 100 mL. Foi observado que a maior densidade em ambas as análises foi em P3, o ponto mais próximo ao bairro Ilha das Caieiras. Dentre os pontos estudados, não foram observadas diferenças significativas na densidade de coliformes termotolerantes ($p = 0,2459$) e de enterococos ($p = 0,3950$).

No período compreendido de janeiro de 2011 a setembro de 2011 não foram realizadas análises de enterococos em água. Entretanto no período de outubro de 2011 a julho de 2012 foi realizado o monitoramento de coliformes termotolerantes e enterococos simultaneamente e o comparativo da estatística descritiva está apresentado na tabela 12 a seguir.

TABELA 12 – Resultados por estatística descritiva (média geométrica, mediana, mínimo e máximo) da densidade de coliformes termotolerantes e *Enterococcus sp.*, em UFC / 100 mL, nos quatro pontos de monitoramento, no período de outubro de 2011 a julho de 2012.

Estatística Descritiva	Coliformes Termotolerantes (UFC / 100 mL)				<i>Enterococcus sp.</i> (UFC / 100 mL)			
	P1	P2	P3	P4	P1	P2	P3	P4
Média	1,92 x 10 ²	2,31 x 10 ²	4,49 x 10 ³	5,04 x 10 ²	6,30 x 10 ¹	5,56 x 10 ¹	1,89 x 10 ³	9,82 x 10 ¹
Mediana	1,50 x 10 ²	1,75 x 10 ²	6,80 x 10 ³	8,75 x 10 ²	1,50 x 10 ²	4,40 x 10 ¹	3,50 x 10 ³	1,65 x 10 ²
Mínima	2,00 x 10 ¹	2,00 x 10 ¹	3,00 x 10 ²	3,30 x 10 ¹	2,00	1,60 x 10 ¹	3,00 x 10 ¹	2,00
Máxima	2,40 x 10 ³	4,20 x 10 ³	2,40 x 10 ⁴	2,40 x 10 ³	3,00 x 10 ²	6,00 x 10 ²	1,50 x 10 ⁴	5,40 x 10 ²

A Resolução CONAMA 274/2000, legislação brasileira para balneabilidade, determina as características que as águas doces, salobras e salinas devem possuir para serem classificadas como próprias (excelente, muito boa, satisfatória) ou impróprias. A água é considerada própria satisfatória quando, em 80% ou mais de um conjunto de amostras obtidas em cada uma das cinco semanas anteriores, colhidas no mesmo local, houver, no máximo, 1.000 coliformes termotolerantes / 100 mL ou 800 *Escherichia coli* / 100 mL ou 100 enterococos / 100 mL. Os padrões referentes aos enterococos aplicam-se somente às águas marinhas. Nesta Resolução, as águas são consideradas impróprias quando no trecho avaliado for verificado que o valor obtido na última amostragem for superior a 2500 coliformes termotolerantes ou 2000 *Escherichia coli* ou 400 enterococos por 100 mililitros, ou ainda, incidência elevada ou anormal na região de enfermidades transmissíveis por via hídrica, indicada pelas autoridades sanitárias, presença de resíduos ou despejos, sólidos ou líquidos, inclusive esgotos sanitários, óleos, graxas e outras substâncias, capazes de oferecer riscos à saúde ou tornar desagradável à recreação.

Para comparação dos resultados obtidos no monitoramento na Ilha das Caieiras com a Resolução CONAMA 274/2000, foi considerado que o percentil 80% (p80) da densidade de Coliformes Termotolerantes das amostras de água, no período de janeiro de 2011 a julho de 2012, devem permanecer abaixo de 1000 UFC / 100 mL para serem consideradas própria para atividades recreacionais de contato primário. Nesta análise, foi verificado que o P3 permaneceu acima do preconizado nesta Resolução em 74% das amostras, sendo, então, considerado impróprio. Os pontos P1 e P2 permaneceram enquadrados como próprio para contato primário, visto que os resultados apontaram que 95% e 100% das amostras possuíam menos de 1000 UFC / 100 mL, respectivamente. No Ponto 4 foi observado que 67% das amostras estavam dentro do limite de 1000 UFC / 100 mL, porém a Resolução preconiza que ao menos 80% devem permanecer neste

limite. Para a análise de enterococos, cujo limite é de 100 UFC / 100 mL, verificou-se que todas as amostras seriam enquadradas como impróprias para contato primário pela Resolução CONAMA 274/2000, visto que as amostras de P1, P2, P3 e P4 apresentaram 50%, 70%, 10% e 40% dos resultados, respectivamente, dentro do limite preconizado nesta Resolução. Deve ser ressaltado, entretanto, que as análises realizadas foram mensais, e não semanais como prevê a legislação.

5.3. DETECÇÃO DE VÍRUS ENTÉRICOS

Os resultados obtidos no monitoramento dos vírus entéricos adenovírus (AdV), rotavírus (RV) e norovírus (NoV), nas amostras da água do estuário da Ilha das Caieiras, podem ser visualizados na tabela 13 a seguir. Os resultados apresentados foram obtidos a partir das duas técnicas moleculares utilizadas neste trabalho, a PCR Qualitativa e a PCR em Tempo Real (Quantitativa). Na tabela 14 encontram-se os resultados resumidos para cada ponto e todos os vírus estudados.

TABELA 13 – Resultado do monitoramento das amostras de água analisadas no período de janeiro de 2011 a julho de 2012, para adenovírus, rotavírus e norovírus. Análise por PCR Qualitativa e Quantitativa.

Mês	AdV				RV				NoV			
	P1	P2	P3	P4	P1	P2	P3	P4	P1	P2	P3	P4
jan/11	-	+	-	NA	-	-	-	NA	+	+	+	NA
fev/11	-	+	-	NA	-	-	-	NA	+	-	-	NA
mar/11	-	-	-	NA	-	+	-	NA	+	-	-	NA
abr/11	-	-	-	NA	+	+	+	NA	+	-	+	NA
mai/11	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-
jun/11	+	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-
jul/11	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ago/11	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
set/11	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-
out/11	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+
nov/11	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+
dez/11	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+	-
jan/12	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-
fev/12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
mar/12	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+
abr/12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
mai/12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
jun/12	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-
jul/12	-	-	-	+	-	+	+	+	-	-	+	-

Amostras positivas (+) e negativas (-) em P1, P2, P3 e P4. As amostras de P4, entre janeiro de 2011 e abril de 2011 não foram analisadas (NA).

TABELA 14 – Resumo dos resultados obtidos nas amostras de água analisadas no período de janeiro de 2011 a julho de 2012, para adenovírus (AdV), rotavírus (RV) e norovírus (NoV). Análise por PCR Qualitativa e Quantitativa.

Ponto de Amostragem	Vírus	Nº de Amostras Analisadas	Amostras Positivas	% de Amostras Positivas
P1	AdV	19	5	26,32
	RV		9	47,37
	NoV		8	42,11
P2	AdV	19	4	21,05
	RV		8	42,11
	NoV		2	10,53
P3	AdV	19	4	21,05
	RV		9	47,37
	NoV		7	36,84
P4	AdV	15	4	26,67
	RV		8	53,33
	NoV		5	33,33

Em todas as amostras analisadas foi detectada maior prevalência de rotavírus, quando comparado com os demais vírus estudados, sendo que, dentre as amostras positivas, 46,58% correspondem a RV, 30,14% a NoV e 23,29% correspondem a AdV.

As técnicas PCR Qualitativa e PCR Quantitativa proporcionaram resultados complementares entre si. A qPCR se mostrou sensível na detecção de partículas virais em amostras em que a técnica PCR Qualitativa não foi capaz de detectar, entretanto também se mostrou sensível à ação de inibidores, comumente presente em amostras ambientais. Neste estudo foi possível verificar que amostras de água, cujos resultados foram negativos para uma das técnicas, mostrou-se positivas na outra.

A PCR Qualitativa apontou positividade para adenovírus em 8,33% das amostras de água para os quatro pontos, enquanto a qPCR detectou AdV em 29,20% das amostras. A detecção de RV foi em 23,61% pela PCR Qualitativa e 60,4% pela qPCR, enquanto NoV GII obteve 25% de positividade das amostras pela PCR Qualitativa e apenas 12,5% pela qPCR.

Os resultados da amplificação do genoma viral pela técnica de PCR Qualitativa podem ser observados na tabela 15. A identificação dos vírus presentes nas amostras de água foi realizada a

partir de gel de agarose, como observado nas figuras 18, 19 e 20, para os vírus adenovírus, rotavírus e norovírus, respectivamente.

TABELA 15 – Resultado do monitoramento das amostras de água analisadas por PCR Qualitativa, no período de janeiro de 2011 a julho de 2012, para adenovírus, rotavírus e norovírus.

Mês	Adenovírus				Rotavírus				Norovírus			
	P1	P2	P3	P4	P1	P2	P3	P4	P1	P2	P3	P4
jan/11	-	-	-	NA	-	-	-	NA	+	+	+	NA
fev/11	-	-	-	NA	-	-	-	NA	+	-	-	NA
mar/11	-	-	-	NA	-	-	-	NA	+	-	-	NA
abr/11	-	-	-	NA	+	-	-	NA	+	-	+	NA
mai/11	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
jun/11	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
jul/11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ago/11	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
set/11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
out/11	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-
nov/11	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	+	+
dez/11	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
jan/12	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
fev/12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
mar/12	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+
abr/12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
mai/12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
jun/12	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-
jul/12	-	-	-	+	-	+	+	+	-	-	+	-

Amostras positivas (+) e negativas (-) em P1, P2, P3 e P4. As amostras de P4, entre janeiro de 2011 e abril de 2011 não foram analisadas (NA).

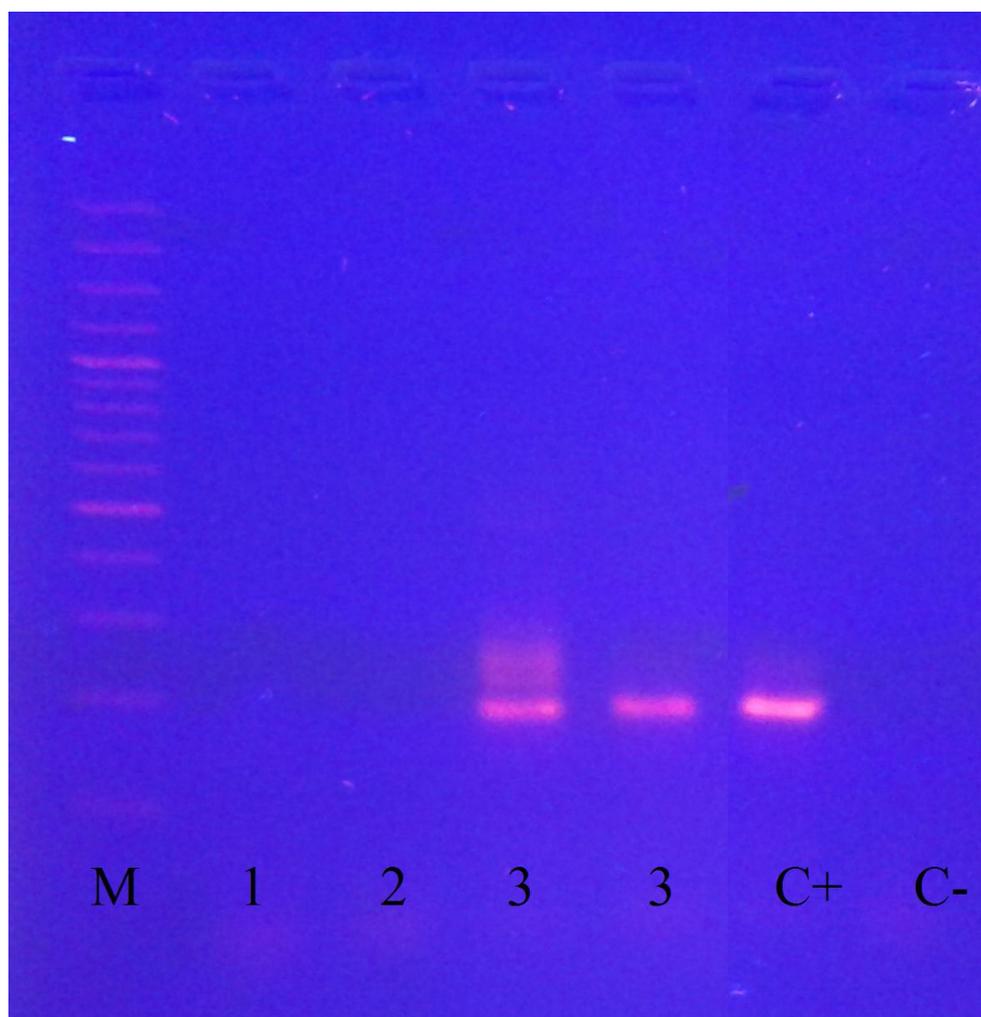


FIGURA 17 – Detecção em gel de agarose de produto da nested-PCR para Adenovírus (banda de 173pb). M: Marcador de peso molecular de 100pb; Da segunda à quinta coluna: Bandas referentes às repetições do Ponto 1 nos meses de março, abril, maio e junho de 2011. Sexta coluna: Controle positivo; Sétima coluna: Controle negativo.

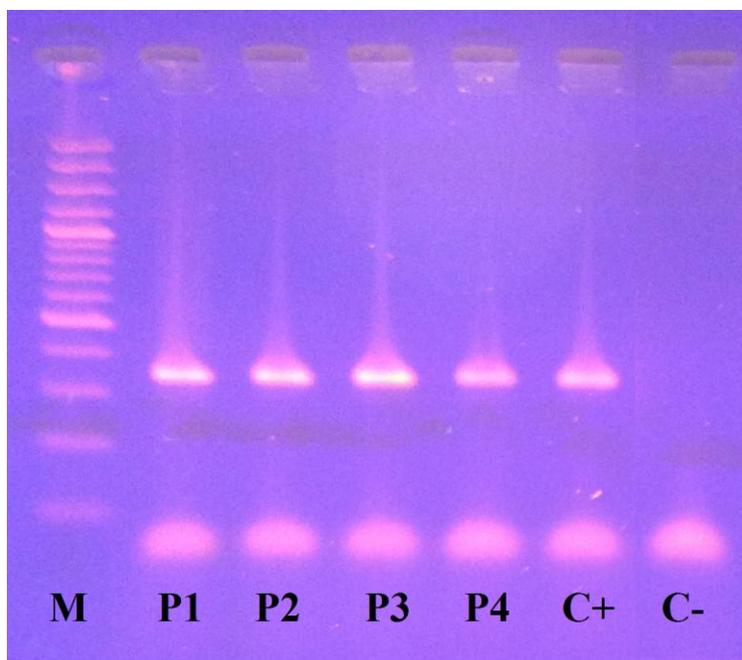


FIGURA 18 – Detecção em gel de agarose de produto da nested-PCR para Rotavírus (banda de 346pb). M: Marcador de peso molecular de 100pb; Da segunda à quinta coluna: Bandas referentes às amostras de P1, P2, P3 P4, de agosto de 2011, respectivamente. Sexta coluna: Controle positivo; Sétima coluna: Controle negativo. Amostras de agosto de 2011.

