

Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

CARMEN BAUR VIEIRA

Rastreamento microbiológico de fontes de contaminação humana e animal por marcadores virais e avaliação de risco de infecções por vírus gastroentéricos na bacia do Rio Negro, Manaus, Amazonas.

Tese apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências

Orientadora: Dra. Marize Pereira Miagostovich

RIO DE JANEIRO

2015

Ficha catalográfica elaborada pela
Biblioteca de Ciências Biomédicas/ ICICT / FIOCRUZ - RJ

V658 Vieira, Carmen Baur

Rastreamento microbiológico de fontes de contaminação humana e animal por marcadores virais e avaliação de risco de infecções por vírus gastroentéricos na bacia do Rio Negro, Manaus, Amazonas / Carmen Baur Vieira. – Rio de Janeiro, 2015.

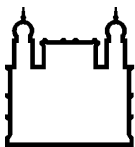
xxviii, 206 f. : il. ; 30 cm.

Tese (Doutorado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, 2015.

Bibliografia: f. 98-129

1. Vírus gastroentéricos. 2. Microbial source tracking. 3. Avaliação de risco. 4. Rio Negro. I. Título.

CDD 616.33



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

CARMEN BAUR VIEIRA

**RASTREAMENTO MICROBIOLÓGICO DE FONTES DE CONTAMINAÇÃO
HUMANA E ANIMAL POR MARCADORES VIRAIS E AVALIAÇÃO DE RISCO DE
INFECCÕES POR VÍRUS GASTROENTÉRICOS NA BACIA DO RIO NEGRO,
MANAUS, AMAZONAS.**

ORIENTADORA: Dra. Marize Pereira Miagostovich

Aprovada em: 29/10/2015

EXAMINADORES:

Dr. Marcelo Alves Pinto – Instituto Oswaldo Cruz (IOC/FIOCRUZ) - **Presidente**
Dr. Paulo Rubens Guimarães Barrocas – Escola Nacional de Saúde Pública (ENSP/FIOCRUZ)
Dr. Matias Victoria Montero – Universidad de la República (Uruguai)
Dra. Tatiana Xavier de Castro – Universidade Federal Fluminense (UFF)
Dra. Cláudia Lamarca Vitral – Universidade Federal Fluminense (UFF)

Rio de Janeiro, 29 de outubro de 2015

Dedico esta tese aos meus amados pais, Antonio e Bel,
meu querido irmão Henrique e meu lindo namorado Bruno,
pelo amor, apoio e estímulo.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Dra. Marize Pereira Miagostovich, pela confiança, carinho e ensinamentos que me fizeram aprender tanto; além, é claro, pelas viagens realizadas dentro deste projeto, que nos proporcionaram tantos bons momentos. Obrigada pelos dez anos de convivência.

Ao meu orientador de estágio no Instituto Nacional para Saúde Pública e Ambiente (do inglês *National Institute for Public Health and the Environment* e do holandês *Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu - RIVM*), Bilthoven, Holanda, Dr. Martijn Bouwknegt, pelo carinho ao me receber e proporcionar grande aprendizado na área de análise de risco. Aos Drs. Ana Maria Husman, Jack Schijven e Peter Teunis pela participação e apoio ao projeto.

À coordenação do curso de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular do IOC/FIOCRUZ e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão das bolsas de doutorado e estágio no RIVM, respectivamente.

Ao *European Union 7th Framework Programme for Research*, pelo financiamento do projeto *Viroclime*, no qual estão inseridas as atividades desta tese.

Ao Dr. Sérgio Luz, por abrir as portas do Laboratório de Ecologia de Doenças Transmissíveis na Amazônia, Instituto Leônidas e Maria Deane, FIOCRUZ Amazônia, e fornecer todo o apoio logístico para realização das coletas de água e concentração das amostras.

À Plataforma de Sequenciamento de DNA PDTIS/FIOCRUZ.

Aos Drs. Marcelo Alves Pinto, Paulo Rubens Guimarães Barrocas e Matias Victoria Montero, por gentilmente aceitarem o convite para participar da banca examinadora desta tese, e as Dras. Tatiana Xavier de Castro e Cláudia Lamarca Vitral, por aceitarem a participação como suplentes.

À Dra. Tatiana Xavier de Castro, pela revisão desta tese.

A todos os participantes do projeto *Viroclime*, pela oportunidade do trabalho, esforço conjunto e

pelo grande aprendizado proporcionado por esta interação.

Ao grupo da FIOCRUZ Amazônia, em especial a Michele de Jesus e Luciete Silva, pelo apoio na quantificação de bactérias e pela acolhida nos almoços e festas, e a todos os motoristas que nos conduziram nas coletas e nos ajudaram a carregar todos os quilos de água nas bombonas, em especial aos senhores Ricardo (*in memoriam*), Alex e Adilson.

À Adriana de Abreu Corrêa, por ser minha grande parceira nas coletas em Manaus, o que nos proporcionou, além de uma grande amizade, boas histórias, como: 14 horas diárias de trabalho, clara e gema, ver o boto, trilha na “selva amazônica”, bolo quentinho, gastroenterite em Manaus, Porão, *All night*, pôr do sol no Negro, pesca de piranhas, procissão de São Sebastião, Caprichoso ou Garantido?, Sérgio Malandro no aeroporto, você é personal trainer?, cair nas bombonas, melão por 47 reais, proteção para o rosto com guarda-chuva do frevo, almoço no Roma e no Gaúchos, “podrão” manauara às sete da manhã, almoços, piscina e dormidinhas na casa da “Madureira”, curvex do laboratório, lavar 60 bombonas, mergulhar no encontro das águas, bicho preguiça, dia dos namorados na pizza no cone, coleta de amostras animais, jantar fora, peixe-boi, passeio com Marta, cupuaçu, banhos de cachoeira, sanduíche “caboquinho”, proficiências e auditorias.

A todos os amigos do Laboratório de Virologia Comparada e Ambiental (LVCA), por todo o carinho e convivência dentro e fora dele.

A todos da Virologia Ambiental: Marize, por nos orientar, incentivar e tornar o grupo bem unido, Tulio, pelo convívio e exemplo, e também pela primeira coleta em Manaus em 2010, e Mônica, por estar comigo desde minha iniciação científica e pela ajuda na condução do projeto, em especial com as amostras da cheia histórica e no sequenciamento. À Fabiana e Julinha, pelo carinho e convivência ao longo de todos esses anos.

À minha amiga catalã Pilar Colas, por ser minha grande companheira na Holanda.

Aos meus amigos do RIVM, Radi, Willemijn, Tizza, Eri, Ankie, Harold, Sanne, Marieka, Fritz, Arnold e Lina, pelos almoços, conversas, *happy hours* e pelas inúmeras tentativas de me ensinar

holandês. Aos demais colegas do Instituto, pelas boas conversas nos cafés. Bedankt!!!

Às queridas Bira e Mara, por me darem uma família holandesa, e a Elisângela, pelas conversas.

A todos os meus amigos que me mandaram qualquer tipo de mensagem, me visitaram e apoiaram quando estava na Holanda.

À minha grande amiga Débora, “por tudo”.

À minha amiga Carol, pelo companheirismo, boas conversas e chamegos.

Aos meus pais, Antonio e Bel, por serem a minha base e apoio, meus grandes incentivadores, amigos e exemplos. Por me colocarem no colo, ouvirem, aguentarem e me fazerem sorrir.

Aos mimicos, irmão Henrique e cunhada Carol, pelo amor e por estarem sempre comigo.

Ao meu namorado Bruno, que conheci escrevendo o projeto de estágio no exterior e me apoiou e estimulou mesmo sabendo que estaríamos longe fisicamente. Por todo amor e carinho ao longo desses anos. Passou e aqui estamos.

A toda minha família, em especial a Tia Lydia, Gláucia e Úrsula, e demais amigos do universo não científico, pela torcida, amizade e carinho que se consolidam ainda mais a cada dia.

A Deus e todos que olham por mim.

“Ambiente limpo não é o que mais se limpa e sim o que menos se suja.”

Chico Xavier

ÍNDICE

| | |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS | xiii |
| LISTA DE FIGURAS | xix |
| LISTA DE TABELAS | xxii |
| LISTA DE QUADROS | xxiv |
| RESUMO | xxv |
| ABSTRACT | xxvii |
| 1. INTRODUÇÃO | 1 |
| 1.1. A cidade de Manaus | 4 |
| 1.2. Vírus gastroentéricos humanos em ambientes aquáticos | 6 |
| 1.2.1. Rotavírus grupo A (RVA) | 7 |
| 1.2.2. Calicivírus (CV) | 10 |
| 1.2.3. Astrovírus humanos (HAstV) | 13 |
| 1.2.4. Adenovírus humanos 40 e 41 (HAdV 40 e 41) | 14 |
| 1.2.5. Klassevírus (KV) | 14 |
| 1.2.6. Bocavírus humanos (HBoV) | 15 |
| 1.2.7. Aichivírus (AiV) | 15 |
| 1.3. Qualidade microbiológica da água e legislação | 16 |
| 1.4. Aspectos da Virologia Ambiental | 17 |
| 1.4.1. Concentração e detecção de vírus em ambientes aquáticos | 17 |
| 1.4.2. Rastreamento microbiológico de fontes de contaminação (do inglês <i>Microbial Source Tracking</i> [MST]) | 19 |
| 1.4.3. Análise de Risco | 21 |
| 1.4.3.1. Avaliação de risco | 22 |
| 1.4.3.2. Gestão do risco | 24 |
| 1.4.3.3. Comunicação do risco | 24 |
| 2. RELEVÂNCIA DO ESTUDO | 25 |
| 3. OBJETIVOS | 27 |
| 4. MATERIAL E MÉTODOS | 28 |
| 4.1. Área de estudo | 28 |
| 4.2. Amostragem | 29 |

| | |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 4.3. Concentração Viral | 32 |
| 4.3.1. Avaliação da metodologia de floculação orgânica para concentração viral | 33 |
| 4.4. Extração do ácido nucléico e obtenção de DNA complementar (cDNA) | 34 |
| 4.5. Detecção, quantificação e caracterização viral | 34 |
| 4.5.1. Estabelecimento de curvas padrão para Reação em Cadeia pela Polimerase quantitativa (qPCR) | 34 |
| 4.5.2. Protocolos de detecção e quantificação viral..... | 36 |
| 4.5.3. Ensaio para avaliação de repetitividade e reprodutibilidade dos protocolos de amplificação genômica quantitativa como ferramentas de rastreamento microbiológico de fontes de contaminação | 38 |
| 4.5.4. Ensaio de proficiência externa | 38 |
| 4.5.5. Caracterização molecular | 38 |
| 4.5.5.1. Análise dos produtos obtidos na Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) | 40 |
| 4.5.5.2. Sequenciamento nucleotídico para caracterização molecular | 40 |
| 4.6. Parâmetros bacteriológicos | 41 |
| 4.7. Parâmetros físico-químicos | 41 |
| 4.8. Análise estatística | 41 |
| 4.9. Avaliação de risco | 42 |
| 4.9.1. Concentração viral | 43 |
| 4.9.2. Vias de exposição | 44 |
| 4.9.3. Dose de partículas infecciosas ingeridas | 44 |
| 4.9.4. Dose-Resposta (DR) | 45 |
| 4.9.5. Caracterização do risco | 46 |
| 5. RESULTADOS | 47 |
| 5.1. Avaliação das metodologias de concentração, detecção e quantificação de vírus de origem humana e animal | 47 |
| 5.1.1. Método de floculação orgânica | 47 |
| 5.1.2. Ensaio para avaliação de repetitividade e reprodutibilidade dos protocolos de amplificação genômica quantitativa como ferramentas de rastreamento microbiológico de fontes de contaminação | 48 |
| 5.1.3. Ensaio de proficiência externa | 48 |

| | |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 5.2. Monitoramento das águas do Rio Negro e dos igarapés da cidade de Manaus/AM considerando o ciclo hidrológico deste rio, no período de janeiro de 2011 a maio de 2012, pela detecção e quantificação de vírus de origem humana e animal | 50 |
| 5.2.1. Rastreamento das fontes de contaminação humana e animal | 51 |
| 5.2.2. Detecção de vírus gastroentéricos | 52 |
| 5.2.3. Detecção e quantificação de vírus de origem humana e animal de acordo com o ciclo hidrológico do Rio Negro | 53 |
| 5.2.4. Caracterização molecular dos vírus | 58 |
| 5.2.5. Qualidade da água por parâmetros bacteriológicos | 58 |
| 5.2.6. Correlações entre adenovírus humano (HAdV) e poliomavírus JC (JCPyV) e indicadores bacteriológicos de contaminação fecal humana da água | 59 |
| 5.2.7. Caracterização dos ambientes aquáticos por parâmetros físico-químicos | 61 |
| 5.2.8. Avaliação de risco de infecções por rotavírus grupo A (RVA) | 62 |
| 5.2.8.1. Concentração viral | 64 |
| 5.2.8.2. Dose de partículas virais infecciosas ingeridas | 64 |
| 5.2.8.2.1. Concentração viral | 64 |
| 5.2.8.2.2. Eficiência da recuperação | 65 |
| 5.2.8.2.3. Percentual de partículas infecciosas | 66 |
| 5.2.8.2.4. Volume de água ingerido | 67 |
| 5.2.8.3. Caracterização do risco | 70 |
| 5.3. Cheia histórica do Rio Negro em Manaus, junho de 2012 | 72 |
| 6. DISCUSSÃO | 79 |
| 6.1. Avaliação das metodologias de concentração, detecção e quantificação de vírus de origem humana e animal | 79 |
| 6.2. Monitoramento das águas do Rio Negro e dos igarapés da cidade de Manaus/AM considerando o ciclo hidrológico deste rio, no período de janeiro de 2011 a maio de 2012, pela detecção e quantificação de vírus de origem humana e animal | 82 |
| 6.2.1. Rastreamento das fontes de contaminação humana e animal | 82 |
| 6.2.2. Detecção de vírus gastroentéricos | 82 |
| 6.2.3. Detecção e quantificação viral considerando os pontos de coleta e o ciclo hidrológico do Rio Negro | 83 |

| | |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 6.2.4. Qualidade da água por indicadores bacteriológicos e virais de contaminação fecal humana | 85 |
| 6.2.5. Caracterização dos ambientes aquáticos por parâmetros físico-químicos | 85 |
| 6.2.6. Avaliação de risco de infecções por rotavírus grupo A (RVA) | 87 |
| 6.3. Cheia histórica do Rio Negro em Manaus, junho de 2012 | 91 |
| 7. CONCLUSÕES | 95 |
| 8. PERSPECTIVAS | 97 |
| 9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 98 |
| 10. ANEXOS | 130 |
| Anexo 1. Condições da reação de Transcrição Reversa (RT) para obtenção de cDNA | 130 |
| Anexo 2. Condições das reações de PCR quantitativa (qPCR) para detecção e quantificação de adenovírus humano (HAdV), poliomavírus JC (JCPyV), rotavírus grupo A (RVA), norovírus genogrupo II (NoV GII), astrovírus humano (HAstV), norovírus genogrupo IV (NoV GIV), sapovírus (SaV), bocavírus humano (HBoV), klassevírus (KV), aichivírus (AiV), adenovírus suíno (PAdV) e poliomavírus bovino (BPyV) | 131 |
| Anexo 3. Condições das Reações em Cadeia Pela Polimerase (PCR) para caracterização viral | 134 |
| Anexo 4. Resultados dos ensaios para avaliação de repetitividade e reprodutibilidade dos protocolos de amplificação genômica quantitativa como ferramentas de rastreamento microbiológico de fontes de contaminação | 139 |
| Anexo 5. Artigo aceito para publicação | 140 |
| Anexo 6. Artigo publicado | 165 |
| Anexo 7. Artigo para submissão | 177 |

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

μg – micrograma

μL – microlitro

μM – micromolar

σ – desvio padrão

AdV – adenovírus

AiV – aichivírus

AM – Amazonas

AstV – astrovírus

BLAST – Ferramenta Básica de Busca de Alinhamentos Locais (do inglês *Basic Local Alignment Search Tool*)

BoV – bocavírus

BPyV – poliomavírus bovino (do inglês *bovine polyomavirus*)

CA – Califórnia

CAPES – Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

CCL – Lista de Contaminantes Candidatos (do inglês *Contaminant Candidate List*)

CDC – Centro para o Controle e Prevenção de Enfermidades (do inglês *Centers for Disease Control and Prevention*)

cDNA – DNA complementar

CG – Cópias de Genoma

cm – centímetro

CONAMA – Conselho Nacional de Meio Ambiente

CV – calicivírus

DALYs – Incapacidade ajustada de anos de vida (do inglês *Disability Adjusted Life Years*)

dATP – desoxiadenosina trifosfato

dCTP – desoxicitosina trifosfato

dGTP – desoxiguanosina trifosfato

DMSO – Dimetilsufóxido

DNA – ácido desoxirribonucléico

DNAfs – DNA fita simples

Dr. – Doutor

DR – Dose-Resposta

dTTP – desoxitimidina trifosfato

dXTP – desoxiribonucleotídeo trifosfato

E. coli – *Escherichia coli*

EDTA – Ácido etilenodiamino tetracético

EGPA – Eletroforese em Gel de Poliacrilamida

EIA – Ensaio Imunoenzimático (do inglês *Immunoenzymatic Assay*)

ELISA – Ensaio Imunoenzimático (do inglês *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*)

EV – enterovírus

ETE – Estação de Tratamento de Efluentes

EUA – Estados Unidos da América

F – senso (do inglês *foward*)

FDA – Administração de Alimentos e Medicamentos (do inglês *Food and Drug Administration*)

FIOCRUZ – Fundação Oswaldo Cruz

g – grama

G – genogrupo

GA – Gastroenterite Aguda

GG – genótipo

GPS – Sistema de Posicionamento Global (do inglês *Global Positioning System*)

h – hora

H₂O – Água

ha – hectares

HAdV – adenovírus humano (do inglês *human adenovirus*)

HAdV 2 – adenovírus humano 2

HAdV 35 – adenovírus humano 35

HAdV 40 – adenovírus humano 40

HAdV 41 – adenovírus humano 41

HAdV – astrovírus humano (do inglês *human astrovirus*)

HAV – vírus da hepatite A (do inglês *hepatitis A virus*)

HEV – vírus da hepatite E (do inglês *hepatitis E virus*)

HBoV – bocavírus humano (do inglês *human bocavirus*)

HCl – Ácido clorídrico

IBGE– Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

ICTV – Comitê Internacional de Taxonomia Viral (do inglês *International Committee on Taxonomy of Viruses*)

ILMD – Instituto Leônidas e Maria Deane

IOC – Instituto Oswaldo Cruz

JCPyV – poliomavírus JC (do inglês *JC polyomavirus*)

kb – quilobase

km – quilômetro

km² – quilômetro quadrado

KS – Kansas

KV – klassevírus

L – litro

LD – método dependente de biblioteca (do inglês *library dependent method*)

LI – método independente de biblioteca (do inglês *library independent method*)

LMP – Leucoencefalopatia Multifocal Progressiva

Ltda – Limitada

LVCA – Laboratório de Virologia Comparada e Ambiental

m – metro

m³ – metro cúbico

mABs – anticorpos monoclonais (do inglês *monoclonal antibodies*)

M – molar

MDDA – Programa Brasileiro de Monitorização de Doenças Diarréicas Agudas

ME – Maine

MgCl₂ – Cloreto de magnésio

min – minuto

mL – mililitro

mm – milímetro

mm² – milímetro quadrado

mM – milimolar

mS – miliSiemens

MST – Rastreamento microbiológico de fontes de contaminação (do inglês *Microbial Source Tracking*)

n – número de vezes
N – Normal
Na₂HPO₄ – Fosfato de sódio dibásico
NaH₂PO₄ – Fosfato de sódio monobásico
NASBA – Reação de amplificação baseada na sequência de ácido nucléico (do inglês *Nucleic Acid Sequence–Based Amplification*)
neg – negativo
ng – nanograma
NIEH – Instituto Nacional de Saúde Ambiental (do inglês *National Institute for Environmental Health* e do húngaro *Országos Környezetegeszsegügyi Inteze*)
nm – nanômetro
NMP – Número Mais Provável
NoV – norovírus
NoV GII – norovírus genogrupo II
NoV GIV – norovírus genogrupo IV
NT – não tipado
NTC – Controle sem molde (do inglês *No Template Control*)
NY – Nova Iorque
°C – graus Celsius
OMS – Organização Mundial de Saúde (do inglês *World Health Organization* [WHO])
ORF – Fase Aberta de Leitura (do inglês *Open Reading Frame*)
p – probabilidade
p/v – peso por volume
PAdV – adenovírus suíno (do inglês *porcine adenovirus*)
PAdV 3 – adenovírus suíno 3
pb – pares de base
PCR – Reação em Cadeia pela Polimerase (do inglês *Polymerase Chain Reaction*)
PDTIS – Programa de Desenvolvimento Tecnológico em Insumos para Saúde
PNI – Programa Nacional de Imunização
PROSAMIM – Programa Social e Ambiental dos Igarapés de Manaus
PyV - poliomavírus (do inglês *polyomavirus*)

QCMD – Controle de Qualidade para Diagnóstico Molecular (do inglês *Quality Control for Molecular Diagnostics*)

QMRA – Avaliação Quantitativa de Risco Microbiológico (do inglês *Quantitative Microbial Risk Assessment*)

qPCR – Reação em Cadeia pela Polimerase em tempo real / PCR quantitativo

r – coeficiente de correlação

R – reverso (do inglês *reverse*)

RIA – Radioimunoensaio (do inglês *Radioimmunoassay*)

RIVM – Instituto Nacional para Saúde Pública e Ambiente (do inglês *National Institute for Public Health and the Environment* e do holandês *Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu*)

RNA – ácido ribonucléico

RNAfd – RNA fita dupla

RNAfs – RNA fita simples

rpm – rotações por minuto

RT – Transcrição Reversa

RV – rotavírus

RVA – rotavírus grupo A

RVH – rotavírus grupo H

s – segundo(s)

SaV – sapovírus

seg – segundo(s)

SNC – Sistema Nervoso Central

TBE – Tris/Borato/EDTA

TCID50 – Dose infecciosa para 50 % da cultura de tecidos (do inglês *Median Tissue Culture Infective Dose Assay*)

U – unidade

UB – Universidade de Barcelona (do catalão *Universitat de Barcelona*)

UFF – Unidade Formadora de Foco

UMU – Universidade de Umea (do sueco *Umea Universitet*)

UNT – Unidade Nefelométrica de Turbidez

UPA – Universidade de Patras (do inglês *University of Patras*)

USEPA – Agência de Proteção Ambiental Americana (do inglês *U.S. Environmental Protection Agency*)

UV – ultravioleta

v/v – volume por volume

V – Volts

VLP – Partículas Semelhantes a Vírus (do inglês *Virus Like Particle*)

X – vezes

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1.1. Representação esquemática de possíveis fontes de contaminação de recursos hídricos por microrganismos patogênicos | 2 |
| Figura 1.2. Número de casos notificados de gastroenterite e nível do Rio Negro em Manaus durante um período de oito anos, 2006-2013 | 6 |
| Figura 1.3. Aspectos estruturais e genômicos dos rotavírus grupo A (RVA) | 8 |
| Figura 1.4. Morfologia dos calicivírus (CV) | 10 |
| Figura 1.5. Classificação dos norovírus (NoV) em sete possíveis genogrupos (GI - GVII) e seus genótipos com base na sequência de aminoácidos da proteína VP1 do capsídeo viral | 11 |
| Figura 1.6. Diagrama esquemático do processo de detecção viral em ambientes aquáticos | 18 |
| Figura 1.7. Estrutura da Análise de Risco | 22 |
| Figura 4.1. Estratégia de estudo desenvolvida nesta tese | 28 |
| Figura 4.2. Mapa da área estudada e distribuição geográfica dos pontos de amostragem (MA01 a MA05) | 30 |
| Figura 4.3. Concentração viral por metodologia de floculação orgânica | 32 |
| Figura 4.4. Modelos conceituais para a estimativa de risco de infecções por rotavírus grupo A (RVA) por contato recreacional e mão-boca com ambientes aquáticos de Manaus | 43 |
| Figura 5.1. Pontos de coleta considerando o ciclo hidrológico do Rio Negro | 51 |
| Figura 5.2. Detecção de vírus de origem humana e animal em ecossistemas aquáticos da cidade de Manaus | 52 |
| Figura 5.3. Quantificação de vírus de origem humana e animal nas oito amostras coletadas nos pontos de coleta de acordo com a amostragem e o nível do Rio Negro | 57 |
| Figura 5.4. Quantificação mediana de <i>Escherichia coli</i> (<i>E. coli</i>) e enterococos como indicadores microbiológicos de contaminação fecal para águas de recreação em Manaus..... | 59 |
| Figura 5.5. Concentrações medianas de marcadores virais e bacteriológicos de acordo com o ciclo hidrológico do Rio Negro | 60 |
| Figura 5.6. Concentrações estimadas de rotavírus grupo A (RVA) considerando 95 % de intervalo de confiança da curva padrão | 64 |
| Figura 5.7. Curvas de distribuição de probabilidade gamma das concentrações de rotavírus grupo A (RVA) considerando cada ponto de amostragem | 65 |

| | |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 5.8. Curva de distribuição de probabilidade beta para a recuperação de rotavírus grupo A (RVA) no ponto MA01 (Rio Negro/Praia de Ponta Negra) | 65 |
| Figura 5.9. Curva de distribuição de probabilidade beta para a recuperação de rotavírus grupo A (RVA) nos igarapés MA02/MA03 (MA02 - São Raimundo /MA03 – Quarenta/Educandos) | 66 |
| Figura 5.10. Curva de distribuição de probabilidade beta para o percentual de partículas infecciosas de rotavírus grupo A (RVA) nos três pontos estudados | 67 |
| Figura 5.11. Curva de distribuição de probabilidade gamma para o volume de água ingerido por adultos em atividades recreacionais em água doce | 68 |
| Figura 5.12. Curva de distribuição de probabilidade gamma para o volume de água ingerido por crianças em atividades recreacionais em água doce | 68 |
| Figura 5.13. Curva de distribuição de probabilidade uniforme para espessura da película de água sobre as mãos (h) formada nas crianças quando em contato com a água | 69 |
| Figura 5.14. Curva de distribuição de probabilidade uniforme para área da mão que é inserida na boca (A) pelas crianças | 69 |
| Figura 5.15. Curva de distribuição de probabilidade gamma para frequência de contato mão-boca (f_{HM}) pelas crianças | 70 |
| Figura 5.16. Probabilidades de infecção de adultos e crianças por rotavírus grupo A (RVA) por atividades recreacionais nos ambientes aquáticos da cidade de Manaus | 71 |
| Figura 5.17. Probabilidades de infecção de crianças por rotavírus grupo A (RVA) pelo contato mão-boca com os igarapés da cidade de Manaus | 72 |
| Figura 5.18. Áreas inundadas na cheia histórica do Rio Negro, Manaus, 2012 | 72 |
| Figura 5.19. Número de casos de gastroenterite notificados e nível do Rio Negro em Manaus em 2011 e 2012 | 73 |
| Figura 5.20. Quantificações virais e bacterianas em cada uma das oito amostras coletadas nos cinco pontos de coleta durante a cheia histórica do Rio Negro em Manaus, 2012 | 75 |
| Figura 5.21. Concentrações de adenovírus humano (HAdV), rotavírus grupo A (RVA) e norovírus genogrupo II (NoV GII) na cheia histórica do Rio Negro em Manaus, 2012, e nos períodos de seca e cheia de 2011 | 76 |
| Figura 5.22. Concentrações de adenovírus humano (HAdV) em comparação às concentrações de <i>Escherichia coli</i> (<i>E. coli</i>) e enterococos como indicadores microbiológicos de contaminação fecal humana para águas de recreação em Manaus | 77 |

| | |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Figura 5.23. Valores medianos dos parâmetros físico-químicos obtidos em cada ponto de amostragem durante a cheia histórica do Rio Negro em Manaus, 2012 | 78 |
| Figura 10.1. Quantificações de adenovírus humano (HAdV), poliomavírus JC (JCPyV), adenovírus suíno (PAdV) e poliomavírus bovino (BPyV) obtidas nos ensaios de repetitividade e reprodutibilidade dos protocolos de quantificação de vírus de origem humana e animal como ferramentas de rastreamento das fontes de contaminação | 139 |

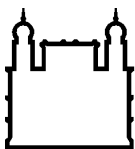
LISTA DE TABELAS

| | |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabela 4.1. Cronograma das campanhas de coleta | 31 |
| Tabela 4.2. Plasmídeos utilizados para obtenção de curva padrão | 35 |
| Tabela 4.3. Iniciadores, sondas, regiões genômicas e referências utilizadas para a detecção e quantificação de vírus de origem humana e animal | 37 |
| Tabela 4.4. Iniciadores utilizados na Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) para caracterização molecular de adenovírus humanos (HAdV), rotavírus grupo A (RVA) e norovírus genogrupo II (NoV GII) | 39 |
| Tabela 5.1. Eficiência de recuperação de adenovírus humano 35 (HAdV 35) e rotavírus grupo A (RVA) pelo método de flocculação orgânica | 47 |
| Tabela 5.2. Percentuais de recuperação de adenovírus humano 35 (HAdV 35) nos ensaios de inoculação experimental nas amostras coletadas durante o monitoramento | 48 |
| Tabela 5.3. Resultados do teste de proficiência externa para quantificação de adenovírus humanos (HAdV) | 49 |
| Tabela 5.4. Resultados do teste de proficiência externa para quantificação de norovírus genogrupo II (NoV GII) | 50 |
| Tabela 5.5. Detecção e quantificação de rotavírus grupo A (RVA) e norovírus genogrupo II (NoV GII) de acordo com os locais de amostragem | 53 |
| Tabela 5.6. Detecção de vírus de origem humana e animal nas 272 amostras de rio de acordo com os pontos de coleta e o ciclo hidrológico do Rio Negro | 55 |
| Tabela 5.7. Correlações entre adenovírus humano (HAdV), poliomavírus JC (JCPyV), <i>Escherichia coli</i> (<i>E. coli</i>) e enterococos como indicadores de contaminação fecal humana em águas de rio de Manaus | 61 |
| Tabela 5.8. Mediana dos parâmetros físico-químicos de acordo com os pontos de coleta e o ciclo hidrológico do Rio Negro | 62 |
| Tabela 5.9. Distribuições de probabilidade e parâmetros utilizados no modelo para a avaliação de risco de infecções por rotavírus grupo A (RVA) pela exposição a ecossistemas aquáticos de Manaus | 63 |
| Tabela 5.10. Detecção de adenovírus humano (HAdV), rotavírus grupo A (RVA) e norovírus genogrupo II (NoV GII) em amostras de água coletadas na cheia histórica do Rio Negro em Manaus, 2012 | 74 |

Tabela 5.11. Valores de p obtidos nos testes de Mann-Whitney para comparação das concentrações virais na cheia histórica de 2012 e nos períodos de seca e cheia de 201176

LISTA DE QUADROS

| | |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Quadro 10.1. Reagentes utilizados na reação de Transcrição Reversa (RT) para a obtenção de DNA complementar (cDNA) a partir do RNA viral extraído | 130 |
| Quadro 10.2. Reagentes utilizados na PCR quantitativa (qPCR) para detecção e quantificação de adenovírus humano (HAdV), poliomavírus JC (JCPyV), rotavírus grupo A (RVA), astrovírus humano (HAstV), klassevírus (KV), aichivírus (AiV), adenovírus suíno (PAdV) e poliomavírus bovino (BPyV) | 131 |
| Quadro 10.3. Reagentes utilizados na PCR quantitativa (qPCR) para detecção e quantificação de norovírus genogrupos II (NoV GII) e IV (NoV GIV) e sapovírus (SaV) | 132 |
| Quadro 10.4. Condições das reações de PCR quantitativa (qPCR) para detecção e quantificação de adenovírus humano (HAdV), poliomavírus JC (JCPyV), rotavírus grupo A (RVA), norovírus genogrupo II (NoV GII), astrovírus humano (HAstV), norovírus genogrupo IV (NoV GIV), sapovírus (SaV), bocavírus humano (HBoV), klassevírus (KV), aichivírus (AiV), adenovírus suíno (PAdV) e poliomavírus bovino (BPyV) | 133 |
| Quadro 10.5. Reagentes utilizados na Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) para caracterização molecular dos adenovírus humanos (HAdV) | 134 |
| Quadro 10.6. Reagentes utilizados na Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) para classificação binária de rotavírus grupo A (RVA) em genótipos G e P | 135 |
| Quadro 10.7. Reagentes utilizados na <i>semi-nested</i> PCR para caracterização molecular de genótipos G de rotavírus grupo A (RVA) | 136 |
| Quadro 10.8. Reagentes utilizados na <i>semi-nested</i> PCR para caracterização molecular de genótipos P de rotavírus grupo A (RVA) | 136 |
| Quadro 10.9. Reagentes utilizados na Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) para caracterização molecular de rotavírus grupo A (RVA) pela proteína VP6 | 137 |
| Quadro 10.10. Reagentes utilizados na Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) para caracterização molecular dos norovírus genogrupo II (NoV GII) | 138 |
| Quadro 10.11. Reagentes utilizados na <i>semi-nested</i> PCR para caracterização molecular dos norovírus genogrupo II (NoV GII) | 138 |



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

RASTREAMENTO MICROBIOLÓGICO DE FONTES DE CONTAMINAÇÃO HUMANA E ANIMAL POR MARCADORES VIRAIS E AVALIAÇÃO DE RISCO DE INFECÇÕES POR VÍRUS GASTROENTÉRICOS NA BACIA DO RIO NEGRO, MANAUS, AMAZONAS.

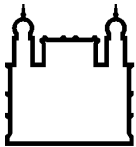
RESUMO

TESE DE DOUTORADO

Carmen Baur Vieira

A disseminação de vírus entéricos em ambientes aquáticos está diretamente relacionada ao despejo *in natura* de esgotos e, conseqüentemente, associada a doenças de veiculação hídrica. Atualmente, os vírus vêm sendo sugeridos como marcadores espécie-específicos para rastreamento microbiológico de fonte de contaminação fecal (*Microbial Source Tracking* [MST]) destes ambientes, podendo ser utilizados em estratégias de monitoramento e gestão de bacias hidrográficas. Neste contexto, este estudo teve como objetivo rastrear fontes de contaminação fecal de origem humana e animal utilizando marcadores virais e determinar a concentração dos principais vírus associados a gastroenterite aguda na bacia hidrográfica do Rio Negro, Manaus, Amazonas (AM), a fim de estimar o risco de infecções por estes vírus por diferentes vias de exposição da população local. Com este propósito, avaliou-se a metodologia de concentração viral por floculação orgânica, além de ensaios quantitativos (qPCR) de detecção. Posteriormente, realizou-se um monitoramento trimestral (2011-2012) ao longo do Rio Negro e dos igarapés da cidade, quando 272 amostras foram coletadas, assim como uma amostragem adicional durante a cheia histórica deste rio (junho de 2012). Parâmetros físico-químicos e bacteriológicos (*E. coli* e enterococos) também foram determinados, sendo investigada uma possível correlação bactéria-vírus. Adenovírus humanos (HAdV) e poliomavírus JC (JCPyV), utilizados como marcadores de contaminação humana, foram detectados em 91,9 % e 69,5 % das amostras, respectivamente, revelando a origem humana de contaminação dos ecossistemas estudados. Adenovírus suíno (PAdV) e poliomavírus bovino (BPyV) foram observados em baixos percentuais, 0,7 e 1,8 %, respectivamente. Rotavírus grupo A (RVA) e norovírus genogrupo II (NoV GII) foram detectados em 23,9 % e 7,4 % das amostras, respectivamente. O NoV GII foi detectado apenas na estação seca enquanto o RVA foi prevalente na cheia, quando suas concentrações apresentaram um aumento significativo. As concentrações dos vírus humanos variaram de 10^2 a 10^6 cópias de genoma (CG)/L, sendo observadas maiores contaminações de HAdV e JCPyV nos igarapés e no período de cheia, enquanto as concentrações dos vírus de origem animal variaram de 10^1 a 10^2 CG/L. Correlações de 0,274 a 0,762 foram observadas entre HAdV, JCPyV, *E. coli* e enterococos e apontaram a utilização de HAdV como possível marcador viral de contaminação fecal humana. Pelos resultados obtidos, realizou-se um estudo de avaliação de risco de infecções por RVA, onde estimou-se probabilidades médias de infecção variando de 0,3954 a 0,868 pela exposição por atividades recreacionais ou contato mão-boca com os ambientes aquáticos de Manaus. Durante a cheia histórica do Rio Negro, demonstrou-se uma correlação entre o nível de água do rio e o

número de casos de gastroenterite, assim como um aumento na concentração de RVA, NoV e HAdV. A investigação de astrovírus e vírus emergentes, como NoV GIV, sapovírus, bocavírus, aichivírus e klassevírus, foi realizada nestas amostras, porém não foram detectados. Globalmente, este estudo representa um grande avanço nos estudos de virologia ambiental no Brasil, sendo pioneiro nas análises de MST e risco virológico, que demonstraram a precariedade de saneamento básico na cidade de Manaus e os riscos de infecção viral associados a esta condição.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

MICROBIAL SOURCE TRACKING OF HUMAN AND ANIMAL CONTAMINATION BY VIRAL MARKERS AND RISK ASSESSMENT OF GASTROENTERIC VIRUSES INFECTIONS IN THE NEGRO RIVER BASIN, MANAUS, AMAZONAS.

ABSTRACT

PhD Thesis

Carmen Baur Vieira

The dissemination of enteric viruses in aquatic environments is directly related to the discharge of raw sewage and consequently associated with waterborne diseases. Currently, viruses have been suggested as host-specific markers for Microbial Source Tracking (MST) in these environments, and can be used in monitoring and management strategies of watersheds. In this context, this study aimed to assess human and animal sources of contamination by viral markers and the concentrations of the main gastroenteric viruses in the Negro River catchment, Manaus, Amazonas (AM), in order to estimate the risk of infection associated with the use of these waters by the locals. For this purpose, a concentration procedure by organic flocculation and quantitative assays (qPCR) for viruses detection were evaluated. Later, a quarterly monitoring (2011-2012) along the Negro River and the *igarapés* of the city was carried out, when 272 surface water samples were collected, as well as an additional sampling during the extreme flood of this river (June 2012). Physico-chemical and bacteriological (*E. coli* and enterococci) parameters were also measured, being investigated the correlation between viruses and bacteria. Human adenovirus (HAdV) and JC polyomavirus (JCPyV) were used as viral markers of human contamination, being detected in 91.9 % and 69.5 % of the samples, respectively, showing the contamination of human origin in the study ecosystems. Porcine adenovirus (PAdV) and bovine polyomavirus (BPyV) were detected in low percentages, 0.7 and 1.8 %, respectively. Group A rotavirus (RVA) and genogroup II norovirus (NoV GII) were detected in 23.9% and 7.4% of the samples, respectively. NoV GII was detected only in the dry season whereas RVA was prevalent in the flood season, when its concentration showed a significant increase. Concentrations of human viruses ranged from 10^2 to 10^6 genome copies (GC)/L, being higher contaminations with HAdV and JCPyV observed in the *igarapés* and during the flood season, whereas concentrations of animal viruses ranged from 10^1 to 10^2 GC/L. Correlations between HAdV, JCPyV, *E. coli* and enterococci ranged from 0.274 to 0.762 and suggested the use of HAdV as a possible viral marker of human fecal contamination. Based on the obtained results, a risk assessment study of RVA infection due to recreational and hand-to-mouth contacts with these contaminated waters was carried out and the estimated mean probabilities of infection ranged from 0.3954 to 0.868. During the extreme flood of the Negro River, a correlation between the river level and number of gastroenteritis cases was demonstrated, as well as an increase in the concentration of RVA, NoV and HAdV. Astrovirus and emerging viruses such as NoV GIV, sapovirus, bocavirus, aichivirus, and klassevirus were also investigated in these samples, but were not detected. The overall results

of this thesis represent major advances in environmental virology in Brazil, since it is pioneer in both *MST* and virological risk assessment studies, which demonstrated the precariousness of basic sanitation in the city of Manaus and risks associated with this condition.

1. INTRODUÇÃO

A água de má qualidade continua representando uma ameaça para a saúde humana, uma vez que grande parte da população ainda convive com abastecimento insuficiente ou inadequado associado à falta de esgotamento sanitário. A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que 4 % da carga global de doenças poderiam ser evitadas através da melhoria de abastecimento de água, saneamento e higiene. Assim, apesar dos avanços tecnológicos aplicados para tratamento e monitoramento da qualidade das águas, cerca de dois milhões de mortes no mundo por doenças diarreicas estão relacionadas a estas precárias condições (OMS, 2015).

O lançamento de esgotos tratados e não tratados, direta e indiretamente, em ambientes aquáticos é uma fonte de poluição fecal humana e animal das águas, sendo responsável pelo aporte de diferentes microrganismos nesses ecossistemas (Fong et al., 2010; Wong et al., 2012a; Prevost et al., 2015). A presença de agentes patogênicos de interesse para a saúde humana em recursos hídricos é bastante variável e dependente da natureza da fonte de contaminação destes (Hipsey & Brookes, 2013). Um número significativo de microrganismos patogênicos humanos, incluindo vírus, bactérias e protozoários, é lançado em ambientes aquáticos, tanto de forma pontual pelas tubulações de esgotos tratados e não tratados de áreas urbanas e de criadouros de animais e fossas sépticas, como por fontes difusas e intermitentes pelo escoamento urbano e agrícola, vazamentos de esgotos e inundações provocadas por tempestades (Figura 1.1) (*Nova Scotia Environment*, 2009; Girones et al., 2010; Hipsey & Brookes, 2013).

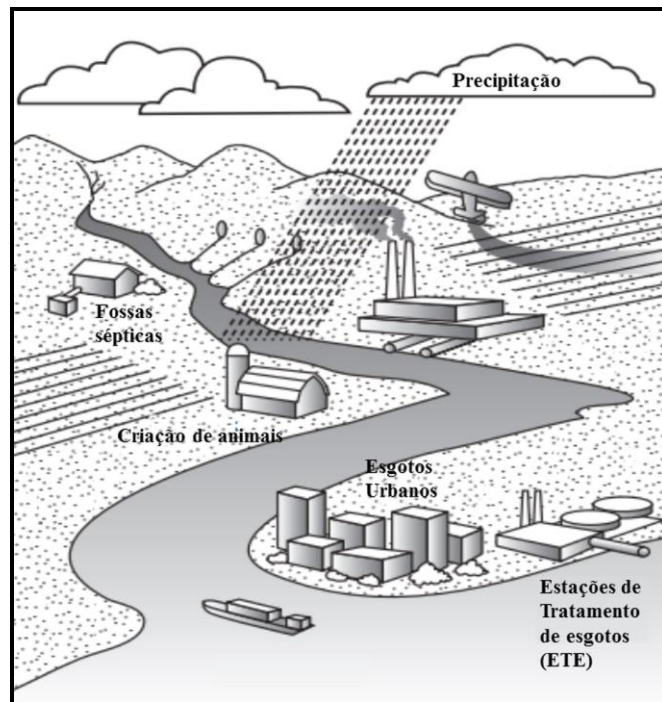


Figura 1.1. Representação esquemática de possíveis fontes de contaminação de recursos hídricos por microrganismos patogênicos. Adaptado de *Nova Scotia Environment*, 2009.

Os vírus entéricos humanos estão entre os principais patógenos associados a surtos de veiculação hídrica. Transmitidos pela via fecal-oral, infectam o trato gastrointestinal dos hospedeiros, sendo excretados em altas concentrações nas fezes e lançados nos esgotos, podendo atingir diferentes ambientes aquáticos, como oceanos, rios, águas destinadas a recreação e água potável (van Heerden et al., 2005; Sinclair et al., 2009; Calgua et al., 2013a; Fumian et al., 2013; Ming et al., 2014).

Diferentes vírus entéricos associados a surtos de veiculação hídrica foram classificados como de importância moderada e alta para a saúde pela OMS, sendo eles os adenovírus (AdV), astrovírus (AstV), vírus da hepatite A (HAV) e E (HEV), rotavírus (RV), norovírus (NoV) e outros calicivírus (CV) e enterovírus (EV), incluindo vírus coxsackie e poliovírus, além dos vírus excretados pela urina, como poliomavírus (PyV). Embora a maioria esteja associada a casos de gastroenterite aguda (GA), alguns são responsáveis por doenças mais graves, como hepatite, encefalite, meningite, miocardite e câncer (OMS, 2003, 2011b). Estes microrganismos apresentam diferenças estruturais e genômicas, mas compartilham propriedades que os tornam particularmente preocupantes quanto ao risco de doenças associadas à contaminação da água: baixas doses infecciosas (31 % de risco de infecção pelo contato com uma partícula de RV e 50

% para NoV), excreção em altas concentrações mesmo em casos assintomáticos (10^{11} partículas/g de fezes), alta estabilidade, persistência no ambiente e resistência a desinfecção (Fong & Lipp, 2005; Teunis et al., 2008; Rodríguez-Lázaro et al., 2012).

Apesar de mais de 150 tipos de vírus já terem sido encontrados nos ambientes aquáticos, estudos apontam a utilização de vírus com genoma DNA, incluindo adenovírus humanos (HAdV) e poliomavírus JC (JCPyV), como possíveis indicadores virais de contaminação fecal humana. Fatores como alta prevalência, estabilidade no ambiente, associação a quadros de infecções persistentes e excreção durante todo o ano em diferentes regiões geográficas (Pina et al., 1998; Hundesa et al., 2006; McQuaig et al., 2009; Wong et al., 2012a; Bofill-Mas et al., 2013) têm contribuído para isto.

Em 1998, a Agência de Proteção Ambiental Americana (USEPA, do inglês *U.S. Environmental Protection Agency*) incluiu os HAdV na sua primeira Lista de Contaminantes Candidatos (CCL-1, do inglês *Contaminant Candidate List*) como parte do *Safe Drinking Water Act*, principal lei que garante a qualidade da água potável nos Estados Unidos, em função das suas implicações na saúde pública e das ocorrências frequentes em muitos ambientes aquáticos (USEPA, 1998). Adicionalmente, vírus entéricos humanos estão descritos como possíveis indicadores alternativos nos critérios de qualidade de água recreacional desta mesma agência (USEPA, 2012).

O relato de diferentes estudos demonstrando que os parâmetros bacterianos não são suficientes para determinar de forma segura a qualidade da água (Gerba et al., 1979; Pusch et al., 2005; Wong et al., 2009; Payment & Locas, 2011) alavancou os estudos na área de virologia ambiental, principalmente no que diz respeito ao estabelecimento e validação de metodologias de recuperação viral a partir de diferentes matrizes aquáticas (Katayama et al., 2002; Haramoto et al., 2005; Calgua et al., 2008, 2013b), a definição de parâmetros virológicos (Pina et al., 1998; Bofill-Mas et al., 2006; Silva et al., 2011) e a estudos de avaliação de risco (Teunis et al., 2009; Kundu et al., 2013; Chigor et al., 2014).

Neste contexto, este estudo está inserido no macroprojeto intitulado “Impacto da mudança climática sobre o destino, transporte e gestão de risco de patógenos virais na água (*Viroclime*)”, aprovado e financiado pela *European Union 7th Framework Programme for Research*, contrato número 243923. O projeto teve como objetivo integrar a virologia à ciência das mudanças climáticas, pela realização de cinco estudos de caso em áreas vulneráveis a estas mudanças, principalmente aquelas associadas a eventos de chuva, a fim de desenvolver e aplicar modelos

matemáticos para estimar mudanças na exposição a partículas virais em condições definidas e associadas às alterações climáticas. Em adição a este estudo realizado na cidade de Manaus, região Amazônica, foram realizados estudos na Espanha, Grécia, Hungria e Suécia. Em sua primeira etapa, o projeto envolveu avaliação de metodologias de concentração e quantificação viral em amostras ambientais para rastreamento da origem da contaminação fecal nestas amostras, avaliação da correlação entre parâmetros bacteriológicos e virais como marcadores de contaminação fecal em corpos hídricos nos diferentes países dos estudos de caso e análise de risco virológico. Por ser uma região vulnerável a mudanças climáticas, a cidade de Manaus, localizada no coração da Amazônia, representa um *hot spot*, sendo por isto objeto deste estudo.

1.1. A cidade de Manaus

Como diversas cidades brasileiras que sofrem um rápido crescimento demográfico associado a um processo de urbanização desordenado, Manaus apresenta uma degradação ambiental resultante do impacto antropogênico principalmente caracterizado pelo desmatamento e despejo de esgotos *in natura* em seus corpos hídricos (Couceiro et al., 2007; Miagostovich et al., 2008). A cidade densamente povoada apresenta baixos índices de saneamento, sofre com as cheias do Rio Negro e com um elevado percentual de casos de diarreia ocorridos anualmente (Satyamurty et al., 2013; Instituto Trata Brasil, 2015; MDDA, 2015).

Manaus está inserida em quatro bacias hidrográficas (Tarumã-Açú, Puraquequara, São Raimundo e Educandos), todas contribuintes da grande bacia do Rio Negro, que compreendem áreas rurais e urbanas e apresentam diferentes graus de degradação ambiental (Projeto GEO Cidades, 2002).

A bacia hidrográfica do Tarumã-Açu compreende as zonas norte e oeste do município de Manaus. Seu principal curso d'água é o Rio Tarumã-Açu, afluente da margem esquerda do Rio Negro. Apesar de problemas ambientais decorrentes de ações antrópicas na região, como explorações mineral, vegetal e animal, esta ainda apresenta a maior parcela de características naturais da floresta amazônica circunvizinhas à Manaus. Nesta bacia está localizado um dos principais espaços da cidade destinados ao lazer da população, o balneário de Ponta Negra (Projeto GEO cidades, 2002; Costa, 2011).

A bacia de Puraquequara, além de apresentar-se na área urbana de Manaus, apresenta áreas consideradas como de uso agrícola. O Rio Puraquequara é afluente da margem esquerda do

Rio Amazonas e ainda mantém muito de suas características naturais, apesar de já serem observados impactos na região (Projeto GEO cidades, 2002).

Nas bacias do São Raimundo e Educandos se encontram os principais igarapés que drenam a cidade de Manaus. O igarapé do São Raimundo, que drena vários bairros e recebe diferentes nomes ao longo da cidade até a sua desembocadura no Negro, apresenta problemas decorrentes do precário saneamento básico da cidade, como poluição, assoreamento e obstrução pela remoção da vegetação de grande porte e mata ciliar, presença de grande quantidade de resíduos sólidos e lançamento de efluentes domésticos e industriais. Segundo dados do Programa Social e Ambiental dos Igarapés de Manaus (PROSAMIM) do São Raimundo, mais de 50 % das residências abrangidas neste programa lançam seus esgotos brutos diretamente nos igarapés, 35% na rede pública de drenagem e menos de 2 % faz uso de fossa rudimentar. Algumas galerias de águas pluviais também recebem esgotos que escoam pelas sarjetas das vias (PROSAMIM III – RIMA, 2012).

Em decorrência da ocupação e não preservação das suas nascentes, grande parte dos igarapés da bacia do São Raimundo têm seus regimes de escoamento dependentes das chuvas e descargas sanitárias. Assim, suas vazões e níveis de água são pequenos durante a seca e grandes durante os períodos de chuva. Além disso, durante o período da cheia, as águas do Rio Negro inundam as áreas mais baixas, ocupando vias de acesso e enchendo os igarapés (PROSAMIM III – RIMA, 2012).

O igarapé do Quarenta, principal tributário da bacia do Educandos, apresenta problemas de degradação de sua nascente e derivados das baixas condições de saneamento semelhantes aos da bacia do São Raimundo, assim como poluição por efluentes provenientes das atividades de cerca de 400 indústrias de diferentes setores, como químico, metalúrgico e eletroeletrônico. Esta área é uma das poucas com coleta de esgotos na cidade, representando 39 % da rede de Manaus. Entretanto, os esgotos coletados na bacia do Educandos são dispostos sem tratamento no Rio Negro pelo emissário subfluvial já existente. Adicionalmente, parte dos domicílios, especialmente os ribeirinhos, lançam seus esgotos brutos diretamente nos corpos d'água. Somente na área abrangida pelo PROSAMIM do Educandos, existem 342.167 moradores, dos quais 36.000 se encontram em situação potencial de risco (PROSAMIM, 2004).

As condições sociais e ambientais da população ribeirinha associadas à falta de saneamento em ambas as bacias são fatores que contribuem para a proliferação de doenças de veiculação hídrica, incluindo as diarreias, nestas regiões. As enchentes dos rios e os altos índices

pluviométricos também são fatores que contribuem para o agravamento do quadro. O problema ambiental de origem hídrica nessas áreas também está associado à distribuição de água potável para a população, principalmente àqueles que estão localizados em áreas irregulares ou estabelecidos recentemente e que utilizam ligações não oficiais, poços e cacimbas, levando a população à ingestão de água contaminada (PROSAMIM, 2004; PROSAMIM III – RIMA, 2012).

Dados obtidos pelo Programa Brasileiro de Monitorização de Doenças Diarréicas Agudas (MDDA, 2015) demonstram um grande número de casos de diarreia na cidade, principalmente nos períodos de cheia do Rio Negro em alguns anos (Figura 1.2).

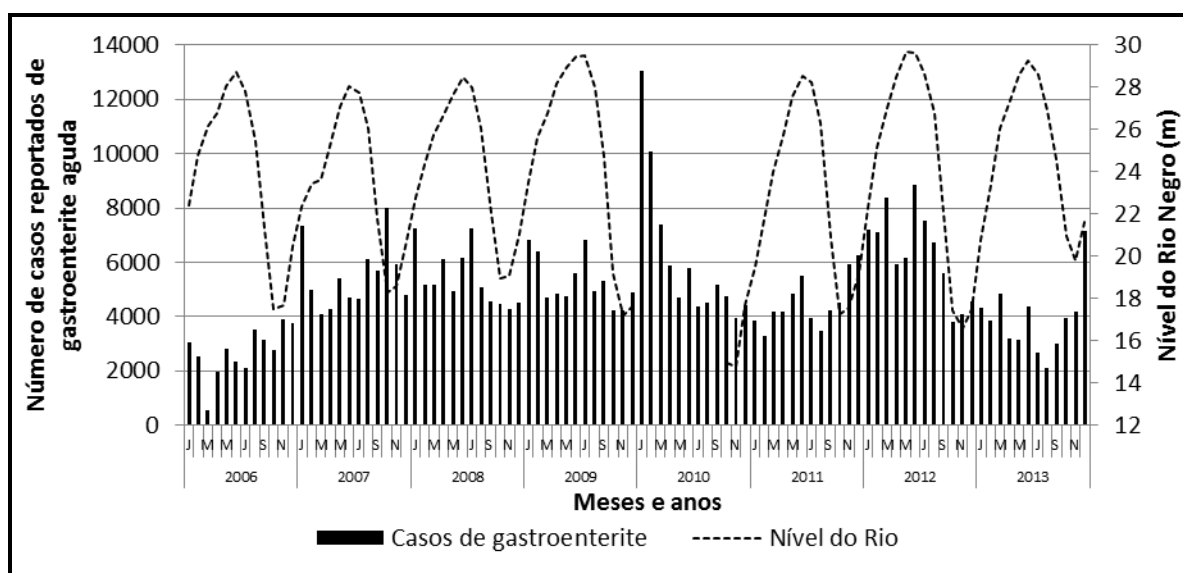


Figura 1.2. Número de casos notificados de gastroenterite e nível do Rio Negro em Manaus durante um período de oito anos, 2006-2013. Dados do nível do rio de 2010 não estavam disponíveis para todos os meses. Programa Brasileiro de Monitorização de Doenças Diarréicas Agudas (MDDA, 2015); Porto de Manaus (2015).

1.2. Vírus gastroentéricos humanos em ambientes aquáticos

Embora os vírus transmitidos por veiculação hídrica sejam responsáveis por diferentes doenças, a GA é a mais comumente relatada (Gibson, 2014). Essa enfermidade é a principal causa de morte em crianças em todo o mundo, perdendo apenas para pneumonia e mortes neonatais. Em 2013, a diarreia foi responsável pelo óbito de 578.000 (448.000-750.000) crianças de até cinco anos em todo o mundo (Liu et al., 2015).

Responsáveis por surtos e casos esporádicos de GA, vírus com genoma RNA como os NoV, os rotavírus grupo A (RVA) e os AstV e vírus com genoma DNA como os HAdV entéricos 40 e 41 vêm sendo detectados em amostras ambientais e estão relacionados a casos esporádicos e surtos de diarreia transmitidos pelo contato com água contaminada (Hejkal et al., 1982; Villena et al., 2003; Smith et al., 2006; Sinclair et al., 2009; Mellou et al., 2014).

Enquanto RVA, NoV, AstV e HAdV entéricos são responsáveis pela maior parte dos casos, aproximadamente 40 % dos episódios e 24 % dos óbitos por GA em todo o mundo são de etiologia desconhecida (Holtz et al., 2009; Lanata et al., 2013). A utilização de metodologias moleculares para detecção e caracterização de patógenos virais tem proporcionado a maior detecção e também a descrição de diferentes agentes associados a quadros de GA, como norovírus genogrupo IV (NoV GIV), sapovírus (SaV), klassevírus (KV), bocavírus (BoV) e aichivírus (AiV). A circulação destes agentes vem sendo comprovada por estudos de detecção em amostras de esgotos e águas contaminadas por esgoto em diferentes regiões (Hamza et al., 2009b; Kitajima et al., 2009, 2011a, 2011b; Sano et al., 2011; Calgua et al., 2013a; Haramoto & Otagiri, 2013; Lodder et al., 2013).

1.2.1. Rotavírus grupo A (RVA)

Os RV pertencem a família *Reoviridae*, subfamília *Sedoreovirinae*, gênero *Rotavirus*, e são os principais agentes etiológicos associados a óbitos de crianças com idade inferior a cinco anos por diarreia em países desenvolvidos e em desenvolvimento (Desselberger, 2014). São estimados 197.000 óbitos associados a estes patógenos, com 23 crianças perecendo a cada hora (Lanata et al., 2013).

A partícula viral não envelopada mede aproximadamente 70 nm de diâmetro e possui simetria icosaédrica (Figura 1.3). O vírion possui três camadas protéicas: externa, interna e core. A camada externa é composta pelas proteínas VP4 e VP7, a interna pela proteína VP6 e o core pelas proteínas VP1, VP2 e VP3, onde também se encontra seu genoma composto de 11 segmentos de RNA fita dupla (RNAfd) (Greenberg & Estes, 2009; Desselberger, 2014).

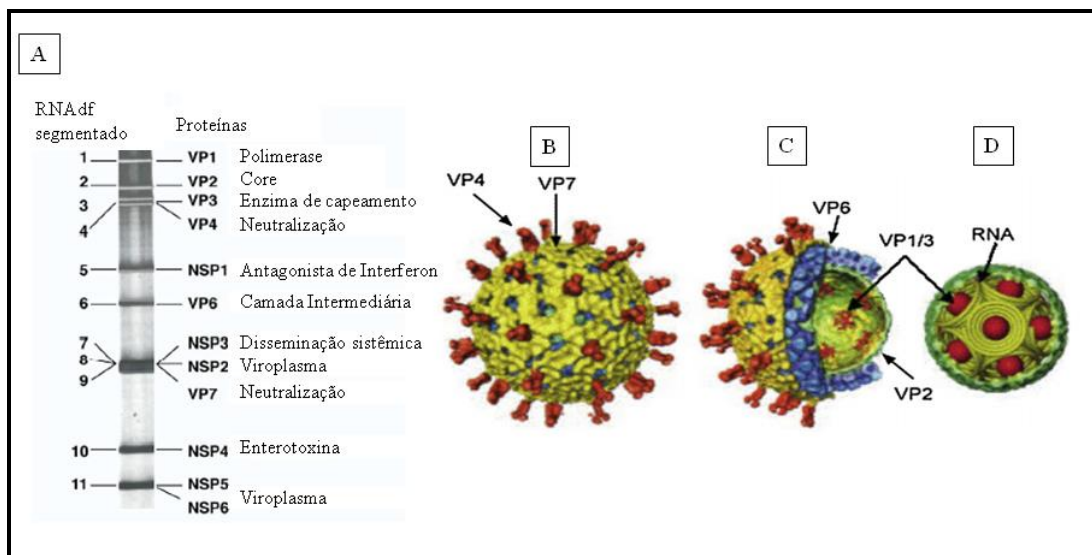


Figura 1.3. Aspectos estruturais e genômicos dos rotavírus grupo A (RVA). A – Eletroforese em Gel de Poliacrilamida (EGPA) demonstrando seus 11 segmentos de RNAdf numerados à esquerda e as proteínas codificadas por eles à direita. B – Reconstrução da camada tripla por criomicroscopia eletrônica. As espículas de VP4 estão representadas em laranja e a proteína VP7 em amarelo. C – Vista em corte da tripla camada demonstrando a camada de VP6 interna em azul e camada de VP2 em verde com as enzimas de transcrição em vermelho ancoradas no seu interior. D – Representação esquemática da organização do genoma com os segmentos representados como espirais cônicas invertidas em torno das enzimas de transcrição (mostradas como bolas vermelhas) no interior da camada de VP2 em verde. (A) Adaptado de Greenberg & Estes, 2009; (B – D) Adaptado de Desselberger, 2014.

Os RV são divididos em oito grupos ou espécies (A-H), com base nas propriedades antigênicas ou, mais recentemente, nas sequências de nucleotídeos da proteína VP6 (ICTV, 2015). Os grupos A, B e C têm sido encontrados tanto em humanos quanto em animais e os grupos D-G identificados somente em animais (Matthijnssens et al., 2012). O RVH foi descrito associado a infecções em adultos e um RV semelhante detectado em suínos (Wakuda et al., 2011; Matthijnssens et al., 2012). Os RVA são os RV mais importantes epidemiologicamente, por serem os principais responsáveis por casos de GA em crianças em todo o mundo (Desselberger, 2014).

A classificação binária dos RVA pelas proteínas VP4 e VP7 em sorotipos e genótipos representados pelas letras P (sensibilidade à protease) e G (glicoproteína), respectivamente, é a mais comumente utilizada. Para G tipo, os sorotipos e genótipos são correspondentes (por

exemplo, G1, G2, etc), enquanto para o P há mais genótipos que sorotipos estabelecidos em função de não haver soros e anticorpos monoclonais (mABs) para a tipagem. Assim, uma nomenclatura dupla foi introduzida: P1A[8] representa sorotipo 1A e genótipo 8 (Coulson et al., 1996; Estes & Greenberg, 2013; Desselberger, 2014).

Matthijnssens e colaboradores (2008, 2011) propuseram um novo sistema de classificação para os RVA tendo como base as relações filogenéticas de todos os seus segmentos gênicos. Por este sistema, diferentes genótipos são descritos para cada um dos segmentos segundo valores de *cut-off* específicos de identidade nucleotídica e também é possível avaliar completamente a diversidade genética, eventos de *reassortments*, genes que influenciam a restrição ou não a hospedeiros, replicação e virulência, além da dinâmica e as relações evolutivas dos RVA co-circulantes na população.

Até o momento, foram descritos 27 G tipos, 37 genótipos P e 27 sorotipos P (Estes & Greenberg, 2013; Desselberger, 2014) e, apesar de mais de 40 combinações G-P já terem sido descritas, estudos de epidemiologia molecular têm demonstrado que, globalmente, a grande maioria dos RVA associados à doença diarréica tem as combinações G1P[8], G2P[4], G3P[8], G4P[8], ou G9P[8], sendo o G1P[8] o mais prevalente. Em função de ano e lugar, os tipos G e P podem variar e os genótipos descritos como não-usuais G1P[4], G1P[6], G2P[6], G3P[6], G2P[8], G9P[4], G12P[6] e G12P[8] têm sido encontrados em diferentes regiões (OMS, 2011a).

Desde que os RV foram descritos como importantes patógenos entéricos em crianças, cientistas e médicos uniram esforços para desenvolver uma vacina para este agente. Atualmente, duas vacinas atenuadas estão licenciadas e vem sendo utilizadas em 77 países: a monovalente G1P[8] Rotarix[®] (GlaxoSmithKline Biologicals) licenciada em 2005 e a pentavalente G1, G2, G3, G4 e P[8] RotaTeq[®] (Merck & Co.) em 2006. A introdução destas vacinas reduziu significativamente o número de visitas médicas, hospitalizações e mortalidade infantis associadas aos RVA, apesar de ensaios clínicos indicarem que as vacinas são menos eficazes em alguns países de baixa renda (Desselberger, 2014; PATH, 2015).