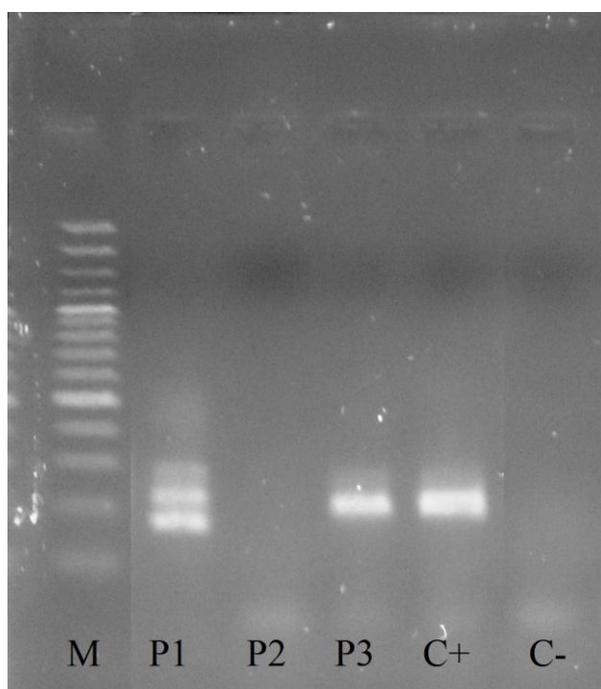


FIGURA 19 – Detecção em gel de agarose de produto da Semi-nested PCR para Norovírus (banda de 201pb). M: Marcador de peso molecular de 100pb; Da segunda à quarta coluna: Bandas referentes às amostras de P1, P2 e P3, de abril de 2011, respectivamente. Quinta coluna: Controle positivo; Sexta coluna: Controle negativo. Amostras de abril de 2011.

A quantificação de adenovírus, rotavírus e norovírus na água foi realizada nas amostras de janeiro de 2011 a janeiro de 2012, pela técnica PCR Real Time. Na tabela 16 estão apresentados os resultados positivos e seus respectivos valores em número de cópias genômicas em 100 mL de água (CG / 100 mL). As amostras em que não foi possível a detecção de vírus foram consideradas como resultados negativos (-).

Os valores médios, mediano, máximo e mínimos das amostras positivas da qPCR podem ser observados na tabela 17 a seguir.

TABELA 16 – Resultado da quantificação de adenovírus, rotavírus e norovírus em amostras de água (cópias genômicas em 100 mL de amostra) dos quatro pontos de monitoramento (P1, P2, P3 e P4), no período de janeiro de 2011 a janeiro de 2012.

Mês	Adenovírus (CG / 100 mL)				Rotavírus (CG / 100 mL)				Norovírus (CG / 100 mL)			
	P1	P2	P3	P4	P1	P2	P3	P4	P1	P2	P3	P4
jan/11	-	3,9 x 10 ¹	-	NA	-	-	-	NA	-	-	-	NA
fev/11	-	8,7 x 10 ¹	-	NA	-	-	-	NA	-	-	-	NA
mar/11	-	-	-	NA	-	8,8 x 10 ²	-	NA	-	-	-	NA
abr/11	-	-	-	NA	9,4 x 10 ³	5,3 x 10 ²	2,3 x 10 ³	NA	-	-	3,1 x 10 ¹	NA
mai/11	-	-	-	-	-	-	4,2 x 10 ¹	-	-	-	-	-
jun/11	9,2 x 10 ¹	-	3,4 x 10 ¹	-	9,2 x 10 ¹	-	-	-	8,3	-	-	-
jul/11	5,3 x 10 ¹	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ago/11	7,7 x 10 ¹	3,0 x 10 ²	2,3 x 10 ²	7,0 x 10 ¹	3,2 x 10 ⁴	3,5 x 10 ⁴	5,2 x 10 ⁴	2,9 x 10 ⁴	-	2,5 x 10 ¹	-	2,3 x 10 ¹
set/11	-	-	-	2,7 x 10 ²	8,7 x 10 ³	3,2 x 10 ³	3,8 x 10 ⁴	3,1 x 10 ²	-	-	-	-
out/11	4,6 x 10 ¹	1,2 x 10 ²	6,6	2,0 x 10 ³	5,6 x 10 ³	5,9 x 10 ³	1,6 x 10 ⁴	1,5 x 10 ⁴	-	-	-	1,5 x 10 ⁴
nov/11	3,0 x 10 ²	-	-	-	7,2 x 10 ²	6,9 x 10 ²	2,1 x 10 ³	3,9 x 10 ²	-	-	-	-
dez/11	-	-	1,8 x 10 ¹	-	1,2 x 10 ²	1,4 x 10 ³	6,0 x 10 ²	2,6 x 10 ²	-	-	1,7 x 10 ¹	-
jan/12	-	-	-	-	5,5 x 10 ¹	1,2 x 10 ²	-	1,1 x 10 ²	-	-	-	-

Não foi realizada análise em P4 (NA) no período de janeiro de 2011 a abril de 2011.

TABELA 17 – Estatística descritiva (média geométrica, mediana, máxima e mínima) dos resultados da qPCR para adenovírus, rotavírus e norovírus em P1, P2, P3 e P4, no período de janeiro de 2011 a janeiro de 2012.

Mês	Adenovírus (CG / 100 mL)				Rotavírus (CG / 100 mL)				Norovírus (CG / 100 mL)			
	P1	P2	P3	P4	P1	P2	P3	P4	P1	P2	P3	P4
MÉDIA	9,3 x 10 ¹	1,3 x 10 ²	3,2 x 10 ¹	3,3 x 10 ²	1,5 x 10 ³	1,9 x 10 ³	4,4 x 10 ³	2,2 x 10 ³	8,3	2,5 x 10 ¹	2,2 x 10 ¹	8,8 x 10 ²
MEDIANA	7,7 x 10 ¹	1,1 x 10 ²	2,6 x 10 ¹	2,7 x 10 ²	2,2 x 10 ³	1,5 x 10 ³	3,3 x 10 ³	4,3 x 10 ³	8,3	2,5 x 10 ¹	2,3 x 10 ¹	3,9 x 10 ³
MÁXIMO	3,0 x 10 ²	3,0 x 10 ²	2,3 x 10 ²	2,0 x 10 ³	3,2 x 10 ⁴	3,5 x 10 ⁴	5,2 x 10 ⁴	2,9 x 10 ⁴	8,3	2,5 x 10 ¹	3,1 x 10 ¹	1,5 x 10 ⁴
MÍNIMO	4,6 x 10 ¹	3,9 x 10 ¹	6,6	7,0 x 10 ¹	5,5 x 10 ¹	1,2 x 10 ²	4,2 x 10 ¹	1,1 x 10 ²	8,3	2,5 x 10 ¹	1,7 x 10 ¹	2,3 x 10 ¹

A síntese dos resultados de cada ponto estudado, no período de janeiro de 2011 a janeiro de 2012, utilizando as duas técnicas moleculares está apresentada na tabela 18.

TABELA 18 – Síntese dos resultados das amostras de água dos quatro pontos analisados, no período de janeiro de 2011 a janeiro de 2012, para adenovírus (AdV), rotavírus (RV) e norovírus (NoV), utilizando as técnicas PCR Qualitativa (PCR) e PCR Quantitativa (qPCR).

Tipo de análise molecular	P1		P2		P3		P4	
	Amostras Positivas	Positivas (%)						
AdV PCR	1	7,69	1	7,69	1	7,69	2	22,22
AdV qPCR	5	38,46	4	30,77	4	30,77	3	33,33
RV PCR	4	30,77	4	30,77	1	7,69	2	22,22
RV qPCR	8	61,54	8	61,54	7	53,85	6	66,67
NoV PCR	6	46,15	1	7,69	4	30,77	2	22,22
NoV qPCR	1	7,69	1	7,69	2	15,38	2	22,22

6. DISCUSSÃO

6.1. QUALIDADE FÍSICO-QUÍMICA DA ÁGUA

A turbidez da água apresentou aumento nos meses em que houve maior precipitação, como nos meses de abril e outubro de 2011. No mês de novembro de 2011 houve grande precipitação na Grande Vitória, mas não foi possível a realização da análise de turbidez, visto que o equipamento de medição estava danificado. Os meses de março de 2011, janeiro e junho de 2012 também apresentaram turbidez alta e, embora o acumulado de precipitação nos 5 dias anteriores à coleta tenha sido baixo, o acumulado mensal até a data de coleta foi de 295 mm, 402,8 mm e 96,2 mm, respectivamente. O valor máximo de turbidez em todos os pontos ocorreu nos períodos chuvosos, principalmente em P1, pois a água do rio Santa Maria da Vitória fica turva devido à lixiviação que o rio recebe ao longo de seu percurso. Os principais problemas que contribuem para degradação da qualidade das águas do rio Santa Maria da Vitória, entretanto, têm como

origem as fontes de lançamento de esgotos domésticos sem tratamento, podendo destacar também os efluentes de pocilgas e a drenagem de áreas agrícolas (MACINA & MENDONÇA, 2000).

Dentre as amostras analisadas, o P1 apresentou maior turbidez média e menor salinidade média, visto que este ponto localiza-se na foz do rio Santa Maria da Vitória, sofrendo, assim, grande influência da água doce deste corpo d'água. Este ponto também apresentou menor condutividade média, devido à diluição da água salgada com a água doce do rio. A salinidade nos quatro pontos estudados variou de menos de 0,1 ‰ (P1) a 27 ‰ (P2 e P4), com valores reduzidos principalmente em períodos chuvosos devido à diluição da água do estuário. Silva et al. (2005) também encontraram menores valores de salinidade em períodos com maior precipitação média. Estatisticamente, os valores encontrados para salinidade e precipitação acumulada dos 5 dias anteriores à coleta apresentaram correlação inversa nos quatro pontos estudados, ou seja, a salinidade da água reduz quando ocorre aumento da precipitação e se eleva em períodos secos. No mês de novembro de 2011 não foi realizada a medição da salinidade, pois o aparelho apresentou defeito.

Nas análises realizadas foi possível observar a estreita relação entre salinidade e condutividade, pois nos meses em que as amostras apresentaram salinidade elevada também foi detectada condutividade elevada. Diversos trabalhos mostraram a relação entre as variações de salinidade e condutividade e que os parâmetros da qualidade da água no estuário estão sujeitos à influência da maré, descarga fluvial e ventos, com influência significativa do fluxo de água doce e da circulação costeira (JUSTINO, 2009; KJERFVE, 1990; KRAMER, 1994; MIRANDA apud ALCANTARA & HARARI, 2006). A Resolução CONAMA 357/2005 classifica como água salobra aquelas com salinidade superior a 0,5 ‰ e inferior a 30 ‰, mas foi possível observar valores inferiores a 0,5 ‰ em P1 nos meses de março e julho de 2011 e janeiro de 2012, evidenciando a forte influência do Rio Santa Maria da Vitória neste ponto de estudo. Embora o P4 também esteja próximo à desembocadura de um rio, a sua localização permite maior mistura com a água salobra do estuário, pois está mais distante da foz, quando comparado ao P1.

Os valores de pH da água não apresentaram grandes variações ao longo do período estudado, sendo que os pontos não apresentaram diferenças significativas ($p = 0,6864$). Segundo a Resolução CONAMA 357/2005, em corpo d'água de água salobra classe 1, o pH deve

permanecer entre 6,5 - 8,5, o que ocorreu nos pontos analisados. A média dos quatro pontos analisados variou de 7,2 a 7,5.

Os resultados das análises físico-químicas em P2 e P3 foram semelhantes entre si, mesmo que as características ambientais nestes dois pontos sejam diferentes. O P2 é uma área de manguezal, com grande quantidade de vegetação no entorno e pouca influência antrópica, pois o local é acessado apenas por pescadores e não recebe esgoto *in natura* diretamente, somente através de correntes marinhas. O P3, ao contrário, recebe grande descarga de esgoto doméstico sem tratamento e não possui vegetação densa no entorno, sendo a área cercada por residências e comércios. O P4 passou a ser analisado a partir do mês de maio de 2011, e os resultados foram semelhantes aos observados em P2 e P3. Os resultados obtidos mostram que o estuário estudado possui características semelhantes ao longo de sua extensão, sendo que a qualidade da água de um ponto sofre influência dos demais pontos, devido, principalmente à sua proximidade e à ação das marés.

6.2. PRESENÇA DE COLIFORMES TERMOTOLERANTES E *Enterococcus sp.* NA ÁGUA

As variações de densidade de Coliformes Termotolerantes na água, ao longo dos 19 meses de monitoramento, podem ser observadas na figura 15. Os quatro pontos analisados apresentaram contaminação por resíduo fecal, possivelmente devido ao lançamento de esgoto *in natura* nos corpos hídricos da região. Como esperado, P3 apresentou maior densidade de bactérias coliformes termotolerantes, visto que este ponto está mais próximo à zona antrópica e o bairro Ilha das Caieiras ainda não possui completa cobertura de coleta e tratamento de esgoto, sendo lançado na região, então, o esgoto de residências e restaurantes sem tratamento prévio (CESAN, 12). Na maior parte do ano, P3 apresentou mais de 1.000 UFC por 100 mL de água (74% das amostras), ultrapassando o limite de balneabilidade preconizado pela Resolução CONAMA 274/2000. Neste ponto foi observada a presença de óleos e graxas na água, devido às embarcações presentes no cais, e de despejos de esgoto sem prévio tratamento. Na última amostra de água do Ponto 3 analisada neste estudo foram detectados $2,4 \times 10^4$ UFC de

coliformes termotolerantes / 100 mL, acima do limite de 2500 UFC / 100 mL determinado pela Resolução CONAMA 274/2000, caracterizando este ponto, então, como impróprio para recreação de contato primário, embora seja comum encontrar crianças e pescadores em contato com esta água. Os pontos P1 e P2 mantiveram-se dentro do limite permitido para água própria satisfatória, embora se deva considerar que as análises foram realizadas mensalmente, e não semanalmente conforme determina a legislação. O P4 também se mostrou contaminado por fezes, mas não é possível precisar se a origem é humana, pois este ponto recebe água do Rio Bubu, que corta o município de Cariacica e recebe contribuição de áreas rurais e urbanas. Em 67% das amostras analisadas em P4, a densidade de coliformes termotolerantes permaneceu abaixo de 1.000 UFC / 100 mL, mas não é possível afirmar que este ponto está próprio ou impróprio para contato primário, devido às análises terem sido mensais. Este resultado pode representar um problema de saúde pública, pois neste ponto ocorre a coleta de ostras para comercialização, que podem acumular contaminantes presentes na água e causar doenças, como gastroenterites (ERONDU & ANYANWU, 2005). Os pontos P1, P2 e P4 recebem esgoto indiretamente, diluído, e por isso apresentaram resultados abaixo dos encontrados em P3. Em trabalho realizado anteriormente neste mesmo estuário foi detectado até 10^5 UFC / 100 mL de *E. coli* na água (JESUS et al, 2006; JUSTINO, 2009). Moraes (2008) estudou pontos de lançamento de esgoto / drenagem urbana na Baía de Vitória e detectou até 10^7 UFC / 100 mL de coliformes termotolerantes.

De acordo com o que preconiza a Resolução CONAMA 357/2005, que dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências, o sistema estuarino da Baía de Vitória poderia ser classificado como corpo d'água Classe 1 – Água Salobra, de acordo com seus usos preponderantes (recreação de contato primário, conforme Resolução CONAMA no 274/2000; proteção das comunidades aquáticas; aquíicultura e atividade de pesca; etc.). Esta Resolução preconiza que, em água salobra classe 1, óleos e graxas e materiais flutuantes devem ser virtualmente ausentes. Em P3 é perceptível a presença de óleos e graxas na água devido, principalmente, a vazamentos de embarcações que ficam ancoradas no cais. Não foi observada a presença de óleos e graxas nos demais pontos. A resolução CONAMA 357/05 também impõe o limite de 1.000 coliformes termotolerantes / 100 mL em 80% ou mais de pelo menos 6 amostras coletadas durante o período de um ano, com frequência bimestral, para

usos que não sejam cultivo de moluscos bivalves ou recreação, sendo este limite ultrapassado em P3.

Os valores de coliformes termotolerantes encontrados nos quatro pontos de estudo são inversamente proporcionais à salinidade da água. Moraes (2008) atribuiu esta correlação à variação da maré e à entrada de água salobra da baía, de melhor qualidade. Bordalo et al. (2002) constatou que a alta salinidade possui efeito deletério em coliformes, então quanto maior a salinidade maior será o decaimento destes microrganismos.

A análise de enterococos foi realizada entre os meses de outubro de 2011 e julho de 2012 e os resultados podem ser observados na figura 16. Embora as amostras tenham sido coletadas mensalmente e o número não seja representativo para sua classificação, percebe-se que o P3 ultrapassou o limite estabelecido para água própria preconizado na Resolução CONAMA 274/2000, nos meses de novembro de 2011 a julho de 2012, totalizando 90% das amostras para este ponto. Os demais pontos apresentaram 60%, 30% e 60% (P1, P2 e P4, respectivamente) de amostras acima do limite estabelecido na Resolução. O aumento na densidade de enterococos encontrados em P3 se deve ao lançamento direto de esgoto no local, enquanto que os resultados encontrados em P1 e P4 estão relacionados com a qualidade dos rios Santa Maria da Vitória e Bubu, respectivamente, que recebem esgoto ao longo de seus leitos, além de material lixiviado pela chuva (período de novembro a março, principalmente). Diversos estudos tem mostrado que as chuvas têm papel fundamental no arraste de fezes humanas e de animais para os corpos d'água (GELDREICH, 1998; AMARAL et al, 2003; VASCONCELLOS et al, 2006). O P2, devido à sua posição geográfica, é o ponto que menos sofre influência de esgoto doméstico, e isso se refletiu na sua qualidade microbiológica, com menor média de enterococos dentre os pontos estudados.

A detecção de enterococos em amostras ambientais foi mostrada em diversos estudos anteriores. Silva et al. (2008) verificaram a presença de *Enterococcus* em praias de São Luis, Maranhão, e constataram elevada densidade destes microrganismos, principalmente no período chuvoso, 10^5 UFC / 100 mL de amostra. No período seco, os valores encontrados foram próximos ao encontrado no presente estudo, de 10^2 a 10^3 UFC / 100 mL. Choi e Jiang (2005) detectaram 10^2 UFC/100 mL em amostras de água de rio urbanos, da Califórnia / EUA, no período seco, mas houve pico de 10^3 UFC / 100 mL após evento chuvoso (últimas 48 horas). He e Jiang (2005)

detectaram até 10^6 UFC / 100 mL em efluente primário de uma estação de tratamento de esgoto também da Califórnia, e até 10^5 UFC/100 mL em efluente tratado (até tratamento secundário – sem desinfecção).

Os valores mais elevados obtidos para coliformes termotolerantes e enterococos foram observados nos meses em que a coleta foi realizada após período de chuva. Os eventos chuvosos contribuem para lançamento de contaminantes nos corpos d'água, pois lixiviam o solo no entorno e aumentam o lançamento na rede de drenagem. Além disso, o movimento da maré também influencia na qualidade da água, pois o fato da maré baixar é suficiente para que o escoamento dos esgotos sanitários presentes no interior das galerias de drenagens se dirija à baía de Vitória (MORAES, 2008). Dentre as amostras analisadas no presente trabalho, não foi observada variação sazonal significativa entre os pontos e microrganismos testados.

A densidade microbiológica detectada na água do estuário foi maior para coliformes termotolerantes que para enterococos, na maior parte do tempo. A relação coliformes termotolerantes / enterococos neste trabalho variou de 0,52 a 66,67. Geldreich & Kenner (1969) propôs que, para diferenciar a poluição de origem humana da não humana, considerando que os dois grupos ocorrem em proporções diferentes nas fezes humanas e de outros animais endotérmicos, a relação acima de 4,0 sugere contaminação humana e abaixo de 0,7 indicaria contaminação por outros animais. Feachem et al. (1973), entretanto, propôs um novo valor: igual ou superior a 2,0 como índice de contaminação humana. Grant et al. (2001) sugerem que enterococos encontrados no ambiente podem ter outras fontes além do esgoto ou fezes, tais como materiais de plantas, insetos e répteis. Futuros estudos são necessários para identificar a fonte de organismos indicadores, auxiliando no desenvolvimento de abordagens viáveis para reduzir e remediar a contaminação microbiana (JENG et al., 2005).

Diversos estudos detectaram a presença de coliformes termotolerantes e enterococos em amostras de diferentes ambientes. Ribeiro (2002) analisou amostras de água do mar da praia de Camburi, Vitória, e detectou prevalência de enterococos em detrimento de coliformes termotolerantes e *E. coli*. Ribeiro atribuiu este resultado ao tempo de sobrevivência e a maior resistência de enterococos em águas salinas, quando comparado à *E. coli*. Bofill-Mas et al. (2010) avaliaram a qualidade microbiológica de águas recreacionais em diversos países da Europa, abrangendo água doce e marinha, e detectaram prevalência de *E. coli*, em comparação

com os enterococos, na maioria das amostras analisadas, em ambos ambientes. Choi e Jiang (2005) estudaram a água de rios urbanos de San Gabriel e Los Angeles, na Califórnia, e detectaram também maior prevalência de coliformes totais e termotolerantes, quando comparado com enterococos. La Rosa et al. (2010) detectaram *E. coli* e enterococos em esgoto bruto e tratado em uma estação da Itália e verificaram que a média de *E. coli* na entrada e na saída da estação era maior que a média de enterococos.

No presente estudo foi verificada maior densidade média de bactérias coliformes termotolerantes que enterococos nas amostras de água devido, possivelmente, à maior quantidade de coliformes eliminados nas fezes, em comparação aos enterococos (FAECHEM et al., 1973). A média de eliminação de microrganismos nas fezes é de 10^6 a 10^9 coliformes termotolerantes por grama e 10^5 a 10^8 enterococos por grama, e suas densidades nos esgotos bruto e tratado permanecem com estas mesmas proporções em diversos trabalhos (LA ROSA et al., 2010; FAECHEM et al., 1973).

Neste trabalho não foi observada correlação estatística significativa entre as concentrações de coliformes termotolerantes e enterococos. Noble et al (2003), em estudo realizado na costa da Califórnia, também não encontraram correlação significativa entre estes microrganismos tanto no Verão quanto no Inverno, porém tal correlação foi verificada nas amostragens feitas 24 horas após uma tempestade no Verão. Essa ausência de correlação entre as bactérias indicadoras de contaminação fecal também foi observada por Shibata et al. (2004), estudando duas praias na Flórida.

Segundo Jeng e colaboradores (2005), o escoamento de águas pluviais urbanas pode contribuir para a deterioração da qualidade da água de um corpo receptor. Em seu trabalho, foi examinada a distribuição de organismos bioindicadores no estuário de um lago e constatou-se um aumento significativo nas concentrações de coliformes termotolerantes e enterococos na coluna d'água e no sedimento após um evento chuvoso. Observou-se que, além da drenagem pluvial, o sedimento estuarino também contribui para o aumento da densidade de bactérias na água, pois serve como reservatório de microrganismos, podendo prolongar a sobrevivência destes no ambiente e recontaminar a coluna d'água através de ressuspensão. Após o período chuvoso, foram necessários três dias para a normalização dos níveis de microrganismos na coluna d'água e sete dias no sedimento. A sedimentação das partículas suspensas contribuiu para a diminuição dos

níveis de bactérias na coluna d'água, uma vez que até 27,5% dos coliformes termotolerantes e 11,5% dos enterococos podiam ser detectadas adsorvidas a partículas em suspensão na água (JENG et al., 2005). Além das chuvas, com as variações da maré também podem ocorrer alteração na qualidade da água, com a entrada ou diluição de contaminantes no estuário. Moraes (2008) observou que os períodos de baixamar favorecem o escoamento dos esgotos sanitários contidos no interior das galerias de drenagem em direção à baía de Vitória e canal da Passagem, aumentando assim, a concentração dos nutrientes nos pontos de coleta.

Pesquisas realizadas por Bordalo et al. (2002) testaram a resistência dos coliformes termotolerantes e enterococos em estuário tropical com relação à salinidade, e constatou-se que este parâmetro, em alta concentração, tem efeito deletério em bioindicadores de poluição fecal, especialmente em coliformes, e que, independente do tratamento, a sobrevivência de enterococos era sempre maior que a de coliformes termotolerantes. Também foi sugerido que enterococos talvez possam ser melhores indicadores sanitários para monitoramento de poluição fecal.

Autoridades de saúde têm tradicionalmente usado organismos indicadores (por exemplo, coliformes termotolerantes) para monitorar a segurança da qualidade da água. A Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos recomendou a utilização de *Escherichia coli* e enterococos como indicadores para a água doce e água salobra, respectivamente (EPA EUA, 1986).

A presença de bactérias coliformes termotolerantes e enterococos no estuário estudado mostra como este ambiente vem sofrendo com a ação antrópica, com lançamentos diários de esgoto sem tratamento. A Região da Grande São Pedro está inserida no programa do governo estadual para coleta e tratamento de esgoto (Projeto Águas Limpas – CESAN), mas muitas residências ainda lançam seus efluentes na rede de drenagem urbana, podendo causar sérios problemas de saúde na população que utiliza o estuário como fonte de renda e recreacional.

6.3. PRESENÇA DE VÍRUS ENTÉRICOS NA ÁGUA

Neste estudo foi verificada a presença de adenovírus, rotavírus e norovírus GII em amostras de água do estuário da Ilha das Caieiras, Vitória, utilizando as técnicas PCR Qualitativa e PCR em Tempo Real. A amplificação do material genético viral por análises moleculares permitiu a detecção de adenovírus em 23,61% das amostras analisadas, enquanto a positividade de rotavírus e norovírus foi de 47,22% e 30,55%, respectivamente.

No estudo da presença de adenovírus nas amostras de água, no P4 foi observada maior positividade que nos demais pontos, perfazendo 26,67% de amostras positivas. O número de amostras positivas para adenovírus detectadas neste trabalho mostrou-se inferior ao detectado em estudo realizado por Justino (2009), em P1, P2 e P3, no período de fevereiro/2008 e março/2009, em que foram detectadas 76,7% de amostras positivas para AdV (32 positivas em 42 amostras). Contudo, as amostras coletadas no trabalho de Justino foram realizadas em períodos com pluviosidade (mm) maior que a do presente estudo, o que facilita a entrada de contaminantes provenientes de aglomerados residenciais, principalmente pela rede pluvial, e de áreas rurais (estábulo, pocilgas e criações de gado) próximos a corpos d'água (JENG et al., 2005; MORAES, 2008). Além disso, adenovírus têm sido encontrados em esgoto doméstico (PUIG et al., 1994; PINA et al., 1998) e a redução da positividade encontrada neste trabalho, em relação ao trabalho de Justino (2009), pode estar relacionada, também, ao aumento da cobertura de tratamento de esgoto devido aos projetos de saneamento em municípios adjacentes ao estuário estudado (Projeto Águas Limpas e Pró-Rural, CESAN, 2008 – 2012).

Estudos realizados em diversos países concluíram que os adenovírus são mais prevalentes que enterovírus em água e sugerem sua utilização como indicador de contaminação de corpos d'água, visto que AdV são abundantemente excretados em fezes e urina (até 10^{11} partículas virais por grama, em picos de infecção), são mais estáveis no meio ambiente, são resistentes à radiação UV, persistem por longo período em esgotos e ambientes aquáticos e são mais resistentes aos processos de tratamento de efluentes que bactérias entéricas normalmente utilizadas para biomonitoramento (LA ROSA et al., 2010; FONG et al.; 2005; CASTIGNOLLES et al., 1998; PINA et al., 1998; BOFILL-MAS et al., 2006; THURSTON-ENRIQUEZ et al., 2003; BOFILL-MAS et al., 2010; ENRIQUEZ et al., 1995, GERBA et al., 2002a, GERBA et al., 2002b).

Entretanto, a detecção de adenovírus por reações de PCR podem ser inibidas pela presença de metais tóxicos, ácidos húmicos e fúlvicos associados aos esgotos, rios e águas costeiras (JIANG, 2006; CASTIGNOLLES et al., 1998). Sdiri-Loulizi et al. (2010) estudaram esgoto bruto e efluente tratado em Monastir, Tunísia, e detectaram menor prevalência de adenovírus (0,4%), quando comparado a rotavírus (32%) e norovírus (4,4%).