O Brasil introduziu a Rotarix[®] no seu Programa Nacional de Imunização (PNI) em março de 2006 e foram observadas reduções na detecção de RVA de 38 % em 2005 para 24 % em 2007 (Carvalho-Costa et al., 2009). Em estudo de revisão sobre o impacto da vacinação de RVA no Brasil, Linhares & Justino (2014) demonstraram reduções de 48 e 54 % nas hospitalizações e óbitos entre crianças com idade inferior a um ano, respectivamente. As combinações mais frequentemente encontradas em períodos pré-vacinais foram G1P[8]/G1P[não tipado (NT)]

(43%), G9P[8]/G9P[NT] (20 %), G2P[4]/G2P[NT] (9 %) e observou-se a reemergência do G2P[4] no período pós-vacinal, provavelmente refletindo oscilações naturais de genótipos de RVA (Leite et al., 2008; Carvalho-Costa et al., 2011; Linhares & Justino, 2014).

A presença destes vírus em ecossistemas aquáticos é um grande problema de saúde pública devido ao seu impacto sobre as crianças, baixa dose infecciosa, persistência e elevadas taxas de excreção. Estima-se uma emissão global de 2×10^{18} partículas virais/quadrante de 0,5 grau latitude \times 0,5 grau de longitude/ano, dos quais 87 % são emitidas pela população urbana (Kiulia et al., 2015).

Os RVA vêm sendo detectados em ambientes aquáticos, inclusive no Brasil, e diferentes casos de veiculação hídrica foram relatados em vários países (Rutjes et al., 2009; Prado et al., 2011; Calgua et al., 2013a; Fumian et al., 2013; Kluge et al., 2014; Mellou et al., 2014; Ming et al., 2014).

1.2.2. Calicivírus (CV)

Os CV pertencem à família *Caliciviridae*, que compreende os gêneros *Norovirus*, *Lagovirus*, *Nebovirus*, *Sapovirus* e *Vesivirus* (Clarke et al., 2012). Esse grupo compreende vírus RNA fita simples (RNAs), polaridade positiva, não-envelopados, de simetria icosaédrica, de 40 nm de diâmetro (Figura 1.4).

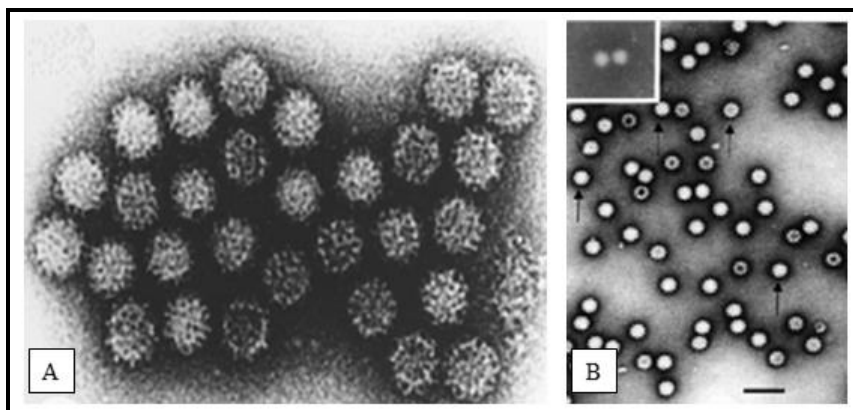


Figura 1.4. Morfologia dos calicivírus (CV). A – Partículas de vírus Norwalk em filtrado de fezes visualizado por micrografia eletrônica. B – Microscopia eletrônica de VLP de sapovírus (SaV). Barra 100 nm. (A) Green et al., 2000; (B) Hansman et al., 2007.

O gênero *Norovirus* está dividido em cinco genogrupos (GI, GII, GGIII, GIV e GV), sendo os genogrupos I, II e IV responsáveis por infecções em humanos (Clarke et al., 2012). Um sexto genogrupo (GVI) está reconhecido e ainda não incluído na classificação do Comitê Internacional de Taxonomia Viral (ICTV, do inglês *International Committee on Taxonomy of Viruses*) (Green, 2013) e um possível sétimo genogrupo (GVII) está sendo sugerido por Tse e colaboradores (2012). Os G são ainda constituídos de genótipos (GG) (Figura 1.5), sendo o NoV GII genótipo 4 (GII.4) o predominantemente detectado globalmente (Green, 2013; Vinjé, 2015).

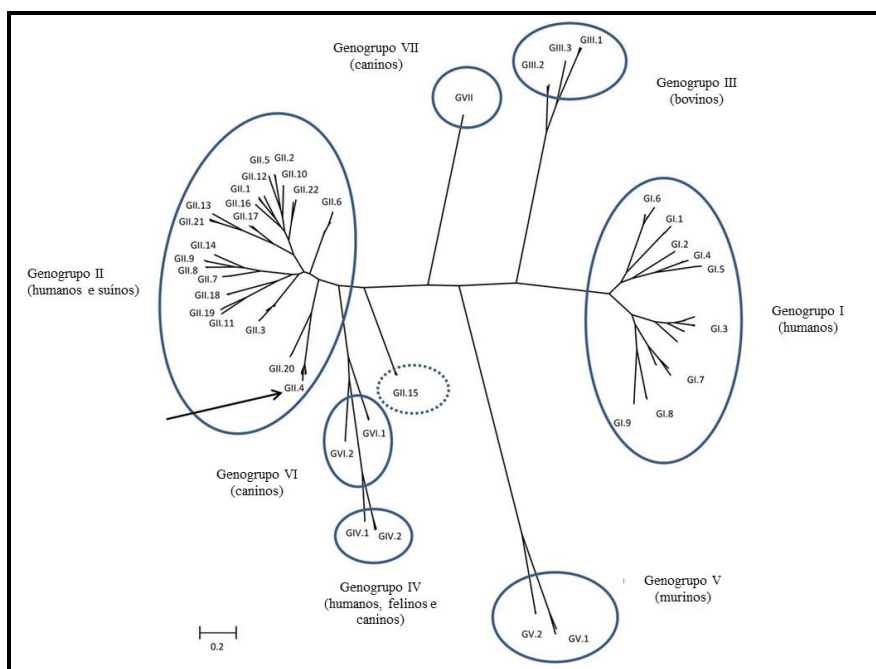


Figura 1.5. Classificação dos norovírus (NoV) em sete possíveis genogrupos (GI - GVII) e seus genótipos com base na sequência de aminoácidos da proteína VP1 do capsídeo viral. A seta indica o genótipo GII.4. Adaptado de Vinjé, 2015.

Os NoV são a principal causa de surtos de GA em todo o mundo. Estima-se que eles sejam responsáveis por pelo menos 95 % dos surtos de gastroenterite não bacteriana e 50 % de todos os surtos de gastroenterite mundialmente (Karst, 2010). Estes vírus são também importantes em casos esporádicos em todos os grupos etários, sendo responsáveis por 12 % dos casos de GA esporádica em crianças menores de cinco anos e 12 % dos casos de diarreia leve e moderada em indivíduos de todas as faixas etárias. Estima-se que, a cada ano, os NoV causem 64.000 episódios de diarreia que requerem hospitalização e 900.000 consultas clínicas de crianças nos países desenvolvidos e até 200.000 mortes de crianças menores de cinco anos nos países em

desenvolvimento, onde mais de 95 % dos óbitos por diarreia ocorrem (Patel et al., 2008). Depois da introdução da vacinação para RV, a causa predominante de hospitalizações de crianças apresentando quadros de GA está associada a infecções por estes vírus (Koo et al., 2013; Payne et al., 2013; Bucardo et al., 2014).

Vários fatores contribuem para a natureza explosiva de surtos de GA associados aos NoV, incluindo a alta infecciosidade, a persistência no ambiente, excreção prolongada por indivíduos sintomáticos e assintomáticos e ausência de imunidade duradoura (Sinclair et al., 2009; Karst, 2010; Pringle et al., 2015).

No Brasil, estudos epidemiológicos vêm demonstrando a importância deste patógeno em casos de GA, especialmente os NoV GII (Fioretti et al., 2011, 2014), assim como estudos de virologia ambiental vêm demonstrando a sua disseminação em diferentes ecossistemas aquáticos (Victoria et al., 2010; Moresco et al., 2012; Vieira et al., 2012; Fumian et al., 2013; Keller et al., 2013).

Os NoV GIV causam infecções em cães, felinos e humanos e estão divididos em dois genótipos, GIV.1 e GIV.2, sendo o primeiro associado a infecções em humanos. Poucos trabalhos têm sido publicados e demonstram uma baixa prevalência desses NoV em casos de gastroenterite (Vinjé & Koopmans, 2000; Bon et al., 2005; Eden et al., 2012; Muscillo et al., 2013; Ao et al., 2014). Entretanto, a detecção dos NoV GIV em amostras ambientais, especialmente em efluentes, indica que eles são frequentes em seres humanos (La Rosa et al., 2008; Kitajima et al., 2011b; Muscillo et al., 2013; Han et al., 2014). Além disso, estudos indicaram prevalência de anticorpos anti GIV.1 em até 44 % de amostras humanas analisadas na Itália (Di Martino et al., 2014). Pelo nosso conhecimento, não há relatos de casos de GA associados ao NoV GIV no Brasil, assim como dados de sua prevalência em amostras ambientais.

Os SaV (Figura 1.4) pertencem ao gênero *Sapovirus*, que compreende cinco genogrupos (GI-GV) divididos em 16 genótipos (GI.1-GI.7, GII.1-GII.7, GIV e GV). Os GI, GII, GIV e GV causam infecção em humanos, enquanto GIII infecta suínos (Hansman et al., 2007; Oka et al., 2012). Esses vírus causam surtos e casos esporádicos de GA em crianças e adultos, com prevalência variando em cada país e cenário e provavelmente afetadas pelas técnicas de detecção utilizadas. Entretanto, uma série de trabalhos demonstra que as taxas de detecção de SaV são geralmente muito menores que as dos NoV (Hansman et al., 2007; Borrows & Turner, 2014; Chhabra et al., 2014; Wang et al., 2014; Osborne et al., 2015; Thongprachum et al., 2015). No Brasil, em trabalho realizado por Xavier e colaboradores (2009), os SaV foram detectados em

menos de 1 % das amostras de fezes de crianças com quadro de GA. A pesquisa de SaVs em amostras ambientais tem sido em grande parte ofuscada pela dos NoVs, apesar de trabalhos demonstrarem a sua prevalência em diferentes ambientes aquáticos (Kitajima et al., 2011b; Sano et al., 2011; Murray et al., 2013).

1.2.3. Astrovírus humanos (HAstV)

Os AstV são importantes patógenos associados a quadros diarreicos na infância, sendo responsáveis por cerca de 15.000 óbitos associados a gastroenterites virais em crianças com idade inferior a cinco anos (Lanata et al., 2013). São vírus de RNAs, polaridade positiva, não envelopados, de simetria icosaédrica, de 28-41 nm de diâmetro e são assim denominados em função da forma de estrela (do grego *astron*) que possuem ao serem observados em microscopia eletrônica (Bosch et al., 2014). Pertencem a família *Astroviridae*, que compreende os gêneros *Mamastrovirus* e *Avastrovirus*, infectando mamíferos, inclusive humanos (HAstV), e aves, respectivamente. Três grupos divergentes de HAstVs estão reconhecidos atualmente: o HAstV clássico (MAstV 1), que apresenta oito sorotipos genótipo-correspondentes (HAstV 1-8) subdivididos em linhagens e é o mais prevalente nos casos de GA infantil, o HAstV-MLB (MAstV 6), que compreende três genótipos (MLB1-MLB3), e o HAstV-VA/HMO (MAstV 8 e MAstV 9), que apresenta quatro genótipos (VA1-VA4). Estes dois últimos HAstV foram descritos a partir de 2008 e diferenças antigênicas ainda precisam ser investigadas (Bosch et al., 2014).

Sua prevalência no ambiente varia de acordo com o local e tipo de água, podendo chegar a 45 % em amostras de esgoto (Pusch et al., 2005; He et al., 2012; Victoria et al., 2014b; Prevost et al., 2015). HAstV MLB foram identificados em amostras ambientais do Uruguai (Lizasoain et al., 2015). No Brasil, a prevalência de HAstV em amostras clínicas de crianças com quadros de GA varia de 0 a 9,2 % de acordo com a região. O HAstV-1 é o genótipo mais encontrado, apesar de outros genótipos, inclusive o MLB1, serem detectados (Ferreira et al., 2012; Raboni et al., 2014; Amaral et al., 2015; Xavier et al., 2015). Estudos têm demonstrado a presença desses vírus em amostras de esgoto do país, porém também em menor prevalência que os demais vírus entéricos (Guimarães et al., 2008; Miagostovich et al., 2008; Fumian et al., 2013).

1.2.4. Adenovírus humanos 40 e 41 (HAdV 40 e 41)

Os HAdV pertencem a família *Adenoviridae*, gênero *Mastadenovirus*, e estão descritos 68 tipos divididos em sete espécies (A – G) (Ghebremedhin, 2014). As infecções por AdV variam de acordo com suas espécies, sendo os HAdV F, tipos 40 e 41, associadas a casos de GA em diferentes partes do mundo. Outras espécies como A, C e D também tem sido associadas a estes casos (Berk, 2013; Chhabra et al., 2013, 2014; Moyo et al., 2014; La Rosa et al., 2015; Thongprachum et al., 2015). Estima-se que os HAdV sejam responsáveis por 22.000 óbitos de crianças com idade inferior a cinco anos por quadros de GA (Lanata et al., 2013).

No Brasil, diferentes tipos de HAdV vêm sendo detectados em amostras de crianças hospitalizadas com GA, sendo os HAdV 40 e 41 com prevalências superiores a 40 % nessas amostras (Filho et al., 2007; de Freitas et al., 2010; Amaral et al., 2015). Os HAdV 40 e 41 também têm sido detectados em amostras ambientais no Brasil e no mundo, apesar de nenhum surto de GA de veiculação hídrica ter sido reportado como associado a estes vírus (Sinclair et al., 2009; Prado et al., 2011; Fumian et al., 2013; Kluge et al., 2014).

1.2.5. Klassevírus (KV)

Os KV (de *Kobu-Like virus Associated with Stool and Sewage*) foram identificados por Holtz e colaboradores (2009) em amostras de fezes coletadas de pacientes com diarreia aguda na Austrália e nos Estados Unidos da América (EUA) e esgoto de Barcelona e são os novos membros da família *Picornaviridae*, uma família altamente diversificada que contém vírus pequenos, não envelopados e de genoma RNAs de polaridade positiva.

Desde sua descrição, os KV foram detectados na Coreia do Sul, China e EUA, sendo associados à gastroenterite em crianças (Greninger et al., 2009; Han et al., 2010; Shan et al., 2010). A sua detecção em amostras de rio do Japão e do Rio de Janeiro e esgoto dos EUA, Japão e Coreia do Sul também demonstram a sua prevalência em diferentes regiões do mundo (Calgua et al., 2013a; Haramoto & Otagiri, 2013; Haramoto et al., 2013; Han et al., 2014; Kitajima et al., 2014).

1.2.6. Bocavírus humanos (HBoV)

Os HBoV pertencem a família *Parvoviridae*, subfamília *Parvovirinae* e gênero *Bocavirus*. São vírus DNA fita simples (DNAfs), não envelopados, de simetria icosaédrica e de aproximadamente 25 nm de diâmetro. Foram descritos por Allander e colaboradores (2005) a partir de amostras de trato respiratório (HBoV1) e, em 2009-2010, este gênero foi ampliado com a inclusão de três novas espécies, HBoV2 (subdividida em estirpes A e B), HBoV3 e HBoV4, encontradas em amostras fecais provenientes de quadros gastroentéricos (Arthur et al., 2009; Kapoor et al., 2009, 2010). Apesar de associado a infecções respiratórias, o HBoV1 também foi detectado em amostras de fezes, embora a associação com a diarreia pareça mais fraca que com sintomas respiratórios. Cepas de HBoV1 mostram um grau muito baixo de variabilidade genética e são as mais prevalentes em todo o mundo (Kapoor et al., 2010).

HBoV tem sido detectado em quadros gastroentéricos como único agente etiológico ou em co-infecções em diferentes regiões, como Irã, Brasil, Chile e Japão (Khamrin et al., 2012; Levican et al., 2013; Romani et al., 2013; Campos et al., 2015), enquanto, em amostras ambientais, os mesmos foram detectados em águas de rio da Alemanha (Hamza et al., 2009b) e esgoto nos EUA (Blinkova et al., 2009).

1.2.7. Aichivírus (AiV)

Os AiV pertencem a família *Picornaviridae*, gênero *Kobuvirus*, e inclui três espécies, Aichivirus A, B e C. As espécies A consistem em quatro membros geneticamente distintos e com diferentes hospedeiros: AiV-1 (humanos), kobuvirus canino 1, kobuvirus felino e kobuvirus murino 1. Os AiV B e C apresentam três e um membros, respectivamente, e infectam somente animais (<http://www.picornaviridae.com/kobuvirus/kobuvirus.htm>).

Os AiV-1 são vírus pequenos (30 nm de diâmetro), esféricos, não envelopados e possuem RNAfs de polaridade positiva, de aproximadamente 8,3 quilobases (kb) de comprimento (Reuter et al., 2011). Estes vírus estão associados a casos de GA e são frequentemente detectados em diversos tipos de amostras ambientais, tais como esgoto, água de rio, águas subterrâneas e moluscos, sugerindo que é um agente patogênico emergente associado à contaminação do ambiente e potencialmente apresenta água e alimentos como vias de transmissão (Kitajima & Gerba, 2015). No Brasil, os AiV foram detectados em 0,8 % de amostras clínicas de crianças com

quadro de GA (Santos et al., 2015). Entretanto, não há relatos da sua detecção em amostras ambientais no país.

1.3. Qualidade microbiológica da água e legislação

O monitoramento microbiológico da qualidade da água vem sendo baseado em indicadores bacterianos, como coliformes termotolerantes, *Escherichia coli* (*E. coli*) e enterococos. Entretanto, a utilização destes indicadores apresenta limitações, uma vez que as bactérias são mais sensíveis à inativação, aos processos de tratamento e à luz solar quando comparadas a outros patógenos, têm a capacidade de se multiplicar em alguns ambientes e uma baixa correlação com a presença de outros agentes patogênicos, como os vírus. Assim, surtos de doenças virais de veiculação hídrica têm sido descritos quando as águas estão consideradas adequadas segundo os indicadores bacteriológicos (Hejkal et al., 1982; Pina et al., 1998; Sinclair et al., 2009; Bofill-Mas et al., 2013; Hewitt et al., 2013). Além disso, essas bactérias apresentam origem fecal não exclusiva, sendo improdutivas na identificação das fontes de contaminação e na determinação do real risco a saúde pública pelo contato com esses ambientes (Bofill-Mas et al., 2013).

No Brasil, a qualidade microbiológica das águas está regulamentada pelas legislações CONAMA 274 e 357, que define sobre os critérios de balneabilidade em águas brasileiras e que dispõe sobre a classificação dos corpos d'água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, respectivamente, e pela Portaria 2914, que dispõe sobre a qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade (Brasil, 2000, 2005, 2011). Estas normas incluem as bactérias como microrganismos indicadores. Entretanto, a Portaria 2914, publicada em dezembro de 2011, revogando a Portaria 518 de 2004 (Brasil, 2004), estabelece a pesquisa de vírus em situações de surtos de veiculação hídrica e recomenda a inclusão do monitoramento de vírus entéricos no ponto de captação de água proveniente de manancial superficial de abastecimento, com o objetivo de subsidiar estudos de avaliação de risco microbiológico.

1.4. Aspectos da Virologia Ambiental

1.4.1. Concentração e detecção de vírus em ambientes aquáticos

A detecção de vírus em matrizes ambientais é um desafio devido à grande variedade e complexidade das amostras, à distribuição heterogênea e a baixa concentração viral nestas matrizes e, principalmente, pela presença de compostos que podem inibir ou interferir nas metodologias de detecção empregadas. Para a investigação desses microrganismos nas águas, a detecção viral por diferentes protocolos está associada e precedida por métodos de concentração viral (Rodríguez-Lázaro et al., 2012).

As metodologias de concentração precisam ser tecnicamente fáceis de serem realizadas em período curto de tempo, apresentar altas taxas de recuperação viral, concentrar diferentes tipos virais, gerar um volume pequeno de concentrado, não ter custo elevado, ser capaz de processar grandes volumes de água (de acordo com a necessidade) e serem reprodutíveis. Uma grande variedade de metodologias para a concentração viral a partir da água tem sido descrita, entretanto nenhuma delas apresenta todas estas características (Wyn-Jones, 2007).

Estes métodos se baseiam nas propriedades físico-químicas e morfológicas das partículas virais, como carga iônica, tamanho e densidade. A partir destas características, técnicas baseadas na adsorção-eluição, ultrafiltração e ultracentrifugação vêm sendo desenvolvidas, respectivamente (Wyn-Jones, 2007; Bosch et al., 2008). As técnicas mais utilizadas são as de adsorção-eluição com filtros ou colunas de lã de vidro, membranas carregadas positiva ou negativamente e floculação (Katayama et al., 2002; Haramoto et al., 2005; Calgua et al., 2008; Lambertini et al., 2008; Albiñana-Gimenez et al., 2009).

Diferentes metodologias de detecção viral podem ser empregadas a partir dos concentrados de água, como cultura de células, métodos imunoenzimáticos e moleculares (Figura 1.6). Entretanto, muitos agentes virais não podem ser detectados pelos métodos convencionais de cultura celular (como os NoV) ou são fastidiosos (como os HAdV e RVA) e os ensaios de infecciosidade em cultura de células são laboriosos, demorados e caros. Além disso, métodos imunoenzimáticos apresentam baixa sensibilidade e especificidade e a NASBA não apresenta tanta especificidade quanto métodos de amplificação genômica pela polimerase (PCR). Por esta razão, PCR, qPCR e multiplex PCR têm se tornado o caminho mais rápido, específico e sensível na análise de vírus no ambiente (Rutjes et al., 2006; Girones et al., 2010; Hamza et al., 2011). No

entanto, o significado da detecção de cópias genômicas ainda permanece controverso, uma vez que a razão partículas infecciosas/cópias de genoma é altamente variável em amostras ambientais (Bosch et al., 2008). Além disso, os métodos moleculares podem sofrer inibições a partir de compostos presentes nas águas, sendo necessárias diferentes abordagens para reduzir essa inibição, como diluição do ácido nucléico extraído e remoção de inibidores por diferentes compostos, assim como a utilização de controles internos de reação (Hamza et al., 2011). O sequenciamento do genoma tem sido rotineiramente utilizado para confirmação e caracterização molecular dos vírus detectados (Fongaro et al., 2013; Ngaosuwanukul et al., 2013; Ogorzaly et al., 2015), assim como estudos de metagenômica têm ajudado na descrição da comunidade viral de amostras de esgoto (Cantalupo et al., 2011; Aw et al., 2014).

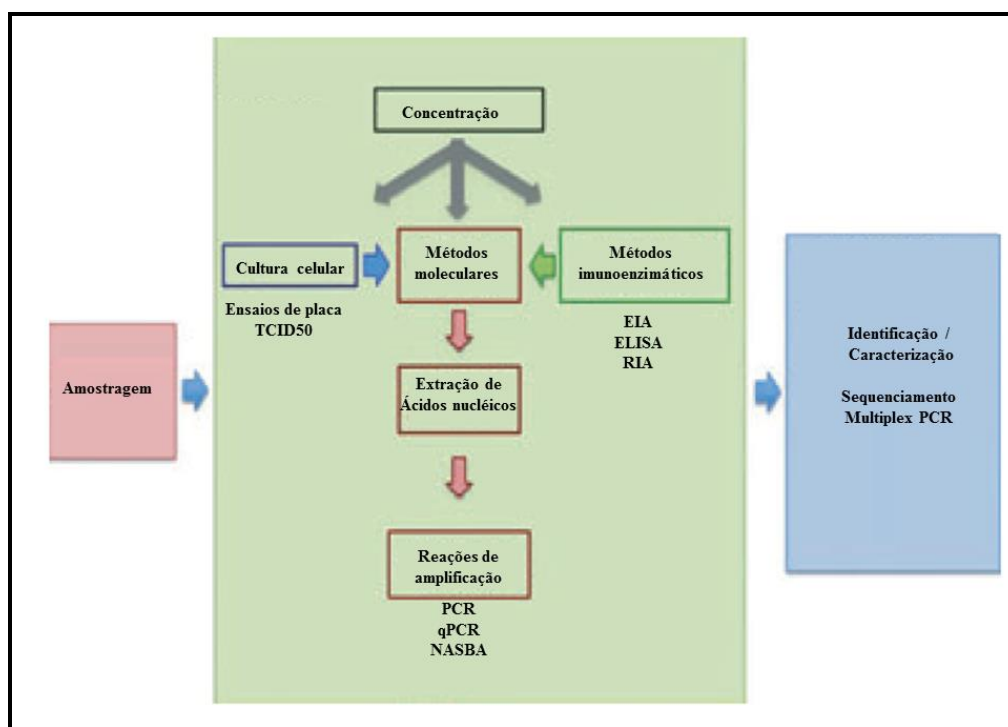


Figura 1.6. Diagrama esquemático do processo de detecção viral em ambientes aquáticos.

EIA – Ensaio Imunoenzimático (do inglês *Immunoenzymatic Assay*); RIA – Radioimunoensaio (do inglês *Radioimmunoassay*); ELISA – Ensaio Imunoenzimático (do inglês *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*); NASBA – Reação de amplificação baseada na sequência de ácido nucléico (do inglês *Nucleic Acid Sequence–Based Amplification*); TCID50 – Dose infecciosa para 50 % da cultura de tecidos (do inglês *Median Tissue Culture Infective Dose Assay*); PCR – Reação em Cadeia pela Polimerase; qPCR – Reação em Cadeia pela Polimerase quantitativa. Adaptado de Rodríguez-Lázaro et al., 2012.

1.4.2. Rastreamento microbiológico de fontes de contaminação (do inglês *Microbial Source Tracking* [MST])

Conforme mencionado, os recursos hídricos estão suscetíveis à contaminação fecal de origem humana e/ou animal e, para atenuar ou eliminar esta contaminação, é importante que o reconhecimento das fontes de poluição seja rápido e que estas sejam corretamente identificadas. Conhecido como *Microbial Source Tracking* (MST), o rastreamento microbiológico de fontes de contaminação do ambiente aquático inclui uma série de metodologias, sendo necessário para estratégias de gestão e custo eficazes para minimizar a contaminação fecal em bacias hidrográficas, para o estabelecimento de valores limite e para a avaliação de risco como parte dos planos de segurança da água (Roslev & Bukh, 2011; Wong et al., 2012a).

Vários métodos microbiológicos, genotípicos e fenotípicos, têm sido propostos para caracterizar microrganismos e, baseando-se nas diferenças dentro desses grupos, identifica-se o hospedeiro ou o ambiente a partir do qual eles se originaram. Estes métodos vêm sendo utilizados para superar a limitação imposta pela incapacidade dos indicadores bacteriológicos indicarem as reais fontes de contaminação dos corpos hídricos e devem apresentar especificidade e sensibilidade (Scott et al., 2002; Stoeckel & Harwood, 2007).

As metodologias de MST podem ser classificadas em dois métodos: métodos dependentes (LD, do inglês *library dependent*) e independentes de biblioteca (LI, do inglês *library independent*). O método LD exige o desenvolvimento de uma biblioteca ou base de dados de atributos fenotípicos e genotípicos de isolados bacterianos obtidos a partir de fontes fecais conhecidas. Os achados bacterianos ambientais são, então, comparados a esta biblioteca para identificar as prováveis fontes de contaminação do ambiente em estudo (Harwood et al., 2003; Stoeckel et al., 2004; Stoeckel & Harwood, 2007). Exemplos das metodologias empregadas incluem análise de resistência a antibióticos e eletroforese de campo pulsado (Casarez et al., 2007). Estes métodos fornecem corretas classificações, entretanto requerem centenas de isolados de vários ambientes aquáticos diferentes, podem ser sensíveis a variabilidade temporal, espacial e geográfica das fontes e dependem de tempo e de recursos para serem realizados (Choi et al., 2003; Casarez et al., 2007).

Os métodos LI não exigem o cultivo de um microrganismo alvo e o desenvolvimento de uma biblioteca. Eles apresentam uma abordagem genotípica pela amplificação de genes marcadores específicos de um determinado microrganismo (Field & Samadpour, 2007). A

vantagem destes métodos é que eles são mais rápidos, sensíveis e evitam as limitações dos cultivos aplicados nos métodos LD.

Uma série de microrganismos vem sendo propostos como promissoras ferramentas independentes de biblioteca para MST, incluindo bacteróides, bifidobactéria, enterococos, DNA mitocondrial, colifagos F+ e vírus entéricos (Scott et al., 2002; Noble et al., 2003; Scott et al., 2005; Hundesa et al., 2006; Schill & Mathes, 2008; Hundesa et al., 2009; Wolf et al., 2010). Apesar de todos estes marcadores apresentarem desvantagens, a maior vantagem de se utilizar vírus entéricos é que estes são facilmente distinguidos baseando-se nas diferenças nas sequências dos genes comuns a diferentes espécies do mesmo gênero. Por exemplo, os genes do hexon e da fibra dos adenovírus vêm sendo utilizados para a detecção de diferentes espécies destes (Wong et al., 2012a).

Além disso, a especificidade de hospedeiro, a alta prevalência em esgotos em diferentes áreas geográficas ao longo do ano e a ausência de replicação no ambiente apontam os vírus como importantes ferramentas de MST em amostras ambientais (Fong & Lipp, 2005; Hundesa et al., 2006; Bofill-Mas et al., 2013). Em um estudo de comparação de métodos de MST por diferentes laboratórios, quando amostras cegas foram inoculadas com mistura de materiais fecais de seres humanos, cães, aves, bois e esgoto, os métodos independentes de biblioteca baseados em vírus apresentaram as menores taxas de falsos positivos (0-8 %), confirmando a sua capacidade de diferenciar entre fontes fecais de origem humana e animal (Noble et al., 2003).

Entretanto, em função da não correlação entre vírus e indicadores bacterianos e da baixa concentração viral em alguns recursos hídricos, recomenda-se a utilização de diferentes metodologias de MST e microrganismos para melhor confiabilidade na identificação das fontes de poluição fecal nos recursos hídricos (Roslev & Bukh, 2011; Wong et al., 2012a).

Na última década, HAdV e JCPyV, ambos vírus com genoma DNA, vêm sendo descritos como potenciais indicadores de contaminação fecal de origem humana (Bofill-Mas et al., 2006; Hewitt et al., 2013; Rusiñol et al., 2014). Os HAdV apresentam tropismo variando de acordo com a espécie e estão associados a casos assintomáticos e diferentes enfermidades, como GA, conjuntivite, doenças respiratórias e cistite. Todas as espécies de HAdV, com exceção da E, têm o sistema gastrointestinal como um dos sítios de infecção. Esses vírus são, então, excretados pelas fezes por semanas após a infecção e independentemente do sítio primário desta (Harrach et al., 2012; Berk, 2013). Os HAdV têm sido detectados em águas de consumo e destinadas a atividades recreacionais, sendo responsáveis por casos de faringites e conjuntivites de veiculação

hídrica (Haramoto et al., 2007; Mena & Gerba, 2009; Sinclair et al., 2009; Calgua et al., 2013a; Kluge et al., 2014).

Os JCPyV pertencem a família *Polyomaviridae*, gênero *Polyomavirus*, e compreendem sete genótipos. Rim e medula óssea são locais de infecção latente por JCPyV, que é excretado na urina de indivíduos saudáveis, e sua patogenicidade está associada a Leucoencefalopatia Multifocal Progressiva (LMP) em indivíduos imunocomprometidos, uma doença desmielinizante frequentemente fatal do sistema nervoso central (SNC) e para a qual não existem atualmente tratamento eficaz (Pavesi, 2005; DeCaprio et al., 2013). Estudos vêm demonstrando a detecção de JCPyV na urina, fezes e saliva, entretanto ainda não se sabe que via dirige a infecção (Bialasiewicz et al., 2009; Feltkamp et al., 2013; Robaina et al., 2013).

Diferentes protocolos moleculares para a detecção de vírus espécie-específicos de origem animal, incluindo parvovírus aviários (Carratalà et al., 2012), adenovírus, enterovírus e poliomavírus bovinos (Hundesda et al., 2006, 2010; Wong & Xagorarakí, 2010, 2011) e adenovírus e poliomavírus ovinos (Wolf et al., 2010; Rusiñol et al., 2013) e suínos (Hundesda et al., 2006, 2009; Wolf et al., 2010), também têm sido descritos e utilizados como ferramentas para avaliação de suas prevalências em esgotos de abatedouros, fezes, urina e ecossistemas aquáticos. Em geral, as infecções por estes vírus não causam problemas graves na saúde animal, resultando geralmente em quadros assintomáticos. No entanto, são excretados em grandes quantidades nas fezes ou urina de animais infectados (Wong et al., 2012a). O poliomavírus bovino (BPyV) e o adenovírus suíno (PAdV) têm mostrado resultados mais promissores, em função da sua ampla disseminação em diferentes países (Hundesda et al., 2006, 2009, 2010; Wong et al., 2012a; Bofill-Mas et al., 2013).

1.4.3. Análise de Risco

A prevenção da transmissão de doenças infecciosas pela exposição à água contaminada permanece como uma das principais tarefas dos profissionais de saúde pública e ambiental e pode ser realizada pela associação de estudos de análise de risco que estimam o perigo e identificam os indivíduos vulneráveis, as implicações a saúde, os lugares e as vias de exposição a medidas de gestão eficazes (Haas et al., 1999; Mena, 2007).

O processo de análise de risco compreende três etapas: avaliação de risco, gestão do risco e comunicação do risco (Figura 1.7) (Haas et al., 1999; USEPA, 2014).



Figura 1.7. Estrutura da Análise de Risco. Adaptado de Fazil, 2005; USEPA, 2014.

1.4.3.1. Avaliação de Risco

A avaliação de risco é definida como a caracterização quali ou quantitativa da estimativa de potenciais efeitos adversos à saúde associada à exposição a um perigo (materiais, situações, agentes químicos, físicos ou microbiológicos) (Haas et al., 1999). Conseqüentemente, a Avaliação Quantitativa de Risco Microbiológico (do inglês *Quantitative Microbial Risk Assessment* – QMRA) é a aplicação do princípio da avaliação de risco para estimar as conseqüências de uma exposição a microrganismos patogênicos, incluindo os vírus.

O primeiro passo na avaliação de risco é determinar o âmbito do trabalho a ser realizado, ou seja, definir o problema a ser estudado (pergunta) e o modelo conceitual a ser aplicado. Isto é realizado a partir de um estudo aprofundado de toda a área de interesse, englobando área de estudo, patógeno e população exposta.

O QMRA compreende quatro etapas: identificação do perigo, avaliação da exposição, dose-resposta (DR) e caracterização do risco (Haas et al., 1999; USEPA, 2014).

A identificação de perigo é um dos passos iniciais do QMRA e é estabelecido após a formulação do problema. Esta etapa compreende um levantamento de todas as informações disponíveis sobre o agente microbiano e as conseqüências para o hospedeiro, incluindo

infeciosidade, patogenicidade, virulência, diversidade genética, epidemiologia, manifestações clínicas, transmissão, metodologias de detecção, imunidade e susceptibilidade do hospedeiro, entre outras (Haas et al., 1999; USEPA, 2014).

A avaliação da exposição, em nível mais simples, é a dose do agente patogênico que um indivíduo entra em contato pela via de exposição e este número alimenta os modelos DR para estimar a probabilidade de infecção. No entanto, este é um processo muito complexo e envolve uma combinação de fatores utilizados para estimar as concentrações dos patógenos pela via de exposição (Haas et al., 1999; USEPA, 2014). Para exposição pela água, estes fatores incluem a natureza da exposição (recreação, consumo, aerossóis, dentre outras), duração, frequência e volume de água ingerido na exposição, resistência e inativação do microrganismo na água, concentração estimada pelo método de detecção, variações temporais, percentual de microrganismos infecciosos, recuperação do método e eficiência do tratamento empregado (Haas et al., 1999; Heerden et al., 2005; Mena, 2007; Schets et al., 2011; de Man et al., 2014b).

A DR é um elemento essencial no QMRA, uma vez que indica a relação entre a concentração do microrganismo na exposição e a probabilidade de ocorrência de algum efeito adverso à saúde, por exemplo, infecção, doença ou morte (Mena, 2007; Haas, 2015). Os modelos DR são funções matemáticas que consideram como argumentos a medida da dose e determinam a probabilidade do seu efeito a saúde, que pode variar de 0 a 1 (Haas et al., 1999). Os modelos DR mais adotados são o exponencial e o beta-poisson. O exponencial é o modelo mais simples e assume que a distribuição dos microrganismos entre as doses é randômica, que um microrganismo pode causar a infecção e que cada um deles tem probabilidade de resistência idêntica e independente (assume uma constância na probabilidade de resistência viral devido à interação patógeno-hospedeiro). O modelo beta-poisson assume que a distribuição dos organismos entre as doses é randômica e que um microrganismo pode causar a infecção, mas considera a interação patógeno-hospedeiro heterogênea (Haas et al., 1999; Fazil, 2005). Modelos DR para vírus entéricos incluem os estabelecidos para HAdV, RVA e NoV (Couch et al., 1966; Ward et al., 1986; Messner et al., 2014).

A partir da infecção, a gravidade dos danos à saúde pode variar, como morbidade e mortalidade, e pode ser estimada multiplicando a probabilidade de infecção pelas probabilidades de morbidade e morte. Adicionalmente, probabilidades anuais de infecção também podem ser estimadas (Mena, 2007).

A caracterização do risco é a etapa final na avaliação de risco e é o passo do processo no qual se contextualiza todas as informações geradas na identificação do perigo, avaliação da exposição e DR para produzir uma imagem completa do risco avaliado e responder à pergunta estabelecida (Mena, 2007). Essa etapa varia de simplesmente conectar uma dose em uma função DR para obter um único "ponto estimado" de risco (Risco Determinístico) até estimativas mais sofisticadas que levam em consideração a incerteza nos parâmetros adotados no modelo e a variabilidade entre os indivíduos e as subpopulações (Risco Estocástico). O modelo estocástico incorpora probabilidades em nível individual (para análise de incertezas dos parâmetros incluídos no modelo conceitual) e que são avaliadas por um processo iterativo, que é a análise de variabilidade pela sobreposição dos modelos de incerteza de cada parâmetro por simulações de Monte Carlo e suas iterações (por exemplo, uma pessoa suscetível A tem uma probabilidade de entrar em contato com a pessoa B, que tem uma probabilidade de ser infecciosa) (USEPA, 2014; Gurian, 2015).

1.4.3.2. Gestão do risco

A gestão do risco sintetiza as informações de avaliação de risco em alguma forma de ação a fim de controlá-lo. O objetivo do gerenciamento de risco não é de chegar ao "risco zero", mas sim escolher e implantar ações sólidas, integradas e econômicas que reduzam ou previnam riscos, levando em consideração aspectos sociais, culturais, éticos, políticos e jurídicos, avaliando os resultados e, se necessário, selecionando e implantando opções de controle adequadas, incluindo medidas regulamentares (Fazil, 2005).

1.4.3.3. Comunicação do risco

A comunicação do risco troca informações entre avaliadores e gestores dos riscos e das partes interessadas, incluindo gestores, empresas e público em geral. Uma vez que o objetivo principal da análise de risco é informar a gestão de riscos e de processos de tomada de decisão, é importante que todos compreendam a questão específica de preocupação (Fazil, 2005).

2. RELEVÂNCIA DO ESTUDO

Os ambientes aquáticos contaminados representam um risco para os seres humanos pelo uso direto e/ou pela captação para produção de água potável, pelas atividades de recreação ou pelo consumo de moluscos bivalves criados nessas águas. Entretanto, a natureza da contaminação e os mecanismos que controlam a dinâmica dos microrganismos no ambiente, tais como condições climáticas e hidrológicas, podem variar consideravelmente de acordo com o local (Hipsey & Brookes, 2013). Assim, existe a necessidade de se compreender as variáveis que influenciam o destino e a distribuição de patógenos, em especial os vírus, em ambientes aquáticos a fim de se estimar e mitigar os riscos em áreas específicas.

Embora as evidências de estudos epidemiológicos e relatórios de surtos de veiculação hídrica demonstrem uma relação entre os efeitos adversos à saúde e a imersão em água de má qualidade, as dificuldades associadas à atribuição de uma infecção por contato com a água são numerosas. Informações sobre os efeitos da contaminação fecal da água na saúde humana podem ser obtidas a partir de avaliação de risco microbiológico, que prevê as taxas de infecção ou doença a partir de concentrações de agentes patogênicos específicos, assumindo taxas de ingestão e modelos apropriados de dose-resposta para a população exposta (Haas et al., 1999).

A contaminação de ecossistemas aquáticos pode ser observada em diferentes cidades do Brasil devido principalmente a inadequação dos serviços de saneamento básico (SNIS, 2014), representando um risco para a saúde da população. Entretanto, em cidades situadas em densas bacias hidrográficas, como Manaus, as condições precárias de saneamento afetam principalmente as populações ribeirinhas que vivem em palafitas e que estão expostas ao contato direto com estas águas contaminadas.

Em Manaus, apesar das intervenções na infraestrutura da cidade realizadas pelo PROSAMIM, ainda é notável a contaminação da bacia do Rio Negro, em particular das microbacias do São Raimundo e Educandos, que compreendem grande parte da área urbana da cidade (PROSAMIM, 2004, 2011; PROSAMIM III – RIMA, 2012). Esta estrutura, em associação ao ciclo hidrológico do Rio Negro caracterizado por cheias onde se registra uma elevação anual média de 15 m em seu nível (Porto de Manaus, 2015), origina inúmeros problemas no âmbito da saúde pública local.

Neste contexto, este estudo pioneiro utilizando os vírus como marcadores de contaminação ambiental fornece dados sobre as fontes de contaminação microbiológica da bacia

do Rio Negro e avalia o risco virológico quantitativo de infecções por vírus associados a quadros de GA. Adicionalmente, os dados gerados ampliam o conhecimento sobre a epidemiologia molecular dos patógenos virais que circulam na população, assim como podem auxiliar a gestão de recursos hídricos na cidade.

3. OBJETIVOS

Objetivo Geral

- Caracterizar as fontes microbiológicas de contaminação fecal de origem humana e animal por marcadores virais espécie-específicos na bacia hidrográfica do Rio Negro, Manaus, Amazonas (AM), e estimar o risco de infecções pelos principais vírus associados a gastroenterite aguda por diferentes vias de exposição da população local.

Objetivos específicos

- Avaliar metodologias de floculação orgânica para concentração viral e de detecção e quantificação molecular de vírus de origem humana e animal.
- Rastrear as fontes de contaminação do Rio Negro e dos igarapés da cidade de Manaus pelo monitoramento de vírus de origem humana (HAdV e JCPyV) e animal (PAdV e BPyV) no período de janeiro de 2011 a maio de 2012.
- Determinar a concentração dos principais vírus associados a gastroenterite aguda (RVA e NoV GII) neste período.
- Investigar a influência do ciclo hidrológico do Rio Negro na disseminação dos vírus detectados.
- Determinar a qualidade microbiológica por parâmetros bacteriológicos (*E. coli* e enterococos) e avaliar os vírus como indicadores de contaminação nesses ambientes.
- Mensurar os parâmetros físico-químicos, tais como temperatura, pH, turbidez e condutividade.
- Estimar o risco de infecção por RVA pelo contato por atividades recreacionais e contato mão-boca nas áreas de exposição.
- Caracterizar os ecossistemas aquáticos estudados durante a cheia histórica do Rio Negro em junho de 2012 utilizando parâmetros físico-químicos e microbiológicos, incluindo marcador viral (HAdV) e vírus gastroentéricos clássicos (RVA, NoV GII e HAstV) e emergentes (NoV GIV, SaV, KV, HBoV e AiV).

4. MATERIAL E MÉTODOS

As atividades deste estudo foram desenvolvidas em três etapas: a) avaliação de metodologias de concentração, detecção e quantificação viral, b) monitoramento de vírus de origem humana e animal no Rio Negro e nos igarapés da cidade de Manaus/AM e avaliação de risco de infecção pelo RVA pelo contato com estes ambientes e c) avaliação pontual da qualidade da água destes ecossistemas durante a cheia histórica do Rio Negro, incluindo a pesquisa de vírus emergentes (Figura 4.1).

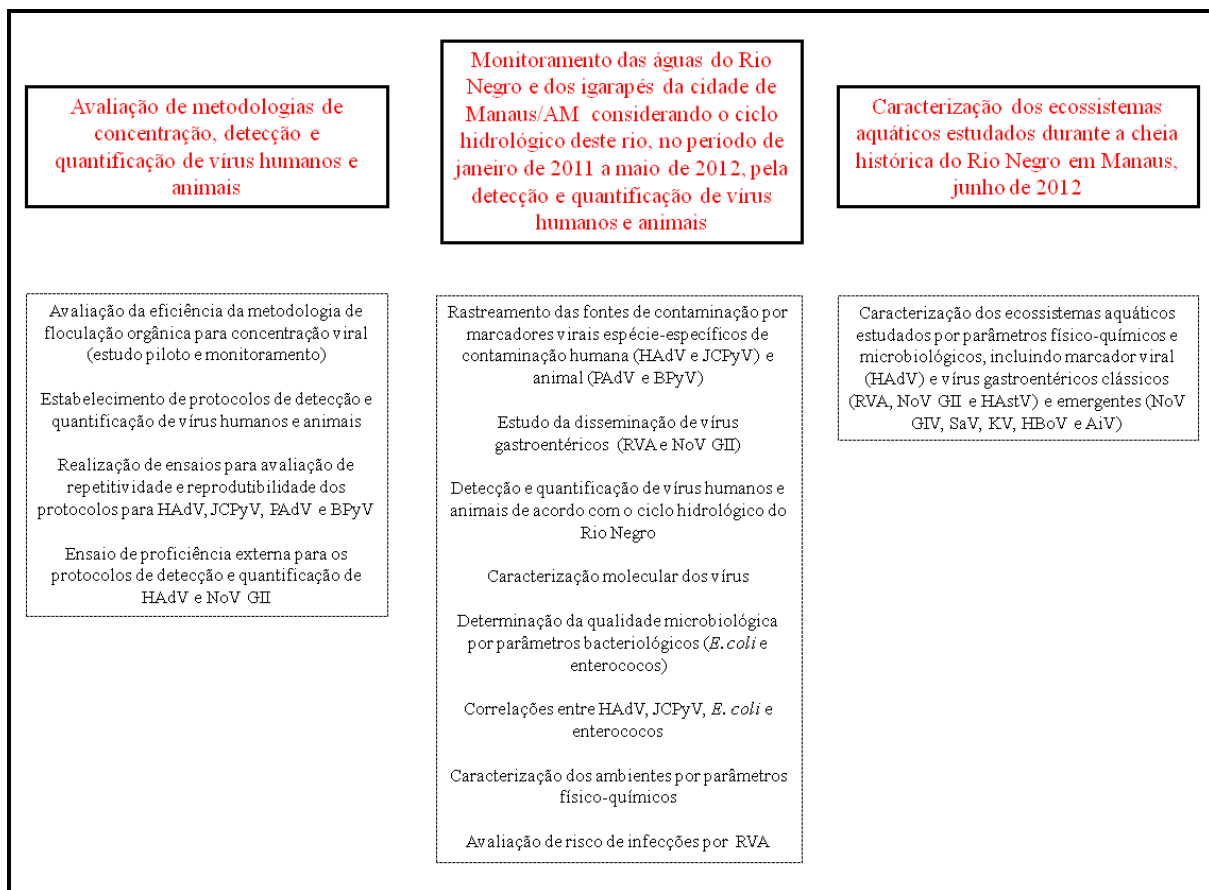


Figura 4.1. Estratégia de estudo desenvolvida nesta tese.

4.1. Área de Estudo

Localizada no coração da floresta amazônica, a cidade de Manaus tem uma área de 11.458,5 km², correspondendo a 0,73 % do território do estado do Amazonas. A cidade de 2.020.301 habitantes (IBGE, 2015) está localizada a 1.450 km da costa atlântica e é rodeada por

uma densa rede hidrográfica, constituída por quatro bacias principais, todas contribuintes da grande bacia do Rio Negro: São Raimundo e Educandos, integralmente inseridas na área urbana de Manaus, e Tarumã-Açú e Puraquequara, que compreendem áreas rurais e urbanas da cidade (Projeto GEO Cidades, 2002).

A bacia do Rio Negro representa 12 % da bacia Amazônica com uma área de 691.000 km². Este rio apresenta 2.250 km de comprimento e vazão de 28.000 m³/s (Frappart et al., 2005; Villar et al., 2009). Devido às chuvas sazonais na bacia Amazônica, o ciclo hidrológico da bacia do Rio Negro é caracterizado por duas estações distintas: o período seco (setembro a fevereiro) e o período de inundação (março a agosto). Geralmente, seus picos anuais máximos e mínimos ocorrem em junho e outubro, respectivamente (Silva et al., 2009; Satyamurty et al., 2013). Este rio apresenta baixas concentrações de sedimentos e nutrientes e pH ácido devido às suas altas concentrações de substâncias húmicas (Silva et al., 2009). Em seu curso, ele carrega folhas, arbustos e troncos, que se decompõem e dissolvem, liberando ácidos e dando a água a coloração escura (negra) e as características típicas de rios localizados em florestas tropicais.

A bacia do São Raimundo compreende 16 bairros em uma área de 11.961,80 hectares (ha), estendendo-se da zona norte até a zona central da cidade e limita-se com o Rio Negro. Esta bacia abriga 603.212 habitantes, dos quais 111.541 estão em áreas ribeirinhas, muitos destes vivendo em palafitas. Deste total, 27.827 habitantes, correspondendo a 6.000 famílias, residem abaixo da cota de 30 m, estando sujeitos anualmente às moléstias causadas pela cheia do Rio Negro (PROSAMIM III – RIMA, 2012).

A bacia do Educandos, que tem como principal tributário o igarapé do Quarenta, tem uma área de 44,87 km², compreendendo 17 bairros no sudeste de Manaus, incluindo 80 % do Distrito Industrial (PROSAMIM, 2004).

A bacia hidrográfica do Tarumã-Açu compreende uma área de 133.756,40 ha. Os rios Negro e Tarumã recebem os efluentes provenientes das edificações do bairro de Ponta Negra, um bairro de classe média-alta de Manaus onde está localizado o balneário de Ponta Negra (Projeto GEO cidades, 2002; Costa, 2011).

4.2. Amostragem

Cinco pontos de amostragem localizados na bacia do Rio Negro e georeferenciados por Sistema de Posicionamento Global (GPS - eTrex H, Garmin Ltda, Olathe, KS) foram estudados.

Estes foram distribuídos ao longo do Rio Negro (MA01 – Praia de Ponta Negra [área de recreação]; MA04 – Educandos; MA05 – Educandos no fim da área urbana de Manaus) e em igarapés que cortam a cidade de Manaus (MA02 – igarapé São Raimundo e MA03 – igarapé Quarenta/Educandos) (Figura 4.2).

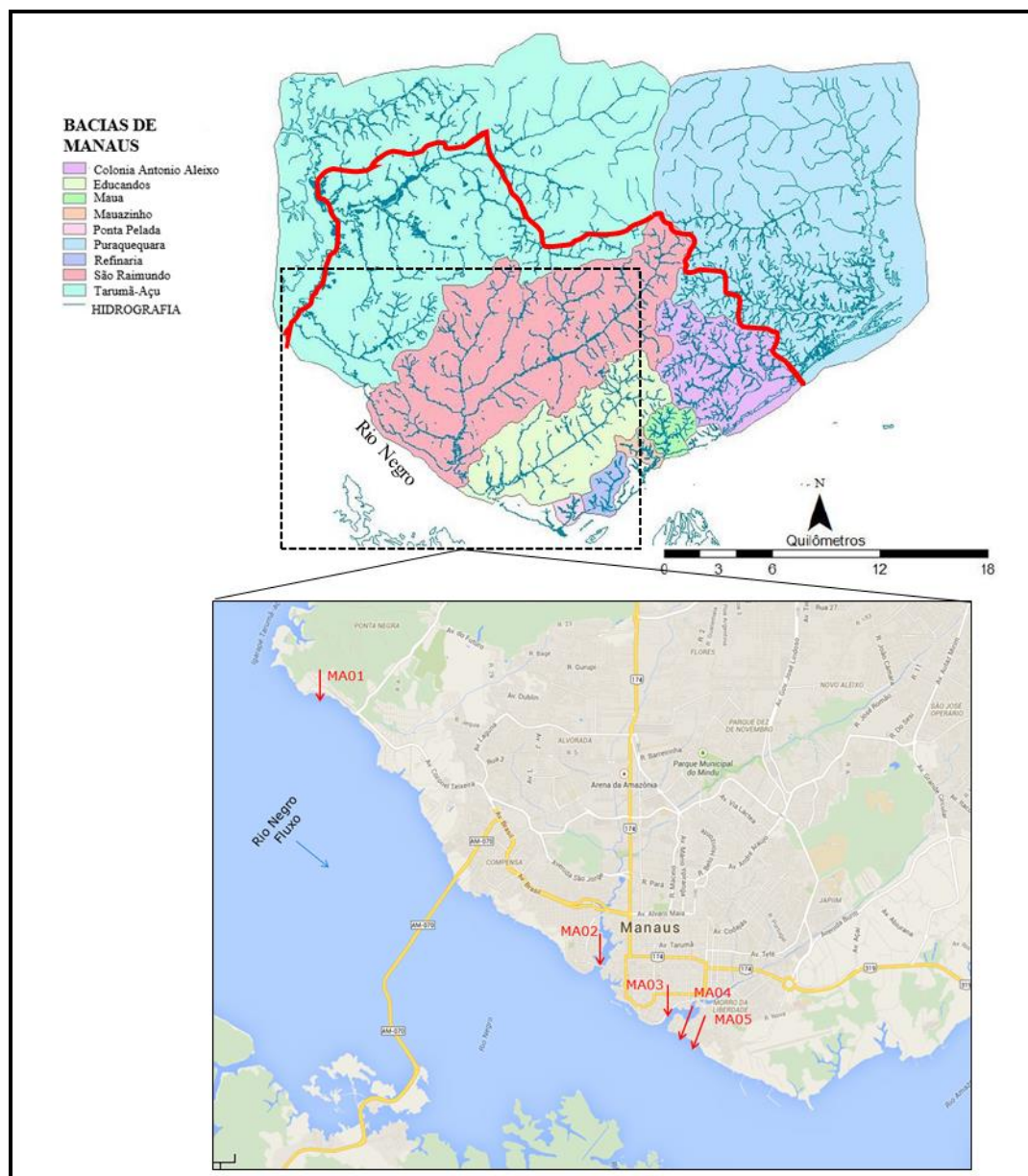


Figura 4.2. Mapa da área estudada e distribuição geográfica dos pontos de amostragem (MA01 a MA05). MA01 – Rio Negro/Praia de Ponta Negra (área de recreação); MA02 – igarapé São Raimundo; MA03 – igarapé Quarenta/Educandos; MA04 – Rio Negro/Educandos; MA05 – Rio Negro/Educandos no fim da área urbana de Manaus. Fontes: Google Maps; adaptado de Projeto GEO cidades, 2002 e Macena & Costa, 2012.

No estudo piloto, realizado em setembro de 2010, oito amostras foram coletadas nos pontos MA01, MA02 e MA03 para avaliar a eficiência da metodologia de recuperação viral.

Para o monitoramento, sete campanhas de coleta foram realizadas trimestralmente no período janeiro de 2011 a maio de 2012 em cada um dos cinco pontos nas diferentes estações do ciclo hidrológico do Rio Negro (Tabela 4.1). Para melhor representatividade, em cada ponto foram coletadas oito amostras de 10 L de água (uma a cada 15 min), totalizando 40 amostras por campanha. Estas foram coletadas em frascos estéreis, transferidas para o laboratório e imediatamente concentradas. A primeira amostra coletada em cada ponto teve volume de 20 L, dos quais 10 L foram utilizados nos experimentos de recuperação viral (A_R), descritos a seguir. Além disso, amostras adicionais de 500 mL foram obtidas em cada ponto de coleta para análise bacteriana.

Tabela 4.1. Cronograma das campanhas de coleta.

| Coleta | Mês/Ano | *Estação Pluviométrica | Ciclo Hidrológico do Rio Negro |
|---------------|----------------|-----------------------------------|-------------------------------------------|
| 1 | Janeiro/2011 | Início da Chuva | Seco |
| 2 | Abril/2011 | Chuvoso | Cheio |
| 3 | Julho/2011 | Início da Seca | Cheio |
| 4 | Outubro/2011 | Seco | Seco |
| 5 | Janeiro/2012 | Início da Chuva | Seco |
| 6 | Março/2012 | Chuvoso | Cheio |
| 7 | Mai/2012 | Chuvoso | Cheio |

*Marengo et al., 2013; Satyamurty et al., 2013

Em junho de 2012, devido a cheia histórica do Rio Negro, que atingiu um nível de 29,97 m, decidiu-se pela realização de uma campanha de coleta extra, a fim de se avaliar a disseminação viral neste evento extremo. As amostras foram coletadas no período de 11 a 15 de junho nos mesmos pontos e sob as condições estabelecidos no período de monitoramento.

4.3. Concentração viral

As amostras de água foram concentradas por metodologia descrita por Calgua e colaboradores (2013a), que se baseia na adsorção viral a proteínas pré-floculadas do leite desnatado (Figura 4.3).



Figura 4.3. Concentração viral por metodologia de floculação orgânica. Foto: Autor da tese.

Resumidamente, a condutividade foi medida e ajustada a 1,5 mS pela adição de sal marinho artificial (Sigma, Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Alemanha) e o pH a 3,5 pela adição de HCl 1 N. Cem mL de leite desnatado pré-floculado 1 % (p/v) pH 3,5 (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Alemanha) foram adicionados às amostras, que foram então submetidas a agitação suave por 8 hs à temperatura ambiente para a adsorção viral aos flocos. Os flocos sedimentaram por gravidade nas 8 hs seguintes e os sobrenadantes foram removidos sem movimentar o sedimento utilizando bomba peristáltica. Os volumes restantes de sedimento (aproximadamente 500 mL) foram centrifugados a 8.000 xg durante 30 min a 4 °C. Os sobrenadantes foram cuidadosamente removidos e os *pellets* re-dissolvidos a \approx 10 mL com tampão de fosfato (1:2 v/v Na_2HPO_4 0,2 M e NaH_2PO_4 0,2 M) pH 7,5. Os concentrados virais foram homogeneizados por agitação em vórtex e alíquotas de dois mL foram preparadas e armazenadas a -80 °C para posterior análise viral.

Esta etapa de concentração foi realizada no Instituto Leônidas e Maria Deane (ILMD) – FIOCRUZ Amazônia, Manaus, e as amostras foram enviadas para o Laboratório de Virologia Comparada e Ambiental (LVCA) em caixas UN3373 congeladas em gelo seco.

4.3.1. Avaliação da metodologia de floculação orgânica para concentração viral

Para a determinação da eficiência do método de concentração viral, no estudo piloto foram realizadas inoculações experimentais com concentrações conhecidas de HAdV e RVA em amostras representativas dos pontos de coleta. Suspensões padrões contendo 10^6 cópias de genoma (CG) de adenovírus humano 35 (HAdV 35) e suspensões fecais contendo 10^{10} CG de RVA G2P[4] foram inoculadas em cada uma das amostras (A_R) e processadas conforme as demais obtidas no estudo. Amostras extras (A_1) foram coletadas nos respectivos pontos para determinação da concentração endógena dos vírus em questão.

Adicionalmente, ensaios de recuperação (controles positivos) foram conduzidos em todas as coletas realizadas durante o monitoramento, quando 10^6 CG de HAdV 35 foram inoculadas no volume de 10 L da primeira amostra coletada (A_R), seguida da sua concentração sob as mesmas condições das demais amostras. Para a determinação da concentração endógena de HAdV, foi utilizada a outra porção de 10 L da amostra (A_1).

O percentual de recuperação foi calculado utilizando-se a seguinte fórmula:

$$\% \text{ Recuperação} = \frac{\text{N recuperado na } A_R}{N_{\text{inoculado}} + N_{A1}} \times 100$$

Onde, N recuperado na A_R = número de CG recuperadas nos 10 L da amostra inoculada; $N_{\text{inoculado}}$ = número de CG inoculadas nos 10 L de água; N_{A1} = número de CG obtidas na amostra de 10 L não inoculada.

Como controle negativo da etapa de concentração viral, amostras de 10 L de água de torneira contendo 100 mL de tiosulfato de sódio a 10 % foram processados em cada amostragem.

4.4. Extração do ácido nucléico e obtenção de DNA complementar (cDNA)

O ácido nucléico viral foi extraído pelo conjunto de reagentes comerciais *QIAamp Viral RNA Mini Kit* (Qiagen, Inc, Valencia, CA, EUA), de acordo com as instruções do fabricante. Para obtenção de cDNA, a reação de Transcrição Reversa (RT) foi realizada utilizando-se iniciador randômico (Invitrogen - Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA) (Anexo 1).

Para todos os procedimentos moleculares, controles positivos e água livre de DNase/RNase como controle negativo foram incluídos e quatro áreas distintas foram utilizadas para evitar-se contaminação.

4.5. Detecção, quantificação e caracterização viral

Foram realizados ensaios de qPCR utilizando o sistema *TaqMan*[®] para detecção e quantificação dos vírus de origem humana e animal. Os vírus humanos detectados foram submetidos a ensaios de caracterização molecular por PCR e sequenciamento nucleotídico.

4.5.1. Estabelecimento de curvas padrão para Reação em Cadeia pela Polimerase quantitativa (qPCR)

Os protocolos de qPCR para detecção e quantificação de HAdV, JCPyV, NoV GII, PAdV e BPyV foram estabelecidos nesta tese, enquanto os demais o foram por outros projetos desenvolvidos pelo nosso grupo no laboratório.

Para o estabelecimento das curvas padrão, bactérias transformadas com as respectivas construções plasmidiais (Tabela 4.2) e plaqueadas em meio LB sólido nos foram enviadas pela Universidade de Barcelona (UB, do catalão *Universitat de Barcelona*).

Tabela 4.2. Plasmídeos utilizados para obtenção de curva padrão.

| *Vírus | Plasmídeo (tamanho pb) | Inserto (tamanho pb) | Origem |
|---------------|-----------------------------------|---------------------------------|----------------------------------------------------|
| HAdV 41 | pBR 322 (4361) | Hexon (8986) | Annika Allard, UMU |
| JCPyV | pBR322 (4361) | Mad1 (5130) | Andrew Lewis, FDA |
| NoV GII | pBluescript II (2961) | Junção ORF1-ORF2 (3004) | Jan Vinjé, CDC |
| PAdV- 3 | pGEM-T Easy (3015) | Hexon (612) | Carlos Maluquer de Motes e Ayalkibet Hundesa UB |
| BPyV | pGEM-T Easy (3015) | VP-1 (416) | Ayalkibet Hundesa, UB |

*HAdV 41 – adenovírus humano 41; JCPyV – poliomavírus JC; NoV GII – norovírus genogrupo II; PAdV 3 - adenovírus suíno 3; BPyV – poliomavírus bovino; pb – pares de base; UMU – Universidade de Umea (do sueco *Umea Universitet*), Suécia; CDC – Centro para o Controle e Prevenção de Enfermidades (do inglês *Centers for Disease Control and Prevention*); FDA – Administração de Alimentos e Medicamentos (do inglês *Food and Drug Administration*); UB – Universidade de Barcelona (do catalão *Universitat de Barcelona*).

As colônias bacterianas foram transferidas para tubos contendo cinco mL de meio LB líquido suplementado com ampicilina 50 µg/mL e incubadas por 16 hs a agitação constante de 150 rotações por minuto (rpm) a 37 °C (Gyrotech Water Bath Shaker Modelo G75, New Brunswick, Scientific Edison, Nova Jersey, EUA). Em seguida, foi realizada a extração do DNA plasmidial a partir das culturas dos clones bacterianos utilizando-se o kit *Miniprep DNA Purification System*[®] (Promega Corporation, Madison, Winsconsin, EUA).

O plasmídeo recombinante foi quantificado em diferentes replicatas em fluorômetro Qubit[®] (Invitrogen - Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA) e a concentração encontrada em ng/µL foi transformada em número de CG/µL de acordo com a fórmula a seguir:

$$\text{Número de CG/}\mu\text{L} = \frac{\text{Concentração (g/}\mu\text{L)}}{(\text{Número de pares de base [pb] do plasmídeo recombinante}) \times 660} \times 6,022 \times 10^{23}$$

Onde: $6,022 \times 10^{23}$ = número de Avogadro; 660 = massa molecular aproximada de um par de bases (A-T ou G-C).

A partir do título obtido, foram realizadas diluições seriadas na base 10, a fim de se obter as concentrações de 10^7 a 10^{-1} CG/ μ L para a curva padrão do qPCR. Essas diluições foram aliqüotadas e armazenadas a -70 °C.

4.5.2. Protocolos de detecção e quantificação viral

Os protocolos de qPCR utilizados nesta tese para detecção e quantificação viral basearam-se em trabalhos previamente publicados (Tabela 4.3), sendo as condições de reação descritas no Anexo 2. HAdV, RVA e NoV GII foram pesquisados em todas as coletas, enquanto JCPyV, PAdV e BPyV só o foram no período de monitoramento. HAstV, NoV GIV, SaV, HBoV, KV e AiV foram investigados somente nas amostras referentes a coleta da cheia histórica de junho de 2012.

Tabela 4.3. Iniciadores, sondas, regiões genômicas e referências utilizadas para a detecção e quantificação de vírus de origem humana e animal.

| *Vírus | Iniciadores e sondas | Região genômica | Referências |
|---------|--------------------------------------------------------|----------------------------|-------------------------------------------|
| HAdV | AdF, AdR e AdP1 | Hexon | Hernroth et al., 2002 |
| JCPyV | JE3F, JE3R e JE3P | Inicial | Pal et al., 2006 |
| RVA | NSP3F, NSP3R e NSP3p | NSP3 | Zeng et al., 2008 |
| NoV GII | QNIF2d, COG2R e QNIFS | Capsídeo | Kageyama et al., 2003; Loisy et al., 2005 |
| HAstV | AstVF, AstVR e AstVP | Junção ORF1b-ORF2 | Dai et al., 2010 |
| NoV GIV | 4F, 4R e Ring 4 | Junção ORF1-ORF2 | Trujillo et al., 2006 |
| SaV | SaV124F, SaV1F, SaV5F, SaV1245R, SaV124TP e SaV5TP | Junção capsídeo-polimerase | Oka et al., 2006 |
| HBoV | HBoV1F, HBoV234F, HBoV1R, HBoV24R, HBoV3R e H1234probe | UTR- NS1 | Kantola et al., 2010 |
| KV | KLA F, KLA R e KLA P | 5' UTR | Haramoto et al., 2013 |
| AiV | AiV-AB-F, AiV-AB-R, AiV-AB-TP, AiV-A-TP e AiV-B-TP | Capsídeo | Kitajima et al., 2013 |
| PAdV | Q-PAdV-F, Q-PAdV-R e Q-PAdV-P | Hexon | Hundesda et al., 2009 |
| BPyV | QB-F1-1, QB-R1-1 e QB-P1-2 | VP1 | Hundesda et al., 2010 |

*HAdV – adenovírus humano; JCPyV – poliomavírus JC; RVA – rotavírus grupo A; NoV GII – norovírus genogrupo II; NoV GIV – norovírus genogrupo IV; HAstV – astrovírus humano; SaV – sapovírus; HBoV – bocavírus humano; KV – klassevírus; AiV – aichivírus; PAdV – adenovírus suíno; BPyV – poliomavírus bovino.

Os protocolos foram realizados com o conjunto de reagentes *TaqMan Environmental Master Mix*[®] (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA), com exceção dos NoV GII e SaV, os quais foram detectados com os kits *RNA UltrasenseTM One-step Quantitative RT-PCR* (Invitrogen - Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA) e *QuantiTec Probe PCR Kit* (Qiagen, Inc, Valencia, CA, EUA), respectivamente. As reações foram realizadas em plataforma *ABI PRISM 7500[®] Real-*

Time System (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). Todas as amostras foram testadas não diluídas e em diluições seriadas na base 10 e em duplicatas (4 corridas/amostra), sendo as concentrações calculadas como a média dos resultados obtidos e corrigindo para as diluições analisadas. Baixas variabilidades nas repetições foram observadas e uma variabilidade significativa foi observada apenas nos resultados de algumas amostras não diluídas (inibição), sendo estes valores excluídos da estimativa da média. Além disso, todos os ensaios incluíram *No template controls* (NTC) e controles positivos e negativos.

4.5.3. Ensaio para avaliação de repetitividade e reprodutibilidade dos protocolos de amplificação genômica quantitativa como ferramentas de rastreamento microbiológico de fontes de contaminação

Para avaliação da repetitividade e reprodutibilidade dos protocolos de qPCR para HAdV, JCPyV, PAdV e BPyV, foram realizados ensaios nos cinco laboratórios envolvidos no projeto *Viroclime*. Foram analisadas 10 suspensões de DNA dos respectivos vírus em duas concentrações diferentes. As suspensões foram enviadas pela UB congeladas e estocadas a 4 °C até o início do processamento. Médias e desvios padrões (σ) foram calculados para todos os vírus.

4.5.4. Ensaio de proficiência externa

Foi realizado um teste de proficiência externa dos protocolos de detecção e quantificação de HAdV e NoV GII pela organização internacional Controle de Qualidade para Diagnóstico Molecular (QCMD, do inglês *Quality Control for Molecular Diagnostics*), que enviou um painel de amostras referente a cada vírus. No total, 192 e 186 laboratórios participaram do QCMD para HAdV e NoV GII, respectivamente. Neste caso, as amostras foram processadas a partir da extração.

4.5.5. Caracterização molecular

Para os estudos de avaliação de risco, 40 e 50 % das amostras positivas para HAdV e RVA, respectivamente, obtidas nos pontos MA01, MA02 e MA03 durante o monitoramento foram selecionadas randomicamente por ferramenta do Excel (Microsoft Corporation[®],

Washington, EUA) para caracterização. Todos os vírus detectados durante a cheia histórica de 2012 foram caracterizados para estudos de diversidade genética.

Todas as amostras selecionadas foram submetidas a protocolos de PCR qualitativos com iniciadores específicos para as regiões de interesse para cada vírus (Tabela 4.4 e Anexo 3).

Tabela 4.4. Iniciadores utilizados na Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) para caracterização molecular de adenovírus humanos (HAdV), rotavírus grupo A (RVA) e norovírus genogrupo II (NoV GII).

| Vírus | Iniciadores | Região genômica | *Fragmento (pb) | Referência |
|-----------|--------------|------------------------------|-----------------|------------------------------------------------------------------------|
| HAdV | Hex 1 | Hexon | 301 | Allard et al., 2001 |
| | Hex 2 | | | |
| RVA | 9con1 | VP7 | 904 | Das et al., 1994; Gouvea et al., 1994; Fischer et al., 2000; OMS, 2009 |
| | 9con2 | | 158 | |
| | 9T1-1 (G1) | | 244 | |
| | 9T1-2 (G2) | | 466 | |
| | 9T1-3P (G3) | | 403 | |
| | 9T1-4 (G4) | | 110 | |
| | 9T-9B (G9) | | 742 | |
| | FT5 (G5) | | 876 | Gentsch et al., 1992; OMS, 2009 |
| | 4con2 | | 345 | |
| | 4con3 | | 483 | |
| | 1T1, 1T1-Wa, | | 267 | |
| | 1T1-VN P[8] | | 391 | |
| | 2T1 P[4] | | 583 | |
| | 3T1 P[6] | | 379 | |
| 4T1 P[9] | 379 | Iturriza-Gomara et al., 2002 | | |
| 5 T1 P[5] | 379 | | | |
| | VP6F | VP6 | 379 | Iturriza-Gomara et al., 2002 |
| | VP6R | | | |
| NoV GII | Mon 431 | Junção | 550 | Beuret et al., 2002; Kojima et al., 2002; Kageyama et al., 2003 |
| | Mon 432 | | | |
| | G2SKR | | | |
| | COG2R | | | |

*pb – pares de bases

4.5.5.1. Análise dos produtos obtidos na Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR)

Para análise dos *amplicons* obtidos para HAdV, RVA e NoV GII, 2 µL de corante azul de bromofenol (Invitrogen - Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA) foram adicionados a 10 µL de cada *amplicon* e os mesmos foram submetidos a eletroforese em gel de agarose (Invitrogen - Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA) a 1,5 % em tampão TBE 0,5 % (GIBCO-BRL[®]) por 1,5 h a 100 volts (V). O gel foi previamente impregnado com Brometo de etídeo (0,5 µg/mL) e os *amplicons* foram visualizados pelo sistema de imagem *Kodak Gel Logic 212* (©Eastman Kodak Company, Rochester, NY, EUA). Para identificar os pesos moleculares dos *amplicons*, foram utilizados marcadores de peso molecular de 50 e 100 pb (Invitrogen - Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA). As imagens obtidas após a eletroforese foram registradas em sistema de captura de imagem *Kodak Gel Logic 212* em combinação com o software *KODAK Molecular Imaging* (©Eastman Kodak Company, Rochester, NY, EUA).

As amostras positivas para RVA (VP4 e VP7) foram caracterizadas pelos tamanhos dos fragmentos amplificados, enquanto as positivas para HAdV, RVA (VP6) e NoV GII foram submetidas a protocolos de reação de sequenciamento para caracterização.

4.5.5.2. Sequenciamento nucleotídico para caracterização molecular

Os produtos da PCR de HAdV, RVA (VP6) e NoV GII foram purificados utilizando o conjunto de reagentes comerciais *QIAquick® PCR Purification Kit* ou *QIAquick® Gel Extraction Kit* (Qiagen, Inc, Valencia, CA, EUA). Após a purificação, os produtos foram quantificados em fluorômetro Qubit[®] (Invitrogen - Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA).

Para o sequenciamento dos produtos purificados, foram utilizados o kit comercial *Big Dye Terminator® v 3.1 Cycle Sequencing Kit* (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA), conforme as recomendações do fabricante, e os mesmos iniciadores de cadeia utilizados na reação de PCR para cada um dos vírus (Tabela 4.4.). As reações de sequência e os cromatogramas das sequências foram obtidos pelo sequenciador automático de 48 capilares *ABI Prism 3730 Genetic Analyzer* (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) do serviço da Plataforma de Sequenciamento de DNA PDTIS/FIOCRUZ.

As sequências nucleotídicas obtidas foram editadas no programa BioEdit® (Hall, 1999) e comparadas às sequências disponíveis na base de dados GenBank, utilizando o BLAST (Ferramenta Básica de Busca de Alinhamentos Locais, do inglês *Basic Local Alignment Search Tool*) (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

4.6. Parâmetros bacteriológicos

Os indicadores bacteriológicos *E. coli* e enterococos foram quantificados em todas as amostras coletadas utilizando-se os kits comerciais *Colilert*® e *Enterolert*® *Quanti-Tray*®/2000 (IDEXX Laboratories, Inc, Westbrook, ME, EUA), respectivamente, sob as recomendações do fabricante. Estes métodos se baseiam na emissão de fluorescência a partir da metabolização de nutrientes por estas bactérias.

As amostras foram testadas em diluições seriadas e os resultados expressos em Número Mais Provável por 100 mL (NMP/100 mL).

Segundo a legislação brasileira para águas destinadas a recreação de contato primário, CONAMA 274 (Brasil, 2000), quarto parágrafo, as amostras são consideradas próprias para esta atividade se apresentarem quantificações de até 2000 e 400 NMP/100 mL de *E. coli* e enterococos, respectivamente.

4.7. Parâmetros físico-químicos

Os parâmetros físico-químicos pH, turbidez (em Unidades Nefelométricas de Turbidez - UNT), condutividade ($\mu\text{S}/\text{cm}$) e temperatura ($^{\circ}\text{C}$) foram mensurados no momento da coleta em todas as amostras utilizando-se a sonda multiparâmetro *Water Quality Checker* (Horiba® U-10, Irvine, CA, EUA).

4.8. Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa *GraphPad Prism* versão 5.0. Os dados foram verificados para normalidade em concentrações exponenciais e \log_{10} utilizando o teste de normalidade de Shapiro-Wilk. Ambos mostraram significância estatística para normalidade ($p < 0,0001$). Testes de Fischer e Mann-Whitney foram realizados para

comparar a detecção e concentração virais, respectivamente, nos períodos de seca e de cheia do ciclo hidrológico do Rio Negro. Para comparar as concentrações, só foram consideradas as amostras positivas.

O teste de Mann-Whitney também foi utilizado para comparar os dados dos parâmetros físico-químicos e as concentrações virais na cheia histórica do Rio Negro às obtidas em outros períodos de seca e cheia.

Análises de correlação entre HAdV, JCPyV, *E. coli* e enterococos foram realizadas utilizando a correlação não-paramétrica de *Spearman*. Para este, os valores não detectados para os vírus e as bactérias foram designados como os limites de detecção dos métodos: 57 CG/L de HAdV e JCPyV (1 CG por reação de qPCR) e 1 NMP/100 mL de *E. coli* e enterococos. Coeficientes de correlação (r) entre 0,9-1,0, 0,3-0,5 e $<0,3$ foram considerados como correlações fortes, baixas e não significativas entre os vírus e bactérias, respectivamente (Hewitt et al., 2013).

A correlação não-paramétrica de *Spearman* também foi utilizada para avaliar a correlação entre o nível do Rio Negro e o número de casos reportados de GA em 2011 e 2012. Os dados de nível do Rio Negro e de GA foram obtidos do Porto de Manaus (2015) e MDDA (2015), respectivamente.

Os resultados foram considerados estatisticamente significativos quando $p < 0,05$.

4.9. Avaliação de risco

O estudo de avaliação de risco foi conduzido durante estágio no Instituto Nacional para Saúde Pública e Ambiente (do inglês *National Institute for Public Health and the Environment* e do holandês *Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu - RIVM*), Bilthoven, Holanda, no período de maio a dezembro de 2014, sob orientação do Dr. Martijn Bouwknegt.

Uma abordagem estocástica foi utilizada para estimar as probabilidades ou riscos de infecções por RVA para evento individual de ingestão de água considerando duas vias de exposição (recreação e contato mão-boca) em três pontos estudados (MA01, MA02 e MA03).

O modelo conceitual deste estudo incluiu a estimativa da concentração viral na água, a atividade de exposição envolvida, a dose de partículas virais infecciosas ingeridas, o modelo dose-resposta e a caracterização do risco de infecção para crianças e adultos (Figura 4.4).

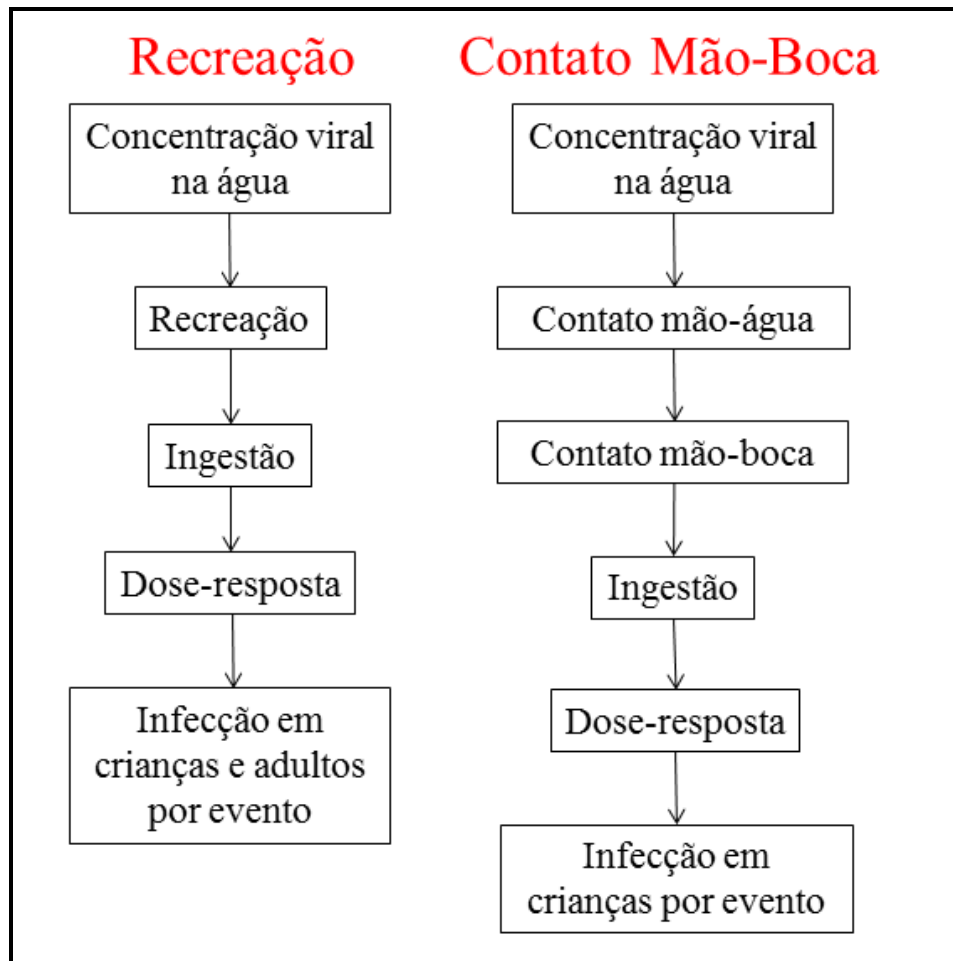


Figura 4.4. Modelos conceituais para a estimativa de risco de infecções por rotavírus grupo A (RVA) por contato recreacional e mão-boca com ambientes aquáticos de Manaus.

4.9.1. Concentração viral

Os vírus foram quantificados por qPCR em diluições seriadas e em duplicatas. Para estimar a distribuição de probabilidade destas concentrações, uma análise de incerteza em diferentes dimensões e escalas foi realizada considerando-se cada curva padrão e estas quatro medições de cada amostra. Para isso, foi estimada a incerteza de cada curva padrão utilizada no qPCR e, em seguida, esta incerteza foi incluída no cálculo dos parâmetros da distribuição gamma da concentração viral: uma regressão linear para cada curva padrão utilizada no qPCR foi realizada e o intervalo de confiança de 95 % para cada uma delas estimado, seguida da estimativa de máxima verossimilhança para ajuste e análise de incerteza do modelo. Os parâmetros da distribuição gamma (e sua incerteza) foram estimados utilizando o pacote JAGS contido no

programa R (Lucent Technologies), que utiliza uma abordagem bayesiana no processo de simulação denominada *Markov Chain Monte Carlo sampling* com 100.000 iterações. Para a composição das curvas de distribuição de probabilidade gamma foram consideradas todas as 56 amostras obtidas nos pontos de coleta.

Adicionalmente à concentração, a caracterização molecular das amostras positivas foi realizada para determinação dos genótipos virais circulantes e aos quais a população está exposta.

4.9.2. Vias de exposição

Para MA01, a recreação foi considerada a única via de exposição, uma vez que esta é uma área de lazer de Manaus. Para MA02 e MA03, as duas vias de exposição foram consideradas, tendo em vista que as pessoas nessas áreas têm contato com a água por atividades recreativas e que esses igarapés são utilizados nos transportes por barcos e para fins domésticos.

4.9.3. Dose de partículas infecciosas ingeridas

Para estimar-se a dose ingerida de partículas infecciosas (D_{jl}), considerou-se a concentração de partículas virais infecciosas nas águas tipo j (C_j) e o volume de água tipo j ingerido na exposição l (V_{jl}).

$$D_{jl} = C_j \times V_{jl}$$

A concentração de partículas virais infecciosas em água do tipo j (C_j) compreende o número estimado bruto de partículas em água do tipo j (c_j) (CG por determinada unidade de volume), a eficiência do procedimento de recuperação do vírus k (R_k) e a proporção de partículas infecciosas do vírus k (f_{ik}):

$$C_j = \frac{c_j}{R_k} \times f_{ik}$$

A inativação viral não foi incluída no modelo, uma vez que a amostragem foi vista como representativa para o evento de contato direto e pontual com a água e qualquer inativação antes da exposição foi representada pela distribuição da fração de partículas infecciosas.

A estimativa dos parâmetros considerados para dose ingerida foi feita da seguinte maneira:

Quantificação viral (c_i): conforme descrito no item 4.9.1.

Eficiência da recuperação do vírus k (R_k): A distribuição beta foi estimada a partir dos resultados dos experimentos de inoculações experimentais descritos no item 4.3.1. Os parâmetros desta distribuição foram estimados por máxima verossimilhança.

Infecciosidade viral (f_{ik}): A distribuição beta foi utilizada para estimar a distribuição de partículas infecciosas de RVA. Em função de RVA serem vírus fastidiosos, assumiu-se que o percentual de partículas infecciosas variou de 0,01 a 99,99 %.

Volume de água ingerido (V_{ij}): Para as atividades recreacionais, considerou-se Schets e colaboradores (2011), que determinaram um volume de ingestão de 27 e 37 mL para homens (adultos) e crianças por evento de balneabilidade em água de rio com duração de 54 e 79 min, respectivamente.

Para via de exposição por contato mão-boca, utilizou-se a abordagem desenvolvida por de Man e colaboradores (2014a), que determina o volume ingerido (Q_{HM}) considerando a espessura da película de água sobre as mãos (h), a área da mão que é inserida na boca (A) e a frequência de contato mão-boca (f_{HM}):

$$Q_{HM} = h \times A \times f_{HM}$$

Pelo nosso conhecimento, não há dados disponíveis de adultos para esta via, sendo assim estimado o risco somente para crianças. No presente estudo, estimou-se, aleatoriamente, a frequência de dois contatos mão-rio e mão-boca por hora pelas crianças de Manaus como evento de exposição.

4.9.4. Dose-Resposta (DR)

Os riscos de infecção por RVA foram estimados baseando-se no modelo beta-poisson como dose-resposta, que foi desenvolvido a partir de estudo envolvendo a ingestão humana da

cepa de rotavírus CJN (Ward et al., 1986; Gerba et al., 1996). A probabilidade de infecção (P_i) é determinada pela seguinte fórmula:

$$P_i = 1 - \left(1 + \frac{D}{\beta}\right)^{-\alpha}$$

Onde, D = dose ingerida (que corresponde ao C_j do modelo empregado nesta tese), $\alpha = 0,2531$ e $\beta = 0,4265$ (Ward et al., 1986; Gerba et al., 1996).

4.9.5. Caracterização do risco

Os riscos foram estimados por simulações de Monte Carlo com 10.000 iterações pelo programa *@Risk*[®] versão 6 (Palisade Corp.'s). Estes foram expressos como risco de infecção por média e 95 % de intervalo de confiança. Como não existe informação disponível sobre a frequência da exposição em Manaus, os riscos foram estimados com base em exposição individual e pontual.

Os valores dos parâmetros empregados para estimativa de dose ingerida foram considerados incertos, sendo estas incertezas descritas pelas respectivas distribuições de probabilidade.

5. RESULTADOS

5.1. Avaliação das metodologias de concentração, detecção e quantificação de vírus de origem humana e animal

5.1.1. Método de floculação orgânica

O método de floculação orgânica foi avaliado pela realização de inoculações experimentais de concentrações conhecidas de HAdV 35 e RVA G2P[4] em oito amostras representativas dos tipos de água analisados no projeto (Rio Negro e igarapés). Os percentuais de recuperação variaram de acordo com os pontos de coleta e vírus inoculados e apresentaram valores médios entre 6,3 a 1282,6 % (Tabela 5.1).

Tabela 5.1. Eficiência de recuperação de adenovírus humano 35 (HAdV 35) e rotavírus grupo A (RVA) pelo método de floculação orgânica.

| Ponto de Coleta | Vírus inoculado | |
|-----------------|-------------------------|------------------|
| | HAdV 35 | RVA G2P[4] |
| MA01 | *11,7 (5,7 – 23,2) | 9,4 (3,8 – 14,3) |
| MA02 | 1282,6 (260,9 – 2511,9) | 6,3 (4,5 – 10,5) |
| MA03 | 39,7 (9,3 – 68,0) | 8,1 (2,1 – 17,3) |

*Resultados expressos em Média % (Mínimo – Máximo); MA01 – Rio Negro/Praia de Ponta Negra (área de recreação); MA02 – igarapé São Raimundo; MA03 – igarapé Quarenta/Educandos.

Durante o período de monitoramento foram realizados experimentos de recuperação de HAdV 35 como controles positivos do método. HAdV foi recuperado em 97% das amostras inoculadas com resultados de eficiência de recuperação variando de acordo com os pontos e as campanhas de coleta (Tabela 5.2).

Tabela 5.2. Percentuais de recuperação de adenovírus humano 35 (HAdV 35) nos ensaios de inoculação experimental nas amostras coletadas durante o monitoramento.

| Ponto de coleta | Coleta | | | | | | |
|-----------------|----------|------------|----------|----------|----------|------------|----------|
| | Jan/2011 | Abril/2011 | Jul/2011 | Out/2011 | Jan/2012 | Março/2012 | Mai/2012 |
| MA01 | 0 | 2 | 71 | 16 | 25 | 35 | 31 |
| MA02 | 76 | 75 | 127 | 242 | 21 | 82 | 77 |
| MA03 | 193 | 116 | 133 | 91 | 16 | 101 | 79 |
| MA04 | 4 | 21 | 52 | 37 | 15 | 83 | 73 |
| MA05 | NR | 60 | 125 | 39 | 40 | 55 | 9 |

NR: Não realizado; MA01 – Rio Negro/Praia de Ponta Negra (área de recreação); MA02 – Igarapé São Raimundo; MA03 – Igarapé Quarenta/Educandos; MA04 – Rio Negro/Educandos; MA05 – Rio Negro/Educandos no fim da área urbana de Manaus.

5.1.2. Ensaio para avaliação de repetitividade e reprodutibilidade dos protocolos de amplificação genômica quantitativa como ferramentas de rastreamento microbiológico de fontes de contaminação

A avaliação da repetitividade dos protocolos de qPCR utilizados ocorreu pela quantificação de 10 suspensões de DNA contendo duas concentrações de HAdV, JCPyV, PAdV e BPyV. As médias de concentrações obtidas foram $8,32 \times 10^2$ ($\sigma = 1,49 \times 10^2$) e $9,32 \times 10^3$ ($\sigma = 6,12 \times 10^2$) CG/10 μ L para HAdV, $1,64 \times 10^3$ ($\sigma = 1,57 \times 10^2$) e $1,44 \times 10^4$ ($\sigma = 8,73 \times 10^2$) CG/10 μ L para JCPyV, $6,38 \times 10^2$ ($\sigma = 5,20 \times 10^1$) e $8,50 \times 10^3$ ($\sigma = 1,55 \times 10^3$) CG/10 μ L para PAdV e $1,11 \times 10^3$ ($\sigma = 7,17 \times 10^1$) e $1,10 \times 10^4$ ($\sigma = 3,96 \times 10^2$) CG/10 μ L para BPyV. Os resultados da reprodutibilidade pela comparação dos nossos resultados e os obtidos pelos demais laboratórios encontram-se no Anexo 4.

5.1.3. Ensaios de proficiência externa

Ensaios de proficiência externa pelo QCMD foram realizados pelo recebimento de dois painéis de amostras: um contendo oito amostras para HAdV e um contendo 12 amostras para NoV GII. Os resultados demonstraram uma sensibilidade mais baixa para todos os três sorotipos de

HAdV quando comparados aos valores consenso de todos os participantes do QCMD, apesar dos valores quantitativos de quatro das amostras positivas estarem dentro de um desvio padrão da média do grupo consenso (Tabela 5.3).

Tabela 5.3. Resultados do teste de proficiência externa para quantificação de adenovírus humanos (HAdV).

| Amostra | Sorotipo de HAdV | LVCA (Log₁₀ CG/mL) | Valor consenso (Log₁₀ CG/mL) | Desvio padrão consenso (Log₁₀ CG/mL) |
|----------------|-------------------------|--------------------------------------|------------------------------------------------|--------------------------------------------------------|
| 1 | 34 | 3,14 | 3,98 | 0,68 |
| *2 | 1 | 2,83 | 3,16 | 0,58 |
| 3 | neg | neg | neg | - |
| 4 | 1 | neg | 2,27 | 0,78 |
| 5 | 1 | 3,67 | 4,12 | 0,55 |
| 6 | 4 | 2,37 | 4,25 | 0,73 |
| 7 | 34 | 2,75 | 3,19 | 0,52 |
| *8 | 1 | 2,96 | 3,19 | 0,58 |

*Réplicas; Log₁₀ CG/mL – Log₁₀ cópias de genoma por mL; LVCA – Laboratório de Virologia Comparada e Ambiental; neg – negativo.

Para NoV GII, as concentrações obtidas para as 12 amostras encontraram-se dentro de um desvio padrão da média do grupo consenso (Tabela 5.4).

Tabela 5.4. Resultados do teste de proficiência externa para quantificação de norovírus genogrupo II (NoV GII).

| Amostra | Genótipo de NoV | LVCA (Log₁₀ CG/mL) | Valor consenso (Log₁₀ CG/mL) | Desvio padrão consenso (Log₁₀ CG/mL) |
|----------------|------------------------|--------------------------------------|------------------------------------------------|--------------------------------------------------------|
| 1 | GI.3 | neg | neg | - |
| 2 | GII.4 | 3,44 | 3,89 | 0,58 |
| 3 | GII.4 | 4,50 | 4,02 | 1,22 |
| 4 | GI.3 | neg | neg | - |
| 5 | neg | neg | neg | - |
| *6 | *GII.4 | 5,51 | 5,28 | 1,08 |
| *7 | *GII.4 | 5,55 | 5,28 | 1,09 |
| 8 | GI.7 | neg | neg | - |
| 9 | neg | Neg | neg | - |
| 10 | GI.8 | Neg | neg | - |
| 11 | GII.b | 8,00 | 6,69 | 1,73 |
| 12 | GII.4 | 9,49 | 9,45 | 1,28 |

*Réplicas; Log₁₀ CG/mL – Log₁₀ cópias de genoma por mL; LVCA – Laboratório de Virologia Comparada e Ambiental; neg – negativo.

5.2. Monitoramento das águas do Rio Negro e dos igarapés da cidade de Manaus/AM considerando o ciclo hidrológico deste rio, no período de janeiro de 2011 a maio de 2012, pela detecção e quantificação de vírus de origem humana e animal

Durante o período de monitoramento, um total de 272 amostras de água foram coletadas em campanhas realizadas nas estações de seca (três) e cheia (quatro), correspondendo a 112 e 160 amostras, respectivamente. A Figura 5.1 mostra os pontos de coleta nas diferentes estações do ciclo hidrológico do Rio Negro, cujo nível de água variou de 16,76 a 29,97 m no período deste estudo.



Figura 5.1. Pontos de coleta considerando o ciclo hidrológico do Rio Negro. A – Seca. B – Cheia.

5.2.1. Rastreamento das fontes de contaminação humana e animal

Os HAdV e JCPyV foram detectados em mais de 65 % das amostras, sendo observados percentuais de 100 % de detecção nos igarapés (MA02 e MA03) e no Rio Negro no fim da área urbana da cidade (MA05) (Figura 5.2). Os vírus de origem animal foram detectados somente em três pontos de coleta (MA02, MA03 e MA05), apresentando baixos percentuais de detecção (0,7 e 1,8 %) (Figura 5.2).

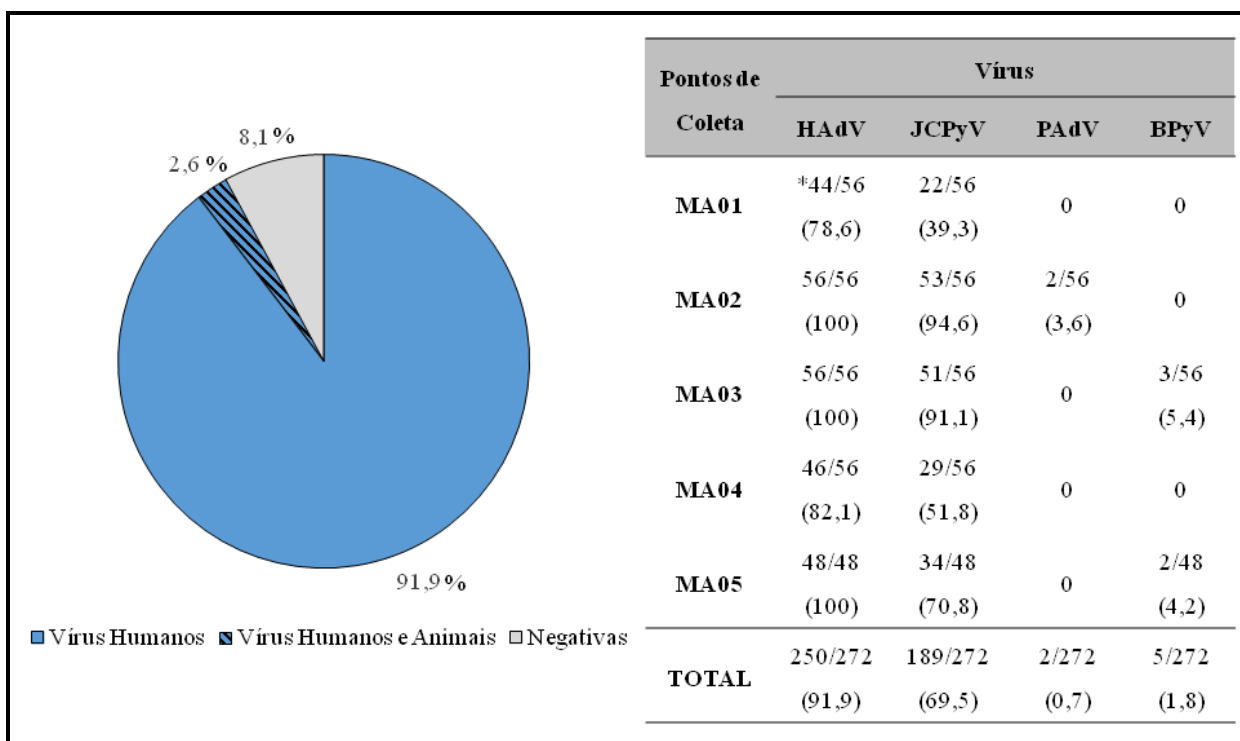


Figura 5.2. Detecção de vírus de origem humana e animal em ecossistemas aquáticos da cidade de Manaus. *positivo/total (%); HAdV – adenovírus humano; JCPyV – poliomavírus JC; PAdV – adenovírus suíno; BPyV – poliomavírus bovino; MA01 – Rio Negro/Praia de Ponta Negra (área de recreação); MA02 – igarapé São Raimundo; MA03 – igarapé Quarenta/Educandos; MA04 – Rio Negro/Educandos; MA05 – Rio Negro/Educandos no fim da área urbana de Manaus.

5.2.2. Detecção de vírus gastroentéricos

Os RVA foram detectados em 23,9 % das amostras analisadas, em concentrações variando de 10^2 a 10^5 CG/L, enquanto os NoV GII apresentaram menores percentuais de detecção (7,4 %) e menores concentrações (10^2 a 10^4 CG/L) (Tabela 5.5). Estes vírus foram detectados em todos os pontos de amostragem, com exceção dos NoV GII, que não foram detectados nos pontos MA04 (foz do igarapé Quarenta) e MA05 (Rio Negro no final da área urbana da cidade). Maiores taxas de detecção foram observadas nos igarapés urbanos (MA02 e MA03).

Tabela 5.5. Detecção e quantificação de rotavírus grupo A (RVA) e norovírus genogrupo II (NoV GII) de acordo com os locais de amostragem.

| Ponto de Coleta | Vírus | | | |
|-----------------|------------------|-----------------------------------|-----------------|-----------------------------------|
| | RVA | | NoV GII | |
| | Detecção | Concentração (CG/L) | Detecção | Concentração (CG/L) |
| MA01 | *1/56 (1,8) | 10 ³ | 8/56 (14,3) | 10 ³ – 10 ⁴ |
| MA02 | 22/56 (39,3) | 10 ³ – 10 ⁴ | 5/56 (8,9) | 10 ³ – 10 ⁴ |
| MA03 | 27/56 (48,2) | 10 ² – 10 ³ | 7/56 (12,5) | 10 ² – 10 ⁴ |
| MA04 | 7/56 (12,5) | 10 ⁴ – 10 ⁵ | 0 | – |
| MA05 | 8/48 (16,7) | 10 ⁴ – 10 ⁵ | 0 | – |
| TOTAL | 65/272 (23,9) | 10 ² – 10 ⁵ | 20/272 (7,4) | 10 ² – 10 ⁴ |

*positivo/total (%); CG/L – cópias de genoma por litro; RVA – rotavírus grupo A; NoV GII – norovírus genogrupo II; MA01 – Rio Negro/Praia de Ponta Negra (área de recreação); MA02 – Igarapé São Raimundo; MA03 – Igarapé Quarenta/Educandos; MA04 – Rio Negro/Educandos; MA05 – Rio Negro/Educandos no fim da área urbana de Manaus.

5.2.3. Detecção e quantificação de vírus de origem humana e animal de acordo com o ciclo hidrológico do Rio Negro

A Tabela 5.6 apresenta os resultados de detecção viral considerando o ciclo hidrológico do Rio Negro. HAdV, JCPyV e RVA foram mais detectados durante a cheia, enquanto NoV GII foi detectado somente na seca ($p < 0,05$). Considerando cada ponto de amostragem, diferenças estatisticamente significativas entre as estações seca e cheia foram observadas: MA01 - NoV GII ($p = 0,0039$), MA02 - NoV GII ($p = 0,011$), MA03 - JCPyV e NoV GII ($p = 0,01$ e $p = 0,0015$),

MA04 - HAdV, JCPyV e RVA ($p < 0,0001$, $p < 0,0001$ e $p = 0,016$) e MA05 - RVA ($p = 0,0394$).

Os PAdV e BPyV foram detectados somente na cheia (Tabela 5.6), entretanto não foi observada diferença estatisticamente significativa para a detecção de ambos nos dois períodos de estudo ($p = 0,5138$ e $p = 0,0798$).

Tabela 5.6. Detecção de vírus de origem humana e animal nas 272 amostras de rio de acordo com os pontos de coleta e o ciclo hidrológico do Rio Negro.

| Pontos de Coleta | HAdV | | JCPyV | | RVA | | NoV GII | | PAdV | | BPyV | |
|------------------------|-----------------|----------------|-----------------|----------------|-----------------|---------------|-----------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| | *Seca | *Cheia | Seca | Cheia | Seca | Cheia | Seca | Cheia | Seca | Cheia | Seca | Cheia |
| MA01 | 16 | 28 | 8 | 14 | 0 | 1 | *18 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| MA02 | 24 | 32 | 21 | 32 | 7 | 15 | *15 | 0 | 0 | 2 | 0 | 0 |
| MA03 | 24 | 32 | *19 | 32 | 8 | 19 | *17 | 0 | 0 | 0 | 0 | 3 |
| MA04 | *14 | 32 | *15 | 24 | *10 | 7 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| MA05 | 16 | 32 | 12 | 22 | *10 | 8 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 |
| TOTAL | *194 (83,9%) | 156 (97,5%) | *165 (58,0%) | 124 (77,5%) | *115 (13,4%) | 50 (31,3%) | *120 (17,9%) | 0 (0,0%) | 0 (0,0%) | 2 (1,3%) | 0 (0,0%) | 5 (3,1%) |

*n seca = 112, n cheia = 160 e n total = 272; *1p < 0,05 (diferença estatisticamente significativa de detecção entre as estações); HAdV – adenovírus humano; JCPyV – poliomavírus JC; RVA – rotavírus grupo A; NoV GII – norovírus genogrupo II; PAdV – adenovírus suíno; BPyV – poliomavírus bovino; MA01 – Rio Negro/Praia de Ponta Negra (área de recreação); MA02 – igarapé São Raimundo; MA03 – igarapé Quarenta/Educandos; MA04 – Rio Negro/Educandos; MA05 – Rio Negro/Educandos no fim da área urbana de Manaus.

As concentrações dos vírus de origem humana variaram de 10^2 a 10^6 CG/L, sendo as concentrações mais elevadas de HAdV e JCPyV observadas nos igarapés MA02 e MA03 (Figura 5.3). HAdV foi detectado em todas as amostragens e pontos de coleta, em concentrações que variaram em três \log_{10} ao longo do período estudado. Apesar da menor prevalência de JCPyV, quando detectado, a sua concentração foi semelhante à dos HAdV na maioria das amostragens e pontos de coleta. Um aumento na concentração de RVA pôde ser observado quando o nível de Rio Negro aumentou e a concentração de NoV GII foi semelhante em todos os pontos quando detectado. Diferença estatisticamente significativa na concentração viral foi observada apenas para RVA ao considerar o ciclo hidrológico do Rio Negro ($p < 0,0001$). Ao considerar cada ponto de amostragem, foram observadas significâncias estatísticas para HAdV nos pontos MA04 e MA05 ($p = 0,0018$ e $p = 0,0096$), JCPyV no MA01 ($p = 0,0441$) e RVA nos MA02 e MA03 ($p = 0,0002$ e $p = 0,024$).

As concentrações dos vírus de origem animal variaram de 10^1 a 10^2 CG/L, sendo maiores concentrações observadas para PAdV (Figura 5.3).

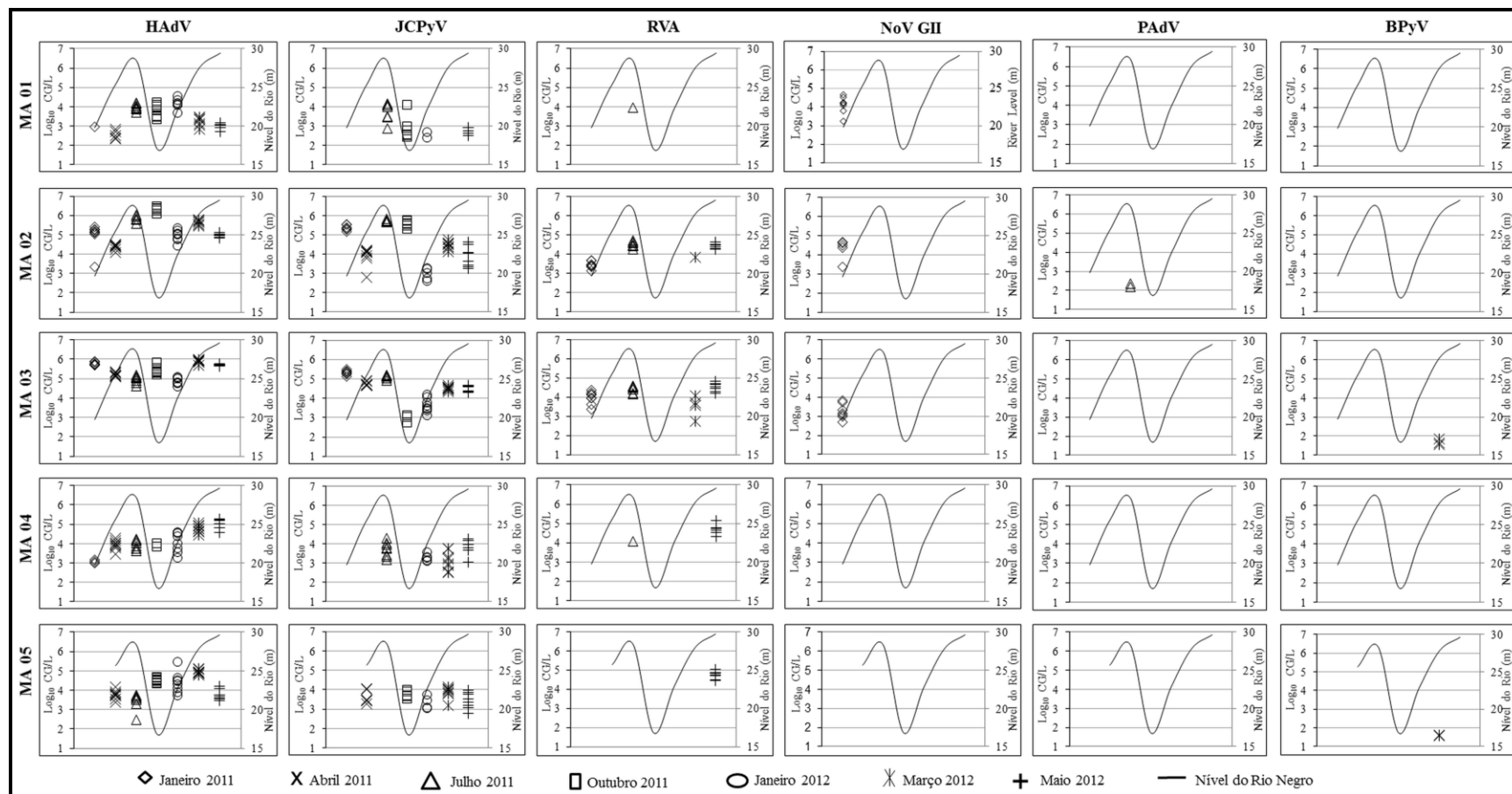


Figura 5.3. Quantificação de vírus de origem humana e animal nas oito amostras coletadas nos pontos de coleta de acordo com a amostragem e o nível do Rio Negro. Não foi realizada coleta em janeiro de 2011 no MA05. HADv – adenovírus humano; JCPyV – poliomavírus JC; RVA – rotavírus grupo A; NoV GII – norovírus genogrupo II; PAdV – adenovírus suíno; BPyV – poliomavírus bovino; CG/L – cópias de genoma por litro; MA01 – Rio Negro/Praia de Ponta Negra (área de recreação); MA02 – igarapé São Raimundo; MA03 – igarapé Quarenta/Educandos; MA04 – Rio Negro/Educandos; MA05 – Rio Negro/Educandos no fim da área urbana de Manaus.

5.2.4. Caracterização molecular dos vírus

Vinte e cinco amostras de RVA representativas dos pontos MA01, MA02 e MA03 foram submetidas a protocolos de caracterização pela VP4, VP7 e VP6 para os estudos de avaliação de risco. Pela classificação binária VP4-VP7 por *semi-nested* PCR, três amostras de MA03 foram caracterizadas como P[8] e não houve resultado positivo para G. Pelo sequenciamento de VP6, duas amostras apresentaram maior identidade nucleotídica (99%) com amostras G2P[4] (uma de MA02 e uma de MA03) e uma amostra (MA03) com G3P[9] (99%). Vale ressaltar que a amostra G2P[4] de MA03 foi uma das que também apresentou amplificação de P[8].

Sessenta e três amostras positivas para HAdV provenientes dos mesmos pontos foram submetidas a protocolos de caracterização molecular. O sequenciamento nucleotídico de 26 amostras demonstrou maior identidade nucleotídica (99%) com amostras de HAdV 41 (quatro de MA01, nove de MA02 e 13 de MA03).

5.2.5. Qualidade da água por parâmetros bacteriológicos

E. coli e enterococos foram detectadas em todas as amostragens, com exceção da *E. coli* no ponto MA01 em janeiro de 2011. Trinta e dois (87/272) e 35 (85/240) por cento das amostras foram classificadas como não conformes com a regulamentação vigente para águas destinadas a recreação de contato primário, pois apresentaram concentrações mais elevadas que o máximo estabelecido para *E. coli* (2000 NMP/100 mL) e enterococos (400 NMP/100 mL), respectivamente.

Esses indicadores bacteriológicos excederam as concentrações padrão principalmente nos igarapés MA02 e MA03 e em outubro, quando o nível do Rio Negro (16,76 m) foi o menor observado (Figura 5.4). A Praia de Ponta Negra (MA01) foi considerada adequada para recreação com base em *E. coli* e enterococos, exceto em abril e julho de 2011, quando as concentrações de enterococos excederam os padrões em quatro e três das oito amostras coletadas, respectivamente. Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas nas concentrações de bactérias entre as estações seca e cheia (p *E. coli* = 0,4308 e p enterococos = 0,1325).

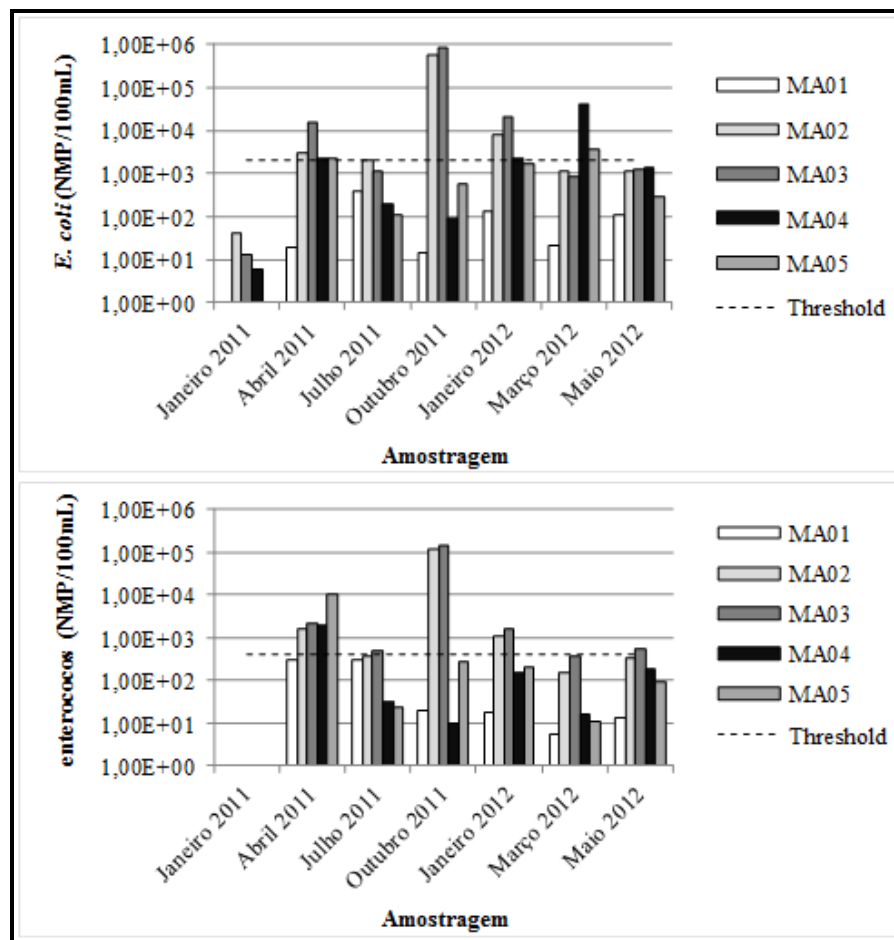


Figura 5.4. Quantificação mediana de *Escherichia coli* (*E. coli*) e enterococos como indicadores microbiológicos de contaminação fecal para águas de recreação em Manaus. *Threshold* significa concentração máxima para ambos os indicadores com base na regulamentação brasileira (2000 e 400 NMP/100 mL, respectivamente). A quantificação de enterococos em janeiro de 2011 não foi realizada. NMP/100 mL – Número mais provável por 100 mL; MA01 – Rio Negro/Praia de Ponta Negra (área de recreação); MA02 – igarapé São Raimundo; MA03 – igarapé Quarenta/Educandos; MA04 – Rio Negro/Educandos; MA05 – Rio Negro/Educandos no fim da área urbana de Manaus.

5.2.6. Correlações entre adenovírus humano (HAdV) e poliomavírus JC (JCPyV) e indicadores bacteriológicos de contaminação fecal humana da água

Sessenta e cinco por cento das amostras positivas para HAdV e JCPyV foram detectadas quando a quantificação de *E. coli* foi inferior ao máximo estabelecido pela norma brasileira para águas de recreação, ao passo que 64,2 % e 61,8 % das amostras positivas para HAdV e JCPyV,

respectivamente, foram detectadas quando a quantificação de enterococos estava dentro do padrão. Considerando a área de recreação (MA01), todas as amostras positivas para HAdV e JCPyV foram detectadas quando a concentração de *E. coli* estava aceitável e 90,7 % e 86,4 % das amostras positivas para HAdV e JCPyV, respectivamente, foram detectadas quando enterococos estavam em conformidade com a regulamentação.

As concentrações de HAdV e JCPyV foram maiores que as observadas para os indicadores bacteriológicos na maioria dos pontos de coleta nas estações do ciclo hidrológico do Rio Negro (Figura 5.5).

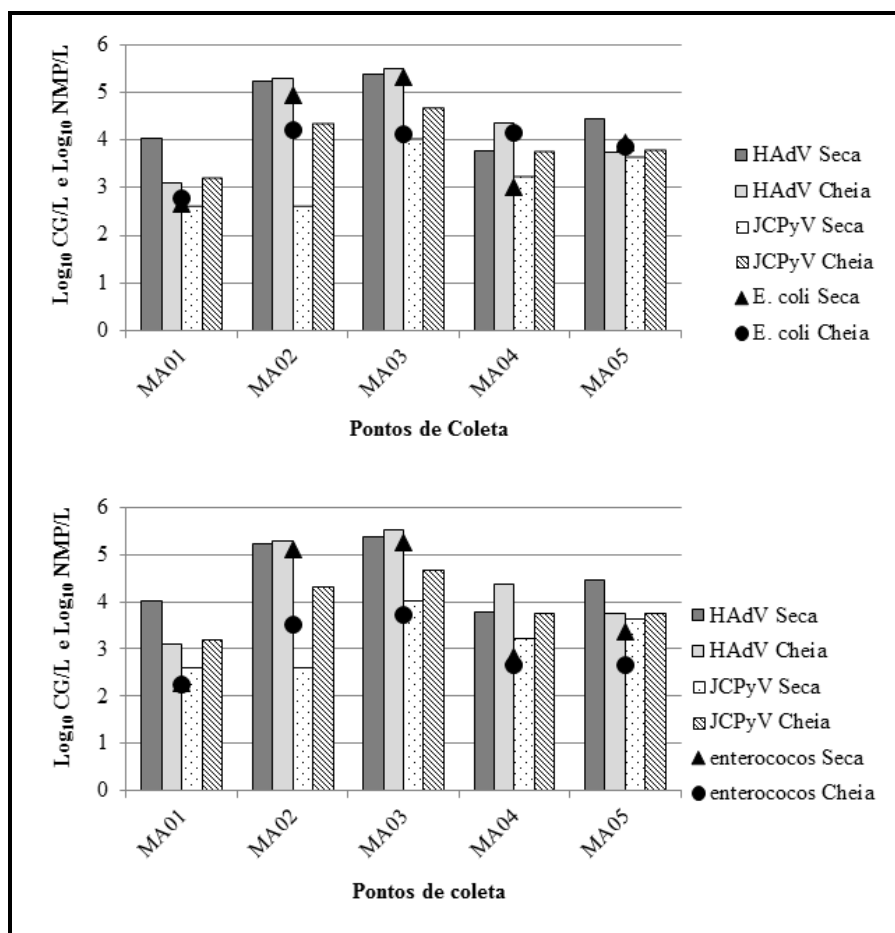


Figura 5.5. Concentrações medianas de marcadores virais e bacteriológicos de acordo com o ciclo hidrológico do Rio Negro. HAdV – adenovírus humano; JCPyV – poliomavírus JC; *E. coli* – *Escherichia coli*; CG/L – cópias de genoma por litro; NMP/L – número mais provável por litro; MA01 – Rio Negro/Praia de Ponta Negra (área de recreação); MA02 – igarapé São Raimundo; MA03 – igarapé Quarenta/Educandos; MA04 – Rio Negro/Educandos; MA05 – Rio Negro/ Educandos no fim da área urbana de Manaus.

Os coeficientes de correlação de *Spearman* (*r*) obtidos entre os vírus e os parâmetros bacteriológicos estão apresentados na Tabela 5.7. Estes apresentaram valores entre 0,274 e 0,762, não sendo observadas correlações fortes entre os parâmetros. Correlações não significativas foram observadas entre JCPyV e *E. coli* e HAdV apresentaram valores de *r* mais elevados que os de JCPyV.

Tabela 5.7. Correlações entre adenovírus humano (HAdV), poliomavírus JC (JCPyV), *Escherichia coli* (*E. coli*) e enterococos como indicadores de contaminação fecal humana em águas de rio de Manaus. Para todos os coeficientes de correlação, $p \leq 0,001$.

| | HAdV | JCPyV | <i>E. coli</i> | Enterococos |
|----------------|-------|-------|----------------|-------------|
| HAdV | | 0,762 | 0,544 | 0,491 |
| JCPyV | 0,762 | | 0,274 | 0,374 |
| <i>E. coli</i> | 0,544 | 0,274 | | 0,607 |
| Enterococos | 0,491 | 0,374 | 0,607 | |

5.2.7. Caracterização dos ambientes aquáticos por parâmetros físico-químicos

As medições dos parâmetros físico-químicos estão apresentadas na Tabela 5.8. Considerando os períodos de seca e cheia, diferenças significativas para todos os parâmetros em todos os pontos de amostragem foram observadas ($p < 0,05$), exceto para temperatura nos pontos MA02, MA03 e MA05 e condutividade nos pontos MA04 e MA05. Foram observadas temperaturas medianas de 28-29 °C e medianas mais elevadas de pH, turbidez e condutividade principalmente na estação seca nos igarapés (MA02 e MA03).

Tabela 5.8. Mediana dos parâmetros físico-químicos de acordo com os pontos de coleta e o ciclo hidrológico do Rio Negro.

| Pontos de coleta | Temperatura (°C) | | pH | | Turbidez (UNT) | | Condutividade (µS/cm) | |
|------------------|------------------|-------|------|-------|----------------|-------|-----------------------|-------|
| | Seca | Cheia | Seca | Cheia | Seca | Cheia | Seca | Cheia |
| MA01 | *29,8 | 29,4 | *5,9 | 5,1 | *21,0 | 9,0 | *10,0 | 9,0 |
| MA02 | 28,4 | 28,7 | *6,9 | 5,4 | *43,0 | 7,5 | *267,0 | 10,1 |
| MA03 | 29,1 | 29,3 | *6,9 | 6,0 | *56,0 | 9,0 | *296,0 | 21,0 |
| MA04 | *29,6 | 29,1 | *5,8 | 5,1 | *9,0 | 5,0 | 8,0 | 8,0 |
| MA05 | 29,4 | 29,3 | *5,9 | 5,1 | *11,5 | 3,0 | 7,5 | 8,0 |

*p < 0,05 (diferença estatisticamente significativa entre as estações); °C – graus Celsius; UNT – Unidades Nefelométricas de Turbidez; µS/cm – microSiemens por centímetro; MA01 – Rio Negro/Praia de Ponta Negra (área de recreação); MA02 – igarapé São Raimundo; MA03 – igarapé Quarenta/Educandos; MA04 – Rio Negro/Educandos; MA05 – Rio Negro/Educandos no fim da área urbana de Manaus.

5.2.8. Avaliação de risco de infecções por rotavírus grupo A (RVA)

A avaliação de risco foi utilizada para estimar os riscos de infecções por RVA considerando recreação e contato mão-boca como vias de exposição às águas de Manaus dos pontos MA01, MA02 e MA03.

Os resultados obtidos foram apresentados conforme o modelo conceitual deste estudo, que incluiu a estimativa da concentração viral na água, a atividade de exposição envolvida, a dose de partículas virais infecciosas ingeridas, o modelo dose-resposta e a caracterização do risco para crianças e adultos.

As distribuições de probabilidade e parâmetros utilizados no modelo estão apresentados na Tabela 5.9.

Como não houve diferença estatisticamente significativa nas concentrações estimadas por qPCR e recuperações de RVA (p = 0,7250, p = 0,2315, respectivamente) nos pontos MA02 e MA03, a estimativa de risco foi considerada igual nos dois pontos, sendo utilizados os dados do ponto MA02.

Tabela 5.9. Distribuições de probabilidade e parâmetros utilizados no modelo para a avaliação de risco de infecções por rotavírus grupo A (RVA) pela exposição a ecossistemas aquáticos de Manaus.

| Modelo | Distribuição (parâmetros) | Referência |
|--------------------------------------------------------------|--------------------------------------|------------------------------------------|
| Recuperação | | |
| MA01 | Beta (2,38, 22,81) | Presente estudo |
| MA02/MA03 | Beta (0,93, 13,77) | |
| Infeciosidade (MA01, MA02/MA03) | Beta (1,01, 1,01) | Presente estudo |
| Concentração | | |
| MA01 | Gamma (1,27, 10,93) | Presente estudo |
| MA02/MA03 | Gamma (0,33, 6591,76) | |
| Volume Ingerido | | |
| Recreação (mL) | Adulto: Gamma (0,45, 60) | Schets et al., 2011 |
| | Criança: Gamma (0,64, 58) | |
| Contato mão-boca (crianças) ($\mu\text{L}/60 \text{ min}$) | | |
| Espessura da película de água sobre as mãos (mm) | Uniforme (0,0214, 0,0499) | USEPA, 2011 |
| Superfície da mão que é inserida na boca (mm^2) | Uniforme (100, 2000) | USEPA, 2011 |
| Frequência contato mão-boca (n/min) | Gamma (2, 60) | De Man et al., 2014a; Presente estudo |

MA01 – Rio Negro/Praia de Ponta Negra (área de recreação); MA02 – igarapé São Raimundo; MA03 – igarapé Quarenta/Educandos.

5.2.8.1. Concentração viral

Representações das concentrações virais obtidas para cada amostra considerando a abordagem de diferentes dimensões e escalas utilizadas nesta tese estão apresentadas na Figura 5.6.

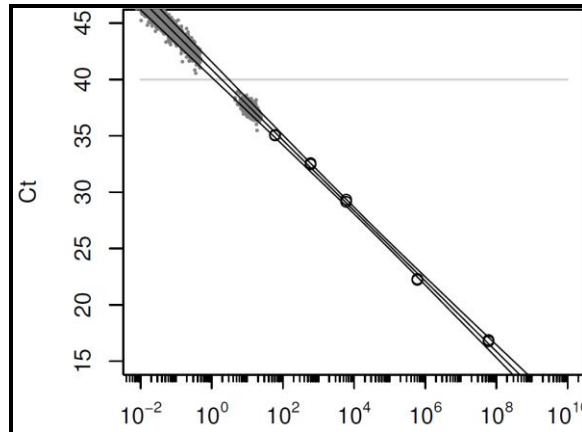


Figura 5.6. Concentrações estimadas de rotavírus grupo A (RVA) considerando 95 % de intervalo de confiança da curva padrão. Cada círculo representa um ponto da curva padrão e as duas áreas com pontos cinza representam as distribuições para amostras de água com valores de ct acima e abaixo do limite de detecção do protocolo de qPCR, sendo cada ponto em cinza representativo de cada uma das 100.000 iterações da simulação.

5.2.8.2. Dose de partículas virais infecciosas ingeridas

5.2.8.2.1. Concentração viral

A curva da distribuição de probabilidade gamma para as concentrações de RVA com 95% de intervalo de confiança em cada ponto de coleta está demonstrada na Figura 5.7. Os parâmetros estimados para estas distribuições estão apresentados na Tabela 5.9. Pode-se observar que o ponto MA02/MA03 apresentou curva enviesada para a esquerda, em função da maior concentração observada neste ponto.

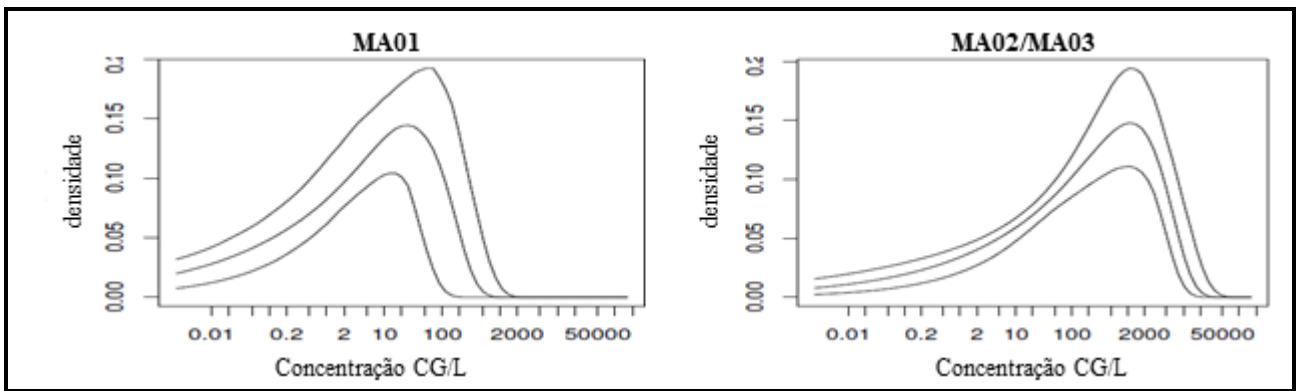


Figura 5.7. Curvas de distribuição de probabilidade gamma das concentrações de rotavírus grupo A (RVA) considerando cada ponto de amostragem. CG/L – cópias de genoma por litro; MA01 – Rio Negro/Praia de Ponta Negra (área de recreação); MA02 – igarapé São Raimundo; MA03 – igarapé Quarenta/Educandos.