Com relação aos rotavírus, as metodologias utilizadas detectaram 34 amostras positivas de água para estes vírus, das 72 analisadas (47,22%) neste estudo, apresentando prevalência maior que a encontrada para adenovírus. Para RV, o ponto que sofre influência do Rio Bubu, P4, apresentou maior positividade que os demais pontos, com 8 amostras positivas de 15 amostras analisadas, totalizando 53,33% de positividade. O Ponto 1 e o Ponto 3 apresentaram 47,37% cada, e P2 apresentou 42,11% de amostras positivas para este vírus. Os pontos P1, P2 e P4 sofrem influência dos rios Santa Maria da Vitória (P1 e P2) e Bubu (P2 e P4) e, por apresentarem alta prevalência de RV sugere-se que a contaminação é proveniente destes rios, que cortam diversos municípios do estado. Além de estarem presentes nas fezes humanas, os rotavírus também podem estar contidos em fezes de animais, como os suínos (NISHIDA et al, 2009) et al., 2009). Assim, a contaminação da água por rotavírus pode estar relacionada, também, à lixiviação de áreas agropecuárias nos municípios que fazem parte da bacia dos rios Bubu e Santa Maria da Vitória (Cariacica, Santa Maria de Jetibá e Santa Leopoldina). Neste caso, as chuvas contribuíram para o despejo de poluentes de áreas rurais nos leitos dos rios, possivelmente provenientes de currais, pocilgas, fossas e sumidouros mal construídos e esgotos domésticos. A positividade detectada em P3 era esperada devido, principalmente, ao contínuo lançamento de esgoto *in natura* do bairro Ilha das Caieiras no estuário. A presença de RV em esgoto foi observada por Mehnert e Stewien (1992), com detecção de rotavírus em 20,6% de amostras de esgoto da cidade de São Paulo, e por Garrafa (2009), em que foi detectado positividade em 81,7% de amostras de esgoto bruto e 47,4% em esgoto tratado.

A positividade para rotavírus nas amostras de água deste estudo já era esperada, visto que o estuário da Ilha das Caieiras é conhecidamente contaminado por esgotos domésticos e que estudo anterior realizado por Justino (2009) detectou, neste mesmo local, prevalência de RV em 88,1% das amostras analisadas. A elevada prevalência de RV em amostras ambientais tem sido descrita por muitos autores (GERBA et al., 1996; MIAGOSTOVICH et al., 2008), principalmente em áreas que recebem esgoto sem tratamento, visto que estes microrganismos são eliminados nas

fezes em níveis elevados e podem sobreviver por dias a semanas, dependendo das condições ambientais. Estudos têm detectado RV em águas superficiais em concentração variando de 0,66 a 29 partículas virais por litro, enquanto que a eliminação nas fezes é de até 10^{10} partículas virais/g por semana (GERBA et al., 1996; GRIFFIN et al. 2003; JIANG et al., 2005).

O Ministério da Saúde Brasileiro implementou, em 2006, a Vacina Oral de Rotavírus Humano (VORH), Rotarix, em todos os seus 27 estados e no Distrito Federal. Esta vacina é dirigida à população de menores de seis meses de idade e atualmente faz parte do Programa Nacional de Imunização, com o objetivo de reduzir a mortalidade infantil (DO CARMO et al., 2011). Entretanto, a alta prevalência de RV foi observada nas amostras do estuário estudado, apesar de a região da Ilha das Caieiras apresentar a cobertura vacinal com a VORH. A alta prevalência de RV nas amostras de água, mesmo com a cobertura vacinal, pode estar dentro da flutuação normal de co-circulação de genótipos de RV, mas afirmações conclusivas não podem ser feitas, pois não foram realizados experimentos para conferir a genotipagem dos vírus estudados.

As amostras positivas para norovírus representam 30,55% do total de amostras analisadas por PCR. Dentre os pontos estudados, P1 apresentou positividade em 42,11% das amostras, enquanto P2, P3 e P4 foram positivos em 10,53%, 36,84% e 33,33% das amostras analisadas, respectivamente.

A detecção de norovírus ocorreu de forma homogênea ao longo do período de monitoramento, não sendo observada influência de sazonalidade nos resultados obtidos. Em estudos realizados no Japão detectou-se NoV principalmente no inverno, mas estes vírus também foram detectados no verão (HARAMOTO et al., 2005; KATAYAMA et al., 2008; YAN et al., 2003). Para Katayama et al. (2008), a existência de NoV no verão sugere a circulação do vírus no ambiente ao longo do ano, incluindo as temporadas não-epidêmicas. Na Grande Vitória, ES, as temperaturas médias permanecem constantes, com pouca variação entre as estações, não interferindo, então, na distribuição de NoV ao longo do ano.

Os norovírus geralmente são eliminados em grandes quantidades durante os estágios iniciais da doença, com até 10^8 partículas virais por grama de fezes. A liberação destes vírus na forma infecciosa ocorre não apenas no momento da doença, mas também durante o período de incubação e após a recuperação do hospedeiro, sendo que em 30% dos casos o derramamento do vírus ocorre por até 3 semanas após a infecção. Os NoVs podem sobreviver fora do hospedeiro e

são resistentes às condições adversas, como flutuações de pH (retêm a infectividade mesmo em pH 3) e tratamento térmico (30 minutos a 60 °C). Os norovírus mostram-se bastante resistentes ao cloro, pois o vírus permanece infeccioso após 30 min na presença de 0,5 a 1 mg de cloro livre por litro, entretanto a concentrações mais elevadas (> 2 mg de cloro livre / L) o vírus é inativado (APPLETON, 2000; KOOPMANS & DUIZER, 2004). Assim, a grande carga viral presente nas fezes de pessoas contaminadas e a resistência deste vírus no ambiente possibilitaram a detecção deste vírus nas amostras estudadas, mesmo em períodos não epidêmicos.

Dos pontos de coleta de água analisados neste estudo, o Ponto 1 foi o mais contaminado, sendo encontrado um ou mais vírus em 68,42% das amostras analisadas, seguido dos pontos P4 (66,67), P3 (57,89%) e P2 (52,63%). Neste trabalho foi possível observar a simultânea contaminação da água por dois ou três vírus em 19 amostras das 72 analisadas (26,38%), sendo 31,57% (6/19) das amostras contaminadas com adenovírus e rotavírus, 5,26% (1/19) de contaminação de AdV e NoV, 26,31% (5/19) contaminadas por rotavírus e norovírus e sete amostras foram positivas para os três vírus (adenovírus, rotavírus e norovírus), totalizando 36,84%. Durante o monitoramento, no mês de agosto de 2011 foram detectados os três vírus em todos os pontos analisados, sendo que a alta frequência de amostras positivas deste mês pode estar relacionada à pluviosidade, visto que a coleta foi realizada em dia chuvoso, podendo ter havido contribuição de esgoto sanitário devido ao escoamento superficial (JENG et al., 2005). Neste trabalho não foi observada relação entre os resultados positivos para vírus entéricos e a sazonalidade.

A tabela 19 apresenta uma revisão de literatura com os resultados obtidos para estes vírus em estudos realizados em diversas partes do mundo.

TABELA 19 – Resultados obtidos na detecção de adenovírus (AdV), rotavírus (RV) e norovírus (NoV) em amostras ambientais. Estudos realizados em diversos países.

REFERÊNCIA / LOCAL	TIPO DE AMOSTRA	RESULTADOS DA DETECÇÃO DE VÍRUS ENTÉRICOS
MEHNERT & STEWIEN (1992) / Brasil	Esgoto bruto e baía	RV em 29.8% das amostras analisadas.
PUIG et al. (1994) / Espanha	Esgoto e água fluvial	AdV em 100% das amostras analisadas.
PINA et al. (1998) / Espanha	Amostras ambientais	93% de AdV em esgoto doméstico; 23,5% de AdV em efluentes matadouro com fezes de animais; 65% de AdV em amostras de rio; 77% de AdV em amostras de água do mar.
KATAYAMA et al. (2002) / Japão	Água marinha	NoV GII em 12,5% das amostras analisadas.
VAN HEERDEN et al. (2003) / África do Sul	Água bruta e tratada	AdV em 12,75% de amostras de água bruta e em 4.41% de amostras de água tratada.
JIANG & CHU (2004) / Estados Unidos	Água fluvial e baía	AdV em 52% das amostras analisadas.
MIAGOSTOVICH et al.(2008) / Brasil	Água fluvial	AdV em 30,8% das amostras, RV em 44,2% e NoV em 5,8%.
HAMZA et al. (2009) / Alemanha	Água fluvial	97,5% de amostras positivas para AdV, 90% para RV e 31,7% para NoV.
JUSTINO (2009) / Brasil	Água estuarina	AdV em 76,2% das amostras, RV em 88,1% e NoV GII em 4,8%.
VERHEYEN et al. (2009) / África Ocidental	Água potável	AdV em 9,1% das amostras e NV em 3,4%.
LOSS (2012) / Brasil	Água de estuário	AdV em 8,33% das amostras, RV em 23,61% e NoV GII em 25%.

A prevalência de adenovírus é observada no estudo de Hamza e colaboradores (2009), mas trabalhos realizados por Justino (2009) e Miagostovich et al. (2008) detectaram prevalência de rotavírus nas amostras ambientais. Nestes três trabalhos detectou-se menor prevalência de NoV, o que não foi observado no presente estudo. Em comparação ao trabalho realizado por Justino (2009), nos pontos P1, P2 e P3 observou-se que nas análises atuais as amostras foram menos positivas para adenovírus e rotavírus. Este resultado pode ser devido a uma combinação de fatores ambientais, como a influência da pluviosidade, pois no trabalho anterior as coletas foram realizadas após períodos de maior precipitação que a registrada nas coletas realizadas em 2011 e 2012 deste trabalho, e aumento da cobertura de esgotamento sanitário, que vem sendo implantado na região de influência do presente estudo. Além disso, a redução da prevalência de RV observada neste trabalho, em comparação com o trabalho de Justino realizado em 2009, pode

ser devido ao aumento da cobertura vacinal, iniciada em 2006. De acordo com o DATASUS, a cobertura vacinal contra o rotavírus em 2009 foi de 93,77%, enquanto que em 2011 foi de 97,07% (BRASIL, 2012). A detecção de norovírus observada no atual trabalho em comparação ao trabalho de Justino (2009), entretanto, sugere que mesmo com o aumento da cobertura de saneamento os norovírus são capazes de sobreviver e/ou que houve um aumento da circulação deste tipo de vírus na região do estuário da Ilha das Caieiras no período estudado. O aumento da prevalência de NoV no presente estudo também pode estar relacionada à adição de uma nova metodologia para detecção deste vírus, a qPCR.

Embora tenham sido sugeridos como indicadores de poluição, os adenovírus tiveram menor prevalência dentre os vírus estudados neste trabalho, sugerindo que este não seria o marcador de contaminação ambiental mais adequado para o estuário na Ilha das Caieiras.

A quantificação de adenovírus, rotavírus e norovírus em amostras de água do estuário mostrou que os pontos estudados estão contaminados por fezes provenientes de esgotos da região. Os pontos P1 e P4, que estão próximos à foz dos rios Santa Maria da Vitória e Bubu, sofrem influência direta destes corpos d'água que, conhecidamente são poluídos com esgotos domésticos e lixiviados de áreas rurais. O valor máximo observado para AdV foi de $3,0 \times 10^2$ cópias genômicas em 100 mL de amostra, em P1, e $2,0 \times 10^3$ cópias genômicas de AdV / 100 mL, em P4. No estudo de Muscillo et al. (2008) foram detectadas $2,3 \times 10^7$ cópias genômicas de AdV em 100 mL de amostra de água de rio na Itália, enquanto Hundesa et al. (2006) detectaram 10^1 cópias genômicas em 100 mL de água de um rio na Espanha. Resultados semelhantes aos encontrados no presente trabalho foram apresentados por Choi e Jiang (2005), no qual detectaram até 10^3 cópias genômicas em 100 mL de água de rio na Califórnia, EUA, e por Haramoto et al. (2010), com detecção de 10^2 a 10^3 cópias genômicas por 100 mL de água de rio no Japão.

No ponto mais próximo ao bairro Ilha das Caieiras, o P3, o valor máximo detectado foi de $2,25 \times 10^2$ cópias genômicas de adenovírus em 100 mL de amostra no mês de agosto de 2011. Esperava-se que a quantidade de vírus nas amostras de P3 fosse superior aos dos demais pontos, visto que o lançamento de esgoto *in natura* ocorre a poucos metros do local onde a coleta foi realizada. Comparando com o estudo de La Rosa et al. (2010), na qual detectaram média de $3,3 \times 10^9$ e $7,6 \times 10^8$ cópias genômicas de AdV em 100 mL de amostras de esgoto bruto e tratado,

respectivamente, em uma estação de tratamento na Itália, o resultado encontrado em P3 mostrou-se baixo, visto que este ponto sofre a maior influência direta de lançamentos de esgoto sem tratamento. Observando a localização do Ponto 3, constatou-se que este se localiza em uma área de lançamento de esgoto sem tratamento proveniente dos restaurantes e residências do entorno, mas não é o ponto principal de lançamento do bairro Ilha das Caieiras. O lançamento de esgoto do bairro é localizado ao norte de P3, em uma zona popularmente chamada de valão, separada de P3 fisicamente e cercada por vegetação típica de manguezal. O valão (figura 21) recebe água pluvial do bairro, mas as ligações clandestinas de esgoto contaminaram a água e deterioraram a beleza paisagística da região. Devido a sua posição geográfica na baía de Vitória e ao regime de maré, a água proveniente do valão atinge o P3 quando a maré está em vazante, entretanto este trabalho foi realizado em período de maré enchente, com a água do estuário diluída com a entrada de água marinha proveniente da baía de Vitória. Ao sul de P3 existem lançamentos pontuais de lançamentos de esgoto provenientes das residências, mas não tão significativo quanto o que ocorre ao norte do cais. He e Jiang (2005) estudaram a presença de adenovírus em amostras de esgoto e observaram 10^5 cópias genômicas de AdV por 100 mL de esgoto tratado e de 10^2 a 10^3 cópias genômicas de AdV por 100 mL em águas de estuário na Califórnia. Assim, percebe-se que mesmo sob influência do lançamento de esgoto sem tratamento da região da Ilha das Caieiras, o P3 apresentou similar quantidade de material viral de AdV que o estuário estudado por He e Jiang (2005).