5.2.8.2.2. Eficiência da recuperação

As curvas de distribuição beta com 95 % de intervalo de confiança para recuperação de RVA nos pontos estudados estão apresentadas nas Figuras 5.8 e 5.9. Os parâmetros estimados destas distribuições estão apresentados na Tabela 5.9. Para ambos os casos, a curva enviesou-se para a direita, em função da maior parte dos percentuais de recuperação encontrarem-se abaixo de 10 % (item 5.1, Tabela 5.1).

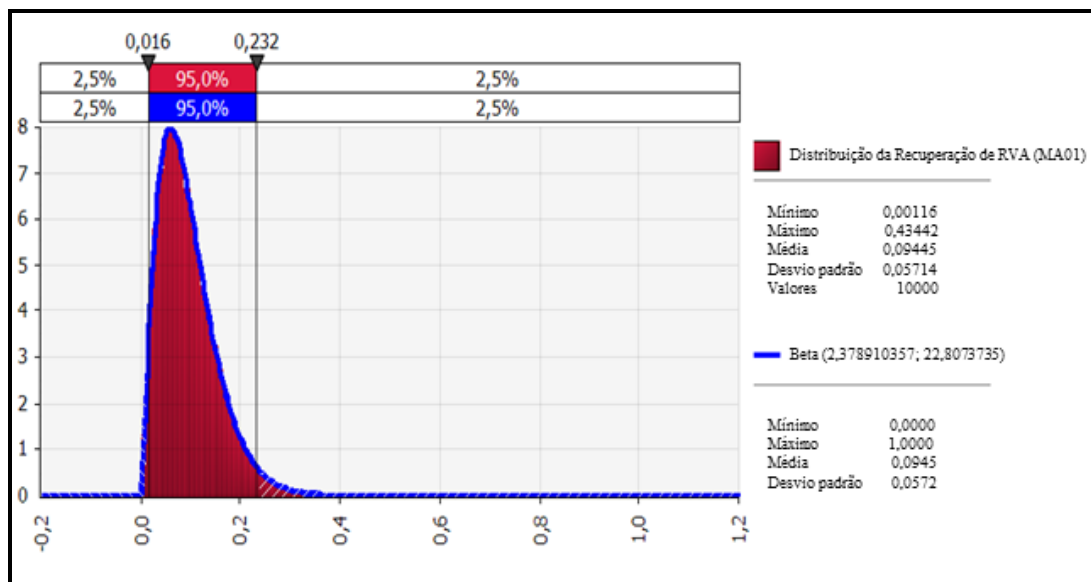


Figura 5.8. Curva de distribuição de probabilidade beta para a recuperação de rotavírus grupo A (RVA) no ponto MA01 (Rio Negro/Praia de Ponta Negra).

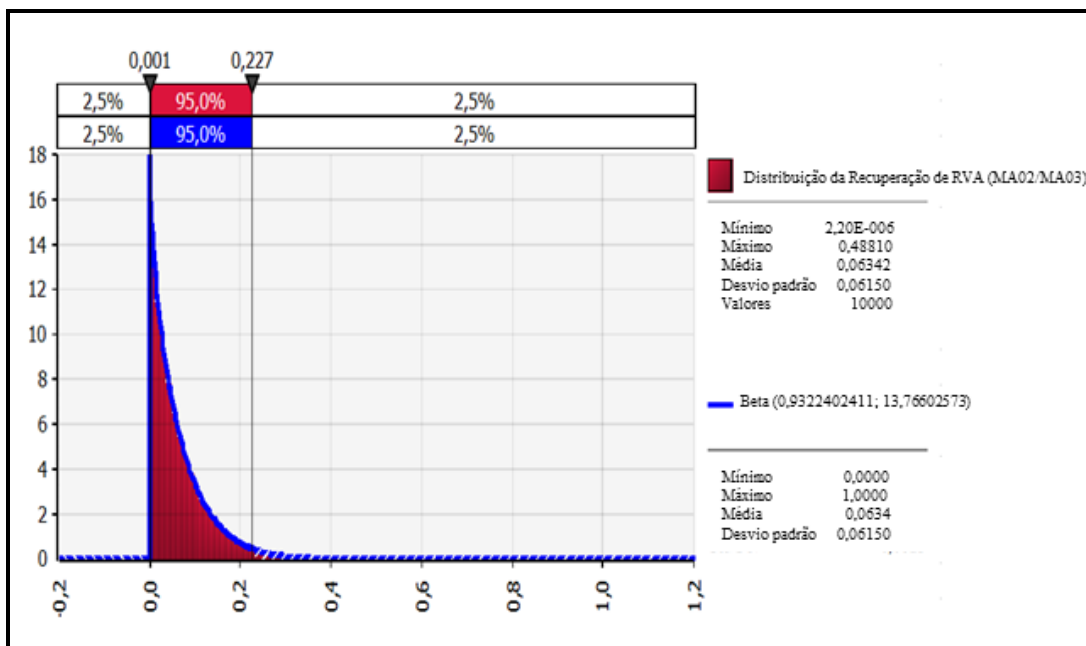


Figura 5.9. Curva de distribuição de probabilidade beta para a recuperação de rotavírus grupo A (RVA) nos igarapés MA02/MA03 (MA02 - São Raimundo /MA03 - Quarenta/Educandos).

5.2.8.2.3. Percentual de partículas infecciosas

A curva de distribuição beta com 95 % de intervalo de confiança para o percentual de partículas infecciosas (considerando 0,01 a 99,99 %) para os três pontos estudados está demonstrada na Figura 5.10. Os parâmetros estimados para esta distribuição estão apresentados na Tabela 5.9.

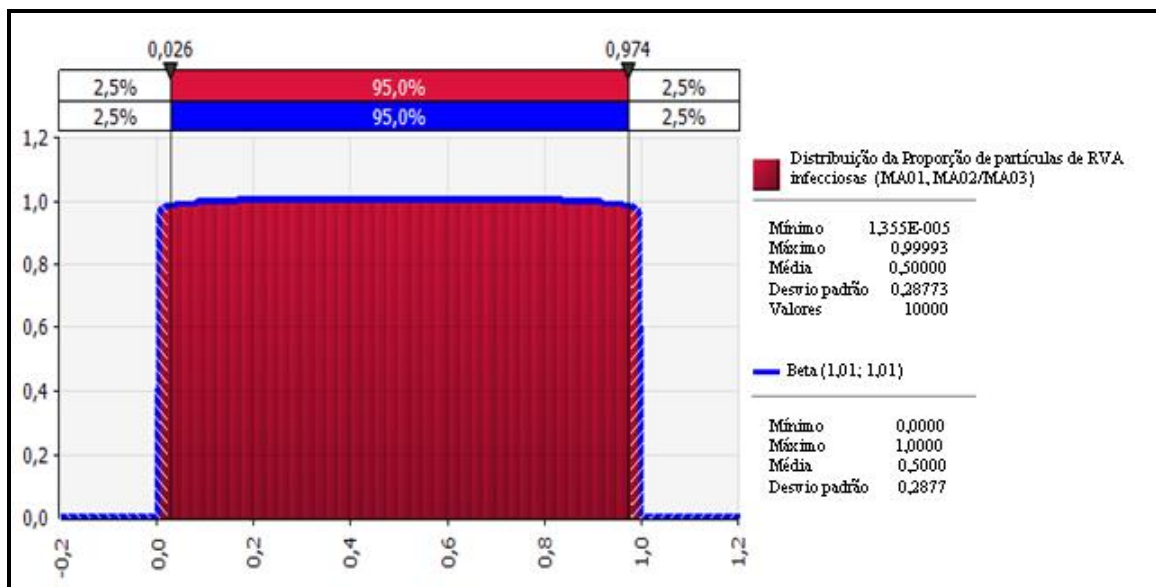


Figura 5.10. Curva de distribuição de probabilidade beta para o percentual de partículas infecciosas de rotavírus grupo A (RVA) nos três pontos estudados. MA01 – Rio Negro/Praia de Ponta Negra (área de recreação); MA02 – Igarapé São Raimundo; MA03 – Igarapé Quarenta/Educandos.

5.2.8.2.4. Volume de água ingerido

Para as atividades recreacionais, considerou-se os volumes ingeridos e distribuições correspondentes descritos por Schets e colaboradores (2011), sendo os parâmetros destas distribuições apresentados na Tabela 5.9. As curvas das distribuições gamma com 95 % de intervalo de confiança para o volume de água ingerido por adultos e crianças em atividades recreacionais nos pontos estudados estão apresentadas nas Figuras 5.11 e 5.12, respectivamente.

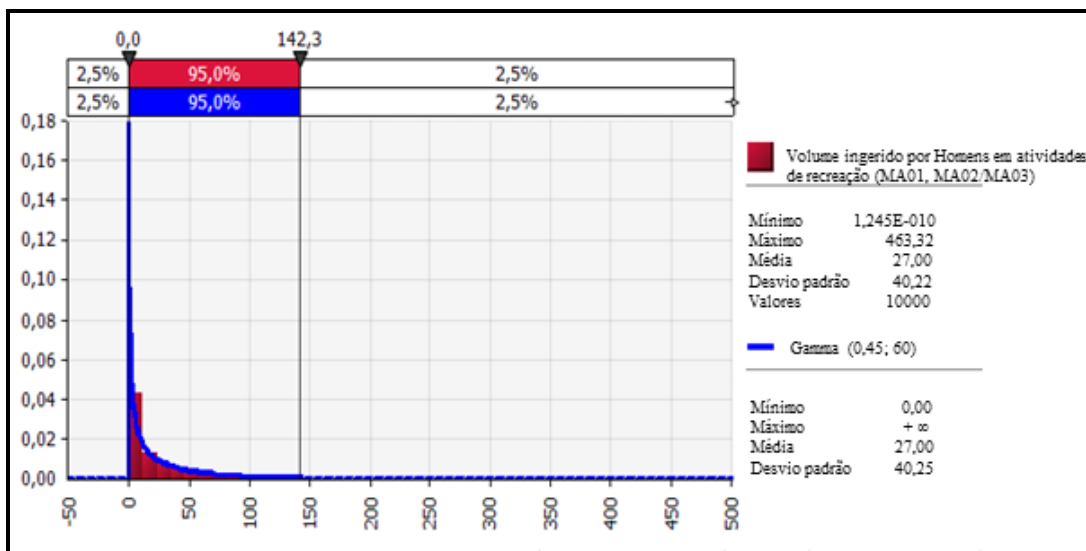


Figura 5.11. Curva de distribuição de probabilidade gamma para o volume de água ingerido por adultos em atividades recreacionais em água doce. MA01 – Rio Negro/Praia de Ponta Negra (área de recreação); MA02 – igarapé São Raimundo; MA03 – igarapé Quarenta/Educandos.

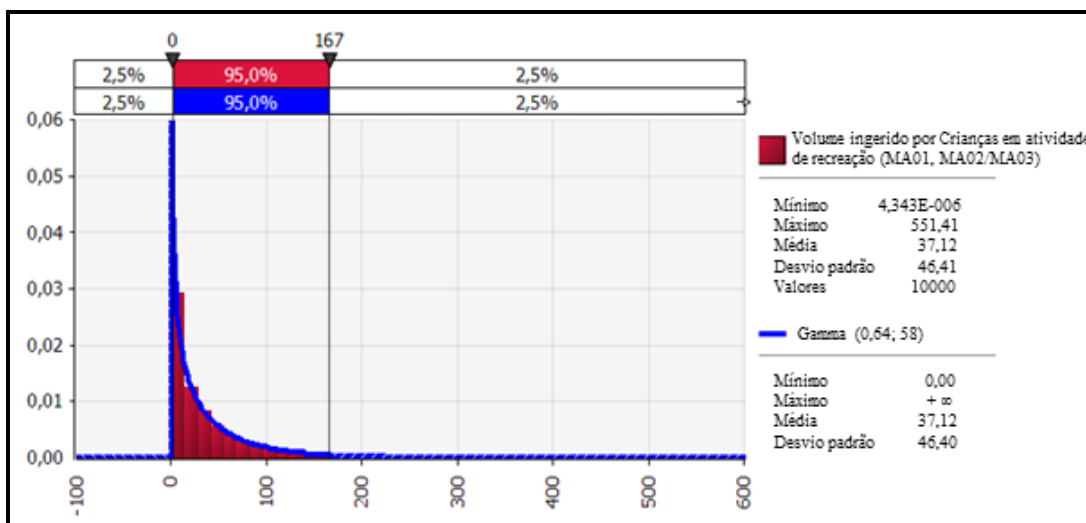


Figura 5.12. Curva de distribuição de probabilidade gamma para o volume de água ingerido por crianças em atividades recreacionais em água doce. MA01 – Rio Negro/Praia de Ponta Negra (área de recreação); MA02 – igarapé São Raimundo; MA03 – igarapé Quarenta/Educandos.

Para contato mão-boca, o cálculo do volume ingerido inclui: espessura da película de água sobre as mãos (h), área da mão inserida na boca (A) e frequência de contato mão-boca (f_{HM}).

Os parâmetros estimados para estas distribuições estão descritos na Tabela 5.9 e as curvas de distribuição com 95 % de intervalo de confiança apresentadas nas Figuras 5.13, 5.14 e 5.15, respectivamente.

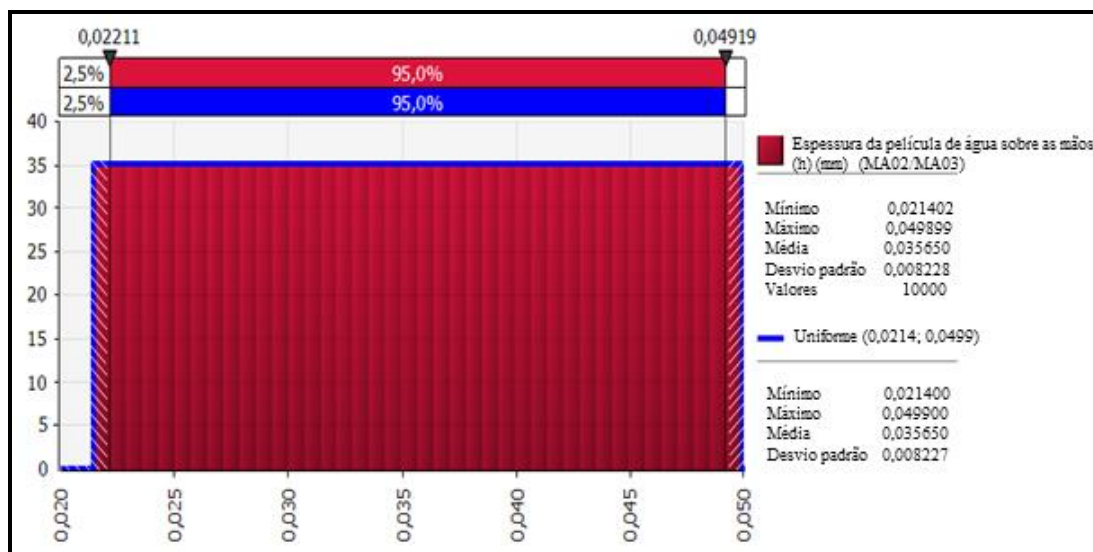


Figura 5.13. Curva de distribuição de probabilidade uniforme para espessura da película de água sobre as mãos (h) formada nas crianças quando em contato com a água. MA02 – igarapé São Raimundo; MA03 – igarapé Quarenta/Educandos.

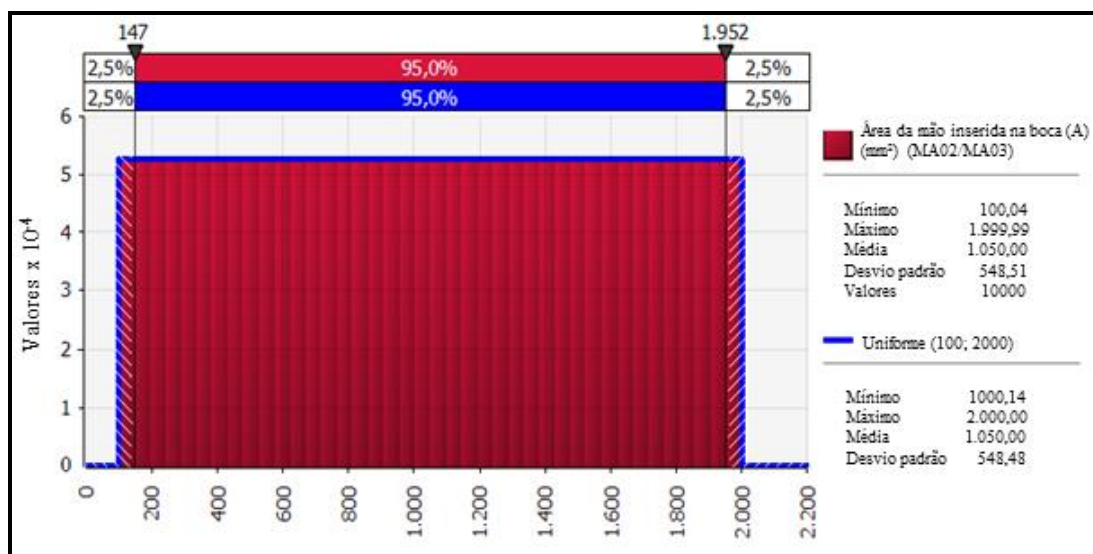


Figura 5.14. Curva de distribuição de probabilidade uniforme para área da mão que é inserida na boca (A) pelas crianças. MA02 – igarapé São Raimundo; MA03 – igarapé Quarenta/Educandos.

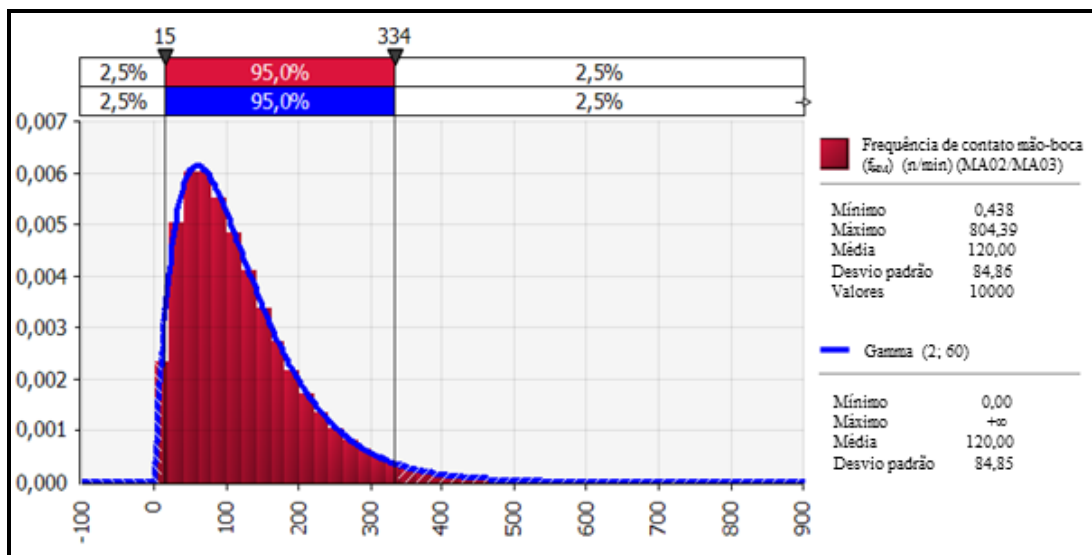


Figura 5.15. Curva de distribuição de probabilidade gamma para frequência de contato mão-boca (f_{HM}) pelas crianças. MA02 – igarapé São Raimundo; MA03 – igarapé Quarenta/Educandos.

5.2.8.3. Caracterização do risco

As estimativas de risco de infecção por RVA por recreação e contato mão-boca nos pontos estudados estão apresentadas nas Figuras 5.16 e 5.17, respectivamente. Os dados apontam probabilidades médias de infecção entre 0,7099 a 0,8680 para atividades recreacionais, sendo maiores os riscos pelo contato com os igarapés (MA02/MA03) e para crianças. Para contato mão-boca, a probabilidade média foi de 0,3954, embora maior frequência tenha sido observada para probabilidade próxima a zero.

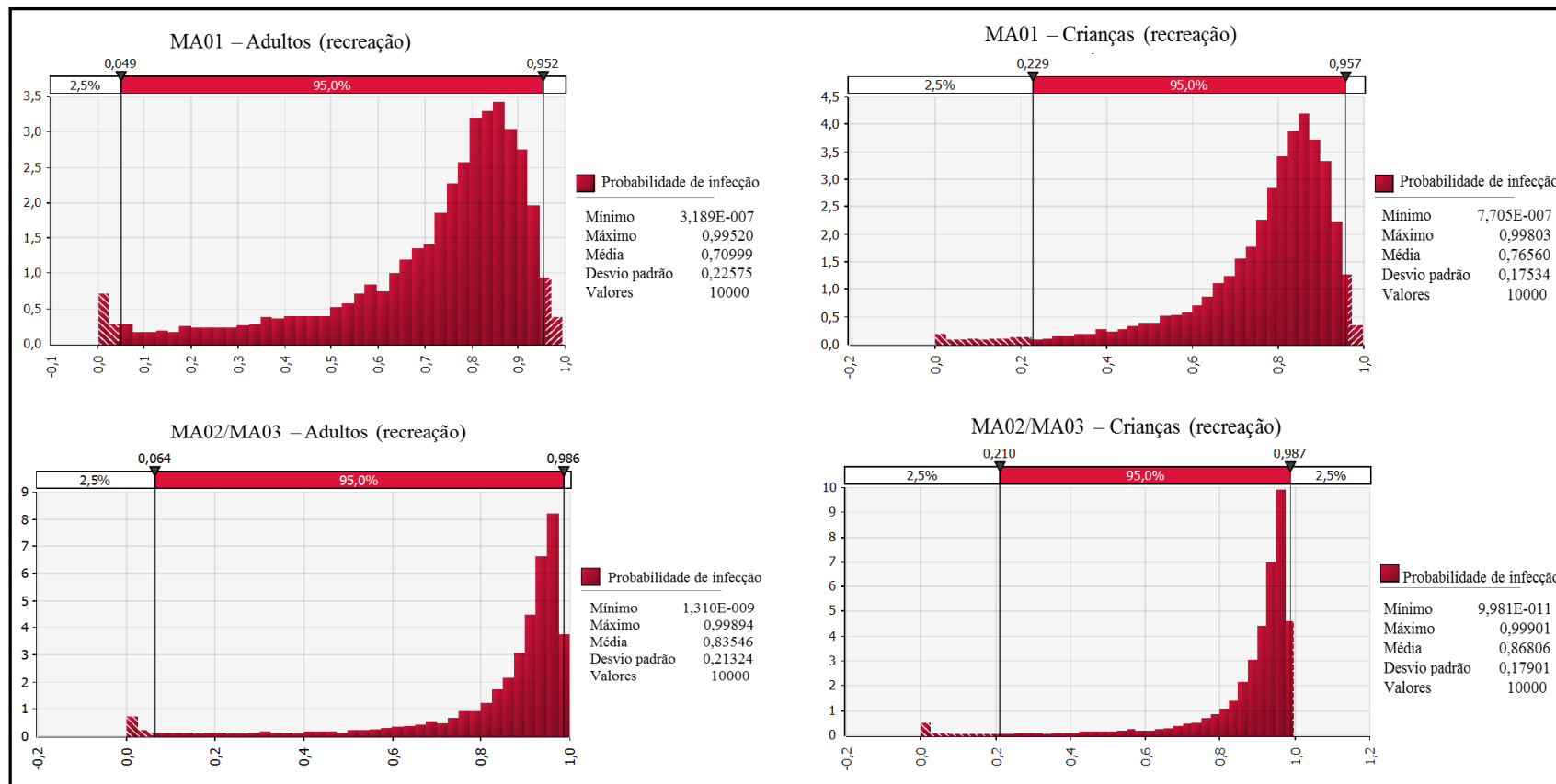


Figura 5.16. Probabilidades de infecção de adultos e crianças por rotavírus grupo A (RVA) por atividades recreacionais nos ambientes aquáticos da cidade de Manaus. MA01 – Rio Negro/Praia de Ponta Negra (área de recreação); MA02 – igarapé São Raimundo; MA03 – igarapé Quarenta/Educandos.

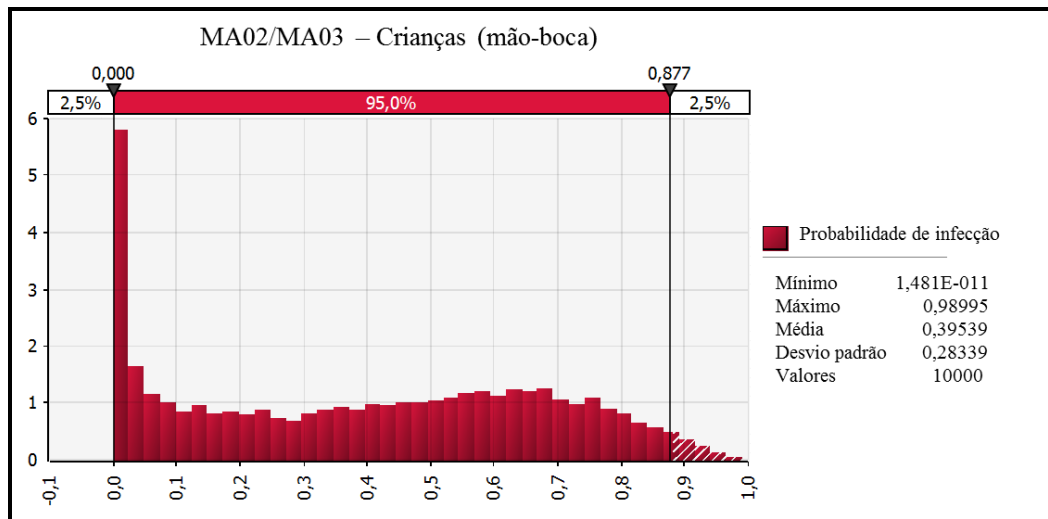


Figura 5.17. Probabilidades de infecção de crianças por rotavírus grupo A (RVA) pelo contato mão-boca com os igarapés da cidade de Manaus. MA02 – igarapé São Raimundo; MA03 – igarapé Quarenta/Educandos.

5.3. Cheia histórica do Rio Negro em Manaus, junho de 2012

Em junho de 2012, o Rio Negro atingiu níveis próximos a 30 m, caracterizando o pior evento extremo de cheia desde 1902, e resultou na inundação de diferentes regiões da cidade de Manaus, especialmente as áreas ribeirinhas (Figura 5.18).



Figura 5.18. Áreas inundadas na cheia histórica do Rio Negro, Manaus, 2012. Fotos: A – Tiago Melo; B – Rafael S. Nobre/Portal Amazônia; C e D – autor da tese; E – Pedro Martinelli; F – Marcio Melo/Futura Press.

Neste ano, dados obtidos do MDDA registraram um aumento no número de casos de GA na cidade (75.908) quando comparados aos obtidos em 2011 (54.180). Um aumento de 49% no número de casos de abril a junho de 2012 (5.942 em abril, 6.158 em maio e 8.867 em junho) contra 33 % em 2011 (4.159 em abril, 4.824 em maio e 5.517 em junho) foi observado. Também foi observada associação entre o aumento do número de casos de GA e a elevação do nível do Rio Negro (Figura 5.19). Os coeficientes de correlações de Spearman obtidos entre o nível do rio e casos de GA notificados mensalmente foram -0,256 ($p = 0,422$) e 0,713 ($p = 0,009$) para 2011 e 2012, respectivamente.

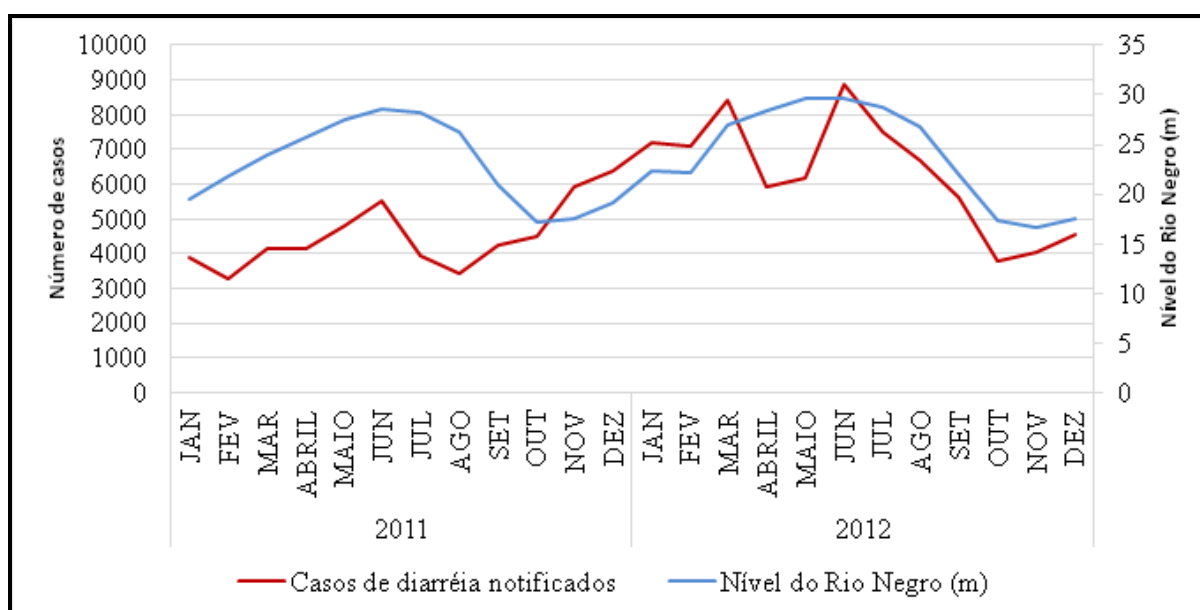


Figura 5.19. Número de casos de gastroenterite notificados e nível do Rio Negro em Manaus em 2011 e 2012. Programa Brasileiro de Monitorização de Doenças Diarréicas Agudas (MDDA, 2015); Porto de Manaus, 2015.

Durante esta cheia, um total de 40 amostras de água foram coletadas nos cinco pontos previamente estudados. Todas as amostras foram positivas para pelo menos um tipo de vírus. HAdV foi o vírus mais prevalente (100 %), seguido por RVA (77,5 %) e NoV GII (27,5 %) (Tabela 5.10). HAstV, NoV GIV, SaV, KV, HBoV e AiV não foram detectados pelas metodologias aplicadas. Nesta campanha, as taxas de recuperação estimadas de HAdV 35 foram de 62 %, 63 %, 135 %, 81 % e 134 % em MA01 a MA05, respectivamente.

Tabela 5.10. Detecção de adenovírus humano (HAdV), rotavírus grupo A (RVA) e norovírus genogrupo II (NoV GII) em amostras de água coletadas na cheia histórica do Rio Negro em Manaus, 2012.

| Pontos de coleta | HAdV | RVA | NoV GII |
|-------------------------|-------------|------------|----------------|
| MA01 | 8 | 0 | 0 |
| MA02 | 8 | 8 | 7 |
| MA03 | 8 | 7 | 0 |
| MA04 | 8 | 8 | 3 |
| MA05 | 8 | 8 | 1 |
| Total | 40 | 31 | 11 |
| (%) | (100) | (77,5) | (27,5) |

MA01 – Rio Negro/Praia de Ponta Negra (área de recreação); MA02 – igarapé São Raimundo; MA03 – igarapé Quarenta/Educandos; MA04 – Rio Negro/Educandos; MA05 – Rio Negro/Educandos no fim da área urbana de Manaus.

As concentrações virais variaram de acordo com o vírus e pontos de coleta. Considerando a área de recreação (MA01), apenas HAdV foi detectado e em concentrações de 10^3 a 10^4 CG/L (Figura 5.20). Os pontos MA02 a MA05 foram positivos para HAdV, RVA e NoV GII, exceto MA03, que foi negativo para NoV GII. Os pontos MA02 e MA03 (igarapés) apresentaram as maiores concentrações de HAdV (10^5 - 10^6 CG/L) e RVA (10^4 - 10^5 CG/L). As concentrações de NoV GII variaram de 10^3 a 10^4 CG/L nos pontos de amostragem.

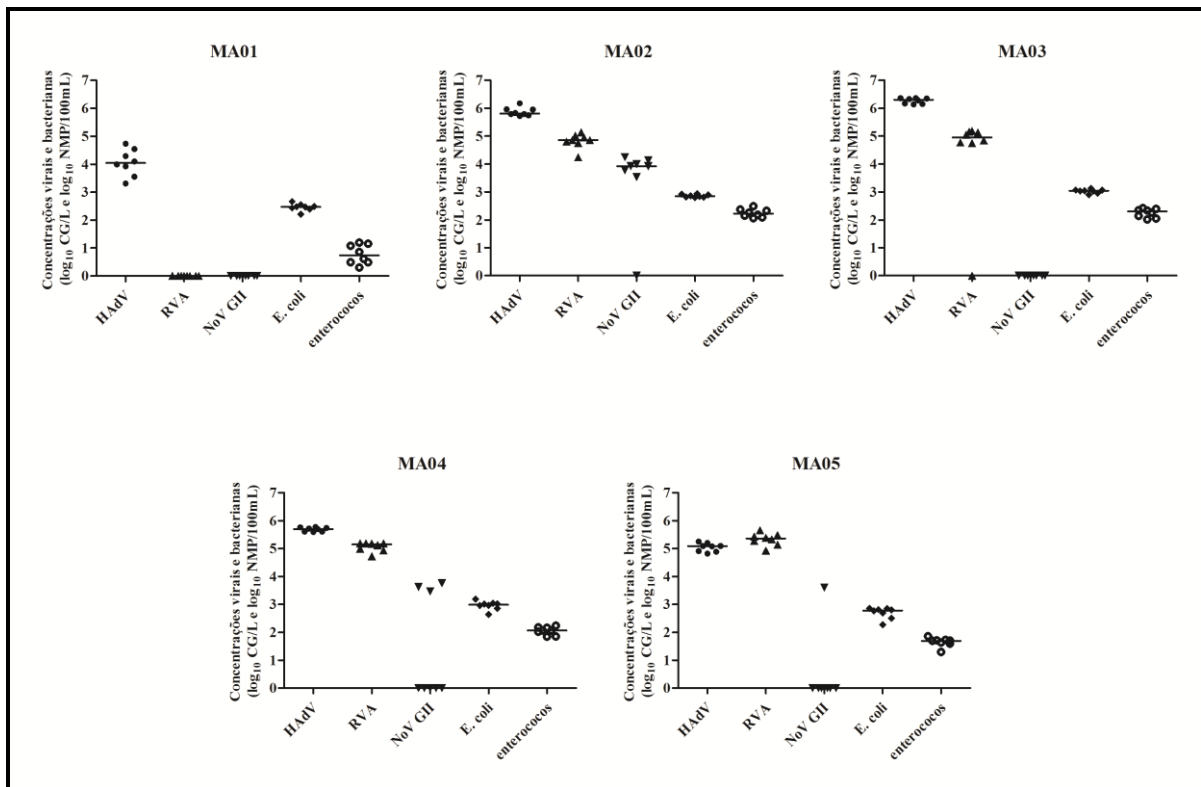


Figura 5.20. Quantificações virais e bacterianas em cada uma das oito amostras coletadas nos cinco pontos de coleta durante a cheia histórica do Rio Negro em Manaus, 2012. HAdV – adenovírus humano; RVA – rotavírus grupo A; NoV GII – norovírus genogrupo II; *E. coli* – *Escherichia coli*; log₁₀ CG/L – log₁₀ cópias de genoma por litro; log₁₀ NMP/100 mL – log₁₀ número mais provável por 100 mL; MA01 – Rio Negro/Praia de Ponta Negra (área de recreação); MA02 – igarapé São Raimundo; MA03 – igarapé Quarenta/Educandos; MA04 – Rio Negro/Educandos; MA05 – Rio Negro/Educandos no fim da área urbana de Manaus.

As detecções e concentrações virais observadas durante este evento extremo de cheia foram comparadas às obtidas nas amostragens realizadas nos mesmos pontos no período de seca (outubro) e cheia (julho) de 2011 (Figura 5.21 e Tabela 5.11). Foram observados diferentes percentuais de detecção, principalmente para RVA e NoV GII, e, portanto, em certos casos, as concentrações não puderam ser comparadas: RVA não foi detectado em alguns pontos na cheia e na seca em 2011 e NoV GII só foi detectado na cheia de 2012. Diferenças estatisticamente significativas nas concentrações virais foram observadas para HAdV e RVA (Tabela 5.11).

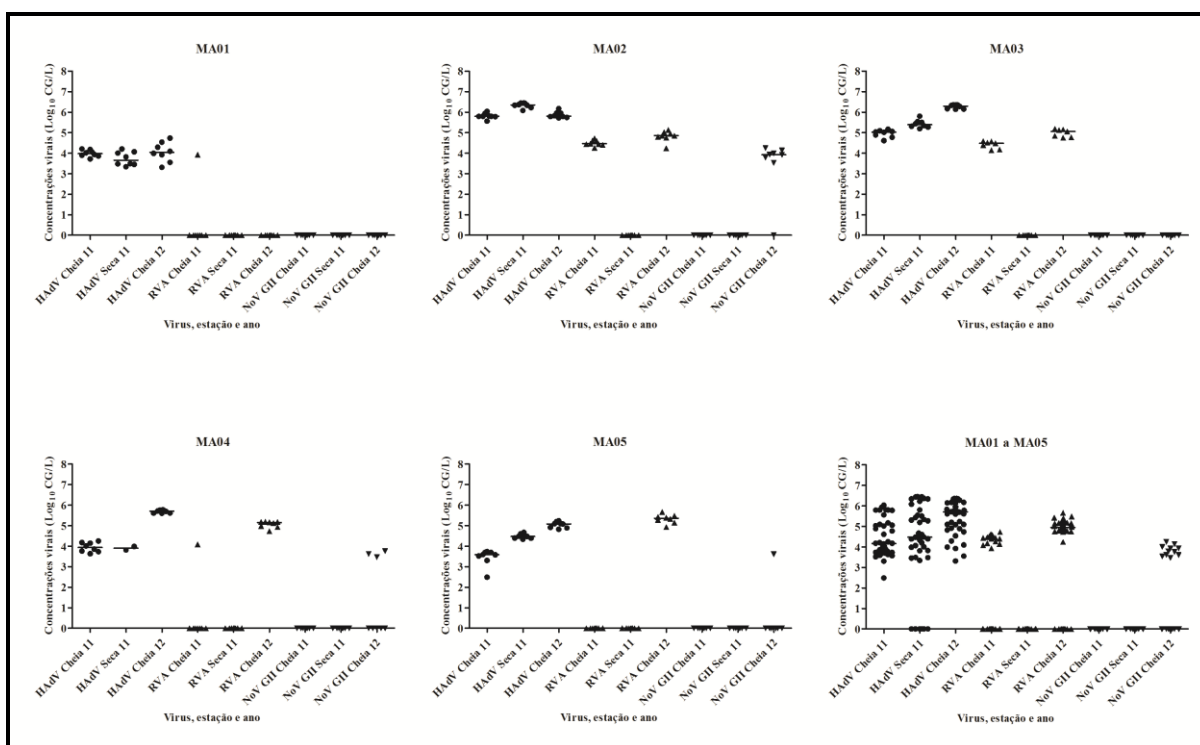


Figura 5.21. Concentrações de adenovírus humano (HAdV), rotavírus grupo A (RVA) e norovírus genogrupo II (NoV GII) na cheia histórica do Rio Negro em Manaus, 2012, e nos períodos de seca e cheia de 2011. Log₁₀ CG/L – log₁₀ cópias de genoma por litro; MA01 – Rio Negro/Praia de Ponta Negra (área de recreação); MA02 – igarápé São Raimundo; MA03 – igarápé Quarenta/Educandos; MA04 – Rio Negro/Educandos; MA05 – Rio Negro/Educandos no fim da área urbana de Manaus.

Tabela 5.11. Valores de p obtidos nos testes de Mann-Whitney para comparação das concentrações virais na cheia histórica de 2012 e nos períodos de seca e cheia de 2011.

| Pontos de coleta | HAdV | | RVA | | NoV GII | |
|------------------|-------------------------------|---------------------|-------------------------------|----------|----------|----------|
| | Cheia | Seca | Cheia | Seca | Cheia | Seca |
| MA01 | 0.6454 | 0.1949 | - | - | - | - |
| MA02 | 0.8785 | 0.0003 ¹ | 0.0104 ² | - | - | - |
| MA03 | 0.0002 ² | 0.0002 ² | 0.0006 ² | - | - | - |
| MA04 | 0.0002 ² | 0.0444 ² | - | - | - | - |
| MA05 | 0.0002 ² | 0.0002 ² | - | - | - | - |
| Total | <0.0001² | 0.0693 | <0.0001² | - | - | - |

¹concentrações inferiores na cheia recorde de 2012; ²concentrações superiores na cheia recorde de 2012; HAdV – adenovírus humano; RVA – rotavírus grupo A; NoV GII – norovírus genogrupo II; MA01 – Rio Negro/Praia de Ponta Negra (área de recreação); MA02 – igarápé São Raimundo; MA03 – igarápé Quarenta/Educandos; MA04 – Rio Negro/Educandos; MA05 – Rio Negro/Educandos no fim da área urbana de Manaus.

Todas as amostras positivas pela qPCR foram submetidas a protocolos de PCR qualitativo para caracterização viral. Doze amostras de HAdV, seis do ponto MA02 e seis do ponto MA03, foram amplificadas e os produtos de 301 pb foram sequenciados. A análise comparativa com sequências disponíveis no BLAST demonstrou que 11 amostras apresentaram 99% de identidade nucleotídica com HAdV 41 e uma com HAdV 2.

Das 31 amostras positivas para RVA, um total de 18 amostras foram caracterizadas com sucesso para G e/ou P. Com base na amplificação de fragmentos de 244 pb e 267 pb pela *semi-nested* PCR, nove amostras foram caracterizadas como G2 (três de MA02, uma de MA03, uma de MA04 e quatro de MA05) e nove amostras foram caracterizadas como P6 (três de MA02, três de MA04 e três de MA05), respectivamente. Deste total, somente três amostras de MA05 foram caracterizadas para ambos os genótipos. Além disso, uma destas três amostras de MA05 também apresentou a banda de 345 pb característica de RVA genótipo P8, sendo assim detectados os genótipos G2, P6 e P8 na mesma. Não foram observados resultados positivos por *semi-nested* PCR para NoV GII.

E. coli e enterococos foram detectadas em todas as amostras (Figura 5.20). Entretanto, considerando a regulamentação brasileira, todas as amostras de água estavam compatíveis com os padrões para ambos os indicadores. Assim, todas as amostras positivas para HAdV foram detectadas quando a quantificação de *E. coli* e enterococos estavam abaixo do limite estabelecido pela regulamentação para atividades recreacionais (Figura 5.22).

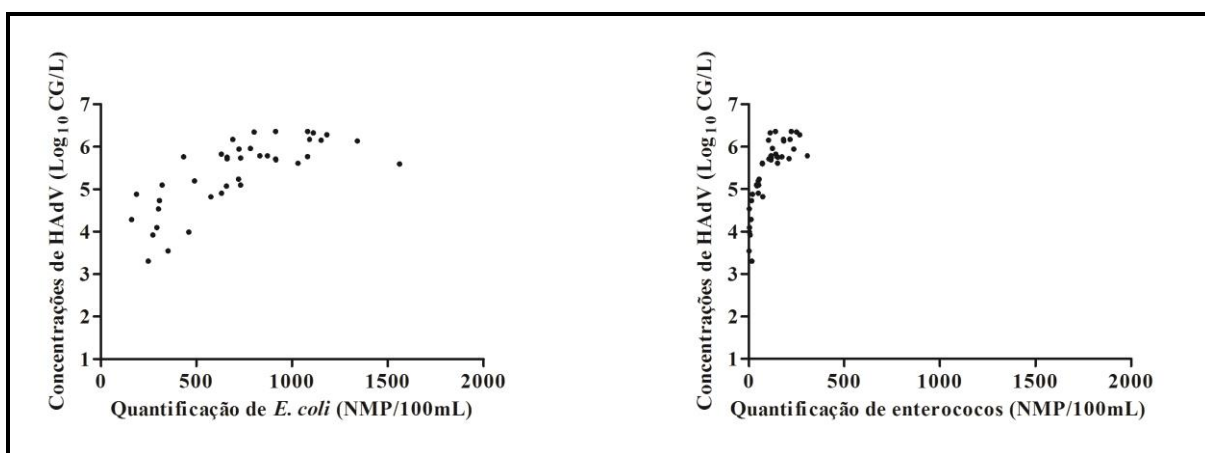


Figura 5.22. Concentrações de adenovírus humano (HAdV) em comparação às concentrações de *Escherichia coli* (*E. coli*) e enterococos como indicadores microbiológicos de contaminação fecal humana para águas de recreação em Manaus. Log₁₀ CG/L - log₁₀ cópias de genoma por litro; Log₁₀ NMP/100 mL - Log₁₀ Número Mais Provável por 100 mL.

Com relação aos parâmetros físico-químicos, as medianas de pH, condutividade, turbidez e temperatura em cada ponto de coleta encontram-se na Figura 5.23. Os parâmetros físico-químicos não apresentaram valores diferentes entre os locais de amostragem, exceto turbidez e condutividade, que foram mais elevadas nos pontos MA01 e nos pontos MA02 e MA03, respectivamente.

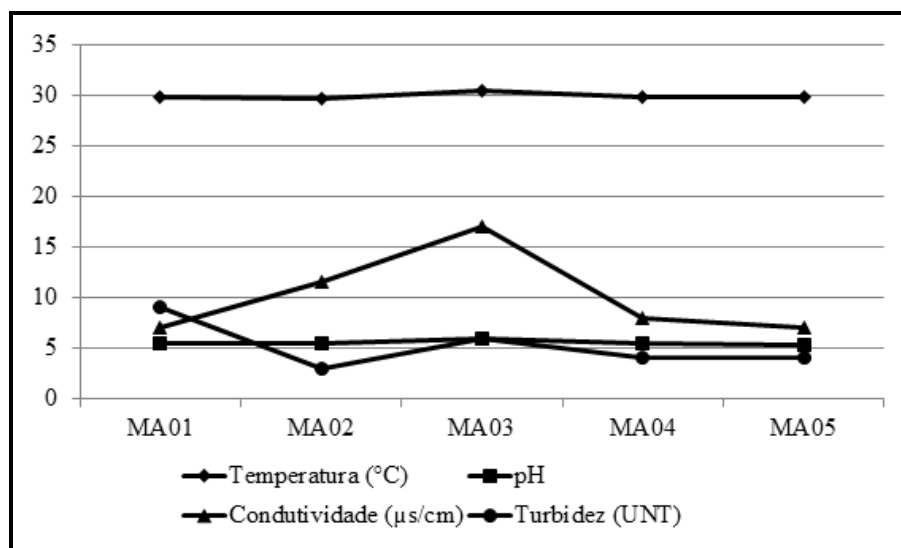


Figura 5.23. Valores médios dos parâmetros físico-químicos obtidos em cada ponto de amostragem durante a cheia histórica do Rio Negro em Manaus, 2012. MA01 – Rio Negro/Praia de Ponta Negra (área de recreação); MA02 – igarapé São Raimundo; MA03 – igarapé Quarenta/Educandos; MA04 – Rio Negro/Educandos; MA05 – Rio Negro/Educandos no fim da área urbana de Manaus.

6. DISCUSSÃO

Este estudo apresenta resultados pioneiros de disseminação e quantificação de vírus de origem humana e animal em ecossistemas aquáticos da cidade de Manaus. Estes dados foram obtidos com o intuito de rastrear as fontes de contaminação fecal nestas áreas e estimar o risco virológico de exposição a estes ambientes. Adicionalmente, vírus humanos clássicos e emergentes foram pesquisados nestes ecossistemas em evento extremo de cheia do Rio Negro na cidade. Anteriormente ao monitoramento conduzido para obtenção dos dados, também realizou-se avaliações das metodologias utilizadas, de modo que os resultados serão discutidos de acordo com as diferentes etapas empregadas neste estudo.

6.1. Avaliação das metodologias de concentração, detecção e quantificação de vírus de origem humana e animal

Os percentuais de recuperação obtidos pela metodologia de floculação orgânica demonstraram sua aplicabilidade nas águas ácidas provenientes dos ecossistemas aquáticos da cidade de Manaus, apesar da alta variabilidade observada no percentual dos vírus recuperados.

Descrita inicialmente para água do mar (Calgua et al., 2008) e validada posteriormente para água doce (Calgua et al., 2013a), a floculação orgânica com leite desnatado vem sendo utilizada na detecção de vírus humanos clássicos e emergentes em diferentes matrizes ambientais (Calgua et al., 2013a, 2013b; Victoria et al., 2014a). Este procedimento apresenta baixo custo e não requer equipamento especializado, sendo, portanto, um protocolo útil para a análise de rotina em laboratórios de saúde pública. Entretanto, sua eficácia depende de muitas variáveis, tais como a concentração viral na amostra e a matriz aquática (Calgua et al., 2013a).

Os percentuais de recuperação de RVA apresentaram baixa variabilidade entre os pontos, embora tenham sido inferiores aos 41 % (27-57 %) obtidos por Calgua e colaboradores (2013a) em amostras de águas de rio da cidade do Rio de Janeiro, aos 55 % obtidos por Victoria e colaboradores (2014a) em amostras de mar e, também, aos percentuais de recuperação obtidos para HAdV no presente trabalho. Vale lembrar que foram inoculadas diferentes concentrações de HAdV e RVA nestas amostras e não foram conduzidos estudos de inoculações de diferentes proporções e concentrações de HAdV e RVA.

Os percentuais de recuperação de HAdV apresentaram grande variabilidade (0-1283%) nas amostras de Manaus, sendo percentuais superiores a 100 % observados

especialmente nos igarapés da cidade (MA02 e MA03), indicando que as características das amostras podem influenciar na eficiência de recuperação viral. Variações altas também foram observadas nos demais estudos de caso do projeto *Viroclime* (dados não demonstrados) e quando utilizando a mesma metodologia de concentração para amostras de rio da cidade de Barcelona (50 %; 25-95 %) e Rio de Janeiro (41%; 21-89 %) (Calgua et al., 2013a). Além disso, este mesmo autor e Victoria e colaboradores (2014a) obtiveram resultados acima de 100 % quando aplicaram a mesma metodologia para testes de recuperação de NoV GII em amostras de rio e água do mar, respectivamente. Resultados acima de 100 % podem ser explicados pela heterogeneidade na distribuição viral na coluna d'água e formação de agregados virais no inóculo (Calgua et al., 2014; Victoria et al., 2014a).

O resultado negativo no experimento de recuperação de HAdV conduzido na Praia de Ponta Negra (MA01) pode ter se originado por problemas individuais em sua concentração, uma vez que foram detectados vírus nas outras amostras de água coletadas na mesma amostragem e inoculadas concentrações acima do limite de detecção ($5,7 \times 10^2$ CG/10 L) deste método.

De maneira geral, os percentuais de recuperação obtidos utilizando a metodologia de floculação para amostras de água doce apresentaram-se mais elevados quando comparados aos resultados obtidos pela metodologia de adsorção-eluição em membrana negativa aplicada a recuperação de RVA no Rio dos Macacos no Rio de Janeiro (2,1 %) (Vieira et al., 2012) e recuperação de HAdV por adsorção-eluição em lã de vidro (0,7-1,36 %), ultrafiltração (3,18-6,02 %) e filtros positivos (0,007-0,02 %) em amostras de água doce de Barcelona (Albiñana-Gimenez et al., 2009). A validação desta metodologia pelos laboratórios envolvidos, os resultados obtidos e o custo do método oferecem subsídios para sua utilização em novos estudos e estabelecimento em laboratórios de virologia ambiental.

A avaliação da repetitividade e reprodutibilidade dos protocolos de qPCR pela quantificação de suspensões de DNA de HAdV, JCPyV, PAdV e BPyV validou a aplicabilidade destes para a quantificação destes marcadores virológicos. Esses protocolos vêm sendo amplamente utilizados e já possibilitaram a detecção e quantificação viral em diferentes amostras de água em diferentes regiões do mundo (Bofill-Mas et al., 2013).

A associação da metodologia de floculação orgânica aos protocolos de qPCR foi utilizada com sucesso neste estudo, assim como nos outros países envolvidos no projeto *Viroclime* (Rusiñol et al., 2014, Anexo 6), demonstrando serem facilmente aplicáveis em análises de rotina de uma grande diversidade de matrizes de água.

Em relação à proficiência externa (QCMD), os resultados obtidos para HAdV e NoV GII validaram a utilização destes protocolos. Para HAdV, os resultados apresentaram menor sensibilidade para todos os sorotipos testados, o que pode ser explicado por perdas ao longo do processamento das amostras, incluindo pela extração com kit para RNA. A especificidade do protocolo de qPCR para a detecção de HAdV desenvolvido por Hernroth e colaboradores (2002) foi avaliada por Boffil-Mas e colaboradores (2006) e observou-se que os adenovírus pertencentes a todas as espécies humanas foram detectados em amostras ambientais quando aplicado o protocolo desta tese, que não inclui as duas sondas descritas por Hernroth e colaboradores. Boffil-Mas utilizou somente a sonda AP1, excluindo a sonda AP2 originalmente desenhada para detectar melhor alguns tipos de adenovírus sorotipo B. Isto poderia explicar a quantificação menor de adenovírus 34, que pertence ao sorotipo B, pelo nosso grupo na proficiência.

Apesar desse resultado, 92 % das amostras do monitoramento e 100 % das amostras da enchente histórica foram positivas para HAdV e, quando submetidas a protocolos de sequenciamento genômico que amplificam todos os sorotipos de HAdV (Allard et al., 2001), foram detectados majoritariamente HAdV 41, indicando que pode não ter havido perda na detecção dos três sorotipos nas amostras de Manaus. Os HAdV 1, 4 e 34 vêm sendo pouco ou não detectados em amostras ambientais, enquanto o HAdV 41 tem sido descrito como o mais prevalente em amostras ambientais (van Heerden et al., 2005; Jiang, 2006; Cantalupo et al., 2011; Hartmann et al., 2013; Ogorzaly et al., 2015).

No nosso estudo, o RNA/DNA viral extraído a partir dos concentrados foi diluído até 100 e 1000 vezes para evitar resultados falsos negativos pela presença de inibidores, tais como matérias orgânicas e substâncias húmicas presentes nas águas de Manaus. Adicionalmente, resultados negativos podem representar concentrações virais abaixo dos limites de detecção dos métodos aplicados. Embora os métodos moleculares tenham maior sensibilidade e especificidade, a co-concentração de inibidores de PCR pode representar uma limitação para a utilização deste método na detecção viral em amostras de água (Girones et al., 2010; Hamza et al., 2011; Hata et al., 2015).

Embora a detecção do ácido nucléico pela PCR não permita a distinção entre partículas virais infecciosas e não-infecciosas (Girones et al., 2010; Hamza et al., 2011), resultados preliminares de ensaios de cultura de células demonstraram a presença de partículas infecciosas de HAdV nas amostras de Manaus (dados não demonstrados). Adicionalmente, o contínuo despejo de esgotos nos ambientes aquáticos da cidade e a redução de 2-3 log₁₀ no número de partículas virais infecciosas em comparação ao número de cópias

de genoma detectados por qPCR (Rutjes et al., 2009; Calgua et al., 2011) indicam uma possível concentração elevada de partículas infecciosas nestes ambientes.

6.2. Monitoramento das águas do Rio Negro e dos igarapés da cidade de Manaus/AM considerando o ciclo hidrológico deste rio, no período de janeiro de 2011 a maio de 2012, pela detecção e quantificação de vírus de origem humana e animal

6.2.1. Rastreamento das fontes de contaminação humana e animal

A alta taxa de detecção de vírus de origem humana nas águas de Manaus retrata as condições precárias de saneamento básico na região, apesar das obras de infraestrutura realizadas pelo PROSAMIM. Por outro lado, a baixa detecção dos marcadores virais de origem suína e bovina está de acordo com informações locais que descrevem a ausência de atividades significativas de criação destes animais na área estudada. A detecção de marcador viral de origem suína no igarapé São Raimundo reflete uma possível criação remanescente desses animais ao longo deste córrego, enquanto a detecção do marcador bovino na região da bacia do Educandos confirma a atividade de criação destes animais na bacia, especificamente no fim da área urbana da cidade.

Os resultados obtidos neste estudo confirmam a contaminação fecal essencialmente de origem humana dos ambientes aquáticos de Manaus e, em associação aos obtidos nos outros quatro estudos de caso do projeto *Viroclime*, demonstram a especificidade e a aplicabilidade dos parâmetros virais em diferentes regiões geográficas (Rusiñol et al., 2014; Anexo 6).

6.2.2. Detecção de vírus gastroentéricos

Infelizmente, este estudo revelou que as intervenções infraestruturais realizadas na cidade pelo PROSAMIM nos últimos anos (2005-2012) (PROSAMIM, 2004, 2011; PROSAMIM III – RIMA, 2012) com objetivo de melhorar as condições do meio ambiente, de habitação e saúde da população ainda não estancou a contaminação dos seus rios por esgotos, o que continua afetando especialmente as pessoas que vivem abaixo da cota de inundação de 30 m.

A prevalência de RVA e NoV no ambiente representa sua circulação na população e pode ter sido influenciada por sua sazonalidade, ocorrência de surtos e também pela menor

estabilidade de vírus RNA em ambientes aquáticos (Fong & Lipp, 2005; Levy et al., 2009; Rohayem, 2009; Fumian et al., 2011; Prevost et al., 2015). Isto explica a detecção de NoV GII apenas em janeiro de 2011 (estação seca) e a detecção de RVA na época das cheias.

Foram notáveis as diferenças observadas tanto na distribuição como na concentração de vírus detectados nos igarapés (MA02 e MA03) e no Rio Negro (MA01, MA04 e MA05). A concentração viral nos igarapés foi semelhante às encontradas em amostras de esgoto de diferentes áreas geográficas, cujos valores foram de quatro a seis \log_{10} (Flannery et al., 2012; Calgua et al., 2013b; Fumian et al., 2013; Myrmel et al., 2015). Como esses córregos “esgoto-like” são afluentes do Rio Negro, os vírus são transportados pelo fluxo natural para este rio, onde são diluídos e dispersos. Vale a pena observar as taxas de detecção mais elevadas de RVA nestes pontos quando comparado às amostras diluídas do Rio Negro. A alta prevalência deste vírus foi anteriormente observada nos igarapés (Miagostovich et al., 2008), bem como em estudos de virologia ambiental realizados em outros países da América Sul, como Venezuela, Argentina e Uruguai (Rodríguez-Díaz et al., 2009; Barril et al., 2010; Victoria et al., 2014b; Barril et al., 2015). O alto percentual de detecção demonstra a morbidade por RVA nessa região, apesar dos programas de vacinação introduzidos em alguns desses países na última década (PATH, 2015). Embora as amostras obtidas nestes igarapés tenham sido semelhantes aos esgotos, a detecção NoV GII foi inferior quando comparada aos outros vírus, corroborando um estudo anterior nesta área (Miagostovich et al., 2008).

Em Manaus, o RVA foi responsável por 25 % da GA em crianças até três anos de idade em 2004-2006 (Melo et al., 2013) e, pelo nosso conhecimento, não há dados disponíveis sobre casos de NoV na cidade. A indisponibilidade de dados laboratoriais que caracterizem os agentes etiológicos da diarreia em Manaus infelizmente não permite uma correlação específica destes casos com esses patógenos virais e, conseqüentemente, a associação dos casos de gastroenterite viral com o aumento do nível do Rio Negro.

6.2.3. Detecção e quantificação viral considerando os pontos de coleta e o ciclo hidrológico do Rio Negro

Diferenças na distribuição dos vírus estudados foram observadas nos pontos de amostragem dos igarapés e ao longo do Rio Negro. Os igarapés apresentaram as maiores taxas de detecção e quantificação viral, refletindo o lançamento de esgoto nesses ambientes que correm ao longo das áreas urbanas de Manaus.

Com relação aos pontos situados ao longo do Rio Negro, a Praia de Ponta Negra (MA01), localizada no início da área urbana da cidade, é uma área de lazer, onde milhares de pessoas se banham toda semana. Apesar do lançamento direto de esgoto neste rio e a descarga do esgoto coletado adequadamente atingir este ambiente aquático pelo sistema de drenagem público e/ou pelo emissário submarino, a Ponta Negra é a área menos afetada, uma vez que não recebe contaminação a partir dos igarapés que atravessam áreas densamente povoadas de Manaus. Apesar de ser o local menos contaminado, todos os vírus foram detectados no ponto MA01, com detecção mais elevada de NoV GII na estação seca e diferenças estatisticamente significativas na concentração de JCPyV.

Nos seguintes pontos de amostragem ao longo do Rio Negro (MA04 e MA05), observou-se maiores prevalências e concentrações virais quando comparadas às observadas no MA01. É importante notar que MA04 está localizado na foz do igarapé Quarenta, que atravessa vários bairros povoados na parte sul da cidade, e o MA05 representa o fim da área urbana ao longo do Rio Negro e está localizado ao lado de um porto. A sua contaminação viral pode ser proveniente do porto ou pode ser resultado do fluxo do rio, que transporta a contaminação de toda a cidade.

Quanto às diferenças observadas entre as estações hidrológicas do Rio Negro, observou-se maior detecção de NoV GII na seca e de HAdV, JCPyV e RVA na cheia, sendo mais evidente o impacto na disseminação e concentração viral deste último. Quando o nível do rio sobe, a água inunda mais áreas, carreando estes microrganismos e ampliando a sua distribuição para ambientes mais distantes. Maiores detecções e concentrações de RVA foram também observadas em rio da Argentina quando em período chuvoso e de maior vazão (Prez et al., 2015).

Uma vez que o ciclo hidrológico do Rio Negro é anual e as pessoas estão mais em contato com a água durante o período de inundação, é possível inferir uma associação desta estação com o aumento do número de casos de gastroenterite na região, especialmente em 2012, quando foi observada a cheia mais extrema em 110 anos. A observação da maior detecção e concentração de vírus descritos neste estudo durante a época das cheias, especialmente no ponto MA04 no Rio Negro, corrobora a dinâmica do transporte de vírus nessa bacia hidrográfica.

6.2.4. Qualidade da água por indicadores bacteriológicos e virais de contaminação fecal humana

A quantificação de *E. coli* e enterococos como padrões microbiológicos de contaminação fecal no ambiente demonstrou que todas as áreas estudadas apresentaram contaminações por esgoto, apesar das diferenças entre elas. Os números excederam os padrões brasileiros para águas de recreação principalmente nos igarapés e quando o Rio Negro apresentou seu menor nível no período de monitoramento, demonstrando a influência do nível deste rio na concentração destes microrganismos nos ambientes aquáticos da cidade de Manaus.

As altas frequências e concentrações de HAdV e JCPyV durante todo o monitoramento e as correlações observadas nesta tese sugerem que estes vírus podem ser candidatos a indicadores de contaminação fecal humana das águas. O uso de HAdV em particular poderia complementar as bactérias indicadoras fecais no monitoramento de ambientes aquáticos e esta nova abordagem com múltiplos indicadores poderia melhor estimar o risco de doenças transmitidas pela água devido ao contato com esses ambientes contaminados, como foi proposto por outros estudos (Wyer et al., 2012; Hewitt et al., 2013; Marion et al., 2014). Infelizmente, não foi possível realizar um estudo para se determinar qual concentração de HAdV poderia estar correlacionada estatisticamente com efeitos adversos à saúde.