No Ponto 2 foi observada maior número de cópias genômicas por 100 mL em agosto de 2011, com a detecção de $3,01 \times 10^2$ cópias genômicas por 100 mL de amostra de água. O valor observado neste ponto foi superior aos dos demais pontos neste mês de monitoramento, o que pode ser explicado devido à coleta ter sido realizada em dia chuvoso, pois a chuva contribui para a liberação de microrganismos depositados no sedimento. Neste ponto o aspecto do sedimento é menos arenoso que nos demais pontos e facilmente é ressuspenso quando da agitação da água. Neste caso, o sedimento funcionou como reservatório de microrganismos, permitindo sua sobrevivência por longos períodos e os liberando para a coluna d'água quando da ocorrência de eventos chuvosos (JENG et al., 2005).

Assim como para adenovírus, os resultados da análise de rotavírus se mostrou similar entre todos os pontos estudados no estuário da Ilha das Caieiras. Entre os pontos, o Ponto 3 apresentou menor número de amostras positivas por qPCR (53,84%), entretanto a quantidade média de

material viral detectada foi superior aos demais pontos, $3,25 \times 10^3$ cópias genômicas/100 mL ($1,26 \times 10^3$, $1,56 \times 10^3$ e $1,97 \times 10^3$ cópias genômicas/100 mL para P1, P2 e P4, respectivamente). A grande quantidade de partículas virais de RV liberada nas fezes em períodos de surto pode ter contribuído para a grande quantidade de cópias genômicas detectadas no estuário em estudo. Durante o monitoramento, foi observada a presença de crianças de faixa etária compreendida entre 4 e 8 anos brincando no ponto de despejo de esgoto do bairro, no valão localizado ao norte do cais e de P3. Na figura 21 é possível observar a situação do local escolhido para recreação por estas crianças.



FIGURA 20 – Zona de lançamento de água de drenagem urbana, mas atualmente contaminada pela descarga de esgoto *in natura* proveniente de ligações clandestinas. Em A e B é observada a presença de crianças sobre a manilha de lançamento; em C é mostrado o ponto de lançamento de água de drenagem / esgoto no “valão”; em D é possível visualizar a presença de crianças em contato primário com a água contaminada.

As crianças que brincavam na água contaminada relataram que sofriam constantemente com diarreias e vômitos, e que sempre eram levadas por suas mães ao pronto atendimento do bairro em que moram. Entretanto, aparentemente nenhuma atitude foi tomada para evitar que estas pessoas entrem em contato com a água contaminada, visto que estas utilizam o valão para recreação. Assim, percebe-se que o adoecimento destas crianças está longe de deixar de ocorrer, visto que a quantidade de vírus despejado no ambiente pelas fezes de pessoas infectadas é extremamente elevada (até 10^{10} / g), e este ambiente permanecerá como foco de contaminação, pois os RV podem persistir no ambiente por longos períodos de tempo (CARTER, 2005). Mesmo com a implantação de tratamento de esgoto no bairro, a redução destes vírus no ambiente a curto e médio prazos poderá ser pouco significativa, visto que RV possuem resistência a processos de tratamento físico-químicos utilizados pelas plantas de tratamento de esgoto (ANSARI et al., 1991; HAMZA et al., 2009).

A detecção de rotavírus por qPCR em amostras do P4 indica a alta contaminação do Rio Bubu por este vírus. A elevada positividade para RV em amostras de água fluvial também foi observada por Hamza e colaboradores (2009) em um rio da Alemanha, em que 90% de amostras estavam contaminadas por este vírus, com pico de $4,2 \times 10^3$ cópias genômicas em 100 mL de amostra. Entretanto, como dito anteriormente, a contaminação do P4 pode ser de origem humana e animal, visto que o Rio Bubu corta áreas rurais do município Cariacica. O elevado grau de homologia genética entre rotavírus humanos e animais foi observado por Gentsch et al. (2005) e a reação cruzada da qPCR pode ter detectado o rotavírus humano e rotavírus de animais nas amostras de água analisadas. Para determinar a origem do rotavírus encontrado nas amostras de água deverá ser realizada análise filogenética destes vírus, o que não é objetivo deste trabalho. Embora haja a incerteza da fonte de contaminação por rotavírus, aparentemente a contaminação por RV humanos é mais provável, visto que os pontos estudados ainda recebem esgoto doméstico direta ou indiretamente.

O pico de maior número de cópias genômicas de rotavírus foi observado em P3, com $5,24 \times 10^4$ cópias genômicas/100 mL na amostra do mês de agosto de 2011, possivelmente devido à sua maior proximidade com o bairro Ilha das Caieiras e à coleta ter sido realizada em dia chuvoso, com maior despejo de lixiviado no estuário próximo a este ponto.

Embora a qPCR tenha detectado alta prevalência de rotavírus nas amostras estudadas no estuário da Ilha das Caieiras, a positividade para este vírus poderia ter sido maior, visto que ocorre inibição substancial desta técnica em vírus RNA. As amostras positivas para este vírus se concentraram de agosto de 2011 a janeiro de 2012, mas não foi possível determinar a sazonalidade. Garrafa (2009) estudou a qualidade microbiológica de esgoto bruto e tratado em uma estação de tratamento em São Paulo e detectou rotavírus com distribuição ao longo de todo o ano e o resultado da quantificação de partículas virais infecciosas no esgoto também não apresentou distribuição sazonal significativa.

A quantidade de material viral detectada para NoV por qPCR nas amostras de água foi menor que a encontrada para adenovírus e rotavírus. Os valores obtidos para norovírus variaram de 8,34 a $3,05 \times 10^1$ cópias genômicas / 100 mL, com exceção da amostra de P4 em outubro de 2011, em que detectou-se o pico de $1,45 \times 10^4$ cópias genômicas em 100 mL de amostra. La Rosa et al. (2010) encontraram 72% de amostras positivas para NoV GII em esgoto bruto e 40% em esgoto tratado na Itália, sendo $2,6 \times 10^8$ e $9,9 \times 10^7$ cópias genômicas/100 mL em esgoto na entrada e na saída da estação de tratamento, respectivamente, valores estes inferiores aos detectados para adenovírus nas mesmas amostras. Katayama et al. (2008) detectaram 2×10^4 cópias genômicas em 100 mL para NoV GII em amostra de esgoto bruto no Japão, além de 92% de positividade em amostras de efluente com tratamento secundário em estações de tratamento. No estudo realizado por Hamza et al. (2009) foram detectados $2,5 \times 10^2$ cópias genômicas de NoV GII em 100 mL de amostras de rios na Alemanha.

Os resultados obtidos para os três vírus estudados (adenovírus, rotavírus e norovírus GII) mostraram que a utilização conjunta das técnicas moleculares PCR Qualitativa e PCR em Tempo Real foi satisfatória, visto que foi possível a confirmação de alguns resultados e até mesmo a obtenção de positividade em amostras tidas como negativas por uma das técnicas (redução de falsos negativos). No mês de agosto de 2011, por exemplo, os resultados de adenovírus e rotavírus foram confirmados nas duas técnicas, com todos os pontos positivos. O limite mínimo detectado pela qPCR neste estudo foi de 6,63 cópias genômicas / 100 mL para adenovírus em P3, no mês de outubro de 2011. Das 62 análises realizadas em P1, P2, P3 e P4, para AdV, RV e NoV GII, no período de janeiro de 2011 a janeiro de 2012, em que as amostras foram analisadas por ambas as técnicas, detectou-se positividade para o norovírus em 11 amostras apenas pela PCR Qualitativa (17,74%). Também foi observado que 53,22% das amostras foram positivas apenas

pela qPCR, enquanto que 29,03% foram positivas nas duas técnicas. Todos os resultados positivos de AdV e RV pela técnica PCR Qualitativa foram confirmados pela PCR em Tempo real. A qPCR detectou maior positividade para estes dois vírus que a PCR Qualitativa. Estudos mostram que a técnica de PCR Qualitativa é eficiente na detecção de vírus, mas a qPCR mostrou-se eficiente e mais sensível na detecção de pequenas quantidades de cópias genômicas em diversos trabalhos (BOFILL-MAS et al. 2006, BOFILL-MAS et al, 2010; HERNROTH et al. 2002; JIANG, 2006; PINA et al. 1998). A alta variabilidade no percentual de positividade entre amostras analisadas por qPCR e por PCR Qualitativa foi observada em outros estudos (VAN HEERDEN et al., 2003, 2005; MIAGOSTOVICH et al., 2008; VERHEYEN et al., 2009). Somente nas amostras de norovírus foi observada positividade pela técnica PCR Qualitativa sem detecção pela qPCR. Bofill-Mas et al. (2010) também observou esta situação, mas em amostras de adenovírus. Diferenças observadas entre PCR Qualitativa e qPCR podem estar relacionadas a diversos fatores, como pequenas diferenças na sensibilidade entre as técnicas e diferentes respostas à inibição enzimática. A qPCR, por ter menos manipulação da amostra em comparação com PCR Qualitativa, é menos propensa a contaminantes (BOFILL-MAS et al., 2010). A inibição enzimática da qPCR em amostras ambientais e com alto grau de contaminação foi observada Jiang (2006). A inibição em amostras ambientais não diluídas foi observada por Bofill-Mas et al. (2010) e não é inerente apenas à qPCR, sendo observada também na PCR Qualitativa.

Hamza et al. (2009) verificaram a ação inibitória na qPCR adicionando cópias padronizadas de RNA e DNA nas 41 amostras de água analisadas. Foram amplificadas misturas com ácidos nucleicos extraídos de vírus DNA e RNA e misturas sem a adição dos mesmos, no qual foi detectado efeito inibitório sobre a amplificação em amostras com adição de extratos de vírus RNA, mas não detectou-se inibição em amostras com extratos de DNA. Também foi observado que os valores do limiar de ciclo (Ct, do inglês Cycle threshold), definida como o número de ciclos necessários para o sinal de fluorescência cruzar o limiar da curva padrão da qPCR, foram de 5 a 8 ciclos mais elevados nas análises para norovírus na presença de extratos de ácidos nucleicos, o que indica inibição da reação da qPCR. O efeito inibitório no estudo de Hamza e colaboradores (2009) foi reduzido pela pré-diluição de purificados dos ácidos nucleicos antes da reação de qPCR.

No presente estudo não foram realizadas diluições nos extratos de ácidos nucleicos de NoV e RV, o que pode ter contribuído para a baixa detecção de NoV pela qPCR, uma vez que a presença de inibidores da etapa de transcrição reversa nas amostras de DNA/RNA extraídos pode levar a uma subestimativa da frequência de amostras positivas. Embora a inibição da reação de qPCR possa ser reduzida com diluições, a quantidade de RNA adicionado à qPCR também reduz a sensibilidade de detecção das partículas virais em amostras de água (HAMZA et al., 2009), o que também é observado na técnica PCR Qualitativa.

A detecção de partículas virais por técnicas moleculares como a PCR não permite determinar a infecciosidade dos vírus encontrados. As amostras ambientais estudadas podem conter partículas virais infecciosas, o que representaria um problema de saúde pública, visto que a população da Ilha das Caieiras está constantemente em contato com a água do estuário. Sabe-se que a dose infecciosa dos vírus é baixa e estes podem causar doenças quando ingeridos ou inspirados (YEZLI & OTTER, 2011).

A PCR em Tempo Real é uma técnica mais recente que a PCR Qualitativa e demonstrou ser uma importante ferramenta para a quantificação de ácido nucleico em águas ambientais, devido não somente à sua sensibilidade e especificidade, mas também por ser rápida e fácil de usar. A utilização das duas técnicas neste trabalho, então, mostrou-se importante, pois uma técnica complementou a outra e permitiu a obtenção de resultados mais confiáveis e precisos. Entretanto, a limitação mais grave das técnicas utilizadas é a falta de mecanismos que permitam a discriminação entre os vírus viáveis, inativados e infecciosos (RICHARDS, 1999;. REYNOLDS et al. 1996).

Neste trabalho não foi possível fazer uma correlação entre os resultados obtidos pelas análises de Coliformes Termotolerantes e enterococos com a detecção de vírus em água, pois observou-se que a variação de carga viral não correspondeu a mesma variação do número de colônias destes bioindicadores. A prevalência de vírus entéricos nos meses em que as densidades de indicadores bacterianos estavam abaixo do limite recomendado em legislação mostra que indicadores bacterianos não são bons indicadores de contaminação viral. Segundo Calgua et al. (2008), a bactéria *E. coli* é comumente utilizada como indicador de patógenos em água, mas não está necessariamente correlacionada com a presença de patógenos virais, que são mais estáveis do que as bactérias no ambiente. Jiang (2004) também não observou correlação entre a ocorrência

de vírus entéricos humanos e a qualidade microbiológica da água baseada em bioindicadores. Embora ainda não tenha sido observada a relação entre indicadores bacterianos de contaminação fecal e presença de vírus entéricos, o Brasil não possui legislação que obrigue a realização de análises virológicas. Na resolução CONAMA 274/2000, em águas classificadas como impróprias, há apenas a recomendação para a pesquisa de organismos patogênicos.

A região de estudo, a Grande São Pedro, é conhecida como bolsão de pobreza da capital do Espírito Santo, sendo o bairro formado a partir da invasão e aterro de áreas de manguezal e do antigo lixão de Vitória. A Ilha das Caieiras é caracterizada pela falta de infraestrutura e de saneamento, e grande parte das famílias residentes é de baixa renda que sobrevive da pesca/coleta de frutos do mar desta região. Esta área de estudo ainda não é totalmente atendida por um sistema de coleta e tratamento de esgotos, sendo o efluente sanitário ligado à drenagem pluvial e lançado no estuário sem qualquer tipo de tratamento. A contaminação deste corpo d'água é preocupante, pois o estuário próximo ao bairro Ilha das Caieiras é local de intensa atividade pesqueira e também de atividades recreativas. Do ponto de vista de saúde pública, é importante considerar não apenas a possibilidade da transmissão de doenças de veiculação hídrica aos banhistas (gastroenterite, hepatite A, cólera, febre tifoide, entre outras), mas, também, a contaminação dos alimentos retirados do mar, uma vez que podem ser consumidos crus ou parcialmente cozidos. Entretanto, a Grande São Pedro será contemplada em 2012/2013 com a implantação do sistema de esgotamento sanitário (Projeto Águas Limpas – CESAN – Prefeitura de Vitória), que prevê a universalização do saneamento com 100% de esgoto tratado na Capital Vitória. Assim, esta pesquisa é de grande importância para a verificação da eficiência do tratamento a ser empregado, pois poderá servir de base para a comparação da qualidade da água antes e após a implantação do sistema sanitário.

7. CONCLUSÃO

A análise da água do manguezal da Ilha das Caieiras, na Baía de Vitória, revelou que a região recebe aporte de esgoto *in natura* em diversos pontos do estuário, comprometendo a qualidade

sanitária deste ambiente. A contaminação da água por esgoto e por efluentes de agricultura e pecuária vem ocorrendo ao longo dos anos e pode ser percebida pelos resultados obtidos nas análises microbiológicas realizadas neste trabalho. Nas amostras de água analisadas foram detectados elevada densidade de Coliformes Termotolerantes e de *Enterococcus sp.*, que em alguns meses ultrapassou os limites preconizados na legislação para uso recreacional de contato primário (Resolução CONAMA 274/2000).

As análises moleculares utilizadas neste trabalho permitiram a detecção de adenovírus, rotavírus e norovírus GII nos quatro pontos estudados durante o monitoramento. A contaminação deste estuário por vírus e bactérias fecais nos indica que esta área está sob forte ação antropogênica, com lançamento contínuo de esgoto sanitário *in natura*. O contato primário com a água e o consumo/comercialização de frutos do mar extraídos do manguezal da Ilha das Caieiras pode representar, então, um potencial risco à saúde pública.

A utilização da técnica qPCR para detecção de material viral na água mostrou-se mais sensível que a PCR Qualitativa, mas observou-se que uma técnica complementou a outra, reduzindo a obtenção de falsos negativos.

Os resultados físico-químicos obtidos permitiram a avaliação da qualidade da água do estuário, que apresentou pouca variação no período de monitoramento deste trabalho. Dentre os parâmetros analisados, a salinidade foi a que mais influenciou nos parâmetros microbiológicos, com correlação observada com os coliformes termotolerantes e enterococos. A pluviosidade mostrou-se relevante na avaliação dos parâmetros estudados, principalmente salinidade, condutividade, coliformes termotolerantes e enterococos.

Assim, o estudo da carga viral realizado neste ambiente é importante para o conhecimento real da qualidade sanitária do estuário, visto que este tem grande importância social e ambiental para a região da Ilha das Caieiras.

8. RECOMENDAÇÕES

Verificar a infecciosidade de vírus entéricos presentes na água do sistema estuarino da Baía de Vitória, por meio de técnicas de cultura celular. Este monitoramento permitirá avaliar o real risco para a saúde pública decorrente da exposição ao ambiente contaminado e do consumo de alimentos provenientes deste estuário.

Realizar a genotipagem de rotavirus e norovírus detectados em amostras de água, a fim de determinar a prevalência dos genótipos dominantes na região, e compará-los com os vírus isolados de pacientes com gastroenterite de origem viral.

Realizar monitoramento após a implantação do sistema de esgotamento sanitário na Ilha das Caieiras, previsto para conclusão em 2012/2013, e que atenderá toda a região de estudo, a fim de comparar com os resultados obtidos neste trabalho e avaliar a qualidade do tratamento de esgoto nessa região.

9. REFERÊNCIAS

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

ALCANTARA, E. H.; HARARI, J. Análise unidimensional dos processos de mistura no sistema estuarino do rio Periá (MA), Brasil. **Sociedade & Natureza**, Uberlândia, 18(35), p. 65-77, 2006.

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

ALLARD, A.; ALBINSSON, B.; WADELL, G. Rapid Typing of Human Adenoviruses by a General PCR Combined with Restriction Endonuclease Analysis, **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n. 2, p. 498-505, 2001.

ALMEIDA, L. G., SILVA, M. R. L. F., VALE, C. C. Análise multitemporal da baía de Vitória (ES) utilizando sensoriamento remoto. **Anais XIII Simpósio Brasileiro de Sensoriamento Remoto**, Florianópolis, INPE, p. 4557-4564. 2007.

American Public Health Association (APHA); American Water Works Association (AWWA); Water Environmet Federation (WEF). **Standard Methods for Examination of Water and Wastewater**, American Public Health Association. 1999;

ANDO, T., NOEL, J. S., FANKHAUSER, R. L. Genetic Classification of “Norwalk-like Viruses”. **The Journal of Infectious Diseases**, 181(Suppl 2):S336–48, 2000.

AN, Y.J.; KAMPBELL, D. H.; BREIDENBACH, G. P. *Escherichia coli* and total coliforms in water and sediments at lake marinas. **Environmental Pollution**, 120, p. 771–778, 2002.

ANSARI, S.A., SPRINGTHORPE, V.S., SATTAR, S.A. Survival and vehicular spread of human rotaviruses: possible relation to seasonality of outbreaks. **Rev. Infect. Dis.** 13, 448–461, 1991.

APHA; AWWA; WEF – American Public Health Association. **Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater**, 15th edn. New York: **Water Pollution Control Federation**, 1992.

APHA; AWWA; WEF – American Public Health Association. **Standard Methods for Examination of Water and Wastewater**, American Public Health Asssociation, 21st edn. New York: **Water Pollution Control Federation**, 2005.

APPLETON, H. Control of food-borne viruses. **BNVSH Medial Bulletin**, 56 (No 1), 2000.

APPLIED BIOSYSTEMS. Real-Time PCR Vs. Traditional PCR. Applied Biosystems. 20-?.

ATMAR, R. L.; ESTES, M. K. The epidemiologic and clinical importance of norovirus infection. **Gastroenterology Clinics of North America**, v. 35, p. 275-290, 2006.

AZADPOUR, K. A., FAULKNER, B. R., CHEN, J. Movement and longevity of viruses in the subsurface. **United States Environmental Protection Agency (USEPA)**, 24p, 2003.

BARRELLA, K. M. Pesquisa de vírus entéricos humanos em lodos de esgoto originários de duas ETES do Estado de São Paulo: estabelecimento de metodologia para recuperação e detecção viral – (Tese de doutorado). Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, 2008.

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

BERG, G. Removal of viruses from sewage, effluents, and waters. A review. **Bull. Org. mond. Santé and Bull. and Wid Hlth Org.**, 49, p. 451-460, 1973.

BEURET, C. A simple method for isolation of enteric viruses (noroviruses and enteroviruses) in water. **J. Virol. Methods** 107 (1), 1–8, 2003.

BOFILL-MAS, S., ALBINANA-GIMENEZ, N., CLEMENTE-CASARES, P., HUNDESA, A., RODRIGUEZ-MANZANO, J., ALLARD, A., et al. Quantification and stability of human adenoviruses and polyomavirus JCPyV in wastewater matrices. **Applied and Environmental Microbiology**, 72, 7894–7896, 2006.

BOFILL-MAS, S., CALGUA, B., CLEMENTE-CASARES, P., LA ROSA, G. Quantification of Human Adenoviruses in European Recreational Waters. **Food Environ Virol.** 2:101–109 DOI 10.1007/s12560-010-9035-4, 2010.

BOOM, R.; SOL, C. J.; SALIMANS, M. M.; JANSEN, C. L.; WERTHEIM-VAN DILLEN P. M.; VAN DER NOORDAA, J. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 28, n. 3, p. 495-503, 1990.

BORDALO, A.A. Effects of salinity on bacterioplankton: field and microcosm experiments. **Journal of Applied Bacteriology**, 75, 393–398, 1993.

BORDALO, A. A.; ONRASSAMI, R.; DECHSAKULWATANA, C. Survival of faecal indicator bacteria in tropical estuarine waters (Bangpakong River, Thailand). **Journal of Applied Microbiology**, 93, 864-871, 2002.

BOSH, A. Human enteric viruses in the water environment: a minireview. **International Microbiology**, v. 1, p. 191-196, 1998.

BRASIL. Fundação Nacional de Saúde (FUNASA). Manual de saneamento. 3. ed. rev. – Brasília, 2006.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Conselho Nacional de Meio Ambiente. Resolução 04 de 18 de Setembro de 1985.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Conselho Nacional de Meio Ambiente. Resolução 274 de 29 de Novembro de 2000.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Conselho Nacional de Meio Ambiente. Resolução 375 de 17 de Março de 2005.

BRASIL. Ministério da Saúde. Informações de Saúde – DATASUS. Disponível em: <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/deftohtm.exe?pn/cnv/cpniuf.def>. Acesso em 18 de dezembro de 2012.

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

CARTER, M. J. Enterically infecting viruses: pathogenicity, transmission and significance for food and waterborne infection. **J. Appl. Microbiol.** 98, 1354–1380, 2005.

CASTIGNOLLES, N., PETIT, F., MENDEL, I. et al. Detection of Adenovirus in the waters of the Seine River estuary by nested-PCR. **Molecular and Cellular Probes** 12, 175–180, 1998.

CAUS, C. L.; GORZA, N. Bacia Sustentável – Estudo da correlação entre a degradação da Mata Atlântica e mananciais hídricos do Espírito Santo – Brasil. Simpósio Ítalo-Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental (SIDISA), Firenze, 2008.

CEE. Diretiva 2006/7/CE do Parlamento Europeu e do Conselho de 15 de Fevereiro de 2006 relativa à gestão da qualidade das águas balneares e que revoga a Directiva 76/160/CEE. **Jornal Oficial das União Européia** (versão em português), n. L64, p. 37-51, 04/03/2006.

CESAN – Companhia Espírito Santense de Saneamento. Programa Águas Limpas, 2012.

CESAN – Companhia Espírito Santense de Saneamento. Programa Pró-Rural, 2012.

CETESB – Companhia Ambiental do Estado de São Paulo. Enterococos – Determinação pela técnica de membrana filtrante: método de ensaio. **Norma Técnica L5.212**, 29P., 1993.

CHOI, S.; JIANG, S.C. Real-Time PCR quantification of human adenoviruses in urban rivers genome prevalence but low infectivity. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 1, p. 7426-7433, 2005.

CIARLET, M., ESTES, M. K. Human and most animal rotavirus strains do not require the presence of sialic acid on the cell surface for efficient infectivity. **Journal of General Virology**, 80, 943–948, 1999.

COMPANHIA AMBIENTAL DO ESTADO DE SÃO PAULO – CETESB. NORMA TÉCNICA L5.212, São Paulo, SP. 29 p., 1993.

COZAC, M. D. C.; MIRANDA, T. M. T. A contaminação ambiental por vírus e a importância do reuso de efluente doméstico tratado na agricultura. 200-?.

CRABTREE, K. D., GERBA, C. P., ROSE, J. B., HAAS C. N. Waterborne adenovirus: a risk assessment. **Water Sci. Technol.** 35:1–6. 1997.

CUPÁKOVÁ, S., LUKÁSOVÁ, J. Agricultural and Municipal Waste Water as a Source of Antibiotic-Resistant Enterococci. **Acta Vet Brno** 72:123–129, 2003.

DAVISON, A. J., BENKO, M., HARRACH, B. Genetic content and evolution of adenoviruses. **Journal of General Virology**. Nov;84(Pt 11):2895-908, 2003.

DEPIZZOL, F. Avaliação da resistência a antibióticos em isolados de *Escherichia coli* provenientes de esgoto hospitalar e sanitário. Dissertação: Mestrado. Departamento de Engenharia Ambiental / Universidade Federal do Espírito Santo, 2006.

DEVRIESE, L. A., POT, B., COLLINS, M. D. Phenotypic identification of the genus *Enterococcus* and differentiation of phylogenetically distinct enterococcal species and species groups. **Journal Applied Bacteriology**, p. 75:399–408, 1993.

DO CARMO, G.M.I.; YEN, C.; CORTES, J.; SIQUEIRA, A.A.; OLIVEIRA, W.K.; CORTEZ-ESCALANTE, J.J.; LOPMAN, B.; FLANNERY, B.; OLIVEIRA, L.H.; CARMO, E. H.; PATEL, M. Decline in diarrhea mortality and admissions after routine childhood rotavirus immunization in Brazil: a time-series analysis. **PLoS Medicine**, v. 8, p. 1-11, 2011.

ECKNER, F. Comparison of membrane filtration and multiple-tube fermentation by the colilert and enterolert methods for detection of waterborne coliform bacteria, *Escherchia coli*, and enterococci used in drinking and bathing water quality monitoring in southern Sweden. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, n. 8, p. 3079–3083, 1998.

EL-SHARKAWI, F., EL-ATTAR, L., GAWAD, A.A., MOLAZEM, S. Some environmental factors affecting survival of fecal pathogens and indicator organisms in seawater. **Water Science and Technology** 21, 115–120, 1989.

ENRIQUEZ, C. E., HURST, C. J.; GERBA C. P. Survival of the enteric adenoviruses 40 and 41 in tap, sea, and waste water. **Water Research**, p. 29:2548–2553. 1995.

EPA. Bacteriological Ambient Water Quality Criteria for Marine and Fresh Recreational Waters. **U.S. Environmental Protection Agency**, 1986.

EPA. Quantitative Microbial Risk Assessment to Estimate Illness in Freshwater Impacted by Agricultural Animal Sources of Fecal Contamination. **U.S. Environmental Protection Agency**, 2010.

ERONDU, E. S., ANYANWU, P. E. Potential hazards and risks associated with the aquaculture industry. Review. **African Journal of Biotechnology**, vol. 4 (13), pp. 1622-1627, 2005.

ESTES, M. K., COHEN, J. Rotavirus Gene Structure and Function. **Microbiological Reviews**, p. 410-449M 1989.

EVISON, L.M. Comparative studies on the survival of indicator organisms and pathogens in fresh and seawater. **Water Research** 20, 309–315, 1989.

FEACHAM, R.G., BRADLEY, D.J., GAVELICK, H., MARA, D.D. Sanitation and Disease: Health Aspects of Excreta and Wastewater Management. Wiley, Chichester, 1983.

FIGUERAS, M. J., POLO, F., INZA, I and GUARRO, J. Present and Future Perspectives of the EU Bathing. **Water Directive Unit of Microbiology**, Faculty of Medicine, University Rovira i Virgili, 43201 Reus, SpainPast, 1997.

FONG, T. T., LIPP, E. K. Enteric viruses of humans and animals in aquatic environments: health risks, detection, and potential water quality assessment tools. **Microbiol Mol Biol Rev** 69: 357-371, 2005.

FORMIGA-CRUZ, M.; TOFIÑO-QUESADA, G. BOFILL-MAS, S.; LEES, D. N.; HENSHILWOOD, K.; ALLARD, A. K.; CONDEN-HANSSON, A. C.; HERNROTH, B. E.; VANTARAKIS, A.; TSIBOUXI, A. PAPAPETROPOULOU, M.; FURONES, M. D.; GIRONES, R. Distribution of human virus contamination in shellfish from different growing areas in Greece, Spain, Sweden, and the United Kingdom. **Applied And Environmental Microbiology**, Vol. 68, No. 12, p. 5990–5998, 2002.

American Society for Microbiology. P. 5990–5998, 2002.