6.2.5. Caracterização dos ambientes aquáticos por parâmetros físico-químicos

O ciclo hidrológico do Rio Negro também causou alterações estatisticamente significativas nos parâmetros físico-químicos nos pontos de estudo, embora maiores diferenças tenham sido observadas nos igarapés, o que pode ser explicado pelas diferenças no volume de água durante os períodos de seca e de cheia. Durante a época das cheias, a água dilui a matéria orgânica, os compostos químicos e os materiais suspensos nessas áreas, diminuindo a turbidez, condutividade e pH.

A turbidez é descrita como um importante fator na resistência das partículas virais em amostras ambientais. A adsorção dos vírus ao material em suspensão ajuda na proteção destas partículas contra enzimas e compostos presentes na água e a inativação por UV (Fong & Lipp, 2005). Apesar disso, partículas virais vêm sendo detectadas em ambientes de turbidez baixa,

como água potável, piscinas, praias e rios, e alta, como águas contaminadas por esgoto e esgotos (van Heerden et al., 2005; Hamza et al., 2009a; Wong et al., 2009; Calgua et al., 2013a; Fumian et al., 2013).

A condutividade foi o parâmetro que apresentou maior diferença entre os períodos de seca e cheia e especialmente nos igarapés. Isto pode representar a maior e menor concentração de íons na água contaminada por esgotos e gerados a partir de processos de decomposição na seca e na cheia, respectivamente. A força iônica também influencia na adsorção e agregação viral influenciando na interação eletrostática entre os vírus e materiais em suspensão (Wong et al., 2012b).

Os valores de pH apresentaram maiores alterações também nos igarapés. Este parâmetro apresentou menores valores na cheia, possivelmente em função do maior volume de águas ácidas nesses pontos nessa estação. O pH influencia a estabilidade, adsorção e agregação das partículas virais e estes microrganismos têm sido detectados em amostras de água em diferentes faixas de pH (Sobsey et al., 1980; Miagostovich et al., 2008; Hamza et al., 2009a; Wong et al., 2009, 2012b).

A temperatura é descrita como um fator chave na inativação viral, especialmente quando em valores elevados e em matrizes complexas, tais como as águas doces (Bertrand et al., 2012). Apesar de terem sido observados valores altos de temperatura em Manaus em todos os pontos e períodos estudados, não foi possível determinar o impacto deste parâmetro na redução da concentração de partículas infecciosas presentes nesse ambiente, uma vez que o tempo que as partículas virais estão expostas a estas temperaturas também influencia no aumento da sua inativação (Fong & Lipp, 2005). Além disso, partículas virais infecciosas são encontradas em amostras de esgoto, que apresentam elevadas temperaturas (Jiang et al., 2009; Li et al., 2010; Calgua et al., 2011).

O risco de transmissão de doenças virais de veiculação hídrica depende da capacidade de estes microrganismos estarem infecciosos no momento da exposição de hospedeiros suscetíveis. Uma vez que os parâmetros físico-químicos influenciam a estabilidade viral, a adsorção e a interação entre os vírus e os materiais suspensos, os mesmos devem ser considerados em estudos ambientais relativos à sua correlação com os vírus pesquisados. Além disso, é importante estimar o tempo decorrido entre o lançamento dos vírus nos ambientes aquáticos e a exposição ao ambiente (Carter, 2005; Fong & Lipp, 2005; Wong et al., 2012b). Em Manaus, não foi possível fazer esta estimativa, uma vez que estes microrganismos podem ser eliminados na água ao longo do dia, mês ou ano e por fontes difusas devido à falta de saneamento na cidade. Entretanto, dados preliminares de cultura

celular apontam partículas virais infecciosas nos ecossistemas aquáticos de Manaus (dados não demonstrados).

6.2.6. Avaliação de risco de infecções por rotavírus grupo A (RVA)

Esse é o primeiro estudo de avaliação de risco de infecções virais pelo contato com ambientes aquáticos conduzido no Brasil e apresenta um grande avanço em termos de qualidade de água no país. A avaliação de risco empregada nesta tese representa uma primeira abordagem geral de cenários visando estabelecer as metodologias e reconhecer possíveis desafios para futuros trabalhos na área.

Uma série de fatores pode ser considerada na escolha do patógeno para avaliação de risco, incluindo prevalência, patogenicidade e resistência ambiental. Uma vez que o MST conduzido no Rio Negro e nos igarapés da cidade de Manaus apontou para a contaminação essencialmente humana desses ambientes e os indicadores bacteriológicos não correlacionam bem com os patógenos virais, estudos de análise de risco de infecções virais tornam-se necessários a fim de se apontar o real problema de saúde pública desencadeado nessa região pelo contato com estes ambientes contaminados.

Apesar da indicação do HAdV como possível marcador viral de contaminação fecal humana em ambientes aquáticos, optou-se por começar os estudos de avaliação de risco por infecções pelo RVA em função da sua importância epidemiológica no Brasil, pelo aumento do número de casos de gastroenterite durante as cheias e pela observação de aumentos estatisticamente significativos tanto na detecção como na concentração deste vírus nas águas da cidade.

Três pontos de coleta foram escolhidos para a avaliação de risco em função de serem os pontos de maior contato da população com os ambientes aquáticos de Manaus e, conseqüentemente, as vias de exposição foram estabelecidas em função destes contatos: MA01 por ser a principal área de recreação da área urbana de Manaus e os pontos MA02/MA03 por representarem áreas em que há ribeirinhos que utilizam a água para diversos fins e que sofrem com as inundações na cidade, além de serem os pontos mais contaminados na cidade.

As atividades recreacionais nos igarapés (MA02/MA03) apresentaram maiores riscos de infecção pelo RVA que na Ponta Negra (MA01), embora o risco de infecção neste último não tenha sido baixo. Como as pessoas vivem em casas de madeira construídas ao longo destes córregos e estão expostas às suas contaminações, intervenções devem ser conduzidas

nessas áreas de modo a reduzir este risco e incluem a construção de Estações de Tratamento de Efluentes (ETE) na cidade, com suas respectivas redes coletoras, e a adoção de medidas preventivas de exposição e higiene pela população. Estudos epidemiológicos e de avaliação de risco demonstraram que as atividades em águas utilizadas para recreação contaminadas por fezes representam risco de doenças gastrointestinais, inclusive doenças virais (Wade et al., 2003; Soller et al., 2010).

As probabilidades de infecção de adultos foram inferiores as de crianças, uma vez que estas ingerem mais águas em suas atividades ao nadarem com mais frequência, ficarem na água por mais tempo e submergirem suas cabeças também com maior frequência (Schets et al., 2011). Mesmo a diferença de risco não sendo muito grande entre crianças e adultos, isto traz preocupações sobre o impacto na saúde das crianças, uma vez que, ao ingerirem mais volumes de água, elas estão mais vulneráveis. As probabilidades médias de infecção por RVA pela recreação de crianças nas águas na Ponta Negra (0,77) e nos igarapés (0,87) de Manaus podem ser comparadas às observadas por Katukiza e colaboradores (2014) para crianças brincando e nadando em canais de uma favela em Uganda, na África Sub-Saariana (0,6-0,8). Considerando os adultos, as probabilidades de infecção pelo contato tanto com a água de recreação (0,71) como com os igarapés (0,84) da cidade de Manaus foram superiores as de 0,4-0,6 observadas pela exposição às águas do Rio Buffalo, África do Sul (Chigor et al., 2014), e semelhante aos 0,7-0,8 de risco diário pela exposição ao rio Suquía na Argentina (Prez et al., 2015).

As estimativas de risco de infecções em crianças pelo contato mão-boca foram menores que as obtidas para recreação em função da ingestão de menor volume de água contaminada por evento de exposição. Apesar dessa diferença, o contato mão-boca também é uma exposição importante para as crianças nos igarapés, enfatizando a necessidade de intervenções e medidas preventivas nestas áreas.

Diferentes trabalhos estimam a probabilidade de doença causada por vírus pela multiplicação da probabilidade de infecção por 0,5 e também expressam a caracterização do risco em DALYs (Incapacidade ajustada de anos de vida, do inglês *Disability Adjusted Life Years*) ou número de infecções por 1.000 banhistas por ano (Haas et al., 1993; Katukiza et al., 2013; Machdar et al., 2013; Chigor et al., 2014; Ming et al., 2014). Entretanto, em função da complexidade genotípica dos RVA e da ausência de dados sobre imunidade, casos de GA associados aos RVA por parte da população exposta e número de pessoas expostas aos ambientes estudados, optou-se pela probabilidade de infecção como resultado da avaliação de risco.

A caracterização molecular das amostras positivas de RVA confirmou a presença de RVA [P8] e indicou a contínua circulação deste genótipo em amostras ambientais de Manaus (Ferreira et al., 2009). O genótipo P8 está compreendido na vacina monovalente de RVA e, portanto, a sua detecção no ambiente poderia não representar risco para a população exposta. Entretanto, para se associar genótipo ambiental, vacina e população, deve-se realizar um estudo baseando-se em todos os segmentos do genoma dos rotavírus. Apesar da identidade nucleotídica com amostras G2P4 e G3P9 e da descrição desses genótipos em amostras ambientais e provenientes de casos de GA em Manaus (Ferreira et al., 2009; Melo et al., 2013), não se pode concluir que as amostras pertencem a estes genótipos, em função de eventos de *reassortments* pelos RVA. Adicionalmente, uma vez que apenas parte das amostras foi caracterizada, há um potencial viés na interpretação da diversidade genética dos tipos virais encontradas nestes três pontos.

Os resultados de caracterização molecular das amostras positivas para RVA corroboram estudos prévios que demonstram a dificuldade em se caracterizar amostras ambientais, especialmente quando estes vírus encontram-se em baixas concentrações, e também a menor eficiência dos protocolos para caracterização binária dos RVA (Ferreira et al., 2009; Vieira et al., 2012). A caracterização de HAdV comprovou a poluição fecal humana dos ambientes estudados.

Os modelos conceituais adotados nesta tese incluíram a concentração de partículas virais na água, a eficiência da metodologia de recuperação viral, a infecciosidade viral, o volume de água ingerido por exposição, modelos DR e probabilidade de infecção.

Para a determinação da concentração viral, foi considerada a análise de incertezas baseando-se em diferentes dimensões e escalas, estratégia muito importante visto que pequenas variações na curva padrão representam diferenças mais elevadas sobre a concentração de vírus, uma vez que uma unidade de ct é traduzida para uma escala logarítmica. Para a composição das curvas de distribuição de probabilidade gamma da concentração viral, foram consideradas todas as 56 amostras obtidas nos pontos de coleta, o que gera resultados subestimados das concentrações de RVA pela inclusão de amostras negativas e estima o risco de infecções por RVA em Manaus sem discriminar período de cheia e seca. Apesar disto, pelos resultados de detecção e quantificação obtidos nesta tese, infere-se maior risco de infecções durante a cheia do Rio Negro. Dados obtidos por Ming e colaboradores (2014) demonstraram diferentes riscos de infecção por RVA pelo contato com água do mar de acordo com as estações do ano na China.

A eficiência de recuperação da metodologia utilizada e a infecciosidade viral também são importantes fatores no modelo de risco adotado e podem ter contribuído para resultados semelhantes entre os pontos de recreação e igarapés. A primeira pelas baixas recuperações do método nos pontos de estudo e a segunda pela homogeneidade da distribuição, que pode sub ou superestimar o risco. Além disso, os dados de recuperação utilizados foram obtidos em coleta prévia ao período de monitoramento.

Os três últimos parâmetros adotados neste modelo conceitual, volume de água ingerido, modelo DR e probabilidade de infecção, representam limitações não só para esta tese, como também para diferentes estudos de avaliação de risco de infecções por RVA pelo contato com matrizes ambientais. Para ingestão de água em atividades recreacionais não há um volume estabelecido para o Brasil, sendo necessária a utilização de modelos que podem não bem representar as condições reais de exposição. As distribuições de volume de ingestão durante atividades recreacionais empregadas nesta tese foram estabelecidas por Schets e colaboradores (2011) na Holanda pela combinação de testes e questionários para diferentes faixas etárias, tipos de água, incluindo água de rio, frequência e duração do contato. Dufour e colaboradores (2006) estabeleceram volumes de ingestão para atividades recreacionais em piscinas e sugeriu que esses volumes poderiam também ser aplicados aos nadadores de água doce, porém não forneceram dados para substanciar esta sugestão. Dorevitch e colaboradores (2011) estabeleceram o volume de água ingerido durante uma variedade de atividades recreativas em água de piscina, porém não compararam o volume de água ingerido por adultos e por crianças. Valores como 30 mL e 100 mL também já foram assumidos para ingestão por crianças em atividades recreacionais (Haas, 1983; Crabtree et al., 1997).

O produto final de caracterização do risco gerado pelo QMRA realizado nesta tese foi o risco de infecção após exposição à água contaminada por RVA. Para isso, foi utilizado o modelo beta-poisson como DR. Este foi desenvolvido por Ward e colaboradores (1986) utilizando dados de ensaios clínicos conduzidos com voluntários adultos do sexo masculino, enquanto o RVA causa doença principalmente em crianças, e em países desenvolvidos, o que pode não ser preciso quando aplicado aos países em desenvolvimento. Além disso, a unidade da dose utilizada no ensaio ambiental necessita ser estimada em conformidade com o formato utilizado para descrever o modelo. Para o desenvolvimento do modelo de RVA, a dose utilizada foi Unidade Formadora de Foco (UFF), enquanto na tese foi utilizado CG/L, o que pode superestimar o risco de infecção. RVA são vírus fastidiosos e as amostras ambientais podem apresentar características que dificultem a aplicação de metodologias de quantificação de partículas infecciosas dificultando, assim, a estimativa real do risco.

6.3. Cheia histórica do Rio Negro em Manaus, junho de 2012

No dia 29 de maio de 2012, o nível do Rio Negro atingiu 29,97 m, inundando 16 bairros de Manaus, afetando áreas residenciais e comerciais da cidade. Caracterizada como a cheia mais grave do Rio Negro desde 1902, quando se iniciou as medições do nível deste rio em Manaus (Porto de Manaus, 2015), este nível recorde de água manteve-se por 10 dias, afetando mais de 29.000 pessoas em várias regiões da cidade, em especial as que viviam em palafitas localizadas nas margens dos igarapés (Marengo et al., 2013; Satyamurty et al., 2013).

A doença diarréica foi relatada como a principal doença registrada nessas áreas (Portal Amazônia, 2012). Diante desse quadro, preocupações sobre o risco de transmissão de doenças infecciosas de veiculação hídrica nas áreas afetadas foram suscitadas e um estudo sobre a disseminação de vírus clássicos e emergentes associados à diarréia foi conduzido, de forma a demonstrar possíveis transmissões de doenças virais pelo contato com esses ambientes. Estudos realizados na China e na Alemanha demonstraram que as inundações contribuíram para um aumento do risco de diarréias infecciosas em áreas alagadas, sendo o contato com a água da enchente o principal fator de risco (Schnitzler et al., 2007; Ding et al., 2013).

Apesar do estudo de uma ampla gama de patógenos virais nos ambientes aquáticos de Manaus durante esta cheia, somente os vírus clássicos (RVA e NoV GII) e o marcador viral de contaminação fecal humana (HAdV) foram detectados. A metodologia de floculação utilizada nesta tese já foi empregada na detecção de vírus clássicos e emergentes em amostras de rio (Calgua et al., 2013b), sugerindo que a não detecção dos demais agentes etiológicos virais pode refletir a sua não circulação nesse ambiente ou que suas concentrações encontram-se abaixo do limite de detecção dos métodos aplicados. Dentro do nosso conhecimento, esta é a primeira investigação de NoV GIV, SaV, HBoV e AiV em amostras de rio no Brasil, uma vez que KV foi detectada por Calgua e colaboradores (2013a) em amostras de água de rio do Rio de Janeiro.

A cheia histórica de 2012 apresentou impacto na disseminação viral nos ambientes aquáticos da cidade, quando concentrações mais elevadas destes patógenos foram observadas e o NoV GII voltou a ser detectado após meses de monitoramento. Apesar de esta tese demonstrar a associação entre o aumento do número de casos de GA e a elevação do nível do Rio Negro, não foi possível conduzir o estudo sobre a associação entre o nível do rio e casos de gastroenterites virais pela ausência de dados de diagnóstico viral nestes casos.

O HAdV foi o vírus mais prevalente, sendo detectado em todas as amostras estudadas, corroborando os dados do monitoramento e os estudos previamente citados que os apontam como marcadores virais de contaminação fecal humana em ambientes aquáticos, especialmente porque todas as amostras de água encontravam-se em conformidade com os padrões bacteriológicos estabelecidos pela norma brasileira para águas de recreação.

As amostras positivas para HAdV apresentaram-se mais relacionadas a HAdV 41 e HAdV 2, adenovírus humanos espécies F e C (ICTV, 2015), respectivamente. O HAdV 41 é responsável por doenças gastrointestinais em jovens e tem sido o tipo mais prevalente em esgotos, águas contaminadas por esgoto e águas de inundação (Rohayem et al., 2006; Fumian et al., 2013; Hartmann et al., 2013; Kuo et al., 2015; Ogorzaly et al., 2015; Osuolale & Okoh, 2015). O HAdV 2 causa doenças respiratórias e também é detectado em amostras de esgoto, embora em menor prevalência (Ogorzaly et al., 2015; Osuolale & Okoh, 2015). No Brasil, o HAdV 2 tem sido detectado em crianças apresentando quadros de doença respiratória aguda (Luiz et al., 2010).

O RVA foi detectado em todos os pontos de amostragem, com exceção ao MA01, e a sua detecção neste evento extremo corrobora a maior prevalência deste vírus no período de cheia do Rio Negro. RVA também foi detectado em cheias na Tailândia (Ngaosuwanikul et al., 2013) e foi o segundo patógeno mais frequentemente identificado em Bangladesh durante as três inundações consecutivas em 1988, 1998 e 2004 (Ahmed et al., 1991; Schwartz et al., 2006), quando a sua detecção foi associada ao aumento no número de casos de gastroenterite durante e/ou após a inundação.

Os métodos de PCR utilizados para a classificação binária de RVA apresentou-se como uma ferramenta útil para demonstrar a circulação dos genótipos G2, P6 e P8 nas águas de Manaus. Estudos realizados com amostras clínicas e ambientais demonstraram que esses genótipos vêm sendo detectados no Brasil, inclusive em Manaus (Ferreira et al., 2009; Fumian et al., 2011; Oliveira et al., 2012; Soares et al., 2012; Gómez et al., 2013; Melo et al., 2013). A detecção de uma amostra genótipo P8 demonstra a sua baixa prevalência quando comparado aos demais genótipos e indica a sua contínua circulação na população, apesar do programa de vacinação de RVA com a vacina monovalente G1[P8] estabelecido em 2006. Este foi o genótipo mais detectado em amostras ambientais de Manaus em 2004-2005, em período pré-vacinal (Ferreira et al., 2009). Os dados sobre a detecção, quantificação e caracterização molecular de RVA destacam a importância do monitoramento ambiental como uma ferramenta para estudos de epidemiologia desses vírus na população humana circundante e pode ser útil em programas de monitoramento contínuo de vacinas.

O NoV GII apresentou a menor taxa de detecção na enchente e foi detectado em três locais de amostragem, o que corrobora os dados qualitativos prévios obtidos em Manaus (Miagostovich et al., 2008). Este vírus tem sido detectado em enchentes, sendo responsável por casos de gastroenterite durante e após a ocorrência de inundações pela exposição direta à água contaminada e foi descrito como um dos agentes patogênicos durante surtos após eventos extremos de cheia (Schmid et al., 2005; Phanuwat et al., 2006; Cann et al., 2013; Ngaosuwan et al., 2013; de Man et al., 2014b). A não caracterização dos genótipos de NoV GII circulantes pelos protocolos utilizados pode estar associada às baixas concentrações destes vírus nas amostras.

Assim como observado no monitoramento, houve diferenças na detecção e concentrações de vírus entre os locais de amostragem, sendo igarapés as áreas mais contaminadas e onde os vírus foram novamente detectados em concentrações semelhantes às encontradas em amostras de esgoto de diferentes áreas geográficas (Fumian et al., 2011; Flannery et al., 2012; Calgua et al., 2013b; Fumian et al. 2013; Myrmet et al., 2015). A disseminação e as altas concentrações virais observadas nos igarapés afetam diretamente as comunidades ribeirinhas que vivem nessas áreas, cujas casas foram inundadas e que usam estas águas para muitas finalidades. O risco de infecções pela exposição a esses patógenos poderia ser reduzido mantendo os habitantes longe das suas casas. No entanto, em Manaus, há a distribuição de tábuas de madeira pelo governo para a construção das chamadas “marombas”, que são assoalhos de madeira construídos conforme a subida da água do Rio Negro e que passam a ser o solo dessas residências. Além disso, também são construídas passarelas de madeiras nas áreas alagadas para a movimentação da população.

Conforme a vazante do Rio Negro se acentua, a população desmonta as “marombas” e retoma as suas condições de habitação. Entretanto, os riscos de doenças gastrointestinais parecem ser importantes também nos períodos pós-cheias por procedimentos de limpeza ou por transmissão secundária pessoa-a-pessoa (Schmid et al., 2005; Fewtrell & Smith, 2007; Hashizume et al., 2008; Fewtrell et al., 2011).

Os parâmetros físico-químicos também foram mensurados nessas águas, apresentando pequenas diferenças entre os locais de amostragem, o que confirma as características de cada ponto de coleta.

A compreensão da epidemiologia das doenças relacionadas à água durante eventos extremos ajudaria os médicos e autoridades de saúde pública a se prepararem para eventos futuros, não só para os mais extremos, mas também para as estações de cheias anuais normais na bacia Amazônica. Além disso, pode haver também um aumento na morbidade por via

aquática durante um período de tempo prolongado, uma vez que se estima que a mudança climática venha interferir na dinâmica da região Amazônica, alterando o número e intensidade das inundações (Marengo et al., 2012, 2013; Satyamurty et al., 2013). Nos últimos anos, a cidade observou as cheias de maior duração (2009) e maior intensidade (2012) do Rio Negro na história recente, e as previsões de esta situação continuar no futuro são elevadas.

7. CONCLUSÕES

- A associação do método de concentração viral por floculação orgânica aos protocolos de qPCR para detecção e quantificação de vírus de origem humana e animal foi validada, sendo eficaz para recuperação viral nas amostras de águas ácidas do Rio Negro e dos igarapés de Manaus.
- O rastreamento das fontes de contaminação microbiológica na bacia do Rio Negro por marcadores virológicos demonstrou as precárias condições de saneamento básico na região e confirmou a contaminação essencialmente humana dos ambientes aquáticos da cidade de Manaus.
- Os RVA e NoV GII apresentaram elevadas concentrações nos ambientes aquáticos de Manaus, especialmente nos igarapés, sendo os RVA prevalentes com maiores concentrações no período das cheias.
- O ciclo hidrológico do Rio Negro tem influência significativa na disseminação dos HAdV, JCPyV, RVA e NoV GII, sendo HAdV, JCPyV e RVA mais detectados na cheia e o NoV GII na seca.
- As maiores detecções e concentrações de vírus descritos neste estudo durante a época das cheias, especialmente no ponto MA04 no Rio Negro, corrobora a dinâmica do transporte de vírus nessa bacia hidrográfica.
- Os igarapés da cidade de Manaus apresentam elevadas concentrações virais e são mais contaminados que o Rio Negro, refletindo o lançamento de esgoto *in natura* nesses ambientes e a capacidade de diluição do grande volume de água do Rio Negro.
- Os parâmetros bacteriológicos de qualidade da água demonstraram diferentes condições dos ambientes estudados, sendo os vírus detectados especialmente nas amostras conformes com a legislação.
- Os resultados indicam a utilização de HAdV como marcador viral de contaminação fecal humana em ambientes aquáticos.
- O ciclo hidrológico do Rio Negro influencia as condições físico-químicas dos ambientes aquáticos da cidade de Manaus, especialmente os igarapés.
- A avaliação de risco virológico demonstrou elevadas probabilidades de infecção por RVA pelo contato de crianças e adultos com os ambientes aquáticos de Manaus por diferentes vias de exposição, sendo maiores as observadas para crianças em atividades recreacionais nos igarapés da cidade.

- A probabilidade de infecção por RVA pelo contato mão-boca por crianças nos igarapés da cidade foi menor que pelo contato recreacional. Entretanto, não deve ser negligenciada.
- O nível do Rio Negro apresentou correlação positiva com o aumento do número de casos de gastroenterite no ano de 2012, quando houve a maior cheia deste rio.
- A cheia histórica do Rio Negro na cidade de Manaus resultou em um aumento na concentração de HAdV e RVA nos ecossistemas da cidade e demonstrou a ausência de vírus gastroentéricos emergentes.
- A caracterização molecular de HAdV e RVA demonstrou a circulação de diferentes genótipos prevalentes na população.
- Os vírus são importantes marcadores de contaminação fecal em ambientes aquáticos, devendo ser utilizados como parâmetros de qualidade de água e nas estimativas dos riscos à saúde pelo contato com esses ambientes, ajudando nas medidas preventivas e de gestão dos recursos hídricos amazônicos e brasileiros.

8. PERSPECTIVAS

Como perspectivas para este estudo estão a avaliação de risco de infecções por RVA considerando as variações sazonais geradas pelo ciclo hidrológico do Rio Negro e a infecciosidade viral obtida por ensaios de cultura celular, a avaliação de risco de infecções por HAdV nos mesmos cenários estabelecidos para RVA e a caracterização molecular dos JCPyV para realizar estudos de origem étnica da população de Manaus, com geração de publicações dos novos dados em revistas indexadas.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ahmed MU, Urasawa S, Taniguchi K, Urasawa T, Kobayashi N, Wakasugi F, et al. Analysis of human rotavirus strains prevailing in Bangladesh in relation to nationwide floods brought by the 1988 monsoon. *J Clin Microbiol.* 1991 Oct; 29(10):2273-9.

Albiñana-Gimenez N, Clemente-Casares P, Calgua B, Huguet JM, Courtois S, Girones R. Comparison of methods for concentrating human adenoviruses, polyomavirus JC and noroviruses in source waters and drinking water using quantitative PCR. *J Virol Methods.* 2009 Jun; 158(1-2):104-9.

Allander T, Tammi MT, Eriksson M, Bjerkner A, Tiveljung-Lindell A, Andersson B. Cloning of a human parvovirus by molecular screening of respiratory tract samples. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005 Sep; 102(36):12891-6.

Allard A, Albinsson B, Wadell G. Rapid typing of human adenoviruses by a general PCR combined with restriction endonuclease analysis. *J Clin Microbiol.* 2001 Feb; 39(2):498-505.

Amaral MS, Estevam GK, Penatti M, Lafontaine R, Lima IC, Spada PK, et al. The prevalence of norovirus, astrovirus and adenovirus infections among hospitalised children with acute gastroenteritis in Porto Velho, state of Rondônia, western Brazilian Amazon. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2015 Apr; 110(2):215-21.

Arthur JL, Higgins GD, Davidson GP, Givney RC, Ratcliff RM. A novel bocavirus associated with acute gastroenteritis in Australian children. *PLoS Pathog.* 2009 Apr; 5(4):e1000391.

Ao YY, Yu JM, Li LL, Jin M, Duan ZJ. Detection of human norovirus GIV.1 in China: a case report. *J Clin Virol.* 2014 Oct; 61(2):298-301.

Aw TG, Howe A, Rose JB. Metagenomic approaches for direct and cell culture evaluation of the virological quality of wastewater. *J Virol Methods.* 2014 Sep; 210C:15-21.

Barril PA, Fumian TM, Prez VE, Gil PI, Martínez LC, Giordano MO, et al. Rotavirus seasonality in urban sewage from Argentina: effect of meteorological variables on the viral load and the genetic diversity. *Environ Res.* 2015 Apr; 138:409-15.

Barril PA, Giordano MO, Isa MB, Masachessi G, Ferreyra LJ, Castello AA, et al. Correlation between rotavirus A genotypes detected in hospitalized children and sewage samples in 2006, Córdoba, Argentina. *J Med Virol.* 2010 Jul; 82(7):1277-81.

Berk AJ. Adenoviridae. In: Knipe DM, Howley PM. *Fields Virology*. 6ed. Filadélfia, EUA: Lippincott Williams & Wilkins; 2013. p.1704-31.

Bertrand I, Schijven JF, Sánchez G, Wyn-Jones P, Ottoson J, Morin T, et al. The impact of temperature on the inactivation of enteric viruses in food and water: a review. *J Appl Microbiol.* 2012 Jun; 112(6):1059-74.

Beuret C, Kohler D, Baumgartner A, Lüthi TM. Norwalk-like virus sequences in mineral waters: one-year monitoring of three brands. *Appl. Environ. Microbiol.* 2002 Apr; 68(4):1925-31.

Bialasiewicz S, Whiley DM, Lambert SB, Nissen MD, Sloots TP. Detection of BK, JC, WU, or KI polyomaviruses in faecal, urine, blood, cerebrospinal fluid and respiratory samples. *J Clin Virol.* 2009 Jul; 45(3):249-54.

Blinkova O, Rosario K, Li L, Kapoor A, Slikas B, Bernardin F, et al. Frequent detection of highly diverse variants of cardiovirus, cosavirus, bocavirus, and circovirus in sewage samples collected in the United States. *J Clin Microbiol.* 2009 Nov; 47(11):3507-13.

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. *Appl Environ Microbiol.* 2006 Dec; 72(12):7894-6.

Bofill-Mas S, Rusiñol M, Fernandez-Cassi X, Carratalà A, Hundesa A, Girones R. Quantification of human and animal viruses to differentiate the origin of the fecal contamination present in environmental samples. *Biomed Res Int.* 2013; 2013:192089.

Bon F, Ambert-Balay K, Giraudon H, Kaplon J, Le Guyader S, Pommepuy M, et al. Molecular epidemiology of caliciviruses detected in sporadic and outbreak cases of gastroenteritis in France from December 1998 to February 2004. *J Clin Microbiol*. 2005 Sep; 43(9):4659-64

Borrows CL, Turner PC. Seasonal screening for viral gastroenteritis in young children and elderly hospitalized patients: is it worthwhile? *J Hosp Infect*. 2014 Jun;87(2):98-102.

Bosch A, Guix S, Sano D, Pintó RM. New tools for the study and direct surveillance of viral pathogens in water. *Curr Opin Biotechnol*. 2008 Jun; 19(3):295-301.

Bosch A, Pintó RM, Guix S. Human astroviruses. *Clin Microbiol Rev*. 2014 Oct; 27(4):1048-74.

Brasil. Ministério da Saúde. Portaria nº 518, de 25 de março de 2004. Estabelece os procedimentos e responsabilidades relativos ao controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade, e dá outras providências. *Diário Oficial [da] União*. 2004 mar 26. 59. p. 266-70.

Brasil. Ministério da Saúde. Portaria nº 2.914, de 12 de dezembro de 2011. Dispõe sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade. *Diário Oficial [da] União*. 2011 dez 14. 239. p. 39-46.

Brasil. Ministério do Meio Ambiente. Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA). Resolução nº 274, de 29 de novembro de 2000. Revisa os critérios de balneabilidade em águas brasileiras. *Diário Oficial [da] União*. 2001 jan 08. 018. p. 70-71.

Brasil. Ministério do Meio Ambiente. Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA). Resolução nº 357, de 15 de março de 2005. 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. *Diário Oficial [da] União*. 2005 mar 18. 053. p. 58-63.

Bucardo F, Reyes Y, Svensson L, Nordgren J. Predominance of norovirus and sapovirus in Nicaragua after implementation of universal rotavirus vaccination. *PLoS One*. 2014 May; 9(5): e98201.

Calgua B, Barardi CR, Bofill-Mas S, Rodriguez-Manzano J, Girones R. Detection and quantitation of infectious human adenoviruses and JC polyomaviruses in water by immunofluorescence assay. *J Virol Methods*. 2011 Jan; 171(1):1-7.

Calgua B, Carratalà A, Guerrero-Latorre L, de Abreu Corrêa A, Kohn T, Sommer R, et al. UVC Inactivation of dsDNA and ssRNA Viruses in Water: UV Fluences and a qPCR-Based Approach to Evaluate Decay on Viral Infectivity. *Food Environ Virol*. 2014 Jun 22. *In press*.

Calgua B, Fumian T, Rusiñol M, Rodriguez-Manzano J, Mbayed VA, Bofill-Mas S, et al. Detection and quantification of classic and emerging viruses by skimmed-milk flocculation and PCR in river water from two geographical areas. *Water Res*. 2013a May; 47(8):2797-2810.

Calgua B, Mengewein A, Grunert A, Bofill-Mas S, Clemente-Casares P, Hundesa A, et al. Development and application of a one-step low cost procedure to concentrate viruses from seawater samples. *J Virol Methods*. 2008 Nov; 153(2):79-83.

Calgua B, Rodriguez-Manzano J, Hundesa A, Suñen E, Calvo M, Boffil-Mas S, et al. New methods for the concentration of viruses from urban sewage using quantitative PCR. *J Virol Methods*. 2013b Feb; 187(2):215-21.

Campos GS, Silva Sampaio ML, Menezes AD, Tigre DM, Moura Costa LF, Chinalia FA, et al. Human bocavirus in acute gastroenteritis in children in Brazil. *J Med Virol*. 2015 Jun. *In pres*.

Cann KF, Thomas DR, Salmon RL, Wyn-Jones AP, Kay D. Extreme water-related weather events and waterborne disease. *Epidemiol Infect*. 2013 Apr; 141(4):671-86.

Cantalupo PG, Calgua B, Zhao G, Hundesa A, Wier AD, Katz JP, et al. Raw sewage harbors diverse viral populations. *Mbio*. 2011 Oct; 2(5):e00180-11.

Carratalà A, Rusinol M, Hundesa A, Biarnes M, Rodriguez-Manzano J, Vantarakis A, et al. A novel tool for specific detection and quantification of chicken/turkey parvoviruses to trace poultry fecal contamination in the environment. *Appl Environ Microbiol.* 2012 Oct; 78(20):7496-9.

Carter MJ. Enterically infecting viruses: pathogenicity, transmission and significance for food and waterborne infection. *J Appl Microbiol.* 2005; 98(6):1354-80.

Carvalho-Costa FA, Araújo IT, Santos de Assis RM, Fialho AM, de Assis Martins CM, Bóia MN, et al. Rotavirus genotype distribution after vaccine introduction, Rio de Janeiro, Brazil. *Emerg Infect Dis.* 2009 Jan; 15(1):95-7.

Carvalho-Costa FA, Volotão Ede M, de Assis RM, Fialho AM, de Andrade Jda S, Rocha LN, et al. Laboratory-based rotavirus surveillance during the introduction of a vaccination program, Brazil, 2005-2009. *Pediatr Infect Dis J.* 2011 Jan; 30(1 Suppl):S35-41.

Casarez EA, Pillai SD, Mott JB, Vargas M, Dean KE, Di Giovanni GD. Direct comparison of four bacterial source tracking methods and use of composite data sets. *J Appl Microbiol* 2007 Aug; 103(2):350-64.

Chhabra P, Payne DC, Szilagyi PG, Edwards KM, Staat MA, Shirley SH, et al. Etiology of viral gastroenteritis in children <5 years of age in the United States, 2008-2009. *J Infect Dis.* 2013 Sep; 208(5):790-800.

Chhabra P, Samoilovich E, Yermalovich M, Chernyshova L, Gheorghita S, Cojocar R, et al. Viral gastroenteritis in rotavirus negative hospitalized children <5 years of age from the independent states of the former Soviet Union. *Infect Genet Evol.* 2014 Dec; 28:283-8.

Chigor VN, Sibanda T, Okoh AI. Assessment of the risks for human health of adenoviruses, hepatitis A virus, rotaviruses and enteroviruses in the Buffalo River and three source water dams in the Eastern Cape. *Food Environ Virol.* 2014 Jun; 6(2):87-98.

Choi S, Chu W, Brown J, Becker SJ, Harwood VJ, Jiang SC. Application of enterococci antibiotic resistance patterns for contamination source identification at Huntington Beach, California. *Mar Pollut Bull.* 2003 Jun; 46(6):748-55.

Clarke IN, Estes MK, Green KY, Hansman GS, Knowles NJ, Koopmans MK, et al. Caliciviridae. In: King AMQ, Adams MJ, Carstens EB, Lefkowitz EJ. *Virus Taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses.* San Diego: Elsevier; 2012. p. 977-86.

Costa FEV. Uma experiência amazônica de gestão dos recursos hídricos: a criação do Comitê de Bacia Hidrográfica do Rio Tarumã-Açu, Manaus - AM - Brasil [dissertação]. Pará: Universidade Federal do Pará; 2011.

Couceiro SRM, Hamada N, Luz SLB, Forsberg BR, Pimentel TP. Deforestation and sewage effects on aquatic macroinvertebrates in urban streams in Manaus, Amazonas, Brazil. *Hydrobiologia.* 2007; 57(1):271-84.

Couch RB, Cate TR, Douglas RG Jr, Gerone PJ, Knight V. Effect of route of inoculation on experimental respiratory viral disease in volunteers and evidence for airborne transmission. *Bacteriol Rev.* 1966 Sep; 30(3):517-29.

Coulson B. VP4 and VP7 typing using monoclonal antibodies. *Arch Virol Suppl.* 1996; 12:113-8.

Crabtree KD, Gerba CP, Rose JB, Haas CN. Waterborne adenovirus: a risk assessment. *Water Science and Technology.* 1997; 35(11-12):1-6.

Dai YC, Xu QH, Wu XB, Hu GF, Tang YL, Li JD, et al. Development of real-time and nested RT-PCR to detect astrovirus and one-year survey of astrovirus in Jiangmen City, China. *Arch Virol.* 2010 Jun; 155(6): 977-82.

Das BK, Gentsch JR, Cicirello HG, Woods PA, Gupta A, Ramachandran M, et al. Characterization of rotavirus strains from newborns in New Delhi, India. *J Clin Microbiol.* 1994 Jul; 32(7): 1820-2.

de Freitas ER, Borges AM, Fiaccadori FS, e Souza MB, Cardoso Dd. Molecular characterization of adenovirus detected from fecal samples obtained from children in the Central West region of Brazil. *Arch Virol.* 2010 Oct; 155(10):1693-6.

de Man H, Bouwknecht M, van Heijnsbergen E, Leenen EJ, van Knapen F, de Roda Husman AM. Health risk assessment for splash parks that use rainwater as source water. *Water Res.* 2014a May; 54:254-61.

de Man H, van den Berg HH, Leenen EJ, Schijven JF, Schets FM, van der Vliet JC, et al. Quantitative assessment of infection risk from exposure to waterborne pathogens in urban floodwater. *Water Res.* 2014b Jan; 48:90-9.

DeCaprio JA, Imperiale MJ, Major EO. Polyomaviruses. In: Knipe DM, Howley PM. *Fields Virology*. 6 ed. Filadélfia: Lippincott Williams & Wilkins; 2013. p. 1633-61.

Desselberger U. Rotaviruses. *Virus Research.* 2014 Sep; 190:75-96.

Di Martino B, Di Profio F, Ceci C, Di Felice E, Green KY, Bok K, et al. Seroprevalence of norovirus genogroup IV antibodies among humans, Italy, 2010-2011. *Emerg Infect Dis.* 2014 Nov; 20(11):1828-32.

Ding G, Zhang Y, Gao L, Ma W, Li X, Liu J, et al. Quantitative analysis of burden of infectious diarrhea associated with floods in northwest of anhui province, china: a mixed method evaluation. *PLoS One.* 2013 Jun 6; 8(6):e65112.

Dorevitch S, Panthi S, Huang Y, Li H, Michalek AM, Pratap P, et al. Water ingestion during water recreation. *Water Res.* 2011 Feb; 45(5):2020-8.

Dufour AP, Evans O, Behymer TD, Cantú R. Water ingestion during swimming activities in a pool: A pilot study. *J Water Health.* 2006 Dec; 4(4):425-30.

Eden JS, Lim KL, White PA. Complete genome of the human norovirus GIV.1 strain Lake Macquaire virus. *J Virol.* 2012 Sep; 86(18):10251-2.

Estes MK, Greenberg HB. Rotaviruses. In: Knipe DM, Howley PM. *Fields Virology*. 6 ed. Filadélfia, EUA: Lippincott Williams & Wilkins; 2013. p.1347-401.

Fazil AM. A primer on risk assessment modeling: focus on seafood products. *FAO Fisheries Technical Paper*. No. 462. Roma: FAO. 2005. p. 56.

Feltkamp MC, Kazem S, van der Meijden E, Lauber C, Gorbalenya AE. From Stockholm to Malawi: recent developments in studying human polyomaviruses. *J Gen Virol*. 2013 Mar; 94(Pt 3):482-96.

Ferreira FF, Guimarães FR, Fumian TM, Victoria M, Vieira CB, Luz S, et al. Environmental dissemination of group A rotavirus: P-type, G-type and subgroup characterization. *Water Sci Technol*. 2009; 60(3):633-42.

Ferreira MS, Xavier Mda P, Tinga AC, Rose TL, Fumian TM, Fialho AM, et al. Assessment of gastroenteric viruses frequency in a children's day care center in Rio De Janeiro, Brazil: a fifteen year study (1994-2008). *PLoS One*. 2012; 7(3):e33754.

Fewtrell L, Kay D, Watkins J, Davies C, Francis C. The microbiology of urban UK floodwaters and a quantitative microbial risk assessment of flooding and gastrointestinal illness. *J Flood Risk Management*. 2011 Jun; 4(2):77-87.

Fewtrell L, Smith K. *Flooding and Infections*, Urban Flood Management project report for the Flood Risk Management Research Consortium. Aberystwyth: University of Wales; 2007.

Field KG, Samadpour M. Fecal source tracking, the indicator paradigm, and managing water quality. *Water Res* 2007 Aug; 41(16):3517-38.

Filho EP, da Costa Faria NR, Fialho AM, de Assis RS, Almeida MM, Rocha M, et al. Adenoviruses associated with acute gastroenteritis in hospitalized and community children up to 5 years old in Rio de Janeiro and Salvador, Brazil. *J Med Microbiol*. 2007 Mar; 56(Pt 3):313-9.

Fioretti JM, Bello G, Rocha MS, Victoria M, Leite JP, Miagostovich MP. Temporal dynamics of norovirus GII.4 variants in Brazil between 2004 and 2012. *PLoS One*. 2014 Mar; 9(3): e92988.

Fioretti JM, Ferreira MS, Victoria M, Vieira CB, Xavier MdaP, Leite JP, et al. Genetic diversity of noroviruses in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2011 Dec; 106(8):942-7.

Fischer TK, Steinsland H, Molbak K, Ca R, Gentsch JR, Valentiner-Branth P, et al. Genotype profiles of Rotavirus Strains from children in suburban community in Guinea-Bissau, Western Africa. *J Clin Microbiol*. 2000 Jan; 38(1):264-7.

Flannery J, Keaveney S, Rajko-Nenow P, O'Flaherty V, Doré W. Concentration of norovirus during wastewater treatment and its impact on oyster contamination. *Appl Environ Microbiol*. 2012 May; 78(9):3400-6.

Fong TT, Lipp EK. Enteric viruses of humans and animals in aquatic environments: health risks, detection, and potential water quality assessment tools. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2005 Jun; 69(2):357-71.

Fong TT, Phanikumar MS, Xagorarakis I, Rose JB. Quantitative detection of human adenoviruses in wastewater and combined sewer overflows influencing a Michigan river. *Appl Environ Microbiol*. 2010 Feb; 76(3):715-23.

Fongaro G, Nascimento MA, Rigotto C, Ritterbusch G, da Silva AD, Esteves PA, et al. Evaluation and molecular characterization of human adenovirus in drinking water supplies: viral integrity and viability assays. *Virol J*. 2013 May; 10:166.

Frappart F, Seyler F, Martinez J-M, Leon JG, Cazenave A. Floodplain water storage in the Negro River basin estimated from microwave remote sensing of inundation area and water levels. *Remote Sens Environ*. 2005; 99(4):387-99.

Fumian TM, Leite JP, Rose TL, Prado T, Miagostovich MP. One year environmental surveillance of rotavirus specie A (RVA) genotypes in circulation after the introduction of the Rotarix® vaccine in Rio de Janeiro, Brazil. *Water Res*. 2011 Nov; 45(17):5755-63.

Fumian TM, Vieira CB, Leite JP, Miagostovich MP. Assessment of burden of virus agents in an urban sewage treatment plant in Rio de Janeiro, Brazil. *J Water Health*. 2013; 11(1):110-9.

Ghebremedhin B. Human adenovirus: Viral pathogen with increasing importance. *Eur J Microbiol Immunol (Bp)*. 2014 Mar; 4(1):26-33.

Gentsch JR, Glass RI, Woods P, Gouvea V, Gorziglia M, Flores J, et al. Identification of group A rotavirus gene 4 types by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol*. 1992 Jun; 30(6):1365-73.

Gerba CP, Goyal SM, LaBelle RL, Cech I, Bodgan GF. Failure of indicator bacteria to reflect the occurrence of enteroviruses in marine waters. *Am J Public Health*. 1979 Nov; 69(11):1116-9.

Gerba CP, Rose JB, Haas CN, Crabtree. Waterborne rotavirus: a risk assessment. *Water Res*. 1996 Nov; 30(12): 2929-40.

Gibson KE. Viral pathogens in water: occurrence, public health impact, and available control strategies. *Curr Opin Virol*. 2014 Feb; 4:50-7.

Girones R, Ferrús MA, Alonso JL, Rodriguez-Manzano J, Calgua B, Corrêa Ade A, et al. Molecular detection of pathogens in water--the pros and cons of molecular techniques. *Water Res*. 2010 Aug; 44(15):4325-39.

Gómez MM, da Silva MF, Zeller M, Heylen E, Matthijnsens J, Ichihara MY, et al. Phylogenetic analysis of G1P[6] group A rotavirus strains detected in Northeast Brazilian children fully vaccinated with Rotarix™. *Infect Genet Evol*. 2013 Oct; 19:395-402

Gouvea V, Santos N, Timenetsky MC. Identification of bovine and porcine rotavirus G types by PCR. *J Clin Microbiol*. 1994 May; 32(5):1338-40.

Green K. Caliciviridae: The Noroviruses. In: Knipe DM, Howley PM. *Fields Virology*. 6ed. Filadélfia, EUA: Lippincott Williams & Wilkins; 2013. p.582-608.

Green KY, Ando T, Balayan MS, Berke T, Clarke IN, Estes MK, et al. Taxonomy of the caliciviruses. *J Infect Dis.* 2000 May; 181(Suppl 2): S322-30.

Greenberg HB, Estes MK. Rotaviruses: from pathogenesis to vaccination. *Gastroenterology.* 2009 May; 136(6):1939-51.

Greninger AL, Runckel C, Chiu CY, Haggerty T, Parsonnet J, Ganem D, et al. The complete genome of klassevirus - a novel picornavirus in pediatric stool. *Virology.* 2009 Jun; 6:82.

Guimarães FR, Ferreira FF, Vieira CB, Fumian TM, Shubo T, Leite JP, et al. Molecular detection of human astrovirus in an urban sewage treatment plant in Rio de Janeiro, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2008 Dec; 103(8):819-23.

Gurian P. QMRA wiki [Internet]. 2015. [acesso em 2015 Aug 26]. Disponível em: http://qmrawiki.canr.msu.edu/index.php/Risk_Characterization

Haas C. QMRA wiki [Internet]. 2015. [acesso em 2015 Aug 26]. Disponível em: [http://qmrawiki.canr.msu.edu/index.php/Quantitative_Microbial_Risk_Assessment_\(QMRA\)_Wiki](http://qmrawiki.canr.msu.edu/index.php/Quantitative_Microbial_Risk_Assessment_(QMRA)_Wiki)

Haas CN. Effect of effluent disinfection on risk of viral disease transmission via recreational exposure. *J Water Poll Control Federation.* 1983 Aug; 55(8):1111-6.

Haas CN, Rose JB, Gerba CP. Quantitative microbial risk assessment. 1.ed. New York: John Wiley & Sons Inc. 1999.

Haas CN, Rose JB, Gerba C, Regli S. Risk assessment of virus in drinking water. *Risk Anal.* 1993 Oct; 13(5):545-52.

Hall TA. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp.* 1999; 41:95-8.

Hamza IA, Jurzik L, Stang A, Sure K, Uberla K, Wilhelm M. Detection of human viruses in rivers of a densely-populated area in Germany using a virus adsorption elution method optimized for PCR analyses. *Water Res.* 2009a Jun; 43(10):2657-68.

Hamza IA, Jurzik L, Überla K, Wilhelm M. Methods to detect infectious human enteric viruses in environmental water samples. *Int J Hyg Environ Health.* 2011 Nov; 214(6): 424-36.

Hamza IA, Jurzik L, Wilhelm M, Uberla K. Detection and quantification of human bocavirus in river water. *J Gen Virol.* 2009b Nov; 90(Pt 11):2634-7.

Han TH, Kim CH, Chung JY, Park SH, Hwang ES. Klassevirus infection in children, South Korea. *Emerg Infect Dis.* 2010 Oct;16(10):1623-5.

Han TH, Kim SC, Kim ST, Chung CH, Chung JY. Detection of norovirus genogroup IV, klassevirus, and pepper mild mottle virus in sewage in South Korea. *Arch Virol.* 2014 Mar; 159(3):457-63

Hansman GS, Oka T, Katayama K, Takeda N. Human sapoviruses: genetic diversity, recombination, and classification. *Rev Med Virol.* 2007 Mar-Apr;17(2):133-41.

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

Haramoto E, Katayama H, Oguma K, Ohgaki S. Quantitative analysis of human enteric adenoviruses in aquatic environments. *J Appl Microbiol.* 2007 Dec; 103(6):2153-9.

Haramoto E, Kitajima M, Otagiri M. Development of a reverse transcription-quantitative PCR assay for detection of salivirus/klassevirus. *Appl Environ Microbiol.* 2013 Jun; 79(11):3529-32.

Haramoto E, Otagiri M. Prevalence and genetic diversity of klassevirus in wastewater in Japan. *Food Environ Virol.* 2013 Mar; 5(1):46-51.

Harrach B, Benkő M, Both GW, Brown M, Davison AJ, Echavarría M, et al. In: King AMQ, Adams MJ, Carstens EB, Lefkowitz EJ. *Virus Taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. San Diego: Elsevier; 2012. p.125-141.

Hartmann NM, Dartscht M, Szewzyk R, Selinka H-C. Monitoring of adenovirus serotypes in environmental samples by combined PCR and melting point analyses. *Viol J*. 2013 Jun; 10:190.

Harwood VJ, Wiggins B, Hagedorn C, Ellender RD, Gooch JA, Kern J, et al. Phenotypic library-based microbial source tracking methods: efficacy in the California collaborative study. *J Water Health*. 2003 Dec; 1(4):153-66.

Hashizume M, Wagatsuma Y, Faruque AS, Hayashi T, Hunter PR, Armstrong B, et al. Factors determining vulnerability to diarrhea during and after severe floods in Bangladesh. *J Water Health*. 2008 Sep; 6(3):323-32.

Hata A, Katayama H, Furumai H. Organic substances interfere with reverse transcription-quantitative PCR-based virus detection in water samples. *Appl Environ Microbiol*. 2015 Mar; 81(5):1585-93.

He X, Wei Y, Cheng L, Zhang D, Wang Z. Molecular detection of three gastroenteritis viruses in urban surface waters in Beijing and correlation with levels of fecal indicator bacteria. *Environ Monit Assess*. 2012 Sep; 184(9):5563-70.

Heerden J, Ehlers MM, Vivier JC, Grabow WO. Risk assessment of adenoviruses detected in treated drinking water and recreational water. *J Appl Microbiol*. 2005; 99(4):926-33.

Hejkal TW, Keswick B, LaBelle RL, Gerba CP, Sanchez Y, Dreesman G, et al. Viruses in a community water supply associated with an outbreak of gastroenteritis and infectious hepatitis. *J Am Water Works Assoc*. 1982; 150:318-21.

Hernroth BE, Conden-Hansson AC, Rehnstam-Holm AS, Girones R, Allard AK. Environmental factors influencing human viral pathogens and their potential indicator

organisms in the blue mussel, *Mytilus edulis*: the first Scandinavian report. *Appl Environ Microbiol.* 2002 Sep; 68(9):4523-33.

Hewitt J, Greening GE, Leonard M, Lewis GD. Evaluation of human adenovirus and human polyomavirus as indicators of human sewage contamination in the aquatic environment. *Water Res.* 2013 Nov; 47(17):6750-61.

Hipsey MR, Brookes JD. Pathogen Management in Surface Waters: Practical Considerations for Reducing Public Health Risk. In: Rodriguez-Morales AJ. *Current Topics in Public Health. In Tech*; 2013. p.445-75.

Holtz LR, Finkbeiner SR, Zhao G, Kirkwood CD, Girones R, Pipas JM, et al. Klassevirus 1, a previously undescribed member of the family Picornaviridae, is globally widespread. *Virology*. 2009 Jun; 6:86.

Hundesda A, Bofill-Mas S, Maluquer de Motes C, Rodriguez-Manzano J, Bach A, Casas M, et al. Development of a quantitative PCR assay for the quantitation of bovine polyomavirus as a microbial source-tracking tool. *J Virol Methods.* 2010 Feb; 163(2):385-9.

Hundesda A, Maluquer de Motes C, Albinana-Gimenez N, Rodriguez-Manzano J, Bofill-Mas S, Suñen E, et al. Development of a qPCR assay for the quantification of porcine adenoviruses as an MST tool for swine fecal contamination in the environment. *J Virol Methods.* 2009 Jun; 158(1-2):130-5.

Hundesda A, Maluquer de Motes C, 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. *Appl Environ Microbiol.* 2006 Dec; 72(12):7886-93.

IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística). 2015. [acesso em 2015 May 10]. Disponível em: <http://cidades.ibge.gov.br/xtras/perfil.php?codmun=130260>

ICTV (*International Committee on Taxonomy of Viruses* - Comitê Internacional de Taxonomia viral). 2015. [acesso em 2015 May 10]. Disponível em: <http://www.ictvonline.org/virusTaxonomy.asp>

Instituto Trata Brasil. 2015. [acesso em 2015 Sept 10]. Disponível em: <http://tratabrasil.org.br/ranking-do-saneamento-2015>

Iturriza-Gómara M, Wong C, Blome S, Desselberger U, Gray J. Molecular characterization of VP6 genes of human rotavirus isolates: correlation of genogroups with subgroups and evidence of independent segregation. *J Virol*. 2002 Jul; 76(13):6596-601.

Jiang SC. Human adenoviruses in water: occurrence and health implications: a critical review. *Environ Sci Technol*. 2006 Dec; 40(23):7132-40.

Jiang SC, Han J, He JW, Chu W. Evaluation of four cell lines for assays of infectious adenovirus in water samples. *J Water Health*. 2009 Dec; 7(4):650-6.

Kageyama T, Kojima S, Shinohara M, Uchida K, Fukushi S, Hoshino FB, et al. Broadly reactive and highly sensitive assay for Norwalk-like viruses based on real-time quantitative reverse transcription-PCR. *J Clin Microbiol*. 2003 Apr; 41(4):1548-57.

Kantola K, Sadeghi M, Antikainen J, Kirveskari J, Delwart E, Hedman K, et al. Real-time quantitative PCR detection of four human bocaviruses. *J Clin Microbiol*. 2010 Nov; 48(11):4044-50. Errata em: *J Clin Microbiol*. 2011 Nov; 49(11):4029.

Kapoor A, Simmonds P, Slikas E, Li L, Bodhidatta L, Sethabutr O, et al. Human bocaviruses are highly diverse, dispersed, recombination prone, and prevalent in enteric infections. *J Infect Dis*. 2010 Jun; 201(11): 1633-43.

Kapoor A, Slikas E, Simmonds P, Chieochansin T, Naeem A, Shaukat S, et al. A newly identified bocavirus species in human stool. *J Infect Dis*. 2009 Jan; 199(2): 196-200.

Karst SM. Pathogenesis of noroviruses, emerging RNA viruses. *Viruses*. 2010 Mar; 2(3):748-81.

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. *Appl Environ Microbiol.* 2002 Mar; 68(3):1033-9.

Katukiza AY, Ronteltap M, van der Steen P, Foppen JW, Lens PN. Quantification of microbial risks to human health caused by waterborne viruses and bacteria in an urban slum. *J Appl Microbiol.* 2014 Feb; 116(2):447-63.

Keller R, Justino JF, Cassini ST. Assessment of water and seafood microbiology quality in a mangrove region in Vitória, Brazil. *J Water Health.* 2013 Sep; 11(3):573-80.

Khamrin P, Thongprachum A, Shimizu H, Okitsu S, Mizuguchi M, Hayakawa S, et al. Detection of human bocavirus 1 and 2 from children with acute gastroenteritis in Japan. *J Med Virol.* 2012 Jun; 84(6):901-5.

Kitajima M, Gerba CP. Aichi virus 1: environmental occurrence and behavior. *Pathogens.* 2015 May 19; 4(2):256-68.

Kitajima M, Haramoto E, Phanuwat C, Katayama H. Genotype distribution of human sapoviruses in wastewater in Japan. *Appl Environ Microbiol.* 2011a Jun; 77(12):4226-9.

Kitajima M, Haramoto E, Phanuwat C, Katayama H, Ohgaki S. Detection of genogroup IV norovirus in wastewater and river water in Japan. *Lett Appl Microbiol.* 2009 Nov; 49(5):655-8.

Kitajima M, Hata A, Yamashita T, Haramoto E, Minagawa H, Katayama H. Development of a reverse transcription-quantitative PCR system for detection and genotyping of aichi viruses in clinical and environmental samples. *Appl Environ Microbiol.* 2013 Jul; 79(13):3952-8.

Kitajima M, Iker BC, Rachmadi AT, Haramoto E, Gerba CP. Quantification and genetic analysis of salivirus/klassevirus in wastewater in Arizona, USA. *Food Environ Virol.* 2014 Sep; 6(3):213-6.

Kitajima M, Oka T, Haramoto E, Phanuwat C, Takeda N, Katayama K, et al. Genetic diversity of genogroup IV noroviruses in wastewater in Japan. *Lett Appl Microbiol.* 2011b Feb; 52(2):181-4.

Kiulia NM, Hofstra N, Vermeulen LC, Obara MA, Medema G, Rose JB. Global occurrence and emission of rotaviruses to surface waters. *Pathogens.* 2015 May; 4(2):229-55.

Kluge M, Fleck JD, Soliman MC, Luz RB, Fabres RB, Comerlato J, et al. Human adenovirus (HAdV), human enterovirus (hEV), and genogroup A rotavirus (GARV) in tap water in southern Brazil. *J Water Health.* 2014 Sep; 12(3):526-32.

Kojima S, Kageyama T, Fukushi S, Hoshino FB, Shinohara M, Uchida K, et al. Genogroup-specific PCR primers for detection of Norwalk-like viruses. *J Virol Methods.* 2002 Feb; 100(10-2):107-14.

Koo HL, Neill FH, Estes MK, Munoz FM, Cameron A, Dupont HL, et al. Noroviruses: the most common pediatric viral enteric pathogen at a large university hospital after introduction of rotavirus vaccination. *J Pediatric Infect Dis Soc.* 2013 Mar; 2(1):57-60.

Kundu A, McBride G, Wuertz S. Adenovirus-associated health risks for recreational activities in a multi-use coastal watershed based on site-specific quantitative microbial risk assessment. *Water Res.* 2013 Oct; 47(16):6309-25.

Kuo HW, Chen LZ, Shih MH. High prevalence of type 41 and high sequence diversity of partial hexon gene of human adenoviruses in municipal raw sewage and activated sludge. *J Appl Microbiol.* 2015 Jul; *In press.*

La Rosa G, Della Libera S, Petricca S, Iaconelli M, Donia D, Saccucci P, et al. Genetic Diversity of Human Adenovirus in Children with Acute Gastroenteritis, Albania, 2013-2015. *Biomed Res Int.* 2015; 2015:142912.

La Rosa G, Pourshaban M, Iaconelli M, Muscillo M. Detection of genogroup IV noroviruses in environmental and clinical samples and partial sequencing through rapid amplification of cDNA ends. *Arch Virol.* 2008; 153(11):2077-83.

Lambertini E, Spencer SK, Bertz PD, Loge FJ, Kieke BA, Borchardt MA. Concentration of enteroviruses, adenoviruses and noroviruses from drinking water with glass wool filters. *Appl Environ Microbiol*. 2008 May; 74(10): 2990-6.

Lanata CF, Fischer-Walker CL, Olascoaga AC, Torres CX, Aryee MJ, Black RE, et al. Global causes of diarrheal disease mortality in children <5 years of age: a systematic review. *PLoS One*. 2013 Sep; 8(9):e72788.

Leite JP, Carvalho-Costa FA, Linhares AC. Group A rotavirus genotypes and the ongoing Brazilian experience: a review. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2008 Dec; 103(8):745-53.

Levican J, Navas E, Orizola J, Avendaño LF, Gaggero A. Human bocavirus in children with acute gastroenteritis, Chile, 1985-2010. *Emerg Infect Dis*. 2013 Nov; 19(11):1877-80.

Levy K, Hubbard AE, Eisenberg JN. Seasonality of rotavirus disease in the tropics: a systematic review and meta-analysis. *Int J Epidemiol*. 2009 Dec; 38(6):1487-96.

Li D, He M, Jiang SC. Detection of infectious adenoviruses in environmental waters by fluorescence-activated cell sorting assay. *Appl Environ Microbiol*. 2010 Mar; 76(5):1442-48.

Linhares AC, Justino MC. Rotavirus vaccination in Brazil: effectiveness and health impact seven years post-introduction. *Expert Rev Vaccines*. 2014 Jan; 13(1):43-57.

Liu L, Oza S, Hogan D, Perin J, Rudan I, Lawn JE, et al. Global, regional, and national causes of child mortality in 2000-13, with projections to inform post-2015 priorities: an updated systematic analysis. *Lancet*. 2015 Jan; 385(9966):430-40.

Lizasoain A, Tort LF, García M, Gómez MM, Leite JP, Miagostovich MP, et al. Environmental assessment reveals the presence of MLB-1 human astrovirus in Uruguay. *J Appl Microbiol*. 2015 Sep; 119(3):859-67.

Lodder WJ, Rutjes SA, Takumi K, de Roda Husman AM. Aichi virus in sewage and surface water, the Netherlands. *Emerg Infect Dis*. 2013 Aug; 19(8):1222-30.

Loisy F, Atmar RL, Guillon P, Le Cann P, Pommepeuy M, Le Guyader FS. Real-time RT-PCR for norovirus screening in shellfish. *J Virol Methods*. 2005 Jan; 123(1):1-7.

Luiz LN, Leite JP, Yokosawa J, Carneiro BM, Pereira Filho E, Oliveira TF, et al. Molecular characterization of adenoviruses from children presenting with acute respiratory disease in Uberlândia, Minas Gerais, Brazil, and detection of an isolate genetically related to feline adenovirus. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2010 Aug; 105(5):712-6.

Macena LSS, Costa RC. A cidade como espaço do risco: estudo em bacias hidrográficas de Manaus, Amazonas – BR. *Revista Geonorte*. 2012; Edição Especial, 1(4):318-30.

Machdar E, van der Steen NP, Raschid-Sally L, Lens PN. Application of Quantitative Microbial Risk Assessment to analyze the public health risk from poor drinking water quality in a low income area in Accra, Ghana. *Sci Total Environ*. 2013 Apr; 449:134-42.

Marengo JA, Borma LS, Rodriguez DA, Pinho P, Soares WR, Alves LM. Recent Extremes of Drought and Flooding in Amazonia: Vulnerabilities and Human Adaptation. *Am J Climate Change*. 2013 Jun; 2(2):87-96.

Marengo JA, Tomasella J, Soares WR, Alves LM, Nobre CA. Extreme climatic events in the Amazon basin. *Theor Appl Climatol*. 2012 Jan; 107(1-2):73-85.

Marion JW, Lee C, Lee CS, Wang Q, Lemeshow S, Buckley TJ, et al. Integrating bacterial and viral water quality assessment to predict swimming-associated illness at a freshwater beach: a cohort study. *PLoS One*. 2014 Nov; 9:e112029.

Matthijnssens J, Ciarlet M, McDonald SM, Attoui H, Bányai K, Brister JR, et al. Uniformity of rotavirus strain nomenclature proposed by the Rotavirus Classification Working Group (RCWG). *Arch Virol*. 2011 Aug; 156(8):1397-413.

Matthijnssens J, Ciarlet M, Rahman M, Attoui H, Bányai K, Estes MK, et al. Recommendations for the classification of group A rotaviruses using all 11 genomic RNA segments. *Arch Virol*. 2008; 153(8):1621-9.

Matthijnssens J, Otto PH, Ciarlet M, Desselberger U, Van Ranst M, Johne R. VP6-sequence-based cutoff values as a criterion for rotavirus species demarcation. *Arch Virol.* 2012 Jun; 157(6):1177-82.

McQuaig SM, Scott TM, Lukasik JO, Paul JH, Harwood VJ. Quantification of human polyomaviruses JC Virus and BK Virus by TaqMan quantitative PCR and comparison to other water quality indicators in water and fecal samples. *Appl Environ Microbiol.* 2009 Jun; 75(11):3379-88.

MDDA (Programa Brasileiro de Monitorização das Doenças Diarreicas Agudas). 2015. Ministério da Saúde, Brasília, DF.

Mellou K, Katsioulis A, Potamiti-Komi M, Pournaras S, Kyritsi M, Katsiaflaka A, et al. A large waterborne gastroenteritis outbreak in central Greece, March 2012: challenges for the investigation and management. *Epidemiol Infect.* 2014 Jan; 142(10):40-50.

Melo GZS, Costa CA, Santos IGC. Diversidade molecular de rotavírus do grupo A na cidade de Manaus, Estado do Amazonas, Brasil, 2004 a 2006. *Epidemiol Serv Saúde.* 2013. 22(2):265-72.

Mena KD. Waterborne Viruses: Assessing the Risks. In: Bosch A. *Human Viruses in Water.* 1.ed. Elsevier; 2007. p.163-75.

Mena KD, Gerba CP. Waterborne Adenovirus. *Rev Environ Contam Toxicol.* 2009; 198:133-67.

Messner MJ, Berger P, Nappier SP. Fractional poisson – a simple dose-response model for human norovirus. *Risk Anal.* 2014 Oct; 34(10):1820-9.

Miagostovich MP, Ferreira FF, Guimarães FR, Fumian TM, Diniz-Mendes L, Luz SL, et al. Molecular detection and characterization of gastroenteritis viruses occurring naturally in the stream waters of Manaus, central Amazonia, Brazil. *Appl Environ Microbiol.* 2008 Jan; 74(2):375-82.

Ming H-X, Zhu L, Feng J-F, Yang G, Fan J-F. Risk Assessment of Rotavirus Infection in Surface Seawater from Bohai Bay, China. *Human and Ecological Risk Assessment: An International Journal*. 2014; 20(4):929-40.

Moresco V, Viancelli A, Nascimento MA, Souza DS, Ramos AP, Garcia LA, et al. Microbiological and physicochemical analysis of the coastal waters of southern Brazil. *Mar Pollut Bull*. 2012 Jan; 64(1):40-8.

Moyo SJ, Hanevik K, Blomberg B, Kommedal O, Nordbø SA, Maselle S, et al. Prevalence and molecular characterisation of human adenovirus in diarrhoeic children in Tanzania; a case control study. *BMC Infect Dis*. 2014 Dec; 14:666.

Murray TY, Mans J, Taylor MB. First detection of human sapoviruses in river water in South Africa. *Water Sci Technol*. 2013; 67(12):2776-83

Muscillo M, Fratini M, Graffeo R, Sanguinetti M, Martella V, Green KY, Della Libera S, La Rosa G. GIV Noroviruses in Wastewaters and in Stool Specimens from Hospitalized Patients. *Food Environ Virol*. 2013 Aug; *In press*.

Myrmel M, Lange H, Rimstad E. A 1-Year Quantitative Survey of Noro-, Adeno-, Human Boca-, and Hepatitis E Viruses in Raw and Secondarily Treated Sewage from Two Plants in Norway. *Food Environ Virol*. 2015 Sep; 7(3):213-23.

Ngaosuwanukul N, Thippornchai N, Yamashita A, Vargas RE, Tunyong W, Mahakunkijchareon Y, et al. Detection and characterization of enteric viruses in flood water from the 2011 Thai flood. *Jpn J Infect Dis*. 2013; 66(5):398-403.

Noble RT, Allen SM, Blackwood AD, Chu W, Jiang SC, Lovelace GL, et al. Use of viral pathogens and indicators to differentiate between human and non-human fecal contamination in a microbial course tracking comparison study. *J Water Health* 2003; 1(4):195-207.

Nova Scotia Environment. Developing a Municipal Source Water Protection Plan: A Guide for Water Utilities and Municipalities Step 3 - Identify Potential Contaminants and Assess Risk. Water and Wastewater Branch. 2009.

Ogorzaly L, Walczak C, Galloux M, Etienne S, Gassilloud B, Cauchie HM. Human Adenovirus Diversity in Water Samples Using a Next-Generation Amplicon Sequencing Approach. *Food Environ Virol.* 2015 Apr; *In press.*

Oka T, Katayama K, Hansman GS, Kageyama T, Ogawa S, Wu FT, et al. Detection of human sapovirus by real-time reverse transcription-polymerase chain reaction. *J Med Virol.* 2006 Oct; 78(10):1347-53.

Oka T, Mori K, Iritani N, Harada S, Ueki Y, Iizuka S, et al. Human sapovirus classification based on complete capsid nucleotide sequences. *Arch Virol.* 2012 Feb; 157(2):349-52.

Oliveira A, Mascarenhas JDP, Soares LS, Guerra SFS, Gabbay YB, Sánchez N, et al. Rotavirus serotype distribution in northern Brazil trends over a 27 year period pre and post national vaccine introduction. *Trials in Vaccinology.* 2012; 1:4-9.

OMS (Organização Mundial de Saúde - *World Health Organization*). 2015. [acesso em 2015 Aug 26]. Disponível em: http://www.who.int/water_sanitation_health/facts_figures/en/

OMS (Organização Mundial de Saúde - *World Health Organization*). Global rotavirus information and surveillance bulletin. Reporting period: January through December 2010. Vol. 4. Genebra, Suíça: Organização Mundial de Saúde; 2011a.

OMS (Organização Mundial de Saúde - *World Health Organization*). Guidelines for drinking-water quality. 4.ed. Genebra, Suíça: Organização Mundial de Saúde; 2011b.

OMS (Organização Mundial de Saúde - *World Health Organization*). Guidelines for safe recreational water environments. Vol. 1, Coastal and fresh Waters. 1.ed. Genebra, Suíça: Organização Mundial de Saúde; 2003.

OMS (Organização Mundial de Saúde - *World Health Organization*). (WHO/IVB/08.17) - Manual of rotavirus detection and characterization methods, 2009. Immunization, Vaccines and Biologicals. Genebra, Suíça: Organização Mundial de Saúde; 2009.

Osborne CM, Montano AC, Robinson CC, Schultz-Cherry S, Dominguez SR. Viral gastroenteritis in children in Colorado 2006-2009. *J Med Virol*. 2015 Jun; 87(6):931-9.

Osuolale O, Okoh A. Incidence of human adenoviruses and Hepatitis A virus in the final effluent of selected wastewater treatment plants in Eastern Cape Province, South Africa. *Virology*. 2015 Jun; 12:98.

Pal A, Sirota L, Maudru T, Peden K, Lewis AM. Real-time PCR assays for the detection of virus-specific DNA in samples with mixed populations of polyomaviruses. *J Virol Methods*. 2006 Jul; 135(1):32-42.

Patel MM, Widdowson MA, Glass RI, Akazawa K, Vinjé J, Parashar UD. Systematic literature review of role of noroviruses in sporadic gastroenteritis. *Emerg Infect Dis*. 2008 Aug; 14(8):1224-31.

PATH (*Program for Appropriate Technology in Health*). 2015. [acesso em 2015 Aug 26]. Disponível em: <http://sites.path.org/rotavirusvaccine/files/2015/04/PATH-Worldwide-Rotavirus-Vaccine-Introduction-Map-geo-2015.04.01.jpg>

Pavesi A. Utility of JC polyomavirus in tracing the pattern of human migrations dating to prehistoric times. *J Gen Virol*. 2005 May; 86(Pt 5):1315-26.

Payment P, Locas A. Pathogens in water: value and limits of correlation with microbial indicators. *Ground Water*. 2011 Jan-Feb; 49(1):4-11.

Payne DC, Vinjé J, Szilagyi PG, Edwards KM, Staat MA, Weinberg GA, et al. Norovirus and medically attended gastroenteritis in U.S. children. *N Engl J Med*. 2013 Mar; 368(12):1121-30.

Phanuwan C, Takizawa S, Oguma K, Katayama H, Yunika A, Ohgaki S. Monitoring of human enteric viruses and coliform bacteria in waters after urban flood in Jakarta, Indonesia. *Water Sci Technol*. 2006; 54(3):203-10.

Pina S, Puig M, Lucena F, Jofre J, Girones R. Viral pollution in the environment and in shellfish: human adenovirus detection by PCR as an index of human viruses. *Appl Environ Microbiol.* 1998 Sep; 64(9):3376-82.

Portal Amazônia. 2012. [acesso em 2012 Jun 20]. Disponível em: <http://www.portalamazonia.com.br/editoria/cidades/doencas-diarreicas-sao-principal-problema-de-saude-em-areas-alagadas-em-manaus/>

Porto de Manaus. 2015. [acesso em 2015 May 10]. Disponível em: <http://www.portodemanaus.com.br/?pagina=niveis-maximo-minimo-do-rio-negro>

Prado T, Silva DM, Guilayn WC, Rose TL, Gaspar AM, Miagostovich MP. Quantification and molecular characterization of enteric viruses detected in effluents from two hospital wastewater treatment plants. *Water Res.* 2011 Jan; 45(3):1287-97

Prevost B, Lucas FS, Goncalves A, Richard F, Moulin L, Wurtzer S. Large scale survey of enteric viruses in river and waste water underlines the health status of the local population. *Environ Int.* 2015 Jun; 79:42-50.

Prez VE, Gil PI, Temprana CF, Cuadrado PR, Martínez LC, Giordano MO, et al. Quantification of human infection risk caused by rotavirus in surface waters from Córdoba, Argentina. *Sci Total Environ.* 2015 Aug; 538:220-9.

Pringle K, Lopman B, Vega E, Vinje J, Parashar UD, Hall AJ. Noroviruses: epidemiology, immunity and prospects for prevention. *Future Microbiol.* 2015; 10(1):53-67.

Projeto GEO cidades: Relatório Ambiental Urbano Integrado: informe GEO: Rio de Janeiro/ Coordenação: Samyra Crespo, Ana Lúcia Nadalutti La Rovere. Rio de Janeiro: Consórcio Parceria 21; 2002. p.193.

PROSAMIM – RIMA (Programa Social e Ambiental dos Igarapés de Manaus. Relatório de Impacto Ambiental – RIMA). Manaus, Igarapé do Educandos. Governo do Estado do Amazonas, Secretaria de Estado de Infra-estrutura e Concremat Engenharia; 2004. p.140.

PROSAMIM (Programa Social e Ambiental dos Igarapés de Manaus). PROGRAMA AMBIENTAL E SOCIAL DOS IGARAPÉS DE MANAUS (PROSAMIM III). Relatório de Gestão Ambiental e Social – RGAS. Luis Fernando Galli; 2011.

PROSAMIM III – RIMA (Programa Social e Ambiental dos Igarapés de Manaus) – Igarapé São Raimundo Projeto Executivo. Igarapé São Raimundo, RIMA - Relatório de Impacto Ambiental - REV. 01. Governo do Estado do Amazonas, Secretaria de Estado de Infra-estrutura, Unidade de Gerenciamento de Programa Social e Ambiental dos Igarapés de Manaus (UGPI) e Concremat Engenharia; 2012. p.326.

Pusch D, Oh DY, Wolf S, Dumke R, Schröter-Bobsin U, Höhne M, et al. Detection of enteric viruses and bacterial indicators in German environmental waters. *Arch Virol.* 2005 May; 150(5):929-47.

Raboni SM, Damasio GA, Ferreira CE, Pereira LA, Nogueira MB, Vidal LR, et al. Acute gastroenteritis and enteric viruses in hospitalised children in southern Brazil: aetiology, seasonality and clinical outcomes. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2014 Jul; 109(4):428-35.

Reuter G, Boros A, Pankovics P. Kobuviruses - a comprehensive review. *Rev Med Virol.* 2011 Jan; 21(1):32-41.

Robaina TF, Mendes GS, Benati FJ, Pena GA, Silva RC, Montes MA, et al. Shedding of polyomavirus in the saliva of immunocompetent individuals. *J Med Virol.* 2013 Jan; 85(1):144-8.

Rodríguez-Díaz J, Querales L, Caraballo L, Vizzi E, Liprandi F, Takiff H, et al. Detection and characterization of waterborne gastroenteritis viruses in urban sewage and sewage-polluted river waters in Caracas, Venezuela. *Appl Environ Microbiol.* 2009 Jan; 75(2):387-94.

Rodríguez-Lázaro D, Cook N, Ruggeri FM, Sellwood J, Nasser A, Nascimento MS, et al. Virus hazards from food, water and other contaminated environments. *FEMS Microbiol Rev.* 2012 Jul; 36(4):786-814.

Rohayem J. Norovirus seasonality and the potential impact of climate change. *Clin Microbiol Infect.* 2009 Jun; 15(6):524-7.

Rohayem J, Dumke R, Jaeger K, Schröter-Bobsin U, Mogel M, Kruse A, et al. Assessing the risk of transmission of viral diseases in flooded areas: viral load of the River Elbe in Dresden during the flood of August 2002. *Intervirology.* 2006; 49(6):370-6.

Romani S, Mohebbi SR, Khanyaghma M, Azimzadeh P, Bozorgi SM, Damavand B, et al. Detection of human Bocavirus 1, 2 and 3 from patients with acute gastroenteritis. *Gastroenterol Hepatol Bed Bench.* 2013; 6(Suppl 1):S77-81.

Roslev P, Bukh AS. State of the art molecular markers for fecal pollution source tracking in water. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2011 Mar; 89(5):1341-55

Rusiñol M, Carratalà A, Hundesa A, Bach A, Kern A, Vantarakis A, et al. Description of a novel viral tool to identify and quantify ovine faecal pollution in the environment. *Sci Total Environ.* 2013 Aug; 458-460:355-60.

Rusiñol M, Fernandez-Cassi X, Hundesa A, Vieira C, Kern A, Eriksson I, et al. Application of human and animal viral microbial source tracking tools in fresh and marine waters from five different geographical areas. *Water Res.* 2014 Aug; 59:119-29.

Rutjes SA, Lodder WJ, van Leeuwen AD, de Roda Husman AM. Detection of infectious rotavirus in naturally contaminated source waters for drinking water production. *J Appl Microbiol.* 2009 Jul; 107(1):97-105.

Rutjes SA, van den Berg HH, Lodder WJ, de Roda Husman AM. Real-time detection of noroviruses in surface water by use of a broadly reactive nucleic acid sequence-based amplification assay. *Appl Environ Microbiol.* 2006 Aug; 72(8):5349-58.

Sano D, Pérez-Sautu U, Guix S, Pintó RM, Miura T, Okabe S, et al. Quantification and genotyping of human sapoviruses in the Llobregat river catchment, Spain. *Appl Environ Microbiol.* 2011 Feb; 77(3):1111-4.

Santos N, Mendes GS, Silva RC, Pena GA, Rojas M, Amorim AR, et al. Salivirus and aichivirus A infections in children with gastroenteritis in Brazil. *Clin Microbiol Infect.* 2015 Aug; 21(8):799.e1-3.

Satyamurty P, Costa CPW, Manzi AO, Candido LA. A quick look at the 2012 record flood in the Amazon Basin. *Geophys Res Lett.* 2013 Apr; 40(7):1396-401.

Schets FM, Schijven JF, de Roda Husman AM. Exposure assessment for swimmers in bathing waters and swimming pools. *Water Res.* 2011 Mar; 45(7): 2392-2400.

Schill WB, Mathes MV. Real-time PCR detection and quantification of nine potential sources of fecal contamination by analysis of mitochondrial cytochrome b targets. *Environ Sci Technol.* 2008 Jul; 42(14):5229-34.

Schmid D, Lederer I, Much P, Pichler AM, Allerberger F. Outbreak of norovirus infection associated with contaminated flood water, Salzburg, 2005. *Euro Surveill.* 2005 Jun; 10(6):E050616.3.

Schnitzler J, Benzler J, Altmann D, Mücke I, Krause G. Survey on the population's needs and the public health response during floods in Germany 2002. *J Public Health Manag Pract.* 2007 Sep-Oct; 13(5):461-4.

Schwartz BS, Harris JB, Khan AI, Larocque RC, Sack DA, Malek MA, et al. Diarrheal epidemics in Dhaka, Bagladesh, during three consecutive floods: 1988, 1998, and 2004. *Am J Trop Med Hyg.* 2006 Jun; 74(6):1067-73.

Scott TM, Jenkins TM, Lukasik J, Rose JB. Potential use of a host associated molecular marker in *Enterococcus faecium* as an index of human fecal pollution. *Environ Sci Technol.* 2005 Jan; 39(1):283-7.

Scott TM, Rose JB, Jenkins TM, Farrah SR, Lukasik J. Microbial source tracking: current methodology and future directions. *Appl Environ Microbiol.* 2002 Dec; 68(12):5796-803.

Shan T, Wang C, Cui L, Yu Y, Delwart E, Zhao W, et al. Picornavirus salivirus/klassevirus in children with diarrhea, China. *Emerg Infect Dis*. 2010 Aug;16(8):1303-5.

Silva GS, Bisinoti MC, Fadini PS, Magarelli G, Jardim WF, Fostier AH. Major aspects of the mercury cycle in the Negro River Basin, Amazon. *J Braz Chem Soc*. 2009; 20(6): 1127-34.

Silva HD, García-Zapata MTA, Anunciação CE. Why the Use of Adenoviruses as Water Quality Virologic Marker?. *Food Environ Virol*. 2011 Dec; 3:138-40.

Sinclair RS, Jones EL, Gerba CP. Viruses in recreational water-borne disease outbreaks: a review. *J. Appl. Microbiol*. 2009 Dec; 107(6):1769-80.

Smith A, Reacher M, Smerdon W, Adak GK, Nichols G, Chalmers RM. Outbreaks of waterborne infectious intestinal disease in England and Wales, 1992-2003. *Epidemiol Infect*. 2006 Dec; 134(6):1141-9.

SNIS (Sistema Nacional de Informações sobre Saneamento: Diagnóstico dos Serviços de Água e Esgotos) – 2013. Brasília: SNSA/MCIDADES; 2014. p.181.

Soares LdaS, Lobo PdosS, Mascarenhas JD, Neri DL, Guerra SdeF, de Oliveira AdoS, et al. Identification of lineage III of G12 rotavirus strains in diarrheic children in the Northern Region of Brazil between 2008 and 2010. 2012 Jan; 157(1):135-9.

Sobsey MD, Dean CH, Knuckles ME, Wagner RA. Interactions and Survival of Enteric Viruses in Soil Materials. *Appl Environ Microbiol*. 1980 Jul; 40(1):92-101.

Soller JA, Bartrand T, Ashbolt NJ, Ravenscroft J, Wade TJ. Estimating the primary etiologic agents in recreational freshwaters impacted by human sources of faecal contamination. *Water Res*. 2010 Sep; 44(16):4736-47.

Stoeckel DM, Harwood VJ. Performance, design, and analysis in microbial source tracking studies. *Appl Environ Microbiol*. 2007 Apr; 73(8):2405-15.

Stoeckel DM, Mathes MV, Hyer KE, Hagedorn C, Kator H, Lukasik J, et al. Comparison of seven protocols to identify fecal contamination sources using *Escherichia coli*. *Environ Sci Technol*. 2004 Nov; 38(22):6109-17.

Teunis PF, Moe CL, Liu P, Miller SE, Lindesmith L, Baric RS, et al. Norwalk virus: how infectious is it? *J Med Virol*. 2008 Aug; 80(8):1468-76.

Teunis PF, Rutjes SA, Westrell T, de Roda Husman AM. Characterization of drinking water treatment for virus risk assessment. *Water Res*. 2009 Feb; 43(2):395-404.

Thongprachum A, Takanashi S, Kalesaran AF, Okitsu S, Mizuguchi M, Hayakawa S, et al. Four-year study of viruses that cause diarrhea in Japanese pediatric outpatients. *J Med Virol*. 2015 Jul; 87(7):1141-8.

Trujillo AA, McCaustland KA, Zheng DP, Hadley LA, Vaughn G, Adams SM, et al. Use of TaqMan real-time reverse transcription-PCR for rapid detection, quantification, and typing of norovirus. *J Clin Microbiol*. 2006 Apr; 44(4):1405-12.

Tse H, Lau SK, Chan WM, Choi GK, Woo PC, Yuen KY. Complete genome sequences of novel canine noroviruses in Hong Kong. *J Virol*. 2012 Sep; 86(17):9531-2.

USEPA (*U.S. Environmental Protection Agency - Agência de Proteção Ambiental Americana*). Contaminant Candidate List 1 - CCL 1. 1998. [acesso em 2015 Aug 26]. Disponível em: <http://www2.epa.gov/ccl/contaminant-candidate-list-1-ccl-1>

USEPA (*U.S. Environmental Protection Agency - Agência de Proteção Ambiental Americana*). Exposure factors handbook: 2011 edition. EPA/600/R-09/052F. 2011.

USEPA (*U.S. Environmental Protection Agency - Agência de Proteção Ambiental Americana*). Microbiological Risk Assessment (MRA) Tools, Methods, and Approaches for Water Media December 2014. Office of Science and Technology. Office of Water U.S. Environmental Protection Agency. EPA-820-R-14-009 Washington, DC 20460. 2014.

USEPA (*U.S. Environmental Protection Agency - Agência de Proteção Ambiental Americana*). Recreational Water Quality Criteria. Office of Water 820-F-12-058. 2012. [acesso em 2015 Aug 26]. Disponível em: <http://water.epa.gov/scitech/swguidance/standards/criteria/health/recreation/upload/RWQC2012.pdf>

van Heerden J, Ehlers MM, Heim A, Grabow WO. Prevalence, quantification and typing of adenoviruses detected in river and treated drinking water in South Africa. *J Appl Microbiol.* 2005; 99(2):234-42.

Victoria M, Fumian TM, Rocha MS, Dalmao F, Leite JP, Girones R, et al. Gastroenteric virus dissemination and influence of rainfall events in urban beaches in Brazil. *J Appl Microbiol.* 2014a Oct; 117(4):1210-8.

Victoria M, Rigotto C, Moresco V, de Abreu Corrêa A, Kolesnikovas C, Leite JP, et al. Assessment of norovirus contamination in environmental samples from Florianópolis City, Southern Brazil. *J Appl Microbiol.* 2010 Jul; 109(1):231-8.

Victoria M, Tort LF, García M, Lizasoain A, Maya L, Leite JP, et al. Assessment of gastroenteric viruses from wastewater directly discharged into Uruguay River, Uruguay. *Food Environ Virol.* 2014b Jun; 6(2):116-24.

Vieira CB, Mendes AC, Guimarães FR, Fumian TM, Leite JP, Gaspar AM, et al. Detection of enteric viruses in recreational waters of an urban lagoon in the city of Rio de Janeiro, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2012 Sep; 107(6):778-84.

Villar JCE, Ronchail J, Guyot JL, Cochonneau G, Filizola N, Waldo L, et al. Spatio-temporal rainfall variability in the Amazon basin countries (Brazil, Peru, Bolivia, Colombia, and Ecuador). *Int J Climatol.* 2009 Sep; 29(11):1574-94.

Villena C, Gabrieli R, Pintó RM, Guix S, Donia D, Buonomo E, et al. A large infantile gastroenteritis outbreak in Albania caused by multiple emerging rotavirus genotypes. *Epidemiol Infect.* 2003 Dec; 131(3):1105-10.

Vinje J. Advances in laboratory methods for detection and typing of norovirus. *J Clin Microbiol.* 2015 Feb; 53(2):373-81.

Vinje J, Koopmans MP. Simultaneous detection and genotyping of “Norwalk-like viruses” by oligonucleotide array in a reverse line blot hybridization format. *J Clin Microbiol.* 2000 Jul; 38(7):2595-601.

Xavier MdaP, Carvalho Costa FA, Rocha MS, Andrade JdaS, Diniz FK, Andrade TR. Surveillance of Human Astrovirus Infection in Brazil: The First Report of MLB1 Astrovirus. *PloS One.* 2015 Aug; 10(8):e0135687.

Xavier MP, Oliveira SA, Ferreira MS, Victoria M, Miranda V, Silva MF, et al. Detection of caliciviruses associated with acute infantile gastroenteritis in Salvador, an urban center in NortheastBrazil. *Braz J Med Biol Res.* 2009 May; 42(5):438-44.

Wade TJ, Pai N, Eisenberg JN, Colford JM Jr. Do U.S. Environmental Protection Agency water quality guidelines for recreational waters prevent gastrointestinal illness? A systematic review and meta-analysis. *Environ Health Perspect.* 2003 Jun; 111(8):1102-9.

Wakuda M, Ide T, Sasaki J, Komoto S, Ishii J, Sanekata T, et al. Porcine rotavirus closely related to novel group of human rotaviruses. *Emerg Infect Dis.* 2011 Aug; 17(8):1491-3.

Wang G, Shen Z, Qian F, Li Y, Yuan Z, Zhang J. Genetic diversity of sapovirus in non-hospitalized adults with sporadic cases of acute gastroenteritis in Shanghai, China. *J Clin Virol.* 2014 Apr; 59(4):250-4.

Ward RL, Bernstein DI, Young EC, Sherwood JR, Knowlton DR, Schiff GM. Human rotavirus studies in volunteers: determination of infectious dose and serological response to infection. *J Infect Dis.* 1986 Nov; 154(5):871-80.

Wolf S, Hewitt J, Greening GE. Viral multiplex quantitative PCR assays for tracking sources of fecal contamination. *Appl Environ Microbiol.* 2010 Mar; 76(5):1388-91.

Wong K, Fong TT, Bibby K, Molina M. Application of enteric viruses for fecal pollution source tracking in environmental waters. *Environ Int.* 2012a Sep; 45:151-64.

Wong K, Mukherjee B, Kahler AM, Zepp R, Molina M. Influence of inorganic ions on aggregation and adsorption behaviors of human adenovirus. *Environ Sci Technol.* 2012b Oct; 46(20):11145-53.

Wong K, Xagorarakis I. Evaluating the prevalence and genetic diversity of adenovirus and polyomavirus in bovine waste for microbial source tracking. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2011 May; 90(4):1521-6.

Wong K, Xagorarakis I. Quantitative PCR assays to survey the bovine adenovirus levels in environmental samples. *J Appl Microbiol.* 2010 Aug; 109(2):605-12.

Wong M, Kumar L, Jenkins TM, Xagorarakis I, Phanikumar MS, Rose JB. Evaluation of public health risks at recreational beaches in Lake Michigan via detection of enteric viruses and human-specific bacteriological marker. *Water Res.* 2009 Mar; 43(4):1137-49.

Wyer MD, Wyn-Jones AP, Kay D, Au-Yeung HK, Gironés R, López-Pila J, et al. Relationships between human adenoviruses and faecal indicator organisms in European recreational waters. *Water Res.* 2012 Sep; 46(13):4130-41.

Wyn-Jones P. The Detection of Waterborne Viruses. In: Bosch A. *Human Viruses in Water*. 1.ed. Elsevier; 2007. p.177-204.

Zeng SQ, Halkosalo A, Salminen M, Szakal ED, Puustinen L, Vesikari T. One-step quantitative RT-PCR for the detection of rotavirus in acute gastroenteritis. *J Virol Methods.* 2008 Nov; 153(2): 238-40.

10. ANEXOS

Anexo 1. Condições da reação de Transcrição Reversa (RT) para obtenção de cDNA

Adicionou-se 2 µL de dimetil sulfóxido (DMSO) (SIGMA®) a 10 µL de RNA extraído, que foram então incubados a 97 °C por sete minutos, seguido de banho de gelo por dois minutos. Em seguida, 38 µL da mistura de reagentes (Quadro 10.1) foram adicionados ao tubo contendo o RNA. O volume total foi então submetido a RT, que consistiu em 25 °C por cinco minutos, 50 °C por uma hora e 70 °C por 20 min. O cDNA foi estocado a -20 °C até o momento da PCR.

Quadro 10.1. Reagentes utilizados na reação de Transcrição Reversa (RT) para a obtenção de DNA complementar (cDNA) a partir do RNA viral extraído.

| Reagente (concentração) | Volume (µL) |
|---------------------------------------------|-------------|
| *H ₂ O DNAase / RNAase livre | 20,9 |
| *Tampão de PCR sem MgCl ₂ (10 X) | 5,0 |
| *dXTP: dATP, dTTP, dGTP, dCTP (2,5 mM) | 4,0 |
| *MgCl ₂ (50 mM) | 1,5 |
| *RT Superscript III™ (200 U/µL) | 1,0 |
| *Random primer (25 U) | 4,0 |
| *DTT (100 mM) | 1,0 |
| *RNAse Out (40 U/µL) | 0,6 |
| Total | 38,0 |

*Invitrogen - Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA

Anexo 2. Condições das reações de PCR quantitativa (qPCR) para detecção e quantificação de adenovírus humano (HAdV), poliomavírus JC (JCPyV), rotavírus grupo A (RVA), norovírus genogrupo II (NoV GII), astrovírus humano (HAstV), norovírus genogrupo IV (NoV GIV), sapovírus (SaV), bocavírus humano (HBoV), klassevírus (KV), aichivírus (AiV), adenovirus suíno (PAdV) e poliomavírus bovino (BPyV)

Os reagentes e volumes de DNA, cDNA e RNA e as condições das reações dos protocolos de qPCR para detecção dos vírus estudados nesta tese estão descritos nos Quadros 10.2, 10.3 e 10.4.

Quadro 10.2. Reagentes utilizados na PCR quantitativa (qPCR) para detecção e quantificação de adenovírus humano (HAdV), poliomavírus JC (JCPyV), rotavírus grupo A (RVA), astrovírus humano (HAstV), klassevírus (KV), aichivírus (AiV), adenovírus suíno (PAdV) e poliomavírus bovino (BPyV).

| | HAdV, PAdV | | JCPyV, BPyV | | | RVA, KV, AiV | | HAstV | |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------|-------------|--------------|-------------|------------------------------------------------|--------------|-------------|--------------|-------------|
| Reagentes | Concentração | Volume (µL) | Concentração | Volume (µL) | Reagentes | Concentração | Volume (µL) | Concentração | Volume (µL) |
| *PCR Master Mix | 2 X | 12,5 | 2 X | 12,5 | PCR Master Mix | 2 X | 12,5 | 2X | 12,5 |
| *1Primer F | 22,5 µM | 1,0 | 10 µM | 1,0 | *1H ₂ O DNAase / RNAase livre | | 5,0 | | 3,9 |
| *1Primer R | 22,5 µM | 1,0 | 10 µM | 1,0 | Primer F | 10 µM | 1,0 | 10 µM | 1,5 |
| *Sonda | 11,25 µM | 0,5 | 6 µM | 0,5 | Primer R | 10 µM | 1,0 | 10 µM | 1,5 |
| Total mix | | 15,0 | | 15,0 | Sonda | 10 µM | 0,5 | 10 µM | 0,6 |
| DNA | | 10,0 | | 10,0 | Total mix | | 20,0 | | 20,0 |
| | | | | | cDNA | | 5,0 | | 5,0 |
| *Applied Biosystems, Foster City, California, EUA; *1Invitrogen - Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA. | | | | | | | | | |

Quadro 10.3. Reagentes utilizados na PCR quantitativa (qPCR) para detecção e quantificação de norovírus genogrupos II (NoV GII) e IV (NoV GIV) e sapovírus (SaV).

| | NoV GII | | | NoV GIV | | | SaV | |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------|-------------|----------------------------------------|--------------|-------------|----------------------------------------|--------------|-------------|
| Reagentes | Concentração | Volume (µL) | Reagentes | Concentração | Volume (µL) | Reagentes | Concentração | Volume (µL) |
| * ¹ Mix Ultrasense | 5 X | 5,0 | PCR Master Mix | 2 X | 12,5 | PCR Master Mix | 2 X | 12,5 |
| * ¹ H ₂ O DNAase / RNAase livre | | 11,0 | H ₂ O DNAase / RNAase livre | | 4,5 | H ₂ O DNAase / RNAase livre | | 2,5 |
| * ¹ Primer F | 12,5 µM | 1,0 | Primer F | 10 µM | 1,0 | 3 Primer F | 10 µM | 1,0 de cada |
| * ¹ Primer R | 22,5 µM | 1,0 | Primer R | 10 µM | 1,0 | Primer R | 10 µM | 1,0 |
| *Sonda | 25 µM | 0,25 | Sonda | 10 µM | 1,0 | 2 Sondas | 10 µM | 0,5 de cada |
| * ¹ Rox | 50 X | 0,5 | Total mix | | 20,0 | Total mix | | 20,0 |
| * ¹ Mix da enzima | | 1,25 | cDNA | | 5,0 | cDNA | | 5,0 |
| Total mix | | 20,0 | | | | | | |
| RNA | | 5,0 | | | | | | |
| *Applied Biosystems, Foster City, California, EUA; ¹ Invitrogen - Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA. | | | | | | | | |

Quadro 10.4. Condições das reações de PCR quantitativa (qPCR) para detecção e quantificação de adenovírus humano (HAdV), poliomavírus JC (JCPyV), rotavírus grupo A (RVA), norovírus genogrupo II (NoV GII), astrovírus humano (HAstV), norovírus genogrupo IV (NoV GIV), sapovírus (SaV), bocavírus humano (HBoV), klassevírus (KV), aichivírus (AiV), adenovírus suíno (PAdV) e poliomavírus bovino (BPyV).

| HAdV, JCPyV, RVA, HBoV, AiV | NoV GII | HAstV | NoV GIV |
|------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------|-----------------------------------------------------|
| 10 min 95 °C 40x } 15 seg 95 °C } 1 min 60 °C | 1 h 55 °C 5 min 95 °C 40x } 15 seg 95 °C } 1 min 60 °C } 1 min 65 °C | 10 min 95 °C 45x } 15 seg 95 °C } 1 min 55 °C | 10 min 95 °C 45x } 15 seg 94 °C } 1 min 60 °C |
| PAdV | BPyV | SaV | KV |
| 10 min 95 °C 45x } 15 seg 95 °C } 20 seg 55 °C } 20 seg 60 °C | 10 min 95 °C 45x } 15 seg 95 °C } 30 seg 60 °C | 15 min 95 °C 45x } 15 seg 94 °C } 1 min 62 °C | 10 min 95 °C 45x } 15 seg 95 °C } 1 min 58 °C |

Anexo 3. Condições das Reações em Cadeia Pela Polimerase (PCR) para caracterização viral

Adenovírus Humano (HAdV)

Para HAdV, a caracterização foi realizada pela amplificação por PCR e sequenciamento de parte do gene que codifica o hexon destes vírus (Tabela 4.4).

Foram adicionados 10 µL do DNA à mistura de reagentes descrita no Quadro 10.5. A reação de amplificação consistiu em desnaturação do DNA a 94 °C por 5 minutos e 35 ciclos de desnaturação dos *amplicons* a 94 °C por 30 seg, hibridação dos iniciadores a 55 °C por 30 seg e extensão a 72 °C por 1 min. Ao final, foi realizada uma extensão a 72 °C por 5 min. Os produtos obtidos foram analisados em gel de agarose 1,5 % (item 4.5.5.1).

Quadro 10.5. Reagentes utilizados na Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) para caracterização molecular dos adenovírus humanos (HAdV).

| Reagentes (Concentração) | Volume (µL) |
|---------------------------------------------|--------------------|
| *H ₂ O DNAase/RNAase livre | 27,7 |
| *dXTP (dCTP, dTTP, dATP, dGTP) (20 µM) | 4,0 |
| *Tampão de PCR sem MgCl ₂ (10 X) | 5,0 |
| *MgCl ₂ (50 mM) | 1,0 |
| *Hex 1 / Hex 2 (25 µM) | 1,0 de cada |
| *Taq Polimerase Platinum (5 U/µL) | 0,3 |
| Total | 40,0 |

*Invitrogen - Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA;

Rotavírus grupo A (RVA)

Os RVA foram classificados binariamente pela amplificação parcial dos segmentos que codificam para as proteínas VP4 e VP7, o que permite a genotipagem por tamanho do fragmento amplificado, e também pela amplificação e sequenciamento de parte do fragmento que codifica a proteína VP6 (Tabela 4.4).

A caracterização por VP4 e VP7 consistiu em uma *semi-nested* PCR. Para o PCR, foram adicionados 2,5 µL do cDNA à mistura de reagentes descrita no Quadro 10.6. A reação de amplificação consistiu em desnaturação do cDNA a 94 °C por 2 min e 35 ciclos de desnaturação dos *amplicons* a 94 °C por 30 seg, hibridação dos iniciadores a 50 °C por 30 seg e extensão a 72 °C por 1 min. Ao final, foi realizada uma extensão a 72 °C por 10 min.

Quadro 10.6. Reagentes utilizados na Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) para classificação binária de rotavírus grupo A (RVA) em genótipos G e P.

| Reagentes (Concentração) | Volume (µL) |
|--------------------------------------------|-------------|
| *H ₂ O DNAase/RNAase livre | 15,625 |
| *dXTP (dCTP, dTTP, dATP, dGTP) (20µM) | 2,0 |
| *Tampão de PCR sem MgCl ₂ (10X) | 2,5 |
| *MgCl ₂ (50mM) | 1,25 |
| *9con1/9con2 (G) ou 4con2/4con3 (P) (20µM) | 0,5 de cada |
| *Taq Polimerase Platinum (5U/µL) | 0,125 |
| Total | 22,5 |

*Invitrogen - Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA;

Para a *semi-nested* de G (VP7), foram utilizados 0,5 µL do iniciador consensual para G (9con1) e 0,5 µL de cada iniciador G específico (G1, G2, G3, G4, G5 e G9) (Tabela 4.4). Para a *semi-nested* de P (VP4) foram utilizados 0,5 µL do iniciador consensual para P (4con3) e 0,5 µL de cada iniciador específico para P[4], P[5], P[6], P[8] e P[9] (Tabela 4.4). Foi adicionado 1 µL do produto da PCR a 24 µL da mistura da reação contendo os reagentes conforme Quadro 10.7 para G tipo e Quadro 10.8 para P tipo. As reações de amplificação para ambas as tipagens consistiram em desnaturação inicial a 94 °C por 2 min, seguida de 35 ciclos de desnaturação dos *amplicons* a 94 °C por 30 seg, hibridação dos iniciadores a 50 °C por 30 seg e posterior extensão a 72 °C por 1 min. Ao final, foi realizada uma extensão a 72 °C por 10 min. As amostras foram genotipadas em função do tamanho de fragmento característico de cada genótipo (Tabela 4.4) em gel de agarose 1,5 % (item 4.5.5.1).

Quadro 10.7. Reagentes utilizados na *semi-nested* PCR para caracterização molecular de genótipos G de rotavírus grupo A (RVA).

| Reagentes (Concentração) | Volume (µL) |
|------------------------------------------------------------|-------------|
| *H ₂ O DNAase/RNAase livre | 14,875 |
| *dXTP (dCTP, dTTP, dATP, dGTP) (20 µM) | 2,0 |
| *Tampão de PCR sem MgCl ₂ (10 X) | 2,5 |
| *MgCl ₂ (50 mM) | 1,0 |
| * ¹ Mistura dos iniciadores de cadeia de G tipo | 3,5 |
| *Taq Polimerase Platinum (5 U/µL) | 0,125 |
| Total | 24,0 |

*Invitrogen - Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA

*¹Mistura de G tipo (0,5 µL de cada iniciador): 9con1 + 9T1-1 (G1) + 9T1-2 (G2) + 9T1-3 (G3) + 9T1-4 (G4) + FT5 (G5) + 9T1-9 (G9).

Quadro 10.8. Reagentes utilizados na *semi-nested* PCR para caracterização molecular de genótipos P de rotavírus grupo A (RVA).

| Reagentes (Concentração) | Volume (µL) |
|------------------------------------------------------------|-------------|
| *H ₂ O DNAase/RNAase livre | 14,375 |
| *dXTP (dCTP, dTTP, dATP, dGTP) (20 µM) | 2,0 |
| *Tampão 10 X | 2,5 |
| *MgCl ₂ (50 mM) | 1,0 |
| * ¹ Mistura dos iniciadores de cadeia de P tipo | 4,0 |
| *Taq Polimerase Platinum (5 U/µL) | 0,125 |
| Total | 24,0 |

*Invitrogen - Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA;

*¹Mistura de P (0,5 µL de cada iniciador): 4con3 + 1T1 P[8] + 1T1 Wa + 1T1-VN + 2T1 P[4] + 3T1 P[6] + 4T1 P[9] + 5T1 P[5]

Para caracterização molecular dos RVA pela proteína VP6, foram adicionados 6 µL do cDNA à mistura de reagentes descrita no Quadro 10.9. A reação de amplificação consistiu em desnaturação do cDNA a 94 °C por 2 min e 40 ciclos de desnaturação dos *amplicons* a 94 °C por 30 seg, hibridação dos iniciadores a 58 °C por 30 seg e extensão a 72 °C por 1 min. Ao final foi

realizada uma extensão a 72 °C por 10 min. Os produtos obtidos foram analisados em gel de agarose 1,5 % (item 4.5.5.1).

Quadro 10.9. Reagentes utilizados na Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) para caracterização molecular de rotavírus grupo A (RVA) pela proteína VP6.

| Reagentes (Concentração) | Volume (µL) |
|---------------------------------------------|-------------|
| *H ₂ O DNAase/RNAase livre | 31,25 |
| *dXTP (dCTP, dTTP, dATP, dGTP) (20 µM) | 4,0 |
| *Tampão de PCR sem MgCl ₂ (10 X) | 5,0 |
| *MgCl ₂ (50 mM) | 1,5 |
| *VP6 F / VP6 R (P) (20 µM) | 1,0 de cada |
| *Taq Polimerase Platinum (5 U/µL) | 0,25 |
| Total | 44,0 |

*Invitrogen - Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA;

Norovírus genogrupo II (NoV GII)

Para NoV GII, a caracterização foi realizada pela amplificação por *semi-nested* PCR e posterior sequenciamento de parte da região de junção ORF1-ORF2 destes vírus (Tabela 4.4).

Foram adicionados 10 µL do cDNA à mistura de reagentes descrita no Quadro 10.10. A reação de amplificação consistiu em desnaturação do DNA a 94 °C por 2 min e 40 ciclos de desnaturação dos *amplicons* a 94 °C por 30 seg, hibridação dos iniciadores a 50 °C por 30 seg e extensão a 72 °C por 1 min. Ao final, foi realizada uma extensão a 72 °C por 7 min.

Quadro 10.10. Reagentes utilizados na Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) para caracterização molecular dos norovírus genogrupo II (NoV GII).

| Reagentes (Concentração) | Volume (µL) |
|---------------------------------------------|-------------|
| *H ₂ O DNAase/RNAase livre | 26,6 |
| *dXTP (dCTP, dTTP, dATP, dGTP) (20 µM) | 4,0 |
| *Tampão de PCR sem MgCl ₂ (10 X) | 5,0 |
| *MgCl ₂ (50 mM) | 2,0 |
| *Mon 431/Mon 432/G2SKR (25 µM) | 0,6 de cada |
| *Taq Polimerase Platinum (5 U/µL) | 0,6 |
| Total | 40,0 |

*Invitrogen - Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA;

Para a *semi-nested*, foram adicionados 4 µL do produto do primeiro PCR à mistura de reagentes descrita no Quadro 10.11. A reação de amplificação consiste das mesmas condições da PCR. Os produtos obtidos foram analisados em gel de agarose 1,5 % (item 4.5.5.1).

Quadro 10.11. Reagentes utilizados na *semi-nested* PCR para caracterização molecular dos norovírus genogrupo II (NoV GII).

| Reagentes (Concentração) | Volume (µL) |
|---------------------------------------------|-------------|
| *H ₂ O DNAase/RNAase livre | 33,2 |
| *dXTP (dCTP, dTTP, dATP, dGTP) (20 µM) | 4,0 |
| *Tampão de PCR sem MgCl ₂ (10 X) | 5,0 |
| *MgCl ₂ (50 mM) | 2,0 |
| *COG2R/G2SKR (25 µM) | 0,6 de cada |
| *Taq Polimerase Platinum (5 U/µL) | 0,6 |
| Total | 46,0 |

*Invitrogen - Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA;

Anexo 4. Resultados dos ensaios para avaliação de repetitividade e reprodutibilidade dos protocolos de amplificação genômica quantitativa como ferramentas de rastreamento microbiológico de fontes de contaminação

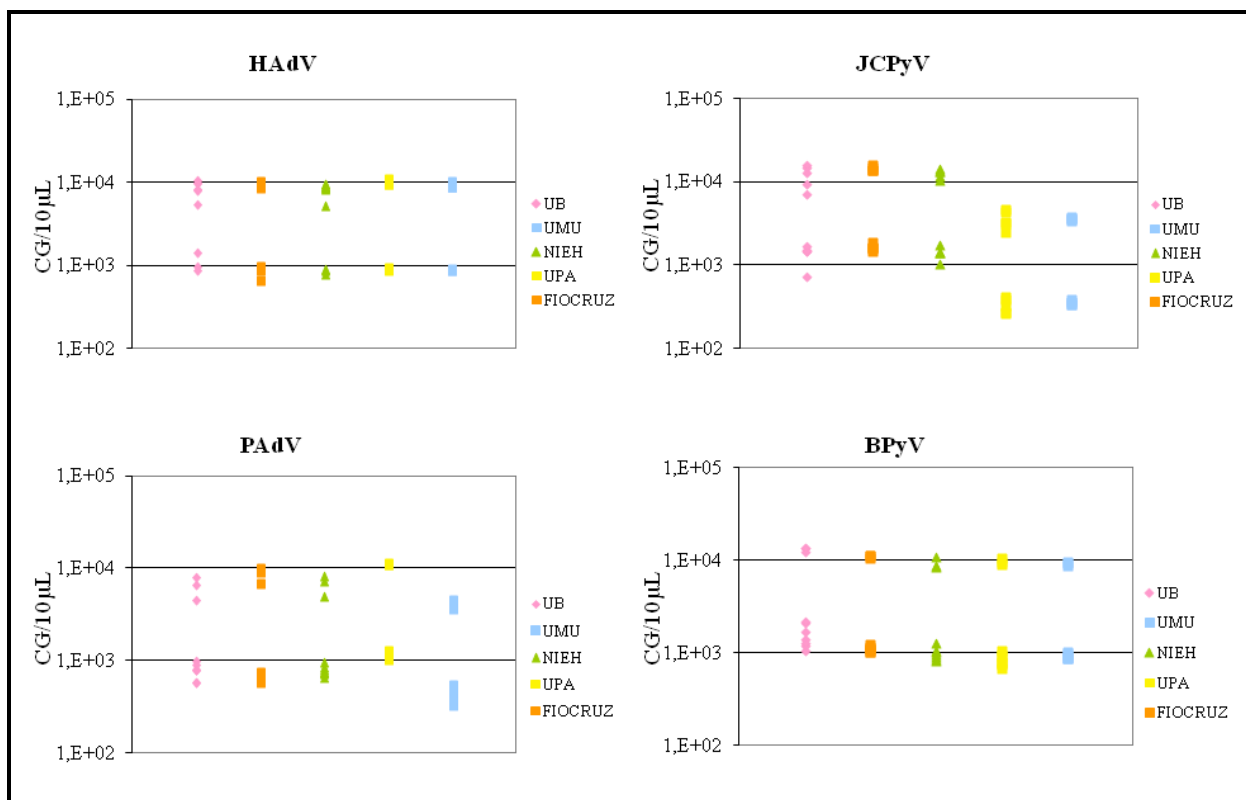


Figura 10.1. Quantificações de adenovírus humano (HAdV), poliomavírus JC (JCPyV), adenovírus suíno (PAdV) e poliomavírus bovino (BPyV) obtidas nos ensaios de repetitividade e reprodutibilidade dos protocolos de quantificação de vírus de origem humana e animal como ferramentas de rastreamento das fontes de contaminação. CG/10µL – cópias de genoma por 10 microlitros; UB – Universidade de Barcelona (do catalão *Universitat de Barcelona*), Espanha; UMU – Universidade de Umea (do sueco *Umea Universitet*), Suécia; NIEH – Instituto Nacional de Saúde Ambiental (do inglês *National Institute for Environmental Health* e do húngaro *Orszagos Kornyezetegeszsegugyi Inteze*), Hungria; UPA – Universidade de Patras (do inglês *University of Patras*), Grécia; FIOCRUZ – Fundação Oswaldo Cruz, Brasil.

Anexo 5. Artigo aceito para publicação

Esse artigo está aceito para publicação na revista internacional *Food and Environmental Virology*, fator de impacto 2,357, conforme carta abaixo. Ele compreende os resultados de detecção e quantificação de vírus humanos considerando o ciclo hidrológico do Rio Negro, assim como os resultados físico-químicos e bacteriológicos, incluindo correlações entre indicadores bacterianos e virais de contaminação fecal humana, obtidos no período de monitoramento.

Date: Jan 07, 2016
To: "Carmen Vieira" c.baur@ioc.fiocruz.br
From: "Food and Environmental Virology (FAEV)" Kishan.Ravishankar@springer.com
Subject: Decision on your manuscript FAEV-D-15-00045R2

Dear Miss Vieira:

I am pleased to inform you that your manuscript, "Viruses Surveillance under Different Season Scenarios of the Negro River Basin, Amazonia, Brazil" has been accepted for publication in *Food and Environmental Virology*.

For information about your accepted paper and the production process, please click the following link:
www.springer.com/12560

Sincerely,
Albert Bosch, Ph.D.
Food and Environmental Virology

Food and Environmental Virology
Viruses Surveillance under Different Season Scenarios of the Negro River Basin,
Amazonia, Brazil
 --Manuscript Draft--

| | | |
|------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------|
| Manuscript Number: | FAEV-D-15-00045R2 | |
| Full Title: | Viruses Surveillance under Different Season Scenarios of the Negro River Basin, Amazonia, Brazil | |
| Article Type: | Original Research | |
| Keywords: | Enteric viruses; river water; flood; dry; Amazonia; Negro River | |
| Corresponding Author: | Carmen Vieira Fundacao Oswaldo Cruz Rio de Janeiro, Rio de Janeiro BRAZIL | |
| Corresponding Author Secondary Information: | | |
| Corresponding Author's Institution: | Fundacao Oswaldo Cruz | |
| Corresponding Author's Secondary Institution: | | |
| First Author: | Carmen Vieira | |
| First Author Secondary Information: | | |
| Order of Authors: | Carmen Vieira | |
| | Adriana de Abreu Corrêa | |
| | Michele Jesus | |
| | Sérgio Luiz Bessa Luz | |
| | Peter Wyn-Jones | |
| | David Kay | |
| | Marta Vargha | |
| | Marize Pereira Miagostovich | |
| Order of Authors Secondary Information: | | |
| Funding Information: | VIROCLIME project/Seventh Framework Programme (FP7), EU (243923) | Not applicable |

1 **Manuscript: Title page**

2

3 **Viruses Surveillance under Different Season Scenarios of the Negro River Basin, Amazonia,**
4 **Brazil**

5

6 Carmen Baur Vieira¹, Adriana de Abreu Corrêa¹, Michele Silva de Jesus², Sérgio Luiz Bessa Luz², Peter Wyn-
7 Jones³, David Kay³, Marta Vargha⁴, Marize Pereira Miagostovich¹

8

9 ¹Laboratório de Virologia Comparada e Ambiental, Instituto Oswaldo Cruz (IOC), Fundação Oswaldo Cruz
10 (FIOCRUZ), Pavilhão Helio e Peggy Pereira, Avenida Brasil, 4365, Manguinhos, Rio de Janeiro, RJ, Brasil, 21040-
11 360

12

13 ²Ecologia de Doenças Transmissíveis na Amazônia, Instituto Leônidas e Maria Deane (ILMD), Fundação Oswaldo
14 Cruz (FIOCRUZ), Rua Terezina, 476, Adrianópolis, Manaus, AM, Brasil, 69057-070

15

16 ³Department of Geography and Earth Sciences (DGES), Aberystwyth University, Penglais Campus, Aberystwyth,
17 Ceredigion SY23 3DB, UK

18

19 ⁴National Institute for Environmental Health, Department of Water Hygiene - Gyáli út 2-6, H-1097 Budapest,
20 Hungary

21

22

23 Corresponding author: Carmen Baur Vieira

24 E-mail address: c.baur@ioc.fiocruz.br

25 Telephone: +5521 25621923;

26 Fax: +5521 25621851

27

28

29

30

31 **Acknowledgements**

32 This work was funded by VIROCLIME project (www.viroclimate.org) as part of *European Union 7th Framework*
33 *Programme for Research* contract number 243923.

34

35

36

37

1 **Manuscript: Blinded manuscript**

2
3 **Viruses Surveillance under Different Season Scenarios of the Negro River Basin, Amazonia,**
4 **Brazil**

5
6 **Abstract**

7
8 The Negro River is located in the Amazon basin, the largest hydrological catchment in the world. Its water is used
9 for drinking, domestic activities, recreation and transportation and water quality is significantly affected by
10 anthropogenic impacts. The goals of this study were to determine the presence and concentrations of the main viral
11 etiological agents of acute gastroenteritis, such as group A rotavirus (RVA) and genogroup II norovirus (NoV GII),
12 and to assess the use of human adenovirus (HAdV) and JC polyomavirus (JCPyV) as viral indicators of human
13 faecal contamination in the aquatic environment of Manaus under different hydrological scenarios. Water samples
14 were collected along Negro River and in small streams known as *igarapés*. Viruses were concentrated by an organic
15 flocculation method and detected by quantitative PCR. From 272 samples analysed, HAdV was detected in 91.9 %,
16 followed by JCPyV (69.5 %), RVA (23.9 %) and NoV GII (7.4 %). Viral concentrations ranged from 10² to 10⁶ GC
17 L⁻¹ and viruses were more likely to be detected during the flood season, with the exception of NoV GII, which was
18 detected only during the dry season. Statistically significant differences on virus concentrations between dry and
19 flood seasons were observed only for RVA. The HAdV data provides a useful complement to faecal indicator
20 bacteria in the monitoring of aquatic environments. Overall results demonstrated that the hydrological cycle of the
21 Negro River in the Amazon Basin affects the dynamics of viruses in aquatic environments and, consequently, the
22 exposure of citizens to these waterborne pathogens.

23
24 **Keywords:** enteric viruses; river water; flood; dry; Amazon; Negro River

1 Introduction

2
3 The discharge of treated and untreated sewage into aquatic environments is a well-known source of faecal
4 pollution in water, and is the likely source of pathogenic microorganisms including viruses entering these ecosystems
5 (Fong et al. 2010; Li et al. 2011; Prevost et al. 2015). In recent years, researchers have demonstrated the presence of
6 human enteric viruses in surface waters, affecting water quality and maintenance of public health through policies
7 designed to control discharge of pathogens to the aquatic environment and limit viral waterborne disease (Aw and
8 Gin 2011; Hewitt et al. 2013; Mellou et al. 2014). Indeed, it is estimated that up to 69 % of diarrheal diseases could
9 be prevented with improved sanitation (Norman et al. 2010; WHO 2014).

10 To reduce health risks from water-related illness, bacteriological indicators such as *Escherichia coli* (*E. coli*)
11 and enterococci have been adopted as standards for water quality by nations worldwide. However, many studies have
12 demonstrated that faecal indicator bacteria concentrations do not correlate well with measures of enteric viruses,
13 particularly when concentrations of indicator bacteria are low (Bofill-Mas et al. 2013; Hewitt et al. 2013; Pina et al.
14 1998). Human adenovirus (HAdV) and JC polyomavirus (JCPyV) have been proposed as possible viral indicators of
15 human faecal contamination in aquatic environments due to their host specificity, high prevalence, and stability in
16 the environment. These double-stranded DNA viruses are ubiquitous in the population and are excreted in faeces and
17 urine, respectively (Albinana-Gimenez et al. 2009; Bofill-Mas and Girones 2003; Bofill-Mas et al. 2006, 2013; Pina
18 et al. 1998). Furthermore, important viral pathogens responsible for acute gastroenteritis such as group A rotavirus
19 (RVA) and norovirus (NoV) have been reported in high concentrations in the environment and have been associated
20 with water-related transmission (Calgua et al. 2013a; Di Bartolo et al. 2015; Sinclair et al. 2009).

21 In Brazil, despite the implementation of rotavirus vaccine in the National Program of Immunization in 2006,
22 morbidity is still high (Carvalho-Costa et al. 2011; Linhares and Justino 2014). The same is observed for NoV, where
23 cases are often associated with outbreaks and the introduction of new variants at regular intervals (Fioretti et al.
24 2014).

25 According to the National Information System on Sanitation (SNIS 2014), only 39 % of the sewage in Brazil is
26 treated, ranging from 14.7 % in the north to 45.9 % in the central and western areas of the country. In this context,
27 the city of Manaus, located in the northern part of the country and in the heart of the Amazon forest, has a significant
28 environmental impact on adjacent aquatic resources. This city of 2,020,301 inhabitants (IBGE 2015) sits on the
29 banks of the Negro River in the Amazon Basin, which has an annual cycle of dry and flood seasons, and has been
30 responsible for the discharge of sewage into small streams that cross the city (*igarapés*) and directly into the Negro
31 River. Data collected under the Brazilian Program of Monitoring Acute Diarrheal Diseases (MDDA 2015) show that
32 more than 40,000 cases of gastroenteritis are notified every year in the city and an increase in river levels is
33 sometimes thought to be associated with an increase in the number of these cases, although a clear relationship is not
34 evident (Fig. 1). The main goal of this study was to quantify the concentrations of the principal gastroenteric viruses
35 in the aquatic environments of Manaus, to provide an empirical evidence-base for RVA and NoV risk assessment
36 studies of human exposure to those viruses, as well as to evaluate the use of HAdV and JCPyV as viral indicators of
37 human faecal contamination taking into account the temporal variations due to the hydrological cycle of the Negro
38 River.

1 **Materials and methods**

2

3 **Study area**

4

5 Water samples were obtained from the main Negro River basin, including São Raimundo and Educandos basins
6 containing small streams that cross the city of Manaus. These streams are called *igarapés*, which are first, second or
7 third order streams. These shallow watercourses are characteristic of the Amazon Basin.

8 The Negro River catchment accounts for 12 % of the 6,000,000 km² of the Amazon basin, which spans seven
9 countries, including Brazil (Frappart et al. 2005; Villar et al. 2009). It has one of the highest rainfalls in the world
10 (2,250-2,500 mm per year in Manaus), and the river regime includes a distinct flood season (Frappart et al. 2005;
11 Vale et al. 2011; Villar et al. 2009). The Negro River basin is 2,250 km in length with a mean flow of 28,000 m³ s⁻¹.
12 This river generally exhibits low sediment and nutrient concentrations and an acid pH due to the high concentrations
13 of humic compounds (Silva et al. 2009). It also receives significant vegetation debris comprising leaves, shrubs and
14 trunks that are dissolved and decomposed, releasing acids, which give the water the characteristic black color of
15 rivers located in tropical forests.

16 Due to seasonal variations in rainfall, the flow regime of the Negro River is characterized by two distinct
17 seasons: the dry period (from September to February) and the flood period (from March to August), where the water
18 level difference can reach up to 15 m. It usually shows its yearly maximum and minimum peaks in June and October,
19 respectively (Satyamurty et al. 2013; Silva et al. 2009).

20 São Raimundo and Quarenta *igarapés* are the main streams of the São Raimundo and Educandos basins,
21 respectively. These are characterized by complete or partial removal of riparian vegetation and chronic urban
22 pollution from waste disposal and domestic and industrial sewage. These streams are also influenced by the rainy
23 season in the Amazon basin and by the hydrological cycle of the Negro River, which, during its flood season, causes
24 black water to flood these *igarapés*.

25

26 **Sampling schedule**

27

28 A surveillance study was carried out from January 2011 to May 2012 at five sampling sites (MA01 to MA05),
29 located using global position system (GPS - eTREX Legend H, Garmin Ltd., Olathe, KS), including areas along
30 Negro River (MA01, MA04 and MA05) and *igarapés* (MA02 and MA03) (Fig. 2).

31 Water sampling was carried out on seven occasions during the dry (January and October 2011 and January
32 2012) and the flood (April and July 2011, March and May 2012) seasons. At each of the five sites, eight water
33 samples (10 L each) were collected within two hours (one every 15 min), totalling 40 water samples per sampling
34 occasion. Samples were collected in sterile carboys, transferred to the laboratory and immediately processed.
35 Additionally, extra water samples were obtained at each sampling point for viral recovery experiments (10 L) and
36 bacterial analysis (500 mL).

1 This study was included in VIROCLIME project (<http://www.viroclime.org>) and was carried out using
2 Standard Operational Procedures (SOPs) for virus concentration, nucleic acid extraction and quantitative PCR
3 detection. The SOPs included process controls and standard plasmid preparation.
4
5

6 **Virus concentration method**

7

8 Water samples were concentrated by a flocculation method based on the adsorption of viruses to pre-
9 flocculated skimmed milk proteins (Calgua et al. 2013a). Briefly, conductivity and pH of water samples were
10 measured. The former was adjusted to 1.5 mS by the addition of solid artificial sea salts (Sigma–Aldrich Chemie
11 GMBH, Steinheim, Germany) and to pH 3.5 by the addition of HCl 1 N. One hundred mL of pre-flocculated 1 %
12 (w/v) skimmed milk solution (PSM) pH 3.5 (Difco, Detroit, MI, USA) was then added into the samples, which were
13 stirred gently for 8 h at room temperature for the adsorption of viruses to the flocs. The flocs were left to sediment by
14 gravity for another 8 h and the supernatants were removed without disturbing the sediment using a peristaltic pump.
15 The remaining volumes with the sediment (approximate 500 mL) were centrifuged at 8,000 x g for 30 min at 4 °C.
16 The supernatants were carefully removed and pellets were re-dissolved to ≈10 mL with phosphate buffer (1:2, v/v of
17 Na₂HPO₄ 0.2 M and NaH₂PO₄ 0.2 M) pH 7.5. Viral concentrates were homogenized by vortexing and aliquots of 2
18 mL were prepared and stored at –80 °C for further viral analysis.

19 Recovery experiments were carried out as positive controls by spiking 10⁶ genome copies (GC) of human
20 adenovirus type 35 (HAdV35) into the extra 10-L water samples followed by its concentration under the same
21 conditions as the field samples and as previously described by Calgua et al. (2013a). Additionally, 10-L tap waters
22 containing 100 mL of a solution of 10 % sodium thiosulphate were processed as negative controls at each sampling.
23

24 **Nucleic acid extraction and reverse transcription reaction**

25

26 Nucleic acid extractions from the concentrates were performed by QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen, Inc.,
27 Valencia, CA, USA), following the manufacturer’s protocol. For RVA, cDNA was obtained by reverse transcription
28 (RT) reaction using random hexamers and Superscript III® Reverse Transcriptase (Invitrogen - Life Technologies,
29 Carlsbad, CA, USA).
30

31 **Virus detection and quantification**

32

33 QPCR protocols for HAdV, JCPyV, RVA and NoV GII detection and quantification were performed as
34 previously described (Hernroth et al. 2002; Kageyama et al. 2003; Loisy et al. 2005; Pal et al. 2006; Zeng et al.
35 2008). Standard curves were prepared with the following plasmid constructions: plasmid pHAdV contained the
36 hexon region of HAdV 41 in pBR322, pJCPyV contained the whole JCPyV genome strain Mad-1 in pBR322,
37 pNoVGII contained ORF 1/ORF 2 junction in pTrueBlue and pRVA contained a fragment of RVA Wa NSP3 in
38 pCR™ 2.1-TOPO® vector (Invitrogen - Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). pRVA was constructed by our group

1 and pHAdV, pJCPyV and pNoVGII were donated by Dr Annika Allard – Umea University (UMU), Dr Andrew
2 Lewis – US Food and Drug Administration (FDA) and Dr Jan Vinjé – Centers for Disease Control and Prevention
3 (CDC), respectively.