FRICKER, E. J., C. R. FRICKER. Use of defined substrate technology and a novel procedure for estimating the numbers of enterococci in water. *J. Microbiol. Methods* 27:207–210, 1996.

GARRAFA, P. Avaliação da qualidade virológica do efluente doméstico tratado e disponibilizado para reuso na cidade de São Paulo. Tese de doutorado. Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo. São Paulo, 2009.

GELDREICH, E. E. Pathogenic agents in freshwater resources. In: **Hydrological Processes**. Vol. 10, Issue 2, 1998.

GELDREICH, E. E.; KENNER, B. Concepts of fecal streptococci in stream pollution. **Journal of the Water Pollution Control Federation**, 41, 336-352, 1969.

GENTSCH, J. R., LAIRD, A. R., BIELFELT, B., GRIFFIN, D. D., BANYAI, K., RAMACHANDRAN, M., JAIN, V., CUNLIFFE, N. A., NAKAGOMI, O., KIRKWOOD, C. D., FISCHER, T. K., PARASHAR, U. D., BRESEE, J. S.,JIANG, B., GLASS, R. I. Serotype diversity and reassortment between human and animal rotavirus strains: implications for rotavirus vaccine programs. **J. Infect. Dis.** 192, S146, 2005.

GEO BRASIL. Ambientes Marinhos e Costeiros. In: *Perspectivas do meio Ambiente no Brasil / Organizado por Thereza Christina Carvalho Santos e João Batista Drummond Câmara*. Ambi Brasília: Edições IBAMA, 2002.

GERBA, C. P.; GRAMOS D. M.; NWACHUKU, N. Comparative inactivation of enteroviruses and adenovirus 2 by UV light. **Appl. Environ. Microbiol.** 68:5167–5169. 2002 (a).

GERBA, C. P., PEPPER, I. L.; WHITEHEAD III, L. F. A risk assessment of emerging pathogens of concern in the land application of biosolids. **Water Sci. Technol.** 46:225–230. 2002 (b).

GERBA, C. P., ROSE, J. B., HAAS, C. N., CRABTREE, K. D. Waterborne rotavirus: a risk assessment. **Water Research**, p. 12:2929–2940, 1996.

GILGEN, M.; GERMANN, D.; LUTHY, J.; HUBNER, Ph. Three-step isolation method for sensitive detection of enterovirus, rotavirus, hepatitis A virus, and small round structured viruses in water samples. **International Journal of Food Microbiology**. v. 37, p. 189-199, 1997.

GLASS, R. I.; PARASHAR, U. D.; BRESEE, J. S.; TURCIOS, R.; FISCHER, T.; WIDDOWSON, M.; JIANG, B.; GENTSH, J. R. Rotavirus vaccines: current prospects and future challenges. **The Lancet**, v. 368, p. 323-332, 2006.

GONÇALVES, M. A., & DE VRIES, A. A. Adenovirus: from foe to friend. **Reviews in Medical Virology**, 16, 167–186, 2006.

GONZALES, J. M., SHERR, E. B., SHERR, B. F. Size-selective grazing on bacteria by natural assemblages of estuarine flagellates and ciliates. **Applied and Environmental Microbiology** 56, 583–589, 1990.

GRANT, S.B., SANDERS, B.F., BOEHM, A.B., REDMAN, J.A., KIM, J.H. Generation of enterococci bacteria in a coastal saltwater marsh and its impact on surface zone water quality. **Environmental Science Technology**, 35, 2407e2416, 2001.

GRIFFIN, D. W., DONALDSON, K. A., PAUL, J. H., ROSE, J. B. Pathogenic Human Viruses in Coastal Waters. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 16, n. 1, p. 129-143, 2003.

HABTEC Engenharia Sanitária e Ambiental Ltda. Diagnóstico do Plano Diretor das Bacias dos rios Santa Maria da Vitória e Jucu. **Relatório Diagnóstico** - Vol. 1, 2 e 3. Disponível em Consórcio Rio Santa Maria Jucu, Vitória, 1997.

HAFLIGER, D.; GILGEN, M.; LUTHY, J.; HUBNER, P. Seminested RT-PCR systems for small round structured viruses and detection of enteric viruses seafood. **International Journal of Food Microbiology**, v. 37, p. 27-36, 1997.

HAMZA, I. A.; JURZIK, L.; STANG, A.; SURE, K.; UBERLA, K.; WILHELM. Detection of human viruses in rivers of a densely-populated area I Fermany using a virus adsorption elution method optimized for PCR analyses. **Water Research**, doi: 10.1016/j.watres.2009.03.020, 2009.

HARAMOTO, E., KITAJIMA, M., KATAYAMA, H., OHGAKI, S. Real-time PCR detection of adenoviruses, polyomaviruses, and torque teno viruses in river water in Japan. **Water Research**. V. 44 p. 1747 – 1752, 2010.

HÁRSI, C. M., ROLIM, D. P., GOMES, S. A., GILIO, A. E., STEWIEN, K. E., BALDACCI, E. R., CANDEIAS, J. A. Adenovirus genome types isolated from stools of children with gastroenteritis in São Paulo, Brazil. **J Med Virol.**;45(2):127-34m 1995.

HE, J. W., JIANG, S. Quantification of Enterococci and Human Adenoviruses in Environmental Samples by Real-Time PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, p. 2250–2255, May 2005.

HEID, C. A., STEVENS, J., LIVAK, K. J. et al. Real time quantitative PCR. **Genome Res**. 6: 986-994, 1996.

HERNROTH, B. E., CONDÉN-HANSSON, A. C., REHNSTAM-HOLM, A. S., GIRONES, R., & ALLARD, A. K. Environmental factors influencing human viral pathogens and their potential

indicator organisms in the blue mussel, *Mytilus edulis*: the first Scandinavian report. **Applied and Environmental Microbiology**, 68, 4523–4533, 2002.

HOBSON, N. S.; TOTHILL, I.; TURNER, A.P.F. Microbial detection. **Biosensors & Bioelectronics**, v. 11, n. 5, p. 455-477, 1996.

HUNDESA, A., MOTES, C. M., BOFILL-MAS, S., ALBINANA-GIMENEZ, N., GIRONES, R. Identification of Human and Animal Adenoviruses and Polyomaviruses for Determination of Sources of Fecal Contamination in the Environment **Applied And Environmental Microbiology**, p. 7886–7893 Vol. 72, 2006.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). Atlas do Saneamento. Rio de Janeiro: IBGE. 151p. 2004.

ITURRIZA-GOMARA, M.; GREEN, J.; BROWN, D.W.G.; DESSLBERGER, U.; GRAY, J. J. Comparison of specific and random priming in the reverse transcriptase polymerase chain reaction for genotyping group A rotaviruses. **Journal of Virological Methods**, v. 78, p. 93-103, 1999.

JAYKUS, L. A., DE LEON, R., SOBSEY, M. D. A virion concentration method for detection of human enteric viruses in oysters by PCR and oligoprobe hybridization. **Appl. Environ. Microbiol.** 62, 2074–2080, 1996.

JESUS, H. C., COSTA, E. A., MENDONÇA, A. S. F., ZANDONALE, E. Distribuição de metais pesados em sedimentos do sistema estuarino da ilha de Vitória - ES. **Quim. Nova**, Vol. 27, No. 3, 378-386, 2004.

JENG, H. A. C.; ENGLANDE, A. J.; BAKEER, R. M.; BRADFORD, H. B. Impacto f urban stormwater runoff on estuarine environmental quality. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, v. 63, p. 513-526, 2005.

JIANG, S. C. Human adenoviruses in water: Occurrence and health implications: A critical review. **Environ. Sci. Technol.** V. 40, 7132-7140, 2006.

JIANG, S., DEZFULIAN, H., CHU, W. Real-time quantitative PCR for enteric adenovirus serotype 40 in environmental waters. **Can. J. Microbiol.** 51: 393–398, 2005.

JUSTINO, J. F. Avaliação de coliformes e vírus entéricos na água e no mexilhão (*Mytella guyanensis*) em área de manguezal da Baía de Vitória (ES). Dissertação de mestrado. Universidade Federal do Espírito Santo. Vitória, 2009.

KAGEYAMA, T.; KOJIMA, S.; SHINOHARA, M.; UCHIDA, K.; FUKUSHI, S.; HOSHINO, F. B. Broadly Reactive and Highly Sensitive Assay for Norwalk-Like Viruses Based on Real-Time Quantitative Reverse Transcription-PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, p. 1548-1557, 2003.

KALININA, O., LEBEDEVA, I., BROWN, B., SILVER, J. Nanoliter scale PCR with TaqMan detection. **Nucleic Acids Research**, Vol. 25, No. 10 1999–2004, 1997.

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

KATAYAMA, H.; SHIMASAKI, A.; OHGAKI, S. Development of a Virus Concentration Method and Its Application to Detection of Enterovirus and Norwalk Virus from Coastal Seawater. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n.3, p. 1033– 1039, 2002.

KJERFVE, B. Manual for investigation of hydrological processes in mangrove ecosystems. New Delhi, UNESCO/ UNDP. 79 p. 1990.

KLUG, L. B., DIAS, M. H. B., SOUZA, E., AGUIAR, M. M. O impacto da urbanização na melhoria da qualidade de vida e no respeito ao meio ambiente: estudo de caso do bairro Resistência – Vitória – ES. In **VI Simpósio Ítalo Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental**, 2002.

KOJAOGHLANIAN, T., FLOMENBERG, P., & HORWITZ, M. S. The impact of adenovirus infection on the immunocompromised host. **Reviews in Medical Virology**, 13, 155–171, 2003.

KOOPMANS, M., BONSDORFF, C., VINJÉ, J.; MEDICI, D.; MONROE, S. Foodborne Viruses. **FEMS Microbiol. Reviews** 26, 187-205, 2002.

KOOPMANS, M., DUIZER, E. Foodborne viruses: an emerging problem. **International Journal of Food Microbiology** 90 23– 41, 2004.

KRAMER, K. J. M.; BROCKMANN, U. H.; WARWICK, R.M. Tidal Estuaries: Manual of sampling and analytical procedures. Commission of the European Communities, 1994.

KUKKULA, M.; ARSTILA, P.; KLOSSNER, M. L.; MAUNULA, L.; BONSDORFF, C. H. V.; JAATINEN, P. Waterborne outbreak of viral gastroenteritis. **Scand. J. Infect. Dis.** 29, 415-418, 1997.

LA ROSA, G., POURSHABAN, M., IACONELLI, M., MUSCILLO, M. Quantitative real-time PCR of enteric viruses in influent and effluent samples from wastewater treatment plants in Italy. **Ann Ist Super Sanità**. Vol. 46, No. 3: 266-273, 2010.

LEBARON, C. W., FURUTAN, N. P., LEW, J. F., et al. Viral agents of gastroenteritis: public health importance and outbreak management. **MMWR**; 39(RR-5):1–24, 1990.

LEES, D. Viruses and Bivalve Shellfish. **International Journal of food Microbiology**, v. 59, p. 81-116, 2000.

LIM, C.-H., FLINT, K.P. The effects of nutrients on the survival of *Escherichia coli* in lake water. **Journal of Applied Bacteriology** 66, 559–569, 1989.

LIU, L., WU, O., KOU, X. Development of a Virus Concentration Method and its Application for the Detection of Noroviruses in Drinking Water in China. **The Journal of Microbiology**, v. 45, p. 48-52, 2007.

MACIEL, N. C. Alternativas de uso e proteção dos manguezais do nordeste. Séries publicações técnicas. n.003: 9-37, 1991.

MACINA, I. L. F., MENDONÇA, A. S. F. Avaliação da qualidade da água a montante e a jusante de reservatórios localizados na bacia do rio Santa Maria da Vitória. XXVII Congresso Interamericano de Engenharia Sanitária e Ambiental – ABES, **Anais**, 2000.

MACKAY, I. M., ARDEN, K. E., NITSCHKE, A. Real-time PCR in virology. **Nucl. Acids Res.** 30 (6): 1292-1305, 2002.

MEHNERT D. U. AND STEWIEN K. E. Detection and Distribution of Rotavirus in Raw Sewage and Creeks in Sao Paulo, Brazil. **Applied And Environmental Microbiology**, p. 140-143 Vol. 59, No. 1, 1993.

MEZRIOUI, N., BLEUX, B., TROUSSELIER, M. A microcosm study of the survival of *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* in brackish water. **Water Research** 29, 459–465, 1995.

MEY, M. D; LEQUEUX, G.; MAERTENS, J.; MAESENEIRE, S. D.; SOETAERT, W. VANDAMME, E. Comparison of DNA and RNA quantification methods suitable for parameter estimation in metabolic modeling of microorganisms. **Analytical Biochemistry** 353, 198–203, 2006.

MIAGOSTOVICH, M. P., FERREIRA, F. F., GUIMARÃES, F. R., FUMIAN, T. M., DINIZ-MENDES, L., LUZ, S. L., et al. Molecular detection and characterization of gastroenteritis viruses occurring naturally in the stream waters of Manaus, central Amazonia, Brazil. **Applied and Environmental Microbiology**, 74(2), 375–382, 2008.

MORAIS, A. C. Estimativa de cargas poluidoras na baía de Vitória com uso de sistemas de informações geográficas e sensoriamento remoto. Dissertação de mestrado, UFES. 2008.

MUSCILLO, M., POURSHABAN, M., IACONELLI, M., FONTANA, S., DI GRAZIA, A., MANZARA, S., FADDA, G., SANTAGELO, R., LA ROSA, G. Detection and quantification of human adenoviruses in surface waters by nested PCR, TaqMan Real-Time PCR and Cell Culture Assays. **Water Air Soil Pollut**, 191: 83-93, 2008.

NEIL, M. Microbiological indices for total coliform and *E. coli* bacteria in estuarine waters. **Mar Pollut Bull** 49: 752–760, 2004.

NISHIDA, M. K. Rotavíruses em suínos: Implicação dos efluentes da criação no ambiente. Dissertação de mestrado. Instituto Biológico, da Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios. São Paulo, 2009.

NOBLE, R. T., MOORE, D. F., LEECASTER, M. K., MCGEED, C.D., WEISBERG, S.B. Comparison of total coliform, fecal coliform, and *enterococcus* bacterial indicator response for ocean recreational water quality testing. **Water Research** 37 1637–1643, 2003.

NOVEL, M., NOVEL, G. Regulation of b-D-glucuronidase synthesis in Escherichia coli K-12: constitutive mutants specifically derepressed for uidA expression. **J. Appl. Bacteriol.** 127:406–417, 1976.

NUNES, A. L. Modelo histórico das alterações fisiográficas recentes da baía de Vitória (ES) e áreas adjacentes, com o uso de sistema de informações geográficas. Monografia de graduação. Universidade Federal do Espírito Santo. Vitória, 2005.

OKPOKWASILI, G.C., AKUJOBI, T.C. Bacteriological indicators of tropical water quality. **Environ. Tax. Water Qual.** Int. J. 11, 77–81, 1996.

OMS – Organização Mundial da Saúde (WHO – *World Health Organization*). **Guidelines for drinking water quality**, 3 ed. Genebra, 2006.

OMS – Organização Mundial da Saúde (WHO – *World Health Organization*). **Guidelines for drinking water quality**, 3 ed. Incorporating the first and second addenda. Genebra, 2008.

OMS Organização Mundial da Saúde. WHO promotes research to avert diarrhoea deaths, 2009. Disponível em: http://www.who.int/pmnch/media/membernews/2009/childhood_diarrhoea/en/. Acesso em 17 de junho de 2010.

ORTEGA, C.; SOLO-GABRIELE, H. M.; ABDELZAHER, A.; WRIGHT, M.; DENG, Y. Correlations between microbial indicators, pathogens, and environmental factors in a subtropical estuary. **Marine Pollution Bulletin**, doi: 10.1016/j.marpolbul. 2009.04.015, 2009.

PANG, X. L., PREIKSAITIS, J. K., LEE, B. Multiplex real time RT-PCR for the detection and quantitation of norovirus genogroups I and II in patients with acute gastroenteritis. **J. Clin. Virol.** 33, 168-171, 2005.

PANGALLO, D., DRAHOVSKA, H., HARICHOVA, J., KARELOVA, E., CHOVANOVA, K., FERIANC, P., TURN, J., TIMKO, J. Assessment of environmental enterococci: bacterial antagonism, pathogenic capacity and antibiotic resistance. **Antonie van Leeuwenhoek**, 94:555–562, 2008.

PARASHAR, U. D., HUMMELMAN, E. G., BRESEE, J. S., MILLER, M. A. AND GLASS, R. I. Global Illness and Deaths Caused by Rotavirus Disease in Children. **Emerging Infectious Diseases** – Vol. 9, No. 5, 2003.

PARASHAR, U. D., GIBSON, C. J. BRESEE, J. S., GLASS R. I. Rotavirus and Severe Childhood Diarrhea. **Emerging Infectious Diseases** - www.cdc.gov/eid - Vol. 12, No. 2, 2006.

PATEL, R., K. E. PIPER, M. S. ROUSE, J. M. STECKELBERG, J. R. UHL, P. KOHNER, M. K. HOPKINS, F. R. COCKERILL III, B. C. KLINE. Determination of 16S rRNA sequences of

enterococci and application to species identification of nonmotile *Enterococcus gallinarum* isolates. **J. Clin. Microbiol.** 36:3399– 3407, 1998.

PEREZ, M. L, SILVA, J. G., ROSSO, T. C. A. Uma visão da Implantação do Plano Nacional de Gerenciamento Costeiro no Brasil. **Rio's International Journal on Sciences of Industrial and Systems Engineering and Management Editor-in-Chief: Dr. Heitor Luiz Murat de Meirelles Quintella**, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, 2009.

PINA, S.; MONTSERRAT, P.; 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. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, n. 9, p. 3376-3382, 1998.

PREFEITURA DE VITÓRIA. Informações Municipais. Região VII. Disponível em: <http://legado.vitoria.es.gov.br/regionais/bairros/regiao7/ilhadascaieiras.asp>. Acesso em: 12 de dezembro de 2010.

PREFEITURA DE VITÓRIA. Lei municipal nº 3326 de 30 de Maio de 1986.

PREFEITURA DE VITÓRIA. Lei municipal nº 3377 de 11 de Novembro de 1986.

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

RAJAL, V.B., MCSWAIN, B.S., THOMPSON, D.E., LEUTENEGGER, C.M., WUERTZ, S. Molecular quantitative analysis of human viruses in California stormwater. **Water Res.** 41, 4287–4298, 2007.

REYNOLDS, K. A., GERBA, C. P., & PEPPER, I. L. Detection of infectious enteroviruses by an integrated cell culture - PCR procedure. **Applied and Environmental Microbiology**, 62, 1424–1427, 1996.

RIBEIRO, E. N., SANTOS, A. B., GONÇALVES, R. F., CASSINI, S. T. A. Avaliação de indicadores de balneabilidade em ambientes costeiros de Vitória/ES. VI Simpósio Ítalo Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental – SIBESA, **Anais**, 2002.

RICHARDS, G. P. Limitations of molecular biological techniques for assessing the virological safety of foods. **Journal of Food Protection**, 62, 691–697, 1999.

RIGO, D. Análise do escoamento em regiões estuarinas com manguezais – medições e modelagem na Baía de Vitória, ES. Tese: Doutorado. Departamento de Engenharia Oceânica / Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2004.

RIGOTTO, C. Aplicação de métodos moleculares e de cultivo celular no monitoramento de vírus entéricos no ambiente aquático. Tese de Doutorado. Florianópolis, 2009.

RIOU, P.; LESAUX, J.C.; DUMAS, F.; CAPRAIS, M.P.; LEGUYADER, S.F.; POMMEMPUY, M. Microbial impact of small tributaries on water and shellfish quality in shallow coastal areas. **Water Research**, v.41, p.2774-2786, 2007.

SAIR, A. I., D'SOUZA, D. H., JAYKUS, L. A. Human enteric viruses as causes of foodborne disease. **Comprehensive Reviews In Food Science And Food Safety**, Vol. 1, 2002.

SANTOS, M. M. Aplicação da Modelagem Estocástica no Estudo de Riscos ao Abastecimento de Água da Grande Vitória. Dissertação de Mestrado em Engenharia Ambiental, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental, UFES, Vitória, Brasil, 1994.

SCHWAB, K. J., DE LEON, R., SOBSEY, M. D. Concentration and purification of beef extract mock eluates from water samples for detection of enteroviruses, hepatitis A viruses, and Norwalk viruses by reverse transcription-PCR. **Appl. Environ. Microbiol.** 61, 531–537., 1995.

SCHWAB, K. J., DE LEON, R., SOBSEY, M. D. Immunoaffinity concentration and purification of waterborne enteric viruses for detection by reverse transcriptase PCR. **Appl. Environ. Microbiol.** 62, 2086–2094, 1996.

SCHWARZ, B. A., BANGE, R., VAHLENKAMP, T. W., JOHNE, R., MULLER, H. Detection and quantitation of group A rotaviruses by competitive and real-time reverse transcription-polymerase chain reaction. **J Virol Methods** 105:277–285. 2002.

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

SHIBATA, T., SOLO-GABRIELE, H. M., FLEMING, L., ELMIR, S. Monitoring marine recreational water quality using multiple microbial indicators in an urban tropical environment. **Water Res.** 38(13): 3119–3131, 2004.

SHIEH, Y.-S. C., WAIT, D., TAI, L., SOBSEY, M. D. Method to remove inhibitors in sewage and other fecal wastes for enterovirus detection by the polymerase chain reaction. **J. Virol. Methods** 54, 51–66, 1995.

SILVA, V. C., NASCIMENTO, A. R., MOURÃO, A. P. C., COIMBRA NETO, S. V., COSTA, F. N. Contaminação por *Enterococcus* da água das praias do município de São Luís, Estado do Maranhão. Maringá, **Acta Scientiarum Technology**, v. 30, n. 2, p. 187-192, 2008.

SILVA, M. A. B., BERNINI, E. DO CARMO, T. M S. Características estruturais de bosques de mangue do estuário do rio São Mateus, ES, Brasil. **Acta bot. bras.** 19(3): 465-471. 2005.

SMITH, E. M., GERBA, C. P. & MELNICK, J. L. Role of Sediment in the Persistence of Enteroviruses in the Estuarine Environment. **Applied And Environmental Microbiology**, p. 685-689, 1978.

SOARES, M.L.G. Estudo da Biomassa Aérea de Manguezais do Sudeste do Brasil – Análise de Modelos. Tese de Doutorado. Instituto Oceanográfico, Universidade de São Paulo. 2 vol. 294 p. 39 figuras e 238 tabelas, 1997.

SOARES, M. L. G., CHAVES, F. O., CORRÊA, F. M., SILVA JÚNIOR, C. M. G. Diversidade Estrutural de Bosques de Mangue e sua Relação com Distúrbios de Origem Antrópica: o caso da Baía de Guanabara (Rio de Janeiro). **Anuário do Instituto de Geociências** – UFRJ, Volume 26, 2003.

SOLO-GABRIELE, H; ABDELZAHER, A.; WRIGHT, M.; DENG, Y.; ORTEGA, C. Pathogen Measurements in the St. Lucie River Estuary. **Timothy Gray, Project Manager Florida Department of Environmental Protection**. 2008.

STEVENS, M.; ASHBOLT, N.; CUNLIFFE, D. Review of Coliforms: As Microbial Indicators of Drinking Water Quality. Recommendations to Change the Use of Coliforms as Microbial Indicators of Drinking Water Quality. Australian Government. **National Health and Medical Research Council**. 2003.

SUBEKTI D., LESMANA M., TJANIADI P., SAFARI N., FRAZIER E., SIMANJUNTAK C., KOMALARINI S., TASLIM J., CAMPBELL J.R., OYOFO B.A. Incidence of Norwalk-like viruses, rotavirus and adenovirus infection in patients with acute gastroenteritis in Jakarta, Indonesia. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v.33, p. 27-33, 2002.

SVEC, P., SEDLÁČEK I. Occurrence of Enterococcus spp. In **Waters. Folia Microbiol** 44:3–10, 1999

TAVARES, T. M., CARDOSO, D. D. P., BRITO, W. M. E. D. Vírus entéricos veiculados por água: aspectos microbiológicos e de controle de qualidade da água. **Rev Patol Trop**, 34:85-104, 2005.

TEJEDOR JUNCO, M. T., GONZALEZ MARTIN, M., TOLEDO, L. P., GOMEZ, P. L., BARRASA, J. L. M. Identification and antibiotic resistance of faecal enterococci isolated from water samples. **Int J Hyg Environ Health** 203:363–368, 2001.

THURSTON-ENRIQUEZ, J. A., HAAS, C. N., JACANGELO, J., & GERBA, C. P. Inactivation of enteric adenovirus and feline calicivirus by chlorine dioxide. **Applied and Environmental Microbiology**, 71, 3100–3105, 2005.

THURSTON-ENRIQUEZ, J. A., HAAS, C. N., JACANGELO, J., RILEY, K., GERBA, C. P. Inactivation of feline calicivirus and adenovirus type 40 by UV radiation. **Applied and Environmental Microbiology**, 69, 577–582, 2003.

TOZE, S. PCR and the detection of microbial pathogens in water and wastewater. **Wat. Res.** Vol. 33, No. 17, pp. 3545±3556, 1999.

TSAI, Y.et al. Detection of poliovirus, hepatitis A virus, and rotavirus from sewage and ocean water by triplex reverse transcriptase PCR. **American Society for Microbiology**. 1994.

UHNOO, I., WADELL, G., SVENSSON, L., JOHANSSON, M. E. Importance of Enteric Adenoviruses 40 and 41 in Acute Gastroenteritis in Infants and Young Children. **Journal Of Clinical Microbiology**. p. 365-372, 1984.

UNITED NATIONS CHILDREN'S FUND (UNICEF), THE; WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Diarrhoea: Why children are still dying and what can be done. Disponível em: http://www.unicef.org/media/files/Final_Diarrhoea_Report_October_2009_final.pdf. Acesso em 18 de novembro de 2012.

UNITED NATIONS EDUCATIONAL, SCIENTIFIC AND CULTURAL ORGANIZATION (UNESCO) 2003. Facts and figures, water and health. International year of freshwater. Disponível em: www.wateryear2003.org. Acesso em 18 de junho de 2010.

VOGELS, R., ZUIJDGEEST, D., VAN RIJNSOEVER, R., et al. Replication-Deficient Human Adenovirus Type 35 Vectors for Gene Transfer and Vaccination: Efficient Human Cell Infection and Bypass of Preexisting Adenovirus Immunity. **Journal of Virology**, p. 8263–8271 Vol. 77, 2003.

VAN HEERDEN, J., EHLERS, M. M., VAN ZYL, W. B., GRABOW, W. O. Incidence of adenoviruses in raw and treated water. **Water Research**, 37, 3704–3708, 2003.

VAN HEERDEN, J., EHLERS, M. M., VIVIER, J. C., GRABOW, W. O. Risk assessment of adenoviruses detected in treated drinking water and recreational water. **Journal of Applied Microbiology**, 99(4), 926–933, 2005.

VERHEYEN, J., TIMMEN-WEGO, M., LAUDIEN, R., BOUSSAAD, I., SEN, S., KOC, A., UESBECK, A., MAZOU, A. F., PFISTER, H. Detection of adenoviruses and rotaviruses in drinking water sources used in rural areas of Benin, West Africa, **Applied And Environmental Microbiology**, 2009.

VERONEZ, J., P., BASTOS, A. C., PIZZIN, B. F., GAVA, R. D., QUARESMA, V. S., SILVA, C. G. Sonar de varredura lateral e sísmica de alta resolução aplicados no estudo de ecofácies na Baía de Vitória – ES. **Revista Brasileira de Geofísica**. 27(3): 411-425, 2009.

VON SPERLING, M. Introdução à qualidade das águas e ao tratamento de esgotos – Princípios do tratamento biológico de águas residuárias. V. 1. 3 ed. Belo Horizonte: Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental. DESA. UFMG, 452 p, 2005.

YAN, H.-N., YAGYU, F., OKITSU, S., NISHIO, O., USHIJIMA, H. Detection of norovirus (GI, GII), sapovirus and astrovirus in fecal samples using reverse transcription single-round multiplex PCR. **J. Virol. Methods** 114, 37–44, 2003.

YEZLI, S., OTTER, J. A. Minimum Infective Dose of the Major Human Respiratory and Enteric Viruses Transmitted Through Food and the Environment. **Food Environ Virol**. Vol. 3, p.1–30, 2011.

ZENG, Q. S., HALKOSALO, A., SALMINEN, M., SZAKAL, E. D., PUUSTINEN, L., VESIKARI, T. One-step quantitative RT-PCR for the detection of rotavirus in acute gastroenteritis. **Journal of Virological Methods**, Volume 153, Issue 2, Pages 238-240, 2008

ZHENG, D. P. Norovirus Classification and Proposed Strain Nomenclature. **Public Health Resources**. Paper 89, 2006.