4 Detection of HAdV, JCPyV and RVA were performed with the TaqMan Environmental PCR Master Mix®
5 (Applied Biosystems, Foster City, California, USA) and NoV GII with RNA Ultrasense™ One-step Quantitative
6 RT-PCR System (Invitrogen - Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). All qPCR reactions were carried out in an
7 ABI PRISM 7500® Real-Time System (Applied Biosystems, Foster City, California, USA). Undiluted and 10-fold
8 dilutions of the nucleic acid extract were analysed in duplicate (4 runs/sample) and concentrations were estimated as
9 the mean of data obtained, correcting for the dilution analysed. Low variability in the replicates was observed and
10 significant variability was observed only in the results of a few undiluted samples, being these values excluded of the
11 mean estimation. All qPCR assays included non-template controls (NTC).

12 For all molecular procedures, positive controls and DNase/RNase free water as negative controls were included
13 and separated rooms were used to avoid cross contamination.

15 **Bacteriological parameters**

16
17 *E. coli* and enterococci were quantified by Colilert® and Enterolert® Quanti-Tray®/2000 (IDEXX Laboratories,
18 Inc., Westbrook, ME, USA), respectively, and results were reported as most probable number per 100 mL (MPN 100
19 mL⁻¹). Samples were tested undiluted and using 10-fold dilutions.

20 Brazilian regulation establishes a maximum of 2000 MPN 100 mL⁻¹ and 400 100 mL⁻¹ of *E. coli* and
21 enterococci, respectively, as standards for recreational waters (CONAMA 2000).

23 **Physico-chemical parameters**

24
25 Water temperature (°C), pH, turbidity (in nephelometric turbidity units - NTU) and conductivity (µS cm⁻¹) were
26 measured in all samples at the time of collection using Water Quality Checker U-10 (Horiba, Ltd., Irvine, CA, USA).

28 **Statistical Analysis**

29
30 Statistical analyses were performed using GraphPad Prism version 5.0. Data were checked for normality in raw
31 and log₁₀ transformed states using Shapiro-Wilk normality test. Both showed significant differences from normality
32 (p<0.0001). Fischer and Mann-Whitney tests were performed for comparing virus detection and concentration,
33 respectively, between dry and flood seasons of the Negro River. For the comparison of the concentrations between
34 seasons using the Mann-Whitney test, only positive samples were considered. The Mann-Whitney test was also used
35 for comparing physico-chemical parameters between seasons. In this case, all samples were considered in the
36 comparison since all of them presented measurements.

37 Correlation analyses between HAdV, JCPyV, *E. coli* and enterococci were carried out using non-parametric
38 Spearman correlation. For this purpose, non-detected values for both viruses and bacteria were assigned as the

1 detection limits of methods, as follows: 57 GC L⁻¹ of HAdV and JCPyV (1 GC per qPCR reaction) and 1 MPN 100
2 mL⁻¹ of *E. coli* and enterococci. Correlation coefficients (r) between 0.9–1.0, 0.3–0.5 and <0.3 were considered as
3 strong, low and negligible correlations between viruses and bacteria, respectively (Hewitt et al. 2013).

4 Results were considered statistically significant when p<0.05.

6 Results

8 Viruses detection and quantification in water samples

9
10 Two hundred and seventy-two water samples were collected from January 2011 to May 2012 in five different
11 sampling points in Manaus. Sampling was carried out on seven occasions during the study, three of them when river
12 level was low (dry) and four when river level was high (flood), producing 112 dry and 160 flood samples,
13 respectively. During the full sampling period, the Negro River level ranged from 16.76 to 29.97 m (Port of Manaus
14 2015) (Fig. 3).

15 Estimated recovery rates of HAdV 35 were 0-71 %, 21-242 %, 16-193 %, 4-83 % and 9-125 % at MA01 to
16 MA05, respectively. HAdV was the most detected virus (found in 91.9 % of all samples), followed by JCPyV (69.5
17 %), RVA (23.9 %) and NoV GII (7.4 %) (Table 1). Viruses were detected at all sampling points, except NoV GII,
18 which was not detected at the mouth of Quarenta *igarapé* (MA04) and at the Negro River in the end of the urban
19 area (MA05). The most contaminated areas were urban streams (MA02 and MA03); Ponta Negra beach (MA01) was
20 the least contaminated site.

21 Virus concentrations ranged from 10² to 10⁶ GC L⁻¹, with generally higher concentrations of HAdV and JCPyV
22 observed in urban streams (Fig. 4). HAdV was detected at all sampling points in concentrations ranging through
23 three log₁₀ orders throughout the study period. Despite the lower prevalence of JCPyV detection, when detected, its
24 concentration was similar to those for HAdV in most samples. An increase on RVA concentration was evident in
25 flood periods. NoV GII concentration was low or zero at all sampling points. Statistically significant differences on
26 viruses concentration were observed only for RVA when comparing dry and flood season samples (p<0.0001). When
27 considering each sampling point, this analysis revealed significant differences for HAdV in MA04 and MA05
28 (p=0.0018 and p=0.0096), for JCPyV in MA01 (p=0.0441) and for RVA in MA02 and MA03 (p=0.0002 and
29 p=0.024).

31 Quantification of *E. coli* and enterococci as microbiological standards of human faecal contamination of water

32 *E. coli* and enterococci were detected in all samples, except *E. coli* in MA01 in January 2011. Thirty-two
33 (87/272) and 35 (85/240) percent of the samples did not comply with the standards for recreational waters, due to
34 elevated concentrations of *E. coli* and enterococci, respectively. These elevated concentrations occurred mainly in
35 urban streams MA02 and MA03 and in October, when river level was the lowest observed (Fig. 5). The recreational
36 area (MA01) was considered acceptable for bathing based on *E. coli* and enterococci parameters, except in April and
37 July of 2011 when concentrations of enterococci exceeded the standards in four and three samples, respectively. No

1 statistically significant differences in bacterial concentrations were observed between dry and flood seasons (*E. coli*
2 $p=0.4308$ and enterococci $p=0.1325$).

4 **Correlations between viruses and bacteriological indicators of human faecal contamination of water**

6 Sixty-five percent of HAdV and JCPyV positive samples were detected when the measured *E. coli*
7 concentration was lower than the Brazilian standard for recreational waters (i.e. the water was compliant with the
8 Brazilian standard) and 64.2 % and 61.8 % of HAdV and JCPyV positive samples, respectively, were detected when
9 enterococci quantification complied with the Brazilian standards. At the designated recreational area (MA01), all
10 HAdV and JCPyV positive samples were detected when *E. coli* concentration was lower than the Brazilian standards
11 for recreational waters and 90.7 % and 86.4 % of HAdV and JCPyV positive samples, respectively, were detected
12 when enterococci quantification complied with the standards. HAdV and JCPyV concentrations were higher than the
13 faecal indicator bacteria in almost all sampling points and seasons (Fig. 6).

14 Calculated Spearman correlations between viruses and bacteriological parameters are shown in Table 2. R-
15 values varied from 0.274 to 0.762. No strong correlations were observed and negligible correlation was observed for
16 JCPyV and *E. coli*. Moreover, HAdV presented higher correlations than JCPyV.

18 **Physico-chemical data of sampling points**

20 Measurements of physico-chemical parameters are shown in Table 3. Considering dry and flood seasons,
21 significant differences for all parameters in all sampling points were observed ($p<0.05$), except temperature in
22 MA02, MA03 and MA05 and conductivity in MA04 and MA05. Median temperatures of 28-29 °C were observed,
23 although higher pH, turbidity and conductivity medians were observed in the dry season in the *igarapés* (MA02 and
24 MA03).

26 **Discussion**

28 The northern region of Brazil exhibits the poorest sanitary conditions in the country, particularly in urban areas
29 which have suffered from unplanned growth. Manaus is the main financial and economic centre of this region and is
30 located in the heart of the largest rainforest in the world and presents important social, environmental and urban
31 problems, possibly associated with the establishment of the Manaus Free Trade Zone (MFTZ) developed in the
32 1970s (Magalhães and Rojas 2005). Today, riparian settlers living in wooden houses (*palafitas*) constructed along
33 the *igarapés* are continually exposed to environmental contaminants coming from the garbage that is deposited into
34 river waters and from raw sewage that is discharged either directly into waters or indirectly by stormwater run-off
35 (PROSAMIM 2004, 2011, 2012).

36 The prevalence and concentration of viruses observed in this study confirms previous qualitative data obtained
37 in 2004-2005, when the impact of microbiological contamination in the city's streams was reported (Miagostovich et
38 al. 2008). In this study, the skimmed-milk flocculation method, previously described to concentrate viruses from

1 seawater and validated later to freshwater (Calgua et al. 2008, 2013a), associated with qPCR protocols constituted a
2 useful tool to assess the concentrations of HAdV, JCPyV, RVA and NoV GII in the acidic waters of the Negro River
3 basin. Although no information on viruses infectivity is given by qPCR, preliminary results from cell culture assays
4 have demonstrated the presence of infectious HAdV particles in these samples (unpublished data). Calgua et al.
5 (2011) could also detect and quantify HAdV and JCPyV infectious particles by immunofluorescence assay in water
6 samples using the same concentration method.

7 Unfortunately, this study also revealed that infrastructural interventions performed in the city of Manaus by the
8 Social and Environmental Program for the *Igarapés* of Manaus (PROSAMIM) in the last years (2005-2011) has not
9 prevented river water contamination by sewage. Despite these improvements poor water quality may still be
10 affecting residents, particularly those in the seasonal flood-affected areas. The overall results suggest that the risk of
11 infection due to different exposures to water, such as through recreation, household activities or transportation, can
12 vary according to the sites and to the hydrological seasons of the Negro River. Remarkable differences were
13 observed both in the distribution and in the concentration of viruses obtained from the *igarapés* (MA02 and MA03)
14 and Negro River sites (MA01, MA04 and MA05).

15 Concentration of viruses in the *igarapés* were similar to those found in sewage samples of different
16 geographical areas with values higher than four \log_{10} (Calgua et al. 2013b; Flannery et al. 2012; Fumian et al. 2013;
17 Myrmel et al. 2015). As these ‘sewage-like’ streams are tributaries of the Negro River, they transport those viruses
18 through the environment by natural water flow to the main river channel where they are diluted and dispersed. It is
19 worth noting the higher detection rates of RVA in the *igarapés* when compared to the diluted samples from the
20 Negro River as reported by Miagostovich et al. (2008). Related reports in other south America countries, including
21 Venezuela, Argentina, Uruguay, confirm the morbidity of RVA in this region (Barril et al. 2010, 2015; Rodríguez-
22 Díaz et al. 2009; Victoria et al. 2014) despite RVA vaccination programs introduced in some of these countries in the
23 last decade (PATH 2015). Although the samples obtained from these streams were similar to sewage, NoV GII
24 detection was lower when compared to the other viruses, corroborating a previous study in this area (Miagostovich et
25 al. 2008).

26 Differences on viruses distribution were also observed in the sampling sites along the Negro River. Ponta Negra
27 Beach (MA01), located in the beginning of the urban area of Manaus, is a recreational area where thousands of
28 people bath every week. It is in a relatively affluent neighbourhood with several buildings, including hotels and
29 leisure areas. This site was relatively clean despite the direct discharge of raw sewage into the river and the discharge
30 of treated sewage outfalls (PROSAMIM 2012). This is probably because Ponta Negra does not receive
31 contamination from large urban streams that cross densely populated areas of Manaus. Although being the least
32 contaminated site, all viruses were detected in MA01 (Ponta Negra), with higher detection of NoV GII in the dry
33 season and significant differences on the JCPyV concentration.

34 In the following sampling sites along the Negro River (MA04 and MA05), viruses were more prevalent and
35 presented higher concentrations than MA01. It is important to note that MA04 is located at the mouth of the urban
36 watershed of Quarenta, which cross two popular neighbourhoods at the southern part of the city, and MA05
37 represents the end of the urban area along the river and is located adjacent to a port. The viral contamination may
38 come from the port itself and/or could be a result of the river flow which carries the contamination from the entire

1 city. At this site, bovine polyomavirus was also detected, which can be explained by the presence of pastures in this
2 area of Manaus (Rusiñol et al. 2014).

3 The higher levels of RVA during flood period of the Negro River is noteworthy. When the river level was
4 higher, water flooded more areas with virus laden water, expanding the distribution of viruses and transporting them
5 to more distant ecosystems. Since the hydrological cycle of Negro River is annual and people are in more contact
6 with water during flood period, it is possible to infer an association of this season with the increased risk and number
7 of gastroenteritis cases, especially in 2012, when it was observed the worst flood season in 110 years (Fig. 1).
8 Findings of higher detection and concentration of viruses described in this study during the flood season, especially
9 at site MA04, suggest this hypothesised dynamics of viruses transport.

10 RVA and NoV are important viruses causing infantile gastroenteritis and waterborne outbreaks, respectively
11 (Ahmed et al. 2014; Braeye et al. 2015; Di Bartolo et al. 2015; Jain et al. 2014; Villena et al. 2003). Unfortunately,
12 the unavailability of laboratory data characterizing etiological agents of diarrhea in Manaus does not allow a specific
13 correlation of these cases with those viral pathogens. In a recent study carried out in Manaus, RVA was responsible
14 for 25% of acute gastroenteritis in children up to 3 years old in 2004-2006 (Melo et al. 2013), and, to our knowledge,
15 there is no available data on NoV cases in the city.

16 The prevalence of RVA and NoV GII in the environment reflects their patterns in the population and could be
17 influenced by illness seasonality and also by the lower stability of RNA viruses in aquatic environments (Fong and
18 Lipp 2005; Fumian et al. 2011; Levy et al. 2009; Prevost et al. 2015; Rohayem 2009). These factors likely explain
19 the NoV GII detection only in January 2011 (dry season) and the RVA detection during the flood season. The
20 contamination of the environment promotes a constant pool of recirculating viruses and, as a consequence, people
21 are exposed and acquire immunity. However, the introduction of new and unusual RVA and NoV strains in Brazil
22 have been observed, which may cause waterborne gastroenteritis cases (da Silva Soares et al. 2014; Fioretti et al.
23 2011; 2014; Leite et al. 2008).

24 The hydrological cycle of Negro River also caused statistically significant changes in physico-chemical
25 parameters in all sampling points, although the greatest differences were observed for the *igarapés*, which could be
26 explained by the differences on the volume of water during dry and flood seasons. During the flood season, water
27 diluted the organic matter, chemical compounds and suspended materials in these areas, decreasing the turbidity,
28 conductivity and pH. Since these parameters may influence virus stability, adsorption and interaction between
29 viruses and suspended materials (Fong and Lipp 2005; Wong et al. 2012), they should be considered in future studies
30 correlating virus concentrations and other water quality parameters.

31 Bacteriological parameters (*E. coli* and enterococci) which are quantified as microbiological standards of faecal
32 contamination in bathing waters confirmed that all study areas were contaminated by sewage, despite the differences
33 between them. Moreover, the constant prevalence and high concentrations of HAdV and JCPyV throughout the study
34 period and correlations observed suggest that they may be useful candidate indicators of human faecal contamination
35 in waterbodies. The use of HAdV in particular, could complement faecal indicator bacteria in the monitoring of
36 aquatic environments and this new multiple health-indicators approach could better estimate the real risk of
37 waterborne diseases due to contact with these contaminated waters, as it has been proposed by other studies (Hewitt

1 et al. 2013; Marion et al. 2014; Wyer et al. 2012). Unfortunately, it was not possible to carry out an epidemiological
2 study to quantify the strength of any relationship.

3 The study of the Negro River hydrological cycle demonstrated that the flood season is characterised by changed
4 physico-chemical and enteric viruses concentrations in the sampled waters. The surveillance of HAdV, JCPyV, RVA
5 and NoV GII in the Negro River basin demonstrated high concentrations of these microorganisms showing the
6 implications of the lack of basic sanitation in this city.

7 Floods are part of the natural climate variability in Manaus occurring as a seasonal pattern. In recent years, the
8 city featured the long-lasting (2009) and most intense (2012) floods in recent history, and this more extreme
9 variability is predicted to continue due to climate change in the Amazon and this could increase the incidence of viral
10 waterborne gastroenteritis in Manaus. Since water plays an important role in the faecal-oral route of transmission of
11 enteric viruses, data from environmental surveillance could inform public health policy on sanitary improvements
12 and the prevalence of specific diseases in the contributing population.

14 **Conflict of interest**

15
16 The authors declare that they have no conflict of interest.

18 **References**

19
20 Ahmed, S. M., Hall, A. J., Robinson, A. E., Verhoef, L., Premkumar, P., Parashar, U. D., et al. (2014). Global
21 prevalence of norovirus in cases of gastroenteritis: a systematic review and meta-analysis. *The LANCET Infectious*
22 *Diseases*, 14(8), 725–730.

23
24 Albinana-Gimenez, N., Miagostovich, M. P., Calgua, B., Huguet, J. M., Matia, L., & Girones, R. (2009). Analysis of
25 adenoviruses and polyomaviruses quantified by qPCR as indicators of water quality in source and drinking-water
26 treatment plants. *Water Research*, 43(7), 2011–2019.

27
28 Aw, T. G., & Gin, K. Y. (2011). Prevalence and genetic diversity of waterborne pathogenic viruses in surface in
29 surface waters of tropical urban catchments. *Journal of Applied Microbiology*, 110(4), 903–914.

30
31 Barril, P. A., Fumian, T. M., Prez, V. E., Gil, P. I., Martínez, L. C., Giordano, M. O., et al. (2015). Rotavirus
32 seasonality in urban sewage from Argentina: effect of meteorological variables on the viral load and the genetic
33 diversity. *Environmental Research*, 138, 409–415.

34
35 Barril, P. A., Giordano, M. O., Isa, M. B., Masachessi, G., Ferreyra, L. J., Castello, A. A., et al. (2010). Correlation
36 between rotavirus A genotypes detected in hospitalized children and sewage samples in 2006, Córdoba, Argentina.
37 *Journal of Medical Virology*, 82(7), 1277–1281.

1 Bofill-Mas, S., Albinana-Gimenez, N., Clemente-Casares, P., Hundesa, A., Rodriguez-Manzano, J., Allard, A., et al.
2 (2006). Quantification and stability of human adenoviruses and polyomavirus JCPyV in wastewater matrices.
3 *Applied and Environmental Microbiology*, 72(12), 7894–7896.
4
5 Bofill-Mas, S., & Girones, R. (2003). Role of the environment in the transmission of JC virus. *Journal of*
6 *NeuroVirology*, 9(Suppl 1), 54–58.
7
8 Bofill-Mas, S., Rusiñol, M., Fernandez-Cassi, X., Carratalà, A., Hundesa, A., & Girones, R. (2013). Quantification
9 of human and animal viruses to differentiate the origin of the fecal contamination present in environmental samples.
10 *BioMed Research International*, 2013, 192089.
11
12 Braeye, T., DE Schrijver, K., Wollants, E., van Ranst, M., & Verhaegen, J. (2015). A large community outbreak
13 of gastroenteritis associated with consumption of drinking water contaminated by river water, Belgium, 2010.
14 *Epidemiology & Infection*, 143(4), 711–719.
15
16 Calgua, B., Barardi, C. R., Bofill-Mas, S., Rodriguez-Manzano, J., & Girones, R. (2011). Detection and
17 quantification of infectious human adenoviruses and JC polyomaviruses in water by immunofluorescence assay.
18 *Journal of Virological Methods*, 171(1), 1–7.
19
20 Calgua, B., Fumian, T., Rusiñol, M., Rodriguez-Manzano, J., Mbayed, V. A., Bofill-Mas, S., et al. (2013a).
21 Detection and quantification of classic and emerging viruses by skimmed-milk flocculation and PCR in river water
22 from two geographical areas. *Water Research*, 47(8), 2797–2810.
23
24 Calgua, B., Mengewein, A., Grunert, A., Bofill-Mas, S., Clemente-Casares, P., Hundesa, A., et al. (2008).
25 Development and application of a one-step low cost procedure to concentrate viruses from seawater samples.
26 *Journal of Virological Methods*, 153(2), 79–83.
27
28 Calgua, B., Rodriguez-Manzano, J., Hundesa, A., Suñen, E., Calvo, M., Bofill-Mas, S., et al. (2013b). New methods
29 for the concentration of viruses from urban sewage using quantitative PCR. *Journal of Virological Methods*, 187(2),
30 215–221.
31
32 Carvalho-Costa, F. A., Volotão, Ede M., de Assis, R. M., Fialho, A. M., de Andrade, Jda S., Rocha, L. N., et al.
33 (2011). Laboratory-based rotavirus surveillance during the introduction of a vaccination program, Brazil, 2005-2009.
34 *Pediatric Infectious Disease Journal*, 30(1 Suppl), S35–41.
35
36 CONAMA - National Environment Council (Conselho Nacional do Meio Ambiente). (2000). Ministério do Meio
37 Ambiente. Resolução 274 de 29 de novembro de 2000. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Poder
38 Executivo, Brasília, DF.

1 da Silva Soares, L., de Fátima Dos Santos Guerra, S., do Socorro Lima de Oliveira, A., da Silva Dos Santos, F., de
2 Fátima Costa de Menezes, E. M., Mascarenhas, Jd., et al. (2014). Diversity of rotavirus strains circulating in
3 Northern Brazil after introduction of a rotavirus vaccine: high prevalence of G3P[6] genotype. *Journal of Medical*
4 *Virology*, 86(6), 1065–1072.

5

6 Di Bartolo, I., Pavoni, E., Tofani, S., Consoli, M., Galuppini, E., Losio, M. N., et al. (2015).
7 Waterborne norovirus outbreak during a summer excursion in Northern Italy. *New Microbiologica*, 38(1), 109–112.

8

9 Fioretti, J. M., Bello, G., Rocha, M. S., Victoria, M., Leite, J. P., & Miagostovich, M. P. (2014). Temporal dynamics
10 of norovirus GII.4 variants in Brazil between 2004 and 2012. *PLoS One*, 9(3), e92988.

11

12 Fioretti, J. M., Ferreira, M. S., Victoria, M., Vieira, C. B., Xavier, Mda P., Leite, J. P., et al. (2011). Genetic diversity
13 of noroviruses in Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 106(8), 942–947.

14

15 Flannery, J., Keaveney, S., Rajko-Nenow, P., O'Flaherty, V., & Doré, W. (2012). Concentration of norovirus during
16 wastewater treatment and its impact on oyster contamination. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(9),
17 3400–3406.

18

19 Fong, T. T., & Lipp, E. K. (2005). Enteric viruses of humans and animals in aquatic environments: health risks,
20 detection, and potential water quality assessment tools. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 69(2), 357–
21 371.

22

23 Fong, T. T., Phanikumar, M. S., Xagorarakis, I., & Rose, J. B. (2010). Quantitative detection of human adenoviruses
24 in wastewater and combined sewer overflows influencing a Michigan river. *Applied and Environmental*
25 *Microbiology*, 76(3), 715–723.

26

27 Frappart, F., Seyler, F., Martinez, J.-M., Leon, J. G., & Cazenave, A. (2005). Floodplain water storage in the Negro
28 River basin estimated from microwave remote sensing of inundation area and water levels. *Remote Sensing of*
29 *Environment*, 99(4), 387–399.

30

31 Fumian, T. M., Leite, J. P., Rose, T. L., Prado, T., & Miagostovich, M. P. (2011). One year environmental
32 surveillance of rotavirus specie A (RVA) genotypes in circulation after the introduction of the Rotarix® vaccine in
33 Rio de Janeiro, Brazil. *Water Research*, 45(17), 5755–5763.

34

35 Fumian, T. M., Vieira, C. B., Leite, J. P., & Miagostovich, M. P. (2013). Assessment of burden of virus agents in an
36 urban sewage treatment plant in Rio de Janeiro, Brazil. *Journal of Water and Health*, 11(1), 110–119.

37

- 1 Hernroth, B. E., Conden-Hansson, A. C., Rehnstam-Holm, A. S., Girones, R., & Allard, A. K. (2002). Environmental
2 factors influencing human viral pathogens and their potential indicator organisms in the blue mussel, *Mytilus edulis*:
3 the first Scandinavian report. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(9), 4523–4533.
4
- 5 Hewitt, J., Greening, G. E., Leonard, M., & Lewis, G. D. (2013). Evaluation of human adenovirus and human
6 polyomavirus as indicators of human sewage contamination in the aquatic environment. *Water Research*, 47(17),
7 6750–6761.
8
- 9 IBGE – The Brazilian Institute of Geography and Statistics (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística). (2015).
10 <http://cidades.ibge.gov.br/xtras/perfil.php?codmun=130260>. Accessed 10 May 2015
11
- 12 Jain, S., Vashisth, J., & Changothra, H. (2014). Rotaviruses: is their surveillance needed? *Vaccine*, 32(27), 3367–3378.
13
- 14 Kageyama, T., Kojima, S., Shinohara, M., Uchida, K., Fukushi, S., Hoshino, F. B., et al. (2003). Broadly reactive
15 and highly sensitive assay for Norwalk-like viruses based on real-time quantitative reverse transcription-PCR.
16 *Journal of Clinical Microbiology*, 41(4), 1548–1557.
17
- 18 Leite, J. P., Carvalho-Costa, F. A., & Linhares, A. C. (2008). Group A rotavirus genotypes and the ongoing Brazilian
19 experience: a review. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 103(8), 745–753.
20
- 21 Levy, K., Hubbard, A. E., & Eisenberg, J. N. (2009). Seasonality of rotavirus disease in the tropics: a systematic
22 review and meta-analysis. *International Journal of Epidemiology*, 38(6), 1487–1496.
23
- 24 Li, D., Gu, A. Z., Zeng, S. Y., Yang, W., He, M., & Shi, H. C. (2011). Monitoring and evaluation of infectious
25 rotaviruses in various wastewater effluents and receiving waters revealed correlation and seasonal pattern of
26 occurrences. *Journal of Applied Microbiology*, 110(5), 1129–1137.
27
- 28 Linhares, A. C., & Justino, M. C. (2014). Rotavirus vaccination in Brazil: effectiveness and health impact seven
29 years post-introduction. *Expert Review of Vaccines*, 13(1), 43–57.
30
- 31 Loisy, F., Atmar, R. L., Guillon, P., Le Cann, P., Pommepuy, M., & Le Guyader, F. S. (2005). Real-time RT-PCR
32 for norovirus screening in shellfish. *Journal of Virological Methods*, 123(1), 1–7.
33
- 34 Magalhães, F., & Rojas, E. (2005). The re-urbanization of the city center of Manaus, Brazil - Facing the challenges
35 of informal settlements. 41st ISoCaRP Congress. Bilbao, Spain.
36

1 Marion, J. W., Lee, C., Lee, C. S., Wang, Q., Limeshow, S., Buckley, T. J., et al. (2014). Integrating bacterial and
2 viral water quality assessment to predict swimming-associated illness at a freshwater beach: a cohort study. *PLoS*
3 *One*, (11), e112029.
4
5 MDDA - Brazilian Program of Monitoring Acute Diarrheal Diseases (Programa Brasileiro de Monitorização das
6 Doenças Diarreicas Agudas). (2015). Ministério da Saúde, Brasília, DF.
7
8 Mellou, K., Katsioulis, A., Potamiti-Komi, M., Pournaras, S., Kyritsi, M., Katsiaflaka, A., et al. (2014). A
9 large waterborne gastroenteritis outbreak in central Greece, March 2012: challenges for the investigation and
10 management. *Epidemiology & Infection*, 142(1), 40–50.
11
12 Melo, G. Z. S., Costa, C. A., & Santos, I. G. C. (2013). Diversidade molecular de rotavírus do grupo A na cidade de
13 Manaus, Estado do Amazonas, Brasil, 2004 a 2006. *Epidemiologia e Serviços de Saúde*, 22(2), 265–272.
14
15 Miagostovich, M. P., Ferreira, F. F., Guimarães, F. R., Fumian, T. M., Diniz-Mendes, L., Luz, S. L., et al. (2008).
16 Molecular detection and characterization of gastroenteritis viruses occurring naturally in the stream waters of
17 Manaus, central Amazonia, Brazil. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(2), 375–382.
18
19 Myrmel, M., Lange, H., & Rimstad, E. (2015). A 1-Year Quantitative Survey of Noro-, Adeno-, Human Boca-, and
20 Hepatitis E Viruses in Raw and Secondarily Treated Sewage from Two Plants in Norway. *Food and Environmental*
21 *Virology*, 7(3), 213–223.
22
23 Norman, G., Pedley, S., & Takkouche, B. (2010). Effects of sewerage on diarrhoea and enteric infections: a
24 systematic review and meta-analysis. *THE LANCET Infectious Diseases*, 10(8), 536–544.
25
26 Pal, A., Sirota, L., Maudru, T., Peden, K., & Lewis, A. M. (2006). Real-time, quantitative PCR assays for the
27 detection of virus-specific DNA in samples with mixed populations of polyomaviruses. *Journal of Virological*
28 *Methods*, 135(1), 32–42.
29
30 PATH – Program for Appropriate Technology in Health. (2015).
31 [http://sites.path.org/rotavirusvaccine/files/2015/04/PATH-Worldwide-Rotavirus-Vaccine-Introduction-Map-geo-](http://sites.path.org/rotavirusvaccine/files/2015/04/PATH-Worldwide-Rotavirus-Vaccine-Introduction-Map-geo-2015.04.01.jpg)
32 [2015.04.01.jpg](http://sites.path.org/rotavirusvaccine/files/2015/04/PATH-Worldwide-Rotavirus-Vaccine-Introduction-Map-geo-2015.04.01.jpg). Accessed 10 July 2015
33
34 Pina, S., Puig, M., Lucena, F., Jofre, J., & Girones, R. (1998). Viral pollution in the environment and in
35 shellfish: human adenovirus detection by PCR as an index of human viruses. *Applied and Environmental*
36 *Microbiology*, 64(9), 3376–3382.
37

- 1 Port of Manaus (Porto de Manaus). (2015). [http://www.portodemanaus.com.br/?pagina=niveis-maximo-minimo-do-](http://www.portodemanaus.com.br/?pagina=niveis-maximo-minimo-do-rio-negro)
2 rio-negro. Accessed 10 May 2015
3
- 4 Prevost, B., Lucas, F. S., Goncalves, A., Richard, F., Moulin, L., & Wurtzer, S. (2015). Large scale survey of enteric
5 viruses in river and waste water underlines the health status of the local population. *Environment International*, 79,
6 42–50.
7
- 8 PROSAMIM - Social and Environmental Program for the *Igarapés* in Manaus (Programa Social e Ambiental dos
9 *Igarapés* de Manaus). Relatório de Impacto Ambiental – RIMA. Manaus, Igarapé do Educandos. (2004) Governo do
10 Estado do Amazonas, Secretaria de Estado de Infra-estrutura e Concremat Engenharia.
11
- 12 PROSAMIM - Social and Environmental Program for the *Igarapés* in Manaus (Programa Social e Ambiental dos
13 *Igarapés* de Manaus). PROSAMIM III – Igarapé São Raimundo Projeto Executivo. Igarapé São Raimundo, RIMA -
14 Relatório de Impacto Ambiental - REV. 01. (2012) Governo do Estado do Amazonas, Secretaria de Estado de Infra-
15 estrutura, Unidade de Gerenciamento de Programa Social e Ambiental dos Igarapés de Manaus (UGPI) e Concremat
16 Engenharia.
17
- 18 PROSAMIM - Social and Environmental Program for the *Igarapés* in Manaus (Programa Ambiental e Social dos
19 *Igarapés* de Manaus). PROGRAMA AMBIENTAL E SOCIAL DOS IGARAPÉS DE MANAUS (PROSAMIM III).
20 Relatório de Gestão Ambiental e Social – RGAS. (2011). Luis Fernando Galli.
21
- 22 Rodríguez-Díaz, J., Querales, L., Caraballo, L., Vizzi, E., Liprandi, F., Takiff, H., et al. (2009). Detection and
23 characterization of waterborne gastroenteritis viruses in urban sewage and sewage-polluted river waters in
24 Caracas, Venezuela. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(2), 387–394.
25
- 26 Rohayem, J. (2009). Norovirus seasonality and the potential impact of climate change. *Clinical Microbiology and*
27 *Infection*, 15(6), 524–527.
28
- 29 Rusiñol, M., Fernandez-Cassi, X., Hundesa, A., Vieira, C., Kern, A., Eriksson, I., et al. (2014). Application of human
30 and animal viral microbial source tracking tools in fresh and marine waters from five different geographical areas.
31 *Water Research*, 59, 119–129.
32
- 33 Satyamurty, P., Costa, C. P. W., Manzi, A. O., & Candido, L. A. (2013). A quick look at the 2012 record flood in the
34 Amazon Basin. *Geophysical Research Letters*, 40(7), 1396–1401.
35
- 36 Silva, G. S., Bisinoti, M. C., Fadini, P. S., Magarelli, G., Jardim, W. F., & Fostier, A. H. (2009). Major aspects of the
37 mercury cycle in the Negro River Basin, Amazon. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 20(6), 1127–1134.
38

1 Sinclair, R. G., Jones, E. L., & Gerba, C. P. (2009). Viruses in recreational water-borne disease outbreaks: a review.
2 *Journal of Applied Microbiology*, 107(6), 1769–1780.
3
4 SNIS – National Information System on Sanitation (Sistema Nacional de Informações sobre Saneamento:
5 Diagnóstico dos Serviços de Água e Esgotos) – 2013. (2014). Brasília: SNSA/MCIDADES.
6
7 Vale, R., Filizola, N., Souza, R., & Schongart, J. (2011). A cheia de 2009 na Amazônia Brasileira. *Revista Brasileira*
8 *de Geociências*, 41(4), 577–586.
9
10 Victoria, M., Tort, L. F., García, M., Lizasoain, A., Maya, L., Leite, J. P., et al. (2014). Assessment of gastroenteric
11 viruses from wastewater directly discharged into Uruguay River, Uruguay. *Food and Environmental Virology*, 6(2),
12 116–124.
13
14 Villar, J. C. E., Ronchail, J., Guyot, J. L., Cochonneau, G., Filizola, N., Lavado, W., et al. (2009). Spatio-temporal
15 rainfall variability in the Amazon basin countries (Brazil, Peru, Bolivia, Colombia, and Ecuador). *International*
16 *Journal of Climatology*, 29(11), 1574–1594.
17
18 Villena, C., Gabrieli, R., Pintó, R. M., Guix, S., Donia, D., Buonomo, E., et al. (2003). A large infantile
19 gastroenteritis outbreak in Albania caused by multiple emerging rotavirus genotypes. *Epidemiology and Infection*,
20 131(3), 1105–1110.
21
22 WHO – World Health Organization. Preventing diarrhoea through better water, sanitation and hygiene: exposures
23 and impacts in low- and middle-income countries. (2014). World Health Organization. Geneva, Switzerland.
24
25 Wong, K., Mukherjee, B., Kahler, A. M., Zepp, R., & Molina, M. (2012). Influence of inorganic ions
26 on aggregation and adsorption behaviors of human adenovirus. *Environmental Science & Technology*, 46(20),
27 11145–11153.
28
29 Wyer, M. D., Wyn-Jones, A. P., Kay, D., Au-Yeung, H. K., Gironés, R., López-Pila, J., et al. (2012). Relationships
30 between human adenoviruses and faecal indicator organisms in European recreational waters. *Water Research*,
31 46(13), 4130–4141.
32
33 Zeng, S. Q., Halkosalo, A., Salminen, M., Szakal, E. D., Puustinen, L., & Vesikari, T. (2008). One-step quantitative
34 RT-PCR for the detection of rotavirus in acute gastroenteritis. *Journal of Virological Methods*, 153(2), 238–240.
35
36
37
38

1 **Figure Captions**

2

3 **Fig. 1** Number of reported gastroenteritis cases and Negro River level in Manaus over an eight-year period. Sources:
4 Brazilian Program of Monitoring Acute Diarrheal Diseases (MDDA 2015) and Port of Manaus (2015). River level
5 data of 2010 were not available for all months

6

7 **Fig. 2** Map of the study area and geographical distribution of the sampling points (MA01 – MA05). MA01- Negro
8 River/Ponta Negra Beach (recreational area); MA02- São Raimundo Stream (*igarapé*); MA03- Quarenta Stream
9 (*igarapé*); MA04- Negro River/Educandos; MA05- Negro River/end of the urban area of Manaus. Source: Google
10 Maps

11

12 **Fig. 3** Sampling points considering hydrological cycle of Negro River. (a) dry season; (b) flood season

13

14 **Fig. 4** Quantification of human adenovirus (HAdV), JC polyomavirus (JCPyV), group A rotavirus (RVA) and
15 genogroup II norovirus (NoV GII) in each of the eight samples collected according to sampling location, sampling
16 and Negro River level. No sampling was carried out in MA05 in January 2011. $\text{Log}_{10} \text{GC L}^{-1}$ – Log_{10} genome copies
17 per litre

18

19 **Fig. 5** Median loads of *Escherichia coli* (*E. coli*) (a) and enterococci (b) as microbiological indicators of human
20 faecal contamination in aquatic environments in Manaus according to sampling location and sampling. MA01-
21 Negro River/Ponta Negra Beach (recreational area); MA02- São Raimundo Stream (*igarapé*); MA03- Quarenta
22 Stream (*igarapé*); MA04- Negro River/Educandos; MA05- Negro River/end of the urban area of Manaus. Threshold
23 means maximum concentrations for both indicators based on Brazilian regulation for recreational waters (2000 MPN
24 100 mL^{-1} and 400 MPN 100 mL^{-1} , respectively). Quantification of enterococci in January 2011 was not carried out.
25 MPN 100 mL^{-1} – Most Probable Number per 100 mL

26

27 **Fig. 6** Median of human adenovirus (HAdV) and JC polyomavirus (JCPyV) concentrations in comparison to
28 *Escherichia coli* (*E. coli*) (a) and enterococci (b) according to hydrological cycle of Negro River and sampling
29 points. MA01- Negro River/Ponta Negra Beach (recreational area); MA02- São Raimundo Stream (*igarapé*); MA03-
30 Quarenta Stream (*igarapé*); MA04- Negro River/Educandos; MA05- Negro River/end of the urban area of Manaus.
31 $\text{Log}_{10} \text{GC L}^{-1}$ – Log_{10} genome copies per litre; $\text{Log}_{10} \text{MPN L}^{-1}$ – Log_{10} Most Probable Number per litre

Figure 1

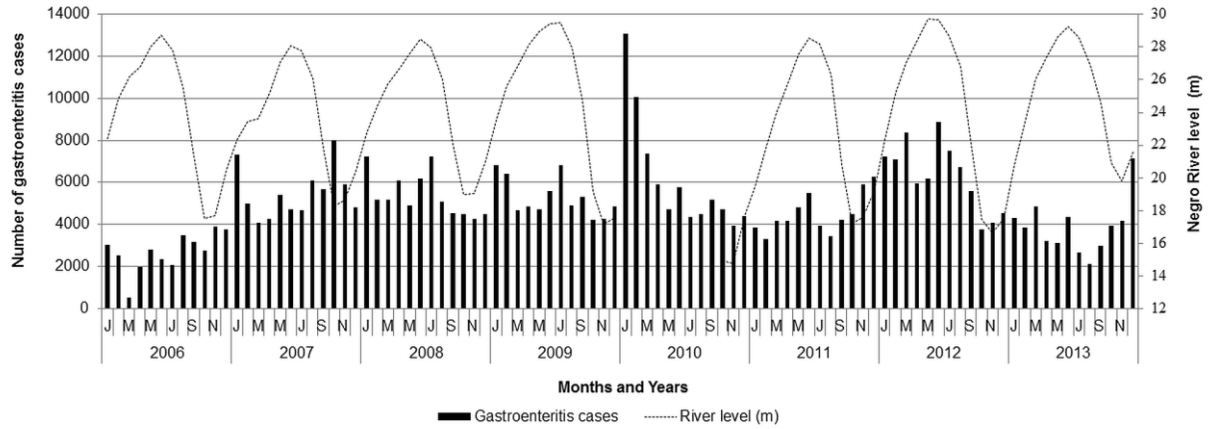


Figure 2

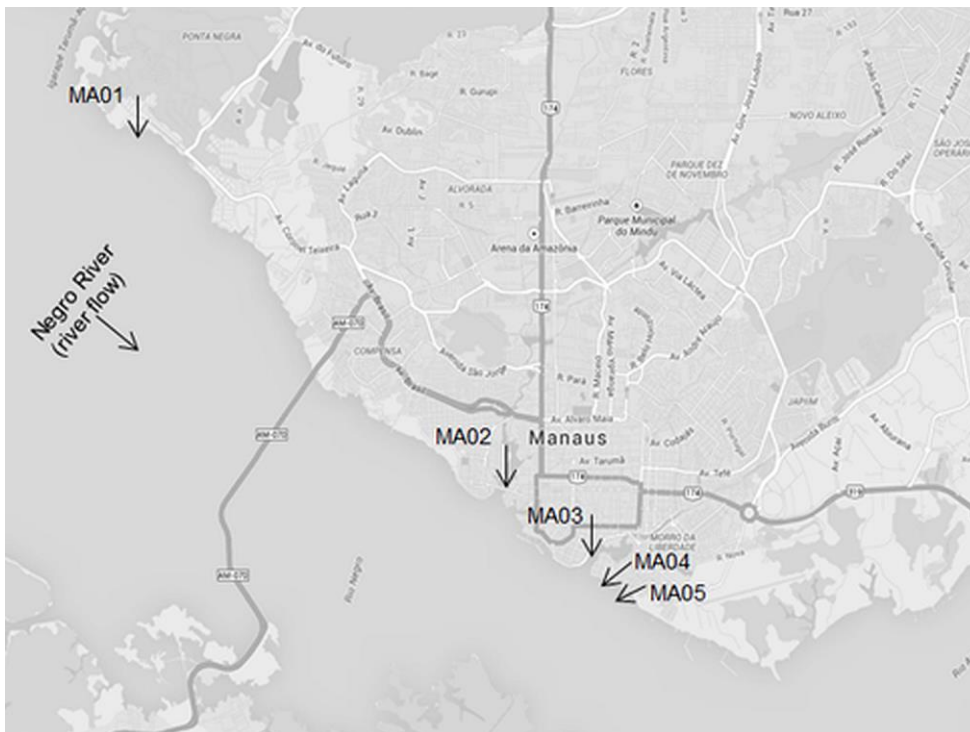


Figure 3

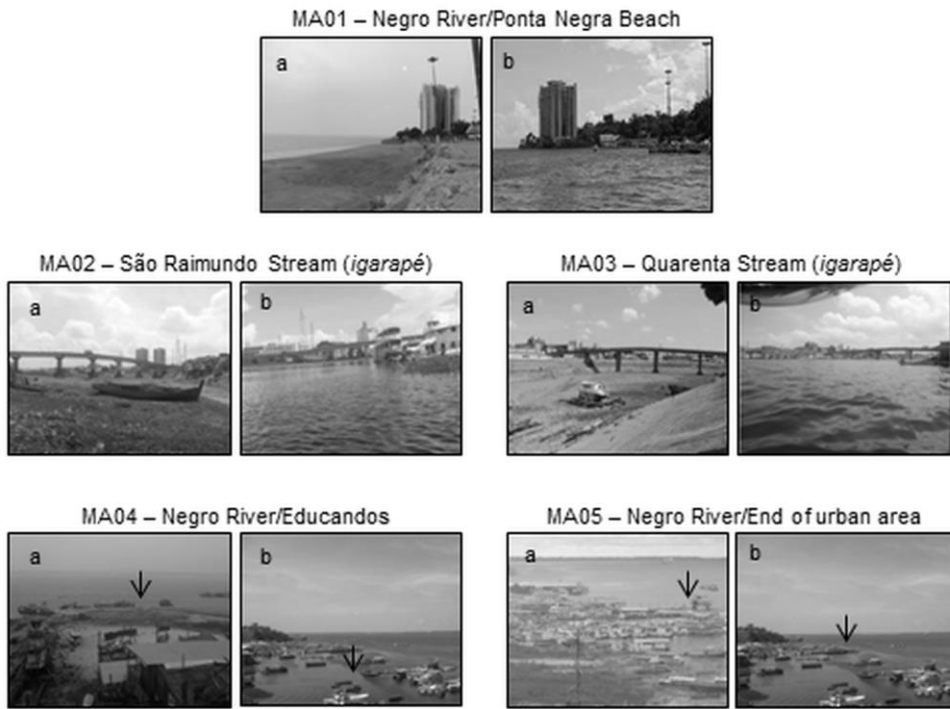


Figure 4

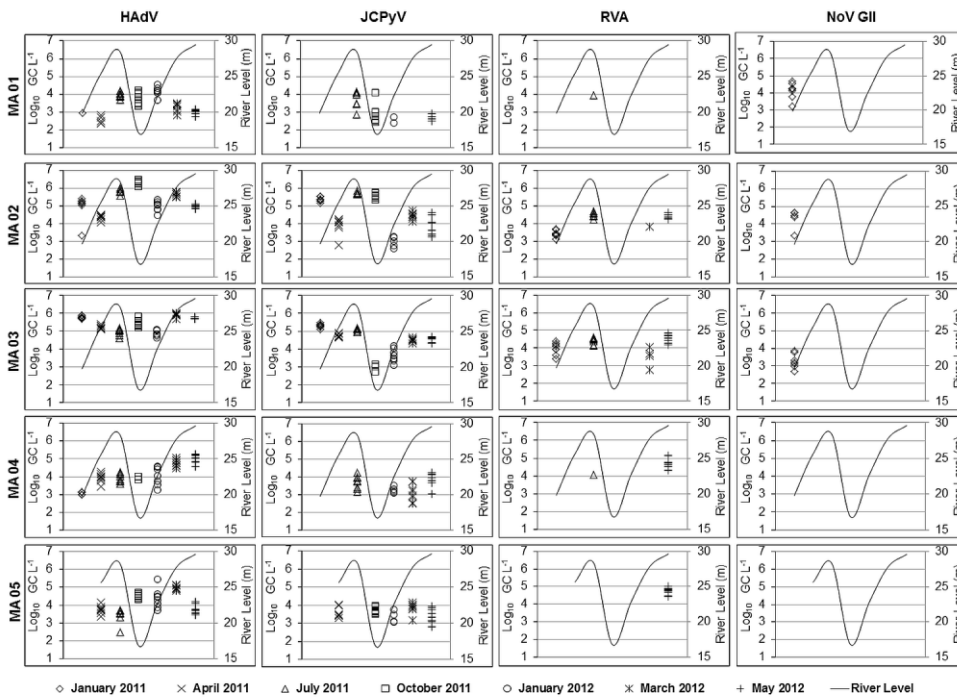


Figure 5

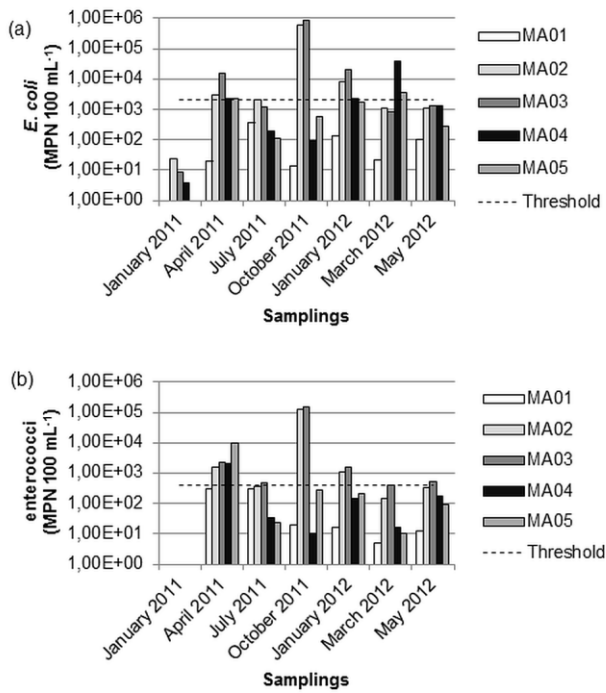


Figure 6

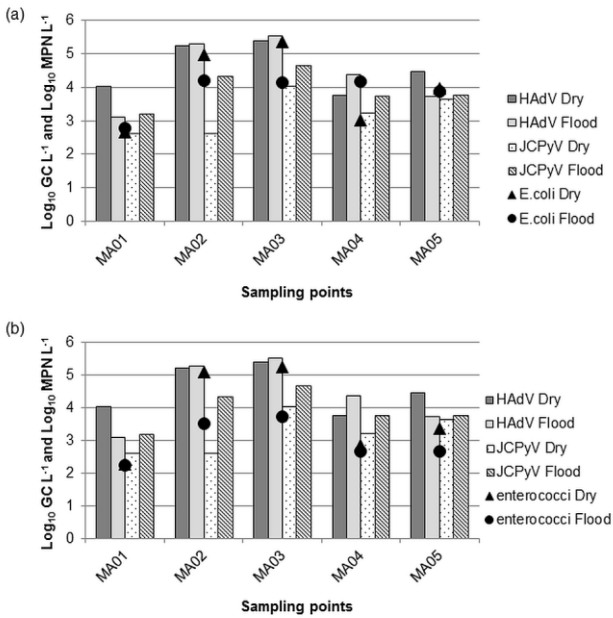


Table 1 Detection of human adenovirus (HAdV), JC polyomavirus (JCPyV), group A rotavirus (RVA) and genogroup II norovirus (NoV GII) in 272 river water samples according to sampling points and hydrological cycle of Negro River.

| Sampling points | HAdV | | | JCPyV | | | RVA | | | NoV GII | | |
|-----------------|------------------|--------------------|--------------------|---------------|----------------|----------------|---------------|---------------|---------------|---------------|-------------|--------------|
| | ^a Dry | ^a Flood | ^a Total | Dry | Flood | Total | Dry | Flood | Total | Dry | Flood | Total |
| MA01 | 16 | 28 | 44 | 8 | 14 | 22 | 0 | 1 | 1 | 8 | 0 | 8 |
| MA02 | 24 | 32 | 56 | 21 | 32 | 53 | 7 | 15 | 22 | 5 | 0 | 5 |
| MA03 | 24 | 32 | 56 | 19 | 32 | 51 | 8 | 19 | 27 | 7 | 0 | 7 |
| MA04 | 14 | 32 | 46 | 5 | 24 | 29 | 0 | 7 | 7 | 0 | 0 | 0 |
| MA05 | 16 | 32 | 48 | 12 | 22 | 34 | 0 | 8 | 8 | 0 | 0 | 0 |
| TOTAL | 94 (83.9%) | 156 (97.5%) | 250 (91.9%) | 65 (58.0%) | 124 (77.5%) | 189 (69.5%) | 15 (13.4%) | 50 (31.3%) | 65 (23.9%) | 20 (17.9%) | 0 (0.0%) | 20 (7.4%) |

^an dry = 112, n flood = 160 and n total =272

Table 2 Correlations between human adenovirus (HAdV), JC polyomavirus (JCPyV), *Escherichia coli* (*E. coli*) and enterococci as indicators of human faecal contamination in river waters in Manaus.

| | HAdV | JCPyV | <i>E. coli</i> |
|----------------|--------------------|-------|----------------|
| HAdV | | | |
| JCPyV | ^a 0.762 | | |
| <i>E. coli</i> | 0.544 | 0.274 | |
| enterococci | 0.491 | 0.374 | 0.607 |

^aFor all correlations, $p \leq 0.001$.

Table 3 Median of physico-chemical parameters according to sampling points and hydrological cycle of Negro River.

| Sampling points | Water Temperature (°C) | | pH | | Turbidity (NTU) | | Conductivity ($\mu\text{S cm}^{-1}$) | |
|-----------------|------------------------|-------|------|-------|-----------------|-------|----------------------------------------|-------|
| | Dry | Flood | Dry | Flood | Dry | Flood | Dry | Flood |
| | MA01 | 29.8 | 29.4 | 5.9 | 5.1 | 21.0 | 9.0 | 10.0 |
| MA02 | 28.4 | 28.7 | 6.9 | 5.4 | 43.0 | 7.5 | 267.0 | 10.1 |
| MA03 | 29.1 | 29.3 | 6.9 | 6.0 | 56.0 | 9.0 | 296.0 | 21.0 |
| MA04 | 29.6 | 29.1 | 5.8 | 5.1 | 9.0 | 5.0 | 8.0 | 8.0 |
| MA05 | 29.4 | 29.3 | 5.9 | 5.1 | 11.5 | 3.0 | 7.5 | 8.0 |

Anexo 6. Artigo publicado

Esse artigo foi publicado na revista internacional *Water Research*, de fator de impacto 5,528. Ele compreende os resultados de *Microbial Source Tracking* (MST) obtidos nesta tese em associação aos resultados obtidos pelos demais participantes do projeto *Viroclime*.

Available online at www.sciencedirect.com

ScienceDirect

journal homepage: www.elsevier.com/locate/watres

Application of human and animal viral microbial source tracking tools in fresh and marine waters from five different geographical areas

Marta Rusiñol^a, Xavier Fernandez-Cassi^a, Ayalkibet Hundesa^a, Carmen Vieira^b, Anita Kern^c, Irene Eriksson^d, Panos Ziros^e, David Kay^f, Marize Miagostovich^b, Marta Vargha^c, Annika Allard^d, Apostolos Vantarakis^e, Peter Wyn-Jones^f, Sílvia Bofill-Mas^a, Rosina Girones^{a,*}

^aLaboratory of Virus Contaminants of Water and Food, Department of Microbiology, University of Barcelona, Barcelona, Spain

^bLaboratory of Comparative and Environmental Virology, Oswaldo Cruz Institute, Rio de Janeiro, Brazil

^cDepartment of Water Microbiology, National Institute for Environmental Health, Budapest, Hungary

^dDepartment of Virology, Umeå University, Umeå, Sweden

^eEnvironmental Microbiology Unit, Department of Public Health, Medical School, University of Patras, Patras, Greece

^fInstitute of Geography and Earth Sciences (IGES), Aberystwyth University, Durham City, United Kingdom

ARTICLE INFO

Article history:

Received 19 January 2014

Received in revised form

24 February 2014

Accepted 6 April 2014

Available online 18 April 2014

Keywords:

Microbial Source Tracking (MST)

Adenovirus

Polyomavirus

River water

Seawater

ABSTRACT

Integrated river basin management planning to mitigate the impacts of economic, demographic and climate change is an important issue for the future protection of water resources. Identifying sources of microbial contamination via the emerging science of Microbial Source Tracking (MST) plays a key role in risk assessment and the design of remediation strategies. Following an 18-month surveillance program within the EU-IP7-funded VIROCLIME project, specific MST tools were used to assess human markers such as adenoviruses (HAdV) and JC polyomaviruses (JCPyV) and porcine and bovine markers such as porcine adenoviruses (PAAdV) and bovine polyomaviruses (BPYV) via quantification with real-time PCR to analyze surface water collected from five sites within different climatic zones: the Negro River (Brazil), Glafkos River (Greece), Tisza River (Hungary), Ulobregat River (Spain) and Umeälven River (Sweden). The utility of the viral MST tools and the prevalence and abundance of specific human and animal viruses in the five river catchments and adjacent seawater, which is impacted by riverine contributions from the upstream catchments, were examined. In areas where no sanitation systems have been implemented, sewage can directly enter surface waters, and river water exhibited high viral loads; HAdV and JCPyV could be detected at mean concentrations of 10^5 and 10^4 Genome Copies/Liter (GC/L), respectively. In general, river water samples upstream of urban discharges presented lower human viral loads than downstream sampling sites, and those differences appeared to increase with urban populations but decrease in response to high river flow, as the elevated river water volume dilutes microbial loads. During dry

* Corresponding author. Department of Microbiology, University of Barcelona, Avinguda Diagonal 643, 08028 Barcelona, Spain. Tel.: +34 93 4021483; fax: +34 93 4039047.

E-mail address: rgirones@ub.edu (R. Girones).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2014.04.013>

0043-1354/© 2014 Elsevier Ltd. All rights reserved.

seasons, river water flow decreases dramatically, and secondary effluents can represent the bulk of the riverine discharge. We also observed that ice cover that formed over the river during the winter in the studied areas in North Europe could preserve viral stability due to the low temperatures and/or the lack of solar inactivation. Porcine and bovine markers were detected where intensive livestock and agricultural activities were present; mean concentration values of 10^7 GC/L indicated that farms were sometimes unexpected and important sources of fecal contamination in water. During spring and summer, when livestock is outdoors and river flows are low, animal pollution increases due to diffuse contamination and direct voiding of feces onto the catchment surface. The field studies described here demonstrate the dynamics of fecal contamination in all catchments studied, and the data obtained is currently being used to develop dissemination models of fecal contamination in water with respect to future climate change scenarios. The results concerning human and animal targets presented in this study demonstrate the specificity and applicability of the viral quantitative parameters developed to widely divergent geographical areas and their high interest as new indicators of human and animal fecal contamination in water and as MST tools.

© 2014 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

The use of integrated river basin management planning is necessary to mitigate the impacts of climate change and to protect water resources. In Europe, this is being implemented through the 'Programs of Measures' as outlined in Article 11 of Directive 2000/60/EC, the Water Framework Directive. Climate change will undoubtedly influence water quality in rivers, lakes and marine waters used for drinking water abstraction, recreational activities, shellfish harvesting and assimilation of point and diffuse fluxes of human and livestock effluents. Thus, the risk profile and treatment interventions necessary for sewage and potable waters must be changed. The fourth assessment report of the Intergovernmental Panel on Climate Change (IPCC) noted that higher temperatures, changes in precipitation regimes and more frequent weather-related disasters are primary changes that represent risks for agriculture, food, and particularly water supplies. Moreover, increasing urban expansion and associated intensification of farm production are increasing microbial loads, which are then discharged into receiving waters worldwide. Achieving legal water quality criteria will, therefore, require intelligent and integrated application of sustainable treatment and urban drainage technologies (SUDs), upgrade of wastewater treatment plants (WWTP), enhanced storm water retention facilities, and application of agricultural best management practices (BMPs) designed to reduce diffuse pollution from livestock farming.

There is increasing concern regarding the levels of fecal pollution in surface waters due to point-source discharges from community sewage treatment plants and livestock concentrations derived from slaughterhouse discharges (Collins et al., 2005; Jamieson et al., 2004). Also, non-point diffuse microbial pollution may originate from direct fecal voiding by grazing livestock, manure spreading or urban surface water runoff, which can derive from roof and road

surfaces contaminated with avian, domestic and wild animal feces and also from cross-connections to urban sewerage system, all of which can exhibit high microbial loads (Llopert-Mascaró et al., 2010; Brownell et al., 2007; Bercu et al., 2011). The identification of fecal contamination sources in water using specific markers is a key step for good management and remediation protocols.

Microbial Source Tracking (MST) encompasses a group of methodologies that aim to identify and, in some cases, quantify the dominant sources of fecal contamination in the environment, particularly in water resources (Field et al., 2004; Fong and Lipp, 2005). MST plays a very important role in informing remediation strategies directed against specific pollutant sources. Molecular markers used for MST are target sequences in host-associated microorganisms or sequences derived directly from the host. These can come from prokaryotes, eukaryotes and viruses. Widely-used human and animal-associated markers have been identified in the order Bacteroidales (Bernhard and Field, 2000a, b) and other bacteria. Polymerase chain reaction (PCR) assays have been developed and validated for markers of fecal contamination from humans and a diversity of animals (reviewed in Roslev and Bukh, 2011). Although these molecular markers represent interesting methods for MST, they do have significant limitations. For example, (i) there is a lack of absolute host specificity among human- and animal-associated microbial markers; (ii) there is a lack of temporal stability of some host-associated microbial markers in different host groups and (iii) non-fecal sources of markers potentially exist (Roslev and Bukh, 2011; Stapleton et al., 2009). The use of highly host specific, ubiquitous and stable MST markers that produce persistent excretions in their human or animal hosts could overcome these limitations.

In recent years, many studies have examined human adenovirus (HAdV) and JC polyomavirus (JCPyV) as human fecal indicators, as they are persistently excreted by infected

humans both with and without clinical symptoms in the feces or urine (Bofill-Mas et al., 2001). Thus, they are commonly detected in urban wastewater in all geographical areas throughout the annual cycle (Koralnik et al., 1999; Bofill-Mas et al., 2000, 2006; Schlindwein et al., 2010; Kokkinos et al., 2011; Rodríguez-Manzano et al., 2012; Bofill-Mas et al., 2013). Traditionally, standard fecal indicator bacteria (FIB) are used to indicate the presence of human or animal fecal contamination. However, FIB counts cannot discriminate between animal or human contamination, whereas AdV and PyV are host-specific and derive from the gastrointestinal and urinary tracts (Bofill-Mas et al., 2000; Maluquer de Motes et al., 2004). In a study using PCR, Harwood et al (2009) suggested that human polyomaviruses were the most specific human marker for MST among various tools analyzed. Importantly, candidate viral MST indicators do not multiply in the environment and are more resistant to environmental stressors, such as UV irradiance from sunlight and water treatment processes, than FIBs (Bofill-Mas et al., 2013). They may, therefore, represent a

better index for viral pathogens such as Hepatitis A and E viruses and noroviruses (NoV) than do the common FIBs used as regulatory parameters world-wide, e.g. *Escherichia coli* and intestinal enterococci. A large diversity of concentration protocols for viruses in water have been described (Albinana-Gimenez et al., 2009). Viral detection consists of several steps: concentration of viruses from the environmental water sample into a suitable volume, extraction of the DNA or RNA and detection or quantification of the viral segment with molecular techniques. Low viral concentration and viral viability are the main handicaps of these PCR techniques.

Efficient and cost-effective techniques for virus pre-concentration in water have been developed using skimmed milk direct flocculation procedures (Calgua et al., 2008; 2013a), which have potential for the routine analysis of viruses in water samples. Moreover, sensitive and reliable molecular detection techniques based on real-time PCR designed for specific DNA viruses, such as HAdV and JCPyV, porcine adenoviruses (PAV) and bovine polyomaviruses (BPyV), have

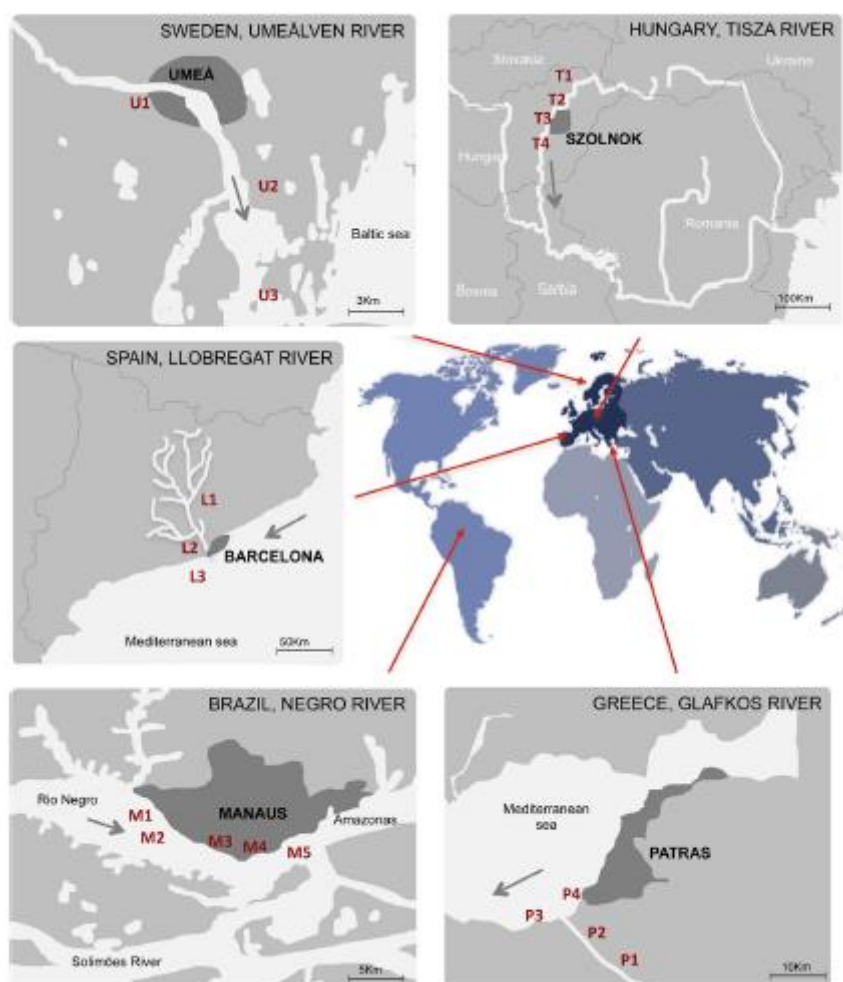


Fig. 1 – Geographic localization and sampling sites of the five case studies analyzed.

been suggested in previous studies for the quantification of these specific markers, offering the potential to delineate human and/or animal fecal contributions in environmental water matrices (Bofill-Mas et al., 2006, 2013; Hundesa et al., 2006, 2009 and 2010).

This study aimed to test the applicability of human and animal adenoviruses and polyomaviruses in widely diverse river catchments by applying skimmed milk flocculation and qPCR to define sources of fecal contamination in all areas and scenarios.

2. Materials and methods

2.1. Control viruses and plasmids

Human adenovirus type 35 (ATCC, LGC Standards AB, Borås, Sweden) stocks were produced by infecting A549 cells cultured in Earl's minimum essential medium (EMEM) supplemented with 1% glutamine, 20 µg of streptomycin and 200 of penicillin per mL and 10% (growth medium) or 2% (maintenance medium) of heat-inactivated fetal bovine serum (FBS). Viruses were released from cells by freezing and thawing the cultures 3 times. Then, a centrifugation step at 3000 g for 20 min was applied to eliminate cell debris. Finally, viral suspensions were quantified, distributed among the participant laboratories and stored in 3.5-mL aliquots at –80 °C until used.

Plasmid DNA has been used as a positive control and as a quantitative standard. For BPyV, a 416-bp amplicon corresponding to a fragment of the VP1-coding gene was cloned into a pGEM-T Easy vector (Promega, Madison, WI, USA). The same vector containing a 612-bp sequence of the PAdV-3

hexon was used for PAdV. Finally, the hexon region (8961 bp) and the whole genome (5130 bp) of HAdV41 and JCPyV Mad1 respectively, were cloned in pBR322 and used as standards for human markers.

2.2. Studied areas

River water and seawater were collected based on ISO 19458 (2006) from five different geographical areas: (i) Llobregat river catchment in Catalonia (Spain), (ii) Glafkos River in Patras (Greece), (iii) Umeålvén River in Umeå (Sweden), (iv) Tisza River in Szolnok (Hungary) and (v) the Negro River in the urban area of Manaus (Brazil) (Fig. 1).

The Glafkos River flows into the Gulf of Patras (Ionian Sea) in Patras, a city of 250,000 inhabitants. The river does not dry completely during the summer, but stream flow decreases dramatically. All Glafkos samples were collected bi-monthly from four sampling sites (Fig. 1): P1 and P2 in the river and two marine sampling points, P3 and P4, at the beach in the Gulf of Patras.

The Llobregat river catchment is located in Catalonia, northeast Spain. It flows for 170 km from the Pyrenees to the Mediterranean Sea. The river basin contains more than half of the Catalan population (approximately 5 million people out of approximately 8 million). The river transports urban sewage and agricultural runoff into the stream, and it is used as a source of drinking water after appropriate treatment. The Llobregat River was sampled bi-monthly at three locations: 80 km upstream of the coast (site L1), downstream near the city of Barcelona (L2), which has 3 million people, and from seawater receiving the riverine discharge (L3) (Fig. 1).

The Umeålvén River in northern Sweden flows in a southeasterly direction from its origin at Lake Överuman. The

Table 1 – Summary of flow, length, basin area, year accumulated rainfall and inhabitants (approximately values). Glossary of the sampling sites, number of samples and analyses included in the study.

| Sampling sites | Mean flow (m ³ /s) | Length (Km) | Basin area (Km ²) | Average annual rainfall (mm) | Inhabitants (thousands) | Sites | Water matrix | Sample number | Total number of analyses ^a | |
|--------------------------|-------------------------------|----------------------|-------------------------------|------------------------------|-------------------------|----------------------------|--------------------------------------------------------------------|----------------------------|---------------------------------------|------|
| Glafkos river | 5 | 98 | 340 | 1100 | 250 | P1 P2 P3 P4 | Riverwater Riverwater Seawater Seawater | 40 40 30 30 | 140 | 560 |
| Llobregat river | 17 | 170 | 5000 | 900 | 5000 | L1 L2 L3 | Riverwater Riverwater Seawater | 30 31 28 | 89 | 356 |
| Umeå river | 450 | 470 | 27000 | 650 | 80 | U1 U2 U3 | Riverwater Riverwater Seawater | 54 54 54 | 162 | 648 |
| Tisza river ^b | 472 | 965 (584 in Hungary) | 55000 (47000 in Hungary) | 495 | 75 (in Szolnok) | T1 T2 T3 T4 | Riverwater Riverwater Riverwater Riverwater | 33 32 32 32 | 129 | 516 |
| Negro river | 28000 | 2250 | 691000 | 2500 | 1400 (in Manaus) | M1 M2 M3 M4 M5 | Riverwater Riverwater Riverwater Riverwater Riverwater | 56 56 56 56 48 | 272 | 1088 |

^a All samples were analyzed by specific qPCR assays for HAdV, JCPyV, BPyV and PAdV.

^b Raw sewage (n = 33) and secondary treatment (n = 32) samples were also collected from Szolnok city WWTP.

river is covered by ice from January to the middle of April. Water samples (Fig. 1) were collected from two river water sampling sites upstream and downstream of the city of Umeå (U1 and U2), which has approximately 80,000 inhabitants. In addition, seawater from Ljumviken (U3) was sampled bi-monthly.

The Tisza River is a vital artery of Central Europe. It rises in Ukraine and flows roughly along the Romanian border with Hungary until it meets the Danube in northern Serbia. Floods in spring and summer characterize the Tisza's flow regime. Bimonthly samples were collected in the river from four sites in the vicinity of the city of Szolnok (Fig. 1). Szolnok is a city of 75,000 inhabitants. Raw sewage and secondary (biological) treated effluent (i.e. using the activated sludge process) were also collected at the wastewater treatment plant on each sampling date to characterize the potential fecal input of the viral markers into the river.

The Negro River joins the Amazon River at Manaus. The city of Manaus has 1.4 million inhabitants within an area of 11.5 km², and it is located 1450 km inland from the Atlantic coast in the heart of the Amazon rain forest. The urban area is strongly impacted by untreated sewage and garbage in these river waters. Five different shoreline sampling locations were selected (Fig. 1): upstream of the city (M1), in two small tributaries crossing the city that flow directly into the main course (M2 and M3) and two sites in southern Manaus (M4 and M5).

2.3. Collection of samples

The sampling and water analysis phase was conducted from January 2011 to June 2012. Eighteen months of sample collection was completed at each site. A description of the characteristics of each river catchment studied, the mean flow and yearly rainfall during the study period and the numbers of samples are described in Table 1. Within the Mediterranean areas (Glaños and Llobregat Rivers) the impact of rainfall was limited to spring and autumn. In the continental climate, Tisza catchment, regular rain was observed over the sampling months but flooding occurred in early spring. The Umeåven subarctic climates had low precipitation due to the low moisture content on air, although moderate rainfall occurred

in summer. Finally, the Negro river in Manaus had the typical features of a tropical climate: twelve months at temperatures not lower than 18 °C and a monthly average precipitation of 250 mm during the rainy season and 100 mm during the dry period.

A total of 792 samples were analyzed across the 5 groups of sampling sites. Samples with high levels of organic matter or sand were permitted to sediment for 1 h, and the clarified water was transferred to a new container. Seawater samples were collected so as to avoid contamination with sand and suspended macro algae. Turbidity, conductivity, pH and temperature were determined for each water sample. On each sampling day, an extra sample was collected and spiked with adenovirus type 35 (10⁵ viral particles/mL) as a process control, including concentration, NA extraction and DNA quantification.

2.4. Viral concentration and nucleic acid extraction

Detection of viruses in the environment requires the concentration of viruses into small volumes. Common standardized operational procedures (SOPs) were utilized for all protocols employed in this study, including sampling, virus concentration, nucleic acid extraction, quantitative PCR (qPCR) assays and process controls and standard plasmid preparation.

All water samples were collected and concentrated using the skimmed milk flocculation (SMF) protocol developed in previous studies (Calgua et al., 2008, 2013b). When analyzing river or seawater samples, 10 L were collected and analyzed to ensure representative volumes for virus detection, whereas 50 mL of wastewater were enough to quantify viral genome copies. When necessary, conductivity was adjusted to a minimum of 1.5 mS/cm² in fresh water samples by adding sea salts (Sigma, Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Germany), and then both river water and seawater samples were acidified to pH 3.5 using 1N HCl. A pre-flocculated skimmed milk solution was prepared by dissolving 10 g skimmed milk powder (Difco, Detroit, MI, USA) in 1 L of artificial seawater at pH 3.5 (Sigma, Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Germany) and adding this to each sample to a final concentration of

Table 2 – Oligonucleotide primers and probes used for the detection and quantification of viral indicators.

| Virus | Primers and probes | Position ^a | Sequence (5'–3') | Reference |
|----------------------------|--------------------|-----------------------|------------------------------------------|-----------------------|
| Human adenovirus (HAdV) | ADF | 18869–18887 | CWTAGATGCACATCKCSGG | Hernroth et al., 2002 |
| | ADR | 18919–18937 | CRCGGCCRAAYTGACCACAG | |
| JC Polyomavirus (JCPyV) | ADP1 | 18889–18916 | FAM-CGGGGCTCAGGTACTCGAGGCGTCT-BHQ1 | Pal et al., 2006 |
| | JE3F | 4317–4339 | ATGTTGCCAGTGATGATGAAAA | |
| | JE3R | 4251–4277 | GGAAAGTCTTTAGGGTCTTCTACCTTT | |
| Bovine polyomavirus (BPyV) | JE3P | 4313–4482 | FAM-AGGATCCCAACACTCTACCCACCTAAAAAGA-BHQ1 | Hundesa et al., 2010 |
| | QB-F1-1 | 2122–2144 | CTAGATCCTACCCCAAGGGAAT | |
| | QB-R1-1 | 2177–2198 | TTACTTGGATCTGGACACCAAC | |
| Porcine adenovirus (PAdV) | QB-P1-2 | 2149–2174 | FAM-GACAAAGATGGTGTATCCTGTGA-BHQ1 | Hundesa et al., 2009 |
| | Q-PAdV-F | 20701–20718 | AACGGCCGCTACTGCAAG | |
| | Q-PAdV-R | 20751–20768 | AGCAGCAGGCTCTTGAGG | |
| | Q-PAdV-P | 20722–20737 | FAM-CACATCCAGGTGCCGC-BHQ1 | |

^a The sequence positions are referred to strains J01917.1 (HAdV), NC_001699.1 (JCPyV), D13942 (BPyV) and AJ237815 (PAdV).

0.01%. Samples were then stirred for 8 h at room temperature, and aggregates were permitted to sediment by gravity for 8 h. Supernatants were carefully removed, and the final volume containing the sediment was centrifuged at 8000g for 30 min at 4 °C. Pellets were suspended using 10 mL of phosphate buffer at pH 7.5 and stored at –80 °C until nucleic acid (NA) extraction was performed. Sewage samples were also analyzed for human and animal viruses in a wastewater treatment plant in the Hungarian case study using a protocol described by Calgua et al. (2013a). Briefly, sewage samples were mixed with 0.25N glycine buffer (pH 9.5) to elute viruses from the organic matter and were then shaken for 30 min on ice followed by centrifugation. The resulting supernatant was processed following the SMF protocol.

Viral DNA was extracted from all samples using the QIAamp Viral RNA kit (Qiagen, Inc., Valencia, CA). Adenovirus type 35 and UltraPure™ DNase/RNase-Free distilled water were used, respectively, as positive and negative control of the NA extraction experiment. Finally, NA elutes were stored at –20 °C until use.

2.5. Quantitative PCR assays

Specific real-time qPCR assays were used to quantify HAdV, JCPyV, PAdV and BPyV. Each qPCR assay contained a set of specific primers and a TaqMan®-fluorogenic probe. Both human and animal viral markers were quantified using methods previously described (Table 2). Undiluted and 10-fold dilutions of the nucleic acid extracts were analyzed in duplicate. All qPCR assays included more than one non-template control (NTC) to demonstrate that the mix did not produce fluorescence. HAdV type 35 was the control process in the study and dilutions of the standard DNA were run in order to evaluate potential enzymatic inhibition due to inhibitors present in the studied samples. Again, UltraPure™ DNase/RNase-Free distilled water was used as negative process control to demonstrate that no cross-contamination occurred.

3. Results

3.1. Quantification of viral markers in five case studies

In this study, samples collected over eighteen months in five river catchments with different land uses and climatological conditions were analyzed for four well-known viral fecal markers (HAdV, JCPyV, PAdV and BPyV). Common SOPs were used in all laboratories for the analysis of the samples. Positive and negative control process produced the expected positive and negative results in all the assays. Inhibition was observed when high levels of organic matter or sand occurred in water samples. In that case, water was allowed to sediment for 1 h, the clarified water was transferred to a new container and 1 more log₁₀ dilution was included into the qPCR analysis. The resulting viral marker loads are plotted separately per virus, sampling site and season, indicating percentages of positive samples and geometric mean values (Figs. 2 and 3). Data is presented for each sampling site by season: winter, spring, summer and autumn, except for the equatorial Negro River

catchment, where the climate is split into the rainy and dry periods.

3.1.1. Glafkos river catchment

Human fecal contamination, tested by analyzing HAdV and JCPyV, was detected throughout the year but with low prevalence during autumn. During this season positive samples were only identified in P1 and P4 (20%), and no JCPyV was detected at any of the sampling points. PAdV and BPyV were detected throughout the year in the river at both sampling points; during summer, all river water samples upstream the city of Patras (P1) exhibited positive values for both porcine and bovine viral markers. HAdV and JCPyV viruses were detected in the Glafkos River at concentrations up to 10⁵ GC/L, whereas the animal viruses BPyV and PAdV were detected at concentrations up to 10⁴ GC/L. The results for each season are represented in Figs. 2 and 3 panels A and B.

3.1.2. Llobregat river catchment

Human fecal contamination was the most important source of contamination in this catchment. HAdV was the most prevalent marker detected at all times and locations within the Llobregat river catchment, with 100% of samples testing positive in spring and summer. HAdV viruses were detected in the Llobregat River at concentrations ranging 10³–10⁵ GC/L. JCPyV was present at concentrations up to 10⁴ GC/L and with prevalence of about 80%. JCPyV was found to be present throughout spring, summer and autumn in many of the seawater samples analyzed. Porcine fecal pollution was detected in 30% of the summer samples at the three sampling sites at concentrations up to 10³ GC/L (Fig. 3C), while bovine was occasionally detected in spring and winter at concentrations up to 10³ GC/L (Fig. 3D).

3.1.3. Umeå river catchment

The results are summarized in Figs. 2 and 3 panels C and D. Bovine contamination was found to be present with a high prevalence throughout the year with a mean value of 3.9 × 10² GC/L and maximum and minimum values of 5.2 × 10³ GC/L and 8.5 × 10¹ GC/L. The highest BPyV concentration, 5.2 × 10⁴ GC/L, was detected at site U1 located upstream of the Umeå urban center (Fig. 1) during autumn when livestock were grazing adjacent fields, but the highest percentage of positives for BPyV were found during spring at the downstream site U3 (Fig. 3F). During winter, when ice covers the river, the prevalence of both human markers was higher than for the rest of the year: up to 60% for HAdV and 50% for JCPyV with concentrations between 10² and 10³ GC/L (Fig. 2E and F). Porcine fecal pollution was detected occasionally in winter (1/24 samples), summer (5/48 samples) and autumn (1/42 samples) (Fig. 3E).

3.1.4. Tisza river catchment

A high level of fecal contamination, from both human and animal origin, was observed in the Tisza River. The results are described in Figs. 2 and 3 panels G and H. A prevalence of 100% for HAdV (human) was found at all sample sites and seasons, and concentrations were as large as 10⁵ GC/L. JCPyV concentrations ranged from 10³–10⁴ GC/L in winter and spring, increasing to 10⁵–10⁶ GC/L during summer and autumn. The

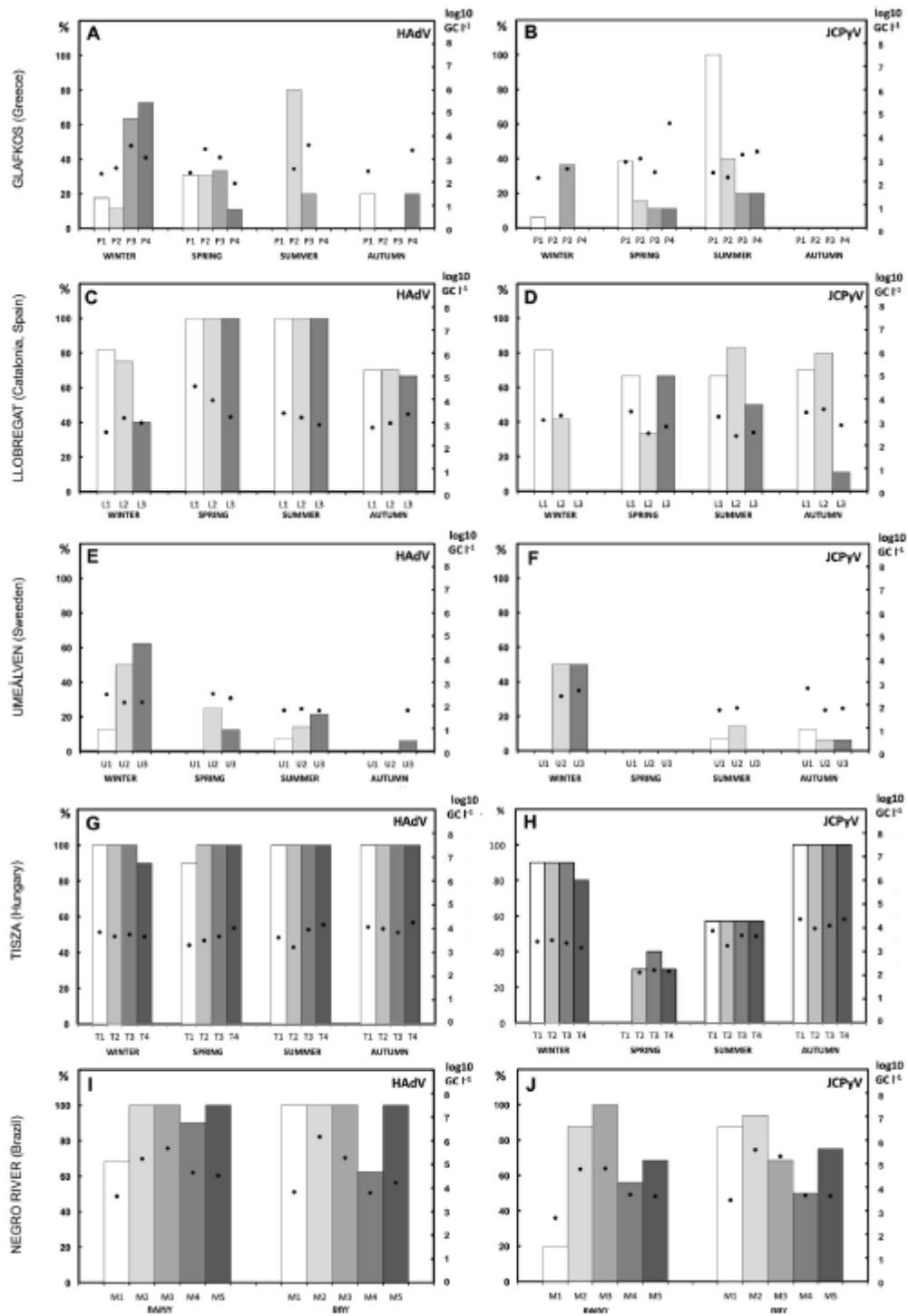


Fig. 2 – Quantitative results of human (HAdV and JCPyV) viral fecal markers in different water matrices from Glafkos river, potted in A, B, Llobregat river, C, D, Umeälven river, E, F, Tisza river, G, H, and Negro River I and J. In columns the prevalences (% of positive samples) in each sampling site. Dots represent geometric mean concentration values, viral genome copies per litre (GC/L).

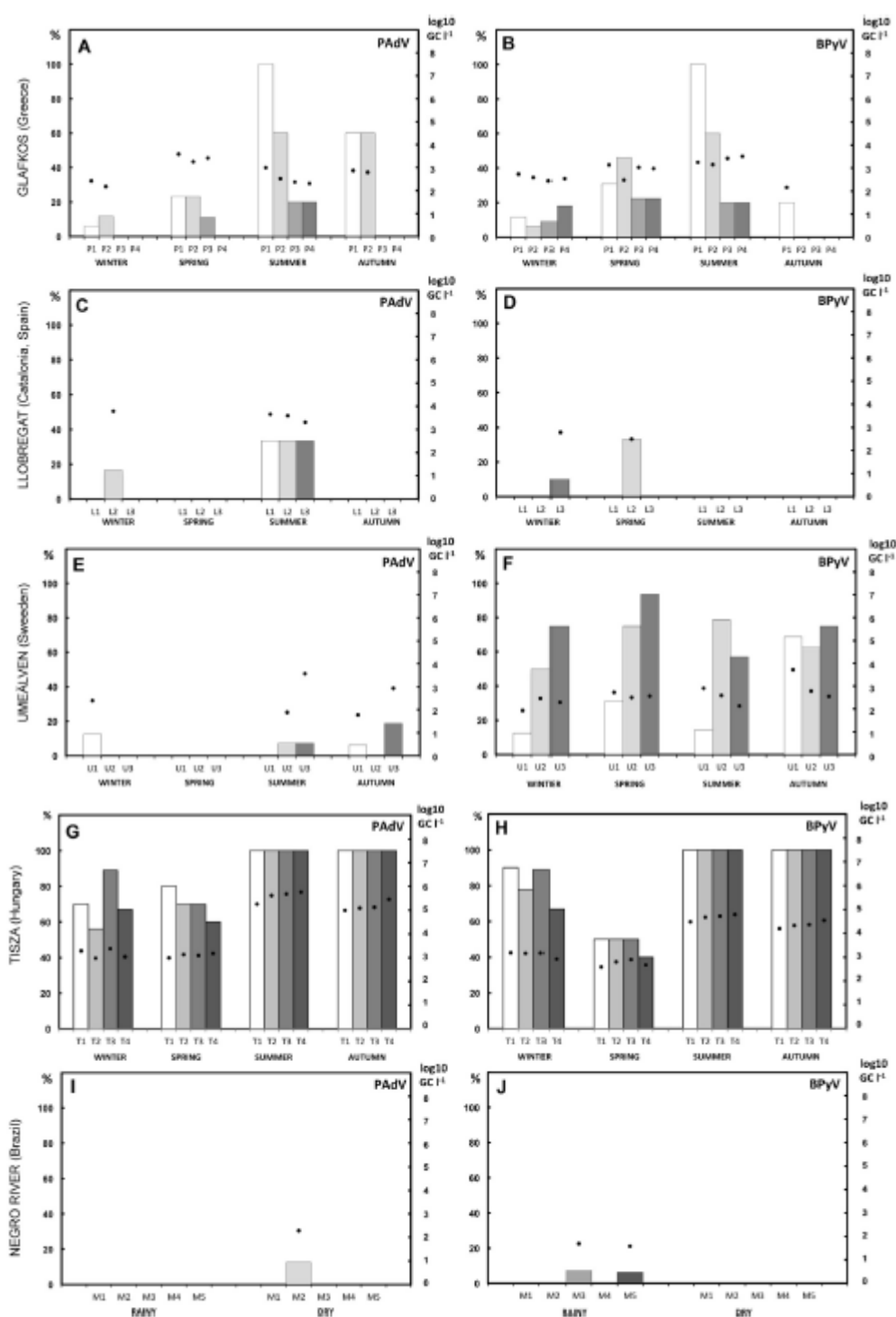


Fig. 3 – Quantitative results of the porcine (PAdV) and bovine (BPyV) viral fecal markers in different water matrices from Glafkos river, potted in A, B, Llobregat river, C, D, Umeälven river, E, F, Tisza river, G, H, and Negro River I, and J. In columns the prevalences (% of positive samples) in each sampling site. Dots represent geometric mean concentration values, viral genome copies per litre (GC/L).

animal viral markers exhibited high prevalence at all sampling sites throughout the year. For example, PAdV (porcine) prevalence in winter ranged between 55 and 90% among river water sites and rose to 100% during spring and autumn, with up to 100% in summer. The viral markers were also quantified in untreated sewage and secondary effluent after activated sludge treatment. Human viruses were between 2 and $2.5 \log_{10}$ higher in raw sewage than in fresh water. A high prevalence of all human and animal viruses was observed in the wastewater samples, although human viruses were more abundant. As expected, all raw sewage samples ($n = 33$) were positive for both human markers at mean concentrations of 8.7 and 9.2×10^5 GC/L. Secondary effluents ($n = 32$) were also 100% positive for HAdV, and approximately 80% were positive for JCPyV with concentrations between 1.3 and 1.2×10^5 GC/L, respectively. Animal viruses were also detected in sewage samples; porcine fecal pollution rose to 2.7 and 1.4×10^7 GC/L in raw and secondary effluents, respectively (with more than 95% positive samples), and bovine fecal pollution was detected at mean concentrations of 3.1×10^6 GC/L in 90% of raw sewage samples and 2.4×10^6 GC/L in secondary effluents (88% positive). In winter mean values were reduced by approximately 1 \log_{10} .

3.1.5. Negro river catchment

The prevalence of HAdV (human) in the Negro River was 100% at all sample sites except for site M1, which was located upstream of the city, and during the rainy season at site M4, which was situated downstream the city of Manaus. HAdV concentrations were present in increments of up to 2 \log_{10} throughout the city, with a concentration of up to 6.6×10^3 GC/L upstream (M1) and up to 1.4×10^6 GC/L when sampling downstream of the city (M2). JCPyV was prevalent throughout the year at lower concentrations than HAdV, specifically 8.2×10^3 versus 5.6×10^4 GC/L during the rainy season and 2.1×10^4 versus 4.5×10^4 GC/L during the dry season. The number of positive samples was also lower during the rainy periods: 58 and 73% for JCPyV versus 90 and 91% for HAdV for the rainy and dry periods, respectively. Both human markers were more prevalent during the dry season. The animal markers were rarely detected, with only two positive samples for PAdV (porcine) during the dry season and five positive samples for BPyV (bovine) during the rainy period at concentrations between 10^2 and 10^1 GC/L for both. The results are presented in Figs. 2 and 3 panels I and J.

4. Discussion

In this study, novel parameters were investigated as microbial source-tracking tools designed to map the origins of fecal contamination to human (HAdV and JCPyV), porcine or bovine (PAdV and BPyV) viruses. DNA-based viral tools were applied in five different river scenarios in five countries: Greece, Spain, Sweden, Hungary and Brazil.

The protocols used in the study have been shown to be easily applicable in routine analysis of a wide diversity of water matrices. The estimated recovery efficiencies of the concentration method, evaluated in previous studies, are between 30 and 95% for adenovirus and between 55 and 90% for

JC polyomavirus (Calgua et al., 2013b). At all case study sites, human markers were detected in river and seawater samples. The theoretical limit of detection of the quantification protocol was 60 GC/L. The analyzed human viruses have been described and quantified in previous studies in sewage and river water (Bofill-Mas et al., 2000, 2006; Miagostovich et al., 2008; Fumian et al., 2010; Staley et al., 2012), and the results obtained in this study confirm that human fecal contamination is widespread and also that viral tools are applicable as fecal indicators in all geographical areas studied.

The results describe five different locations with specific characteristics and contamination patterns in each studied area. In the city of Manaus, raw sewage is discharged directly into the Negro River, and the receiving water exhibits high viral loads, with HAdV and JCPyV detected at mean concentrations of 10^5 GC/L and 10^4 GC/L, respectively. The absence of significant bovine or porcine markers is in agreement with available information describing the absence of any significant farming activity in the area.

The Tisza River area exhibited very high numbers of positive samples both for human and animal viruses, with increasing downstream levels reflecting the urban discharges in the area. Intensive livestock farming is practiced throughout the basin, specifically around Szolnok, where 13 pig farms and 20 dairy farms are located immediately upstream of the sampling sites. All the farms and slaughterhouse effluents are treated in the urban WWTP. Both porcine and bovine contaminations were highly abundant and exhibited lower concentrations in winter, while higher values for both human and animal contamination were present in summer and autumn. The Tisza is one of the main rivers of Central Europe, with seasonal flooding in early spring and early summer. Although these flows will dilute fecal contamination, may represent a significant microbiological risk for the population, considering the high level of human and animal contamination observed all over the sampling periods.

Two rivers were studied in the Mediterranean area: the Llobregat River ($17 \text{ m}^3/\text{s}$), in Catalonia, which is heavily impacted by more than 50 urban sewage treatment plant secondary effluents, and the Glafkos River in the European East Mediterranean, a smaller river ($5 \text{ m}^3/\text{s}$) with a flow that is also highly dependent on rainfall and that drastically decreases in summer up to $1 \text{ m}^3/\text{s}$. The Llobregat River exhibited human fecal contamination as the most significant source of pollution, which reflects the high amount of secondary effluent discharged into the river basin (from more than fifty plants). The Glafkos River presented a different profile, with variable concentrations over the year from both human and farm animals. Human settlements and animals drinking directly in the river were observed during the summer period posing a risk of direct voiding of urine/feces and uncontrolled discharges. Rain events in the Glafkos River may rapidly affect water quality. Rainy periods with higher river flows represent higher dilution levels of fecal contamination and viral markers in river and seawater. In agreement with this, lower numbers of HAdV and JCPyV were observed in autumn (the most common rainy season in Mediterranean areas) in Greece and Spain. The Patras River samples that were tested presented high levels of animal pollution, while seawater

samples primarily indicated human pollution; this suggests (as expected) that other fecal urban discharges may influence the microbiological quality of seawater in the area. This information has been confirmed, and several treated sewage discharges were also identified in the studied beach area. It is important to note the high levels of viral contamination observed in seawater samples during the summer period. Reduction in river flow levels results in a lower dilution of viral input and therefore increased viral contamination when discharging into the sea, posing a public health risk.

The predicted reduction in total rainfall and the number of summer rainfall events as a result of climate change would produce lower river flows and likely higher variability in fecal contamination levels, particularly where treated or untreated wastewater represents a significant proportion of the river water flow (Kay et al., 2011). Therefore, drought events could represent a reduction in water quality due to sewage concentration and animal effluents, although environmental die-off of microbial pollutants would also be enhanced under such low-flow conditions. Although most communities in the Glafkos, Llobregat, Umeålvén and Tisza catchments treat their wastewater, present sewage treatment systems are not designed to specifically reduce virus concentrations, and high viral loads were observed in the receiving water bodies.

In the more rural Swedish catchment, the main source of fecal contamination was identified as being produced by bovine cattle. High concentrations of bovine viral markers were observed in all seasons, with the lower contamination levels during winter months, probably related to the fact that livestock is indoors and diffuse contamination is reduced. The strong ice cover formed on the river surface and the low temperatures could protect viruses against inactivation. Low levels of human fecal viral MST markers were detected at this site, with a low number of positives and concentrations 1 log₁₀ lower than those observed for BPyV.

In order to standardize the qPCR assay in different laboratories, reproducibility tests, reference materials and common standard DNA suspensions could be needed. In this study the viral concentration and quantification was robust and reproducible when analyzing twenty repeated water matrices, specifically river or seawater. Coefficients of variance were 0.64 for HAdV in river water and 0.41 for JCPyV in seawater respectively (Data not shown). Simple cost-effective protocols are available for the quantification of AdV and PyV in routine laboratories with responsibilities for water quality. The results of this study probe the feasibility of using the proposed protocols and viral markers for quantification of the levels and sources of fecal contamination in river catchments in any geographical area.

5. Conclusions

1. The novel MST tools described in this paper have been shown to be specific, sensitive and provide quantitative data describing source-specific fecal impact in river catchments in different geographical areas.
2. The protocols and viral markers applied in this multi-laboratory study have proven to be robust, cost-effective

and applicable for routine MST analysis in all types of water matrices and geographical areas.

3. The human (HAdV and JCPyV) and animal (PAdV and BPyV) viruses analyzed in this study identified the sources of fecal contamination in all river catchment areas analyzed in Europe and in South America.
4. The application of viral MST tools to river catchments clearly reflects the exploitative pressures in these respective areas, either from human or animal sources, and will contribute to risk assessment analysis and define remediation actions.

Acknowledgments

The VIROCLIME Project is funded under the EU Seventh Framework Program, Contract No. 243923. The described study was supported by a collaborative European project coordinated by David Kay and Peter Wyn-Jones as vice-coordinator from the University of Aberystwyth, United Kingdom (VIROCLIME, contract no. 243923). Marta Rusiñol was a fellow of the Catalan Government "AGAUR" (FI-DGR), and Xavier Fernández was a fellow of the University of Barcelona (APIF). Finally, we would like to thank to the Serveis Científicotècnics of the University of Barcelona for their efficient sequencing.

REFERENCES

- Albinana-Gimenez, N., Clemente-Casares, P., Calgua, B., Huguet, J.M., Courtois, S., Girones, R., 2009. Comparison of methods for concentrating human adenoviruses, polyomavirus JC and noroviruses in source waters and drinking water using quantitative PCR. *J. Virol. Methods* 158 (1–2), 104–109.
- Bercu, B., Van De Werfhorst, L.C., Murray, J.L., Holden, P.A., 2011. Sewage exfiltration as a source of storm drain contamination during dry weather in urban watersheds. *Environ. Sci. Technol.* 45 (17), 7151–7157.
- Bernhard, A.E., Field, K.G., 2000a. A PCR assay to discriminate human and ruminant faeces on the basis of host differences in *Bacteroides-Prevotella* genes encoding 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 4571–4574.
- Bernhard, A.E., Field, K.G., 2000b. Identification of nonpoint sources of faecal pollution in coastal waters by using host-specific 16S ribosomal DNA genetic markers from faecal anaerobes. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 1587–1594.
- Bofill-Mas, S., Pina, S., Girones, R., 2000. Documenting the epidemiologic patterns of polyomaviruses in human populations by studying their presence in urban sewage. *Appl. Environ. Microbiol.* 66 (1), 238–245.
- Bofill-Mas, S., Formiga-Cruz, M., Clemente-Casares, P., Calafell, F., Girones, R., 2001. Potential transmission of human polyomaviruses through the gastrointestinal tract after exposure to virions or viral DNA. *J. Virol.* 75 (21), 10290–10299.
- Bofill-Mas, S., Albinana-Gimenez, N., Clemente-Casares, P., Hundesa, A., Rodríguez-Manzano, J., Allard, A., Calvo, M., Girones, R., 2006. Quantification and stability of human adenoviruses and polyomavirus JCPyV in wastewater matrices. *Appl. Environ. Microbiol.* 72 (12), 7894–7896.

- Bofill-Mas, S., Rusiñol, M., Fernandez-Cassi, X., Carratalà, A., Hundesa, A., Girones, R., 2013. Quantification of human and animal viruses to differentiate between human and non-human fecal contamination present in environmental samples. *Biomed. Res. Int.* 2013 (192089), 1–11.
- Brownell, M.J., Harwood, V.J., Kurz, R.C., McQuaig, S.M., Lukasik, J., Scott, T.M., 2007. Confirmation of putative stormwater impact on water quality at a Florida beach by microbial source tracking methods and structure of indicator organism populations. *Water Res.* 41 (16), 3747–3757.
- Calgua, B., Mengewein, A., Grünert, A., Bofill-Mas, S., Clemente-Casares, P., Hundesa, A., Wyn-Jones, A.P., López-Pila, J.M., Girones, R., 2008. Development and application of a one-step low cost procedure to concentrate viruses from seawater samples. *J. Virol. Methods* 153 (2), 79–83.
- Calgua, B., Fumian, T., Rusiñol, M., Rodríguez-Manzano, J., Bofill, S., Miagostovich, M., Girones, R., 2013a. Detection and quantification of classical and emerging viruses in river water by applying a low cost one-step procedure. *Water Res.* 47 (8), 2797–2810, 15.
- Calgua, B., Rodríguez-Manzano, J., Hundesa, A., Suñen, E., Calvo, M., Bofill-Mas, S., Girones, R., 2013b. New methods for the concentration of viruses from urban sewage using quantitative PCR. *J. Virol. Methods* 187 (2), 215–221.
- Collins, R., Elliott, S., Adams, R., 2005. Overland flow delivery of faecal bacteria to a headwater pastoral stream. *J. Appl. Microbiol.* 99, 126–132.
- Field, K.G., Cotruvo, J.A., Dufour, A., Reese, G., Bartram, J., Carr, D.O., Cliver, G.F., Craun, R., Fayer, V.P.J., 2004. Faecal Source Identification in Waterborne Zoonosis: Identification, Causes and Control. Gannon. IWA Publishing, London, pp. 349–366.
- Fong, T.T., Lipp, E.K., 2005. 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.
- Fumian, T.M., Guimarães, F.R., Pereira Vaz, B.J., da Silva, M.T., Muiylaert, F.F., Bofill-Mas, S., Girones, R., Leite, J.P., Miagostovich, M.P., 2010. Molecular detection, quantification and characterization of human polyomavirus JC from waste water in Rio De Janeiro, Brazil. *J. Water Health* 8 (3), 438–445.
- Harwood, V.J., Brownell, M., Wang, S., Lepo, J., Ellender, R.D., Ajidahun, A., Hellein, K.N., Kennedy, E., Ye, X., Flood, C., 2009. Validation and field testing of library-independent microbial source tracking methods in the Gulf of Mexico. *Water Res.* 43 (19), 4812–4819.
- Hemroth, B., Conden-Hansson, A., Rehnstam-Holm, A., Girones, R., Allard, A., 2002. Environmental factors influencing human viral pathogens and their potential indicator organisms in the blue mussel, *Mytilus edulis*: the first Scandinavian report. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 4523–4533.
- Hundesa, A., Maluquer de Motes, C., Bofill-Mas, S., Albinana-Gimenez, N., Girones, R., 2006. Identification of human and animal adenoviruses and polyomaviruses for determination of sources of fecal contamination in the environment. *Appl. Environ. Microbiol.* 72 (12), 7886–7893.
- Hundesa, A., Maluquer de Motes, C., Albinana-Gimenez, N., Rodríguez-Manzano, J., Bofill-Mas, S., Suñen, E., Girones, R., 2009. Development of a Q-PCR assay for the quantification of porcine adenoviruses as an MST tool for swine fecal contamination in the environment. *J. Virol. Methods* 158(1–2), 130–135.
- Hundesa, A., Bofill-Mas, S., Maluquer de Motes, C., Rodríguez-Manzano, J., Bach, A., Casas, M., Girones, R., 2010. Development of a quantitative PCR assay for the quantification of bovine polyomavirus as a microbial source-tracking tool. *J. Virol. Methods* 163 (2), 385–389.
- Jamieson, R., Gordon, R., Joy, D., Lee, H., 2004. Assessing microbial pollution of rural surface waters: a review of current watershed scale modeling approaches. *Agric. Water Manag.* 70, 1–17.
- Kay, D., Lowe, C., McDonald, A.T., Figueras, M., Lopez-Pila, J., 2011. Impact of Climate Change on Recreational Water Use: Climate Change Risk of Bathing in Coastal Waters Framework Service Contract. Project Reference: OJ/2009/09/25-PROC/2009/045. European Centre for Disease Control, Stockholm. Final Report, 30th June 2011. 72pp.
- Kokkinos, P.A., Ziros, P.G., Mpalasopoulou, A., Galanis, A., Vantarakis, A., 2011. Molecular detection of multiple viral targets in untreated urban sewage from Greece. *Virol. J.* 27 (8), 195.
- Koralnik, I.J., Boden, D., Mai, V.X., Lord, C.I., Letvin, N.L., 1999. JC virus DNA load in patients with and without progressive multifocal leukoencephalopathy. *Neurology* 52 (2), 253–260.
- Llopart-Mascaró, A., Ruiz, R., Martínez, M., Malgrat, P., Rusiñol, M., Gil, A., Suarez, J., Puertas, J., del Rio, H., Paraira, M., Rubio, P., 2010. Analysis of Rainwater Quality: Towards Sustainable Rainwater Management in Urban Environments. Novatech 2010.
- Maluquer de Motes, C., Clemente-Casares, P., Hundesa, A., Martín, M., Girones, R., 2004. Detection of bovine and porcine adenovirus for tracing the source of fecal contamination. *Appl. Environ. Microbiol.* 70 (3), 1448–1454.
- Miagostovich, M.P., Ferreira, F.F., Guimarães, F.R., Fumian, T.M., Diriz-Mendes, L., Luz, S.L., Silva, L.A., Leite, J.P., 2008. Molecular detection and characterization of gastroenteritis viruses occurring naturally in the stream waters of Manaus, central Amazonia, Brazil. *Appl. Environ. Microbiol.* 74 (2), 375–382.
- Pal, A., Sirota, L., Maudru, T., Peden, K., Lewis, A.M., 2006. Real-time PCR assays for the detection of virus-specific DNA in samples with mixed populations of polyomaviruses. *J. Virol. Methods* 135 (1), 32–42.
- Rodríguez-Manzano, J., Alonso, J.L., Ferrnís, M.A., Moreno, Y., Amorós, I., Calgua, B., Hundesa, A., Guerrero-Latorre, L., Carratalà, A., Rusiñol, M., Girones, R., 2012. Standard and new faecal indicators and pathogens in sewage treatment plants, microbiological parameters for improving the control of reclaimed water. *Water Sci. Technol.* 66 (12), 2517–2523.
- Roslev, P., Bukh, A.S., 2011. State of the art molecular markers for fecal pollution source tracking in water. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 89 (5), 1341–1355.
- Stapleton, C.M., Kay, D., Wyer, M.D., Davies, C., Watkins, J., Kay, C., McDonald, A.T., Porter, J., Gawler, A., 2009. Evaluating the operational utility of a bacteroidales quantitative PCR-based MST approach in determining the source of faecal indicator organisms at a UK bathing water. *Water Res.* 43, 4888–4899.
- Schlindwein, A.D., Rigotto, C., Simões, C.M., Barardi, C.R., 2010. Detection of enteric viruses in sewage sludge and treated wastewater effluent. *Water Sci. Technol.* 6 (2), 537–544.
- Staley, C., Gordon, K.V., Schoen, M.E., Harwood, V.J., 2012. Performance of two quantitative PCR methods for microbial source tracking of human sewage and implications for microbial risk assessment in recreational waters. *Appl. Environ. Microbiol.* 78 (20), 7317–7326.

Anexo 7. Artigo para submissão

Esse artigo compreende os resultados de detecção e quantificação de vírus gastroentéricos humanos clássicos e emergentes nos ecossistemas aquáticos da cidade de Manaus investigados na maior cheia já enfrentada pela cidade. Ele será submetido na revista *Journal of Environmental Management*, de fator de impacto 2,723.

1 **DISSEMINATION OF HUMAN GASTROENTERIC VIRUSES AT RIVER WATERS**
2 **OF MANAUS DURING THE MOST SEVERE AMAZONIAN FLOOD SEASON.**

3
4 Carmen Baur Vieira^{a,*}, Adriana de Abreu Corrêa^{a,1}, Michele Silva de Jesus^b, Sérgio Luiz
5 Bessa Luz^b, Peter Wyn-Jones^c, David Kay^c, Mônica Simões Rocha^a, Marize Pereira
6 Miagostovich^a

7
8 ^aLaboratory of Comparative and Environmental Virology, Oswaldo Cruz Institute (IOC),
9 Oswaldo Cruz Foundation (FIOCRUZ), Pavilhão Helio e Peggy Pereira, Avenida Brasil,
10 4365, Manguinhos, Rio de Janeiro, RJ, Brasil, 21040-360; e-mails: c.baur@ioc.fiocruz.br
11 (C.B. Vieira) and marizepm@ioc.fiocruz.br (M.P. Miagostovich)

12 ^bResearch Programme on Infectious Disease Ecology in the Amazon, Leônidas & Maria
13 Deane Institute, Oswaldo Cruz Foundation (FIOCRUZ), Rua Terezina, 476, Adrianópolis,
14 Manaus, AM, Brasil, 69057-070; e-mails: michele@amazonia.fiocruz.br (M.S. Jesus) and
15 sergioluz@amazonia.fiocruz.br (S.L.B. Luz)

16
17 ^cDepartment of Geography and Earth Sciences (DGES), Aberystwyth University, Penglais
18 Campus, Aberystwyth, Ceredigion SY23 3DB, UK; e-mails: pyw@aber.ac.uk (P. Wyn-Jones)
19 and dave@crehkay.demon.co.uk (D. Kay)

20
21 *Corresponding author: Carmen Baur Vieira. Mailing address: Fundação Oswaldo Cruz
22 (FIOCRUZ), Laboratório de Virologia Comparada e Ambiental, Pavilhão Helio e Peggy
23 Pereira, sala B203, Av. Brasil 4.365, Manguinhos, 21040-360, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.
24 Phone +5521-25621923. Fax: +5521- 25622921. E-mail: c.baur@ioc.fiocruz.br

ABSTRACT

During the annual Amazonian flood season in 2012, Negro River reached up to its maximum level in 110 years, submerging residential and commercial areas and increasing gastroenteritis cases in the flooded regions in the city of Manaus. The aim of this study was to assess the dissemination of the main viral etiological agents of acute gastroenteritis, including emerging viruses, in aquatic environments of Manaus during this extreme flood event. Human adenovirus (HAdV), group A rotavirus (RVA), genogroup II (NoV GII) and IV (NoV GIV) norovirus, human astrovirus (AstV), sapovirus (SaV), klassevirus (KV), bocavirus (HBoV), and aichivirus (AiV) were detected and characterized by the association of organic flocculation concentration and molecular methodologies. HAdV was the most prevalent virus (100%), followed by RVA (77.5%) and NoV GII (27.5%). NoV GIV, AstV, SaV, KV, HBoV and AiV were not detected. Viruses concentrations ranged from 10^2 to 10^6 GC/L. Molecular characterization identified HAdV 2 and 41 and G2, P[6], and [P8] RVA strains. Statistical analyzes showed correlations between river level and reported gastroenteritis cases, and significant differences between virus concentrations during this extreme event and normal dry and flood seasons of Negro River. This study demonstrates the impact of an extreme flood season on the population health. Integrating the detection of those host-specific pathogens with established water quality indicators helps authorities to better understand the contamination of aquatic environments under extreme scenarios, and helps on a better water quality management and evaluation of human health risks.

Keywords: Flood, enteric viruses, qPCR, Amazon

1 **1. Introduction**

2
3 Health outcomes of flooding include waterborne diseases, especially those transmitted
4 by fecal-oral route, and a wide range of infectious illnesses resulting from the contact with
5 contaminated floodwater have been described (Alderman et al., 2012; Kunii et al., 2002).
6 Gastroenteritis appears to be an important disease during flood and post-flood conditions,
7 although the risk is higher in low-income countries and low socio-economic groups, where
8 there is a lack of sanitation and poor hygiene conditions (Alderman et al., 2012; Hashizume et
9 al., 2008; Kunii et al., 2002). Important etiological agents of diarrhea, viruses have been
10 detected in floodwaters, being a risk of viral gastroenteritis due to human contact with
11 contaminated floodwater previously described (de Man et al., 2014; Fewtrell et al., 2011;
12 Phanuwan et al., 2006; Schwartz et al., 2006; Vieira et al., submitted).

13 Floods are part of the natural climate variation in the Amazon region. Its floodplains
14 are seasonally exposed to inundations and recessions every year due to the rainy season in the
15 Amazon Basin, which is from November to April. However, because of the basin's slope,
16 there is a delay between the precipitation period and the flood of the rivers in central and
17 eastern parts of the basin (Marengo et al., 2013; Satyamurty et al., 2013).

18 Manaus is located in the heart of the Amazon forest, northern of Brazil. The city sits
19 on the banks of the Negro River, which presents an interannual hydrological cycle based on
20 the previously cited Amazonian rainy season. It usually reaches its maximum and minimum
21 levels in June and in October, respectively (Satyamurty et al., 2013).

22 The inhabitants of Manaus have a close relation with the network of rivers that cross
23 the city and are well adapted to this hydrological regime (Marengo et al., 2013). Water is used
24 for recreation, water supply, transport, commerce, and home activities. Due to the unplanned
25 growth of the city, it presents environmental and social problems such as eutrophication and
26 contamination of river waters by discharge of raw sewage. Moreover, some people live in
27 wooden houses built along the riverbanks of the small streams that cross the city (*igarapés*),
28 where the sanitary and hygiene conditions are extremely poor (Couceiro et al., 2007; Melo et
29 al., 2013).

30 The rising of Negro River in 2012 was the highest observed since 1902, when the first
31 measure was carried out. It reached 29.97 m on 29 May 2012, flooding 16 neighborhoods of
32 Manaus, affecting more than 29,000 people (Marengo et al., 2013; Satyamurty et al., 2013).
33 This level was maintained for 10 days and several residential and commercial areas were
34 submerged, especially the riverine ones (Fig. 1). Diarrhea was reported as the main disease

1 recorded by the Municipal Health Department in homes affected by the flooding and public
2 concerns were raised about the risk of transmission of infectious diseases in these flooded
3 areas.



5
6 **Fig. 1.** Flooded areas during the most severe flood season of Negro River, Manaus, 2012.

7
8 The aim of this study was to demonstrate the dissemination of gastroenteric viruses
9 disseminated in the Negro River basin, Amazon region, during this extreme flood season, and
10 which could be responsible for the increase in the number of the reported gastroenteritis cases,
11 helping authorities on further management strategies.

12 13 **2. Materials and methods**

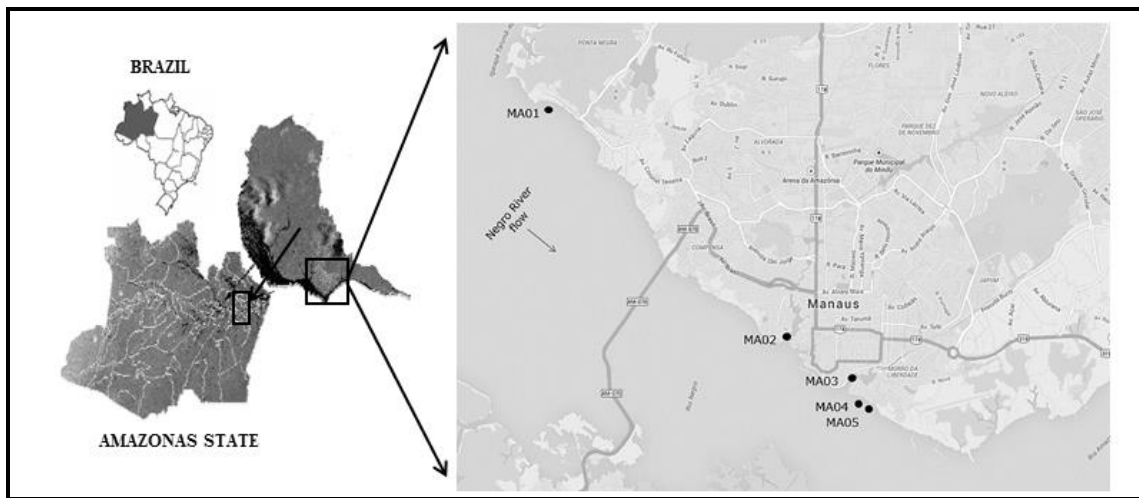
14 15 *2.1. Study area*

16
17 Manaus is the capital of Amazonas, the largest Brazilian state, located in the northern
18 area of the country, in the heart of the Amazon forest. The city of 2,020,301 inhabitants
19 (IBGE, 2015) is surrounded by a dense hydrographic network, composed by four main basins,
20 all contributors of the main Negro River catchment: the Tarumã-Açu and Puraquequara,
21 partially situated within the urban area, and the São Raimundo and Educandos, within the
22 urban area of Manaus.

23 The Negro River basin has an area of 691,000 km², representing 12% of the Amazon
24 Basin, 2,250 km in length, and mean flow of 28,000 m³/s (Frappart et al., 2005; Villar et al.,
25 2009). This blackwater river is the left tributary of the Amazon River and connects Manaus to
26 other cities in the northern of Brazil. Due to the disordered urbanization process of Manaus,
27 urban streams (*igarapés*) of the city are strongly impacted by the complete or partial removal
28 of riparian vegetation and by pollution from garbage and raw sewage that are discharged into
29 these waters.

30 Five precisely positioned sampling sites were defined using global positioning system
31 (GPS, eTREX Legend H, Garmin Ltd., Olathe, KS, USA): three sites at Negro River outlining

1 the city of Manaus (MA01, MA04 and MA05) and two at small streams that cross the city
2 (MA02 and MA03) (Fig. 2).



4
5 **Fig. 2.** Map of the study area and geographical distribution of the sampling sites (MA01 –
6 MA05). MA01- Ponta Negra Beach, MA02 - São Raimundo (*igarapé*), MA03 - Educandos
7 (*igarapé*), MA04 - Negro River/Educandos and MA05 - Negro River (end of urban area of
8 Manaus)

9
10 MA01 represents an official recreational area of Manaus in Negro River, named Ponta
11 Negra Beach, and is located in the beginning of the urban area of the city. MA02 and MA03
12 are located at São Raimundo and Quarenta *igarapés*, main streams of São Raimundo and
13 Educandos basins, respectively. They are tributaries of Negro River and receive raw sewage
14 discharge from several neighborhoods of Manaus. In both areas, there are people living in
15 wooden houses (*palafitas*) constructed in the riverbanks. MA04 is located near the mouth of
16 Quarenta *igarapé* and MA05 is located adjacent to a Port and represents the end of the urban
17 area along the river.

18 19 2.2. Sampling schedule and virus concentration method

20
21 From 11th to 15th June 2012, eight ten-liter water samples were collected every 15
22 minutes in each sampling site. They were collected in sterile bottles and transferred to the
23 laboratory, where they were immediately processed.

24 For controls, an extra ten-liter sample was collected in each sampling point and spiked
25 with 10⁶ genome copies (GC) of human adenovirus 35 (HAdV 35) for viral recovery

1 experiments and a tap water containing 100 mL of a solution of 10% sodium thiosulphate was
2 processed as a negative control.

3 All water samples were concentrated by a flocculation method based on the adsorption of
4 viruses to pre-flocculated skimmed milk proteins (Calgua et al., 2013). Briefly, conductivity
5 of water samples was measured and adjusted to 1.5 mS by the addition of solid artificial sea
6 salts (Sigma–Aldrich Chemie GMBH, Steinheim, Germany) and to pH 3.5 by the addition of
7 HCl 1 N. One hundred mL of pre-flocculated 1 % (w/v) skimmed milk solution (PSM) pH 3.5
8 (Sigma-Aldrich Chemie GMBH, Steinheim, Germany) was then added into the samples,
9 which were stirred gently for 8 hs at room temperature for the adsorption of viruses to the
10 flocs. The flocs were left to sediment by gravity for another 8 hs and the supernatants were
11 removed without disturbing the sediment using a peristaltic pump. The remaining volumes
12 with the sediment (approximate 500 mL) were centrifuged at 8,000 xg for 30 min at 4 °C. The
13 supernatants were carefully removed and pellets were re-dissolved to ≈10 mL with phosphate
14 buffer (1:2 v/v of Na₂HPO₄ 0.2 M and NaH₂PO₄ 0.2 M) pH 7.5. Viral concentrates were
15 homogenized by vortexing and aliquots of 2 mL were prepared and stored at -80 °C for
16 further viral analysis.

17 18 *2.3. Nucleic acid extraction and reverse transcription reaction (RT)*

19
20 Nucleic acid extractions were performed from the concentrate by QIAamp Viral RNA
21 Mini Kit (Qiagen, Inc., Valencia, CA, USA), following the manufacturer’s protocol. cDNA
22 was obtained by RT using random primer (Invitrogen - Life Technologies, Carlsbad, CA,
23 USA).

24 For all molecular procedures, four separated rooms were used to avoid cross
25 contamination. Positives and negative controls were also included for controlling the process.

26 *2.4. Virus detection and quantification*

27
28 qPCR protocols for HAdV, RVA, genogroups II (NoV GII) and IV NoV (NoV GIV),
29 SaV, HAstV, KV, HBoV, and AiV detection and quantification were performed as previously
30 described (Table 1). They were all performed with TaqMan Environmental PCR Master
31 Mix® (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), except those for NoV GII and SaV,
32 which were performed with RNA Ultrasense™ One-step Quantitative RT-PCR System
33 (Invitrogen - Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) and QuantiTect Probe PCR Kit
34 (Qiagen, Inc., Valencia, CA, USA), respectively.

1 **Table 1**

2 Oligonucleotide primers and probes used for detection, quantification and molecular
3 characterization of classic and emerging enteric viruses.

| Viruses | Primers and probes | Genome Region | References |
|----------------------|------------------------------------------------------------|-----------------------|---------------------------------------------------------------------------------|
| HAdV ^a | AdF, AdR and AdP | Hexon | Hernroth et al., 2002 |
| RVA ^a | NSP3F, NSP3R and NSP3p | NSP3 | Zeng et al., 2008 |
| NoV GII ^a | QNIF2d, COG2R and QNIFS | Capsid | Kageyama et al., 2003; Loisy et al., 2005 |
| NoV GIV ^a | 4F, 4R and Ring 4 | ORF1- ORF2 | Trujillo et al., 2006 |
| SaV ^a | SaV124F, SaV1F, SaV5F, SaV1245R, SaV124TP and SaV5TP | polymerase- capsid | Oka et al., 2006 |
| HAstV ^a | AstVF, AstVR and AstVP | ORF1b- ORF2 | Dai et al., 2010 |
| KV ^a | KLA F, KLA R e KLA P | 5` UTR | Haramoto et al., 2013 |
| HBoV ^a | HBoV1F, HBoV234F, HBoV1R, HBoV24R, HBoV3R and H1234p | UTR- NS1 | Kantola et al., 2010 |
| AiV ^a | AiV-AB-F, AiV-AB-R, AiV-AB- TP, AiV-A-TP e AiV-B-TP | Capsid | Kitajima et al., 2013 |
| HAdV ^b | HEX 1 and HEX 2 | Hexon | Allard el at., 2001 |
| RVA ^b | 4con2, 4con3,1T1,1T1-Wa, 1T1- VN, 2T1, 3T1, 4T1 and 5T1 | VP4 | Gentsch et al. 1992; WHO, 2009 |
| | 9con1, 9con2,9T1-1, 9T1-2, 9T- 3P, 9T-4, 9T-9B and 9FT5 | VP7 | Das et al., 1994; Fischer et al., 2000; Gouvea et al., 1994; WHO, 2009 |
| NoV ^b | Mon 431, Mon 432, G2SKR and COG2R | ORF1- ORF2 | Beuret et al., 2002; Kageyama et al., 2003; Kojima et al., 2002 |

4 ^aPrimes and probes used for detection and quantification (qPCR); ^bPrimes used for molecular
5 characterization (PCR);

1 All qPCR reactions were carried out in an ABI PRISM 7500[®] Real-Time System
2 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Undiluted and 10-fold dilutions of the nucleic
3 acid extract and cDNA were analyzed in duplicate and concentrations were estimated as the
4 mean of data obtained, correcting for the dilution analyzed. All qPCR assays included non-
5 template controls (NTC).

6 7 *2.5. Molecular characterization*

8
9 qPCR positive samples were submitted to PCR protocols with sets of primers that
10 amplify specific regions used for virus characterization (Table 1). RVA positive samples were
11 characterized by a semi-nested PCR amplification with primers that target fragments that code
12 for the main structural capsid proteins (VP4 and VP7) and which allows the genotyping by
13 the size of the amplicon. HAdV and NoV GII were characterized by partial sequencing of the
14 regions that code for hexon and ORF1-ORF2 junction regions, respectively.

15 The amplicons obtained from PCR positive samples were purified using QIAquick Gel
16 Extraction Kit and QIAquick and PCR Purification kit (Qiagen, Inc., Valencia, CA, USA),
17 following the manufacturer's recommendations. The purified DNA amplicons were
18 sequenced using the BigDye[®] Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems,
19 Foster City, CA, USA) and ABI Prism 3100 Genetic Analyzer sequencer (Applied
20 Biosystems, Foster City, CA, USA). Sequences were edited and aligned using BioEdit
21 Sequence Alignment Editor Program (Hall, 1999) and subsequently compared to those
22 available in the GenBank database using the Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)
23 (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

24 25 *2.6. Bacteriological parameters*

26
27 *Escherichia coli* (*E. coli*) and enterococci were quantified by Colilert[®] and Enterolert[®]
28 Quanti-Tray[®]/2000 (IDEXX Laboratories, Inc., Westbrook, ME, USA), respectively, and
29 results were reported as most probable number per 100 mL (MPN/100 mL). Samples were
30 tested undiluted and using 10-fold dilutions.

31 Brazilian regulation establishes a maximum of 2,000 and 400 MPN/100 mL of *E. coli*
32 and enterococci, respectively, as standards for recreational waters (Brasil, 2000).

2.7. Physicochemical parameters

Water temperature (°C), pH, turbidity (in nephelometric turbidity units - NTU) and conductivity ($\mu\text{S}/\text{cm}$) were measured in all samples at the time of collection using Water Quality Checker U-10 (Horiba, Ltda., Irvine, CA, USA).

2.8. Gastroenteritis and Negro River level data

Monthly surveillance data on gastroenteritis cases from January 2011 to December 2012 were obtained from Brazilian Program of Monitoring Acute Diarrheal Diseases (MDDA). All diarrhea cases were diagnosed by clinical symptoms but there is no available laboratorial data on the etiological agent.

River level data of Manaus were obtained from Port of Manaus (2015).

2.9. Statistical analysis

Statistical analyses were performed using GraphPad Prism version 5.0. Data were checked for normality in raw and \log_{10} transformed states using Shapiro-Wilk normality test. Both showed significance from normality ($p < 0.0001$).

Mann-Whitney test was performed for comparing virus concentration during this extreme flood season with virus concentration in normal dry and flood seasons in 2011 (Vieira et al., submitted). For comparing concentrations, only positive samples were included.

Correlation analysis between river level and monthly reported gastroenteritis cases in 2011 and 2012 was carried out using non-parametric Spearman correlation.

Results were considered statistically significant when $p < 0.05$.

3. Results

3.1. Virus detection, quantification and molecular characterization

A total of 40 water samples were collected during the most severe flood season of Negro River in Manaus in 2012, in samplings points representing both Negro River and *igarapés*. All samples were positive for at least one virus type. HAdV was the most prevalent virus (100%), followed by RVA (77.5%) and NoV GII (27.5%). NoV GIV, SaV, HAstV, KV, HBoV and AiV were not detected.

1 Experimental results estimated recovery rates of HAdV 35 of 62%, 63%, 135%, 81%
2 and 134% in MA01 to MA05, respectively.

3 Twelve strains out of the 40 HAdV positive samples were nucleotide sequenced, being
4 eleven closely related with HAdV 41 (99% of nucleotide identity) and one with HAdV 2
5 (99%).

6 Of the 31 RVA-positive samples, 18 samples were successfully characterized by G
7 and P typing. Based on the amplification of 244 bp and 267 bp fragments, nine samples were
8 characterized as G2 (3 from MA02, 1 from MA03, 1 from MA04 and 4 from MA05) and nine
9 samples were characterized as P6 (3 from MA02, 3 from MA04 and 3 from MA05),
10 respectively. Of this total, only three samples from MA05 were characterized for both
11 genotypes. Furthermore, one out of these 3 samples also presented a 345 bp fragment, which
12 is characteristic of P8 RVA genotype, thus being detected G2, P6 and P8 genotypes in this
13 sample. No positive results by nPCR for NoV GII were observed.

14 Fig. 3 shows virus and bacteria concentrations according to the sampling points.
15 Considering the recreational area (MA01), only HAdV were detected, in concentrations of
16 10^3 - 10^4 GC/L. MA02 to MA05 water samples were positive for all viruses, except MA03,
17 which was negative for NoV GII. The highest contaminated points were two small streams
18 MA02 and MA03, where concentrations were 10^5 - 10^6 GC/L for HAdV and 10^4 - 10^5 GC/L for
19 RVA. NoV GII concentration was 10^3 - 10^4 GC/L in all sampling points.

20
21
22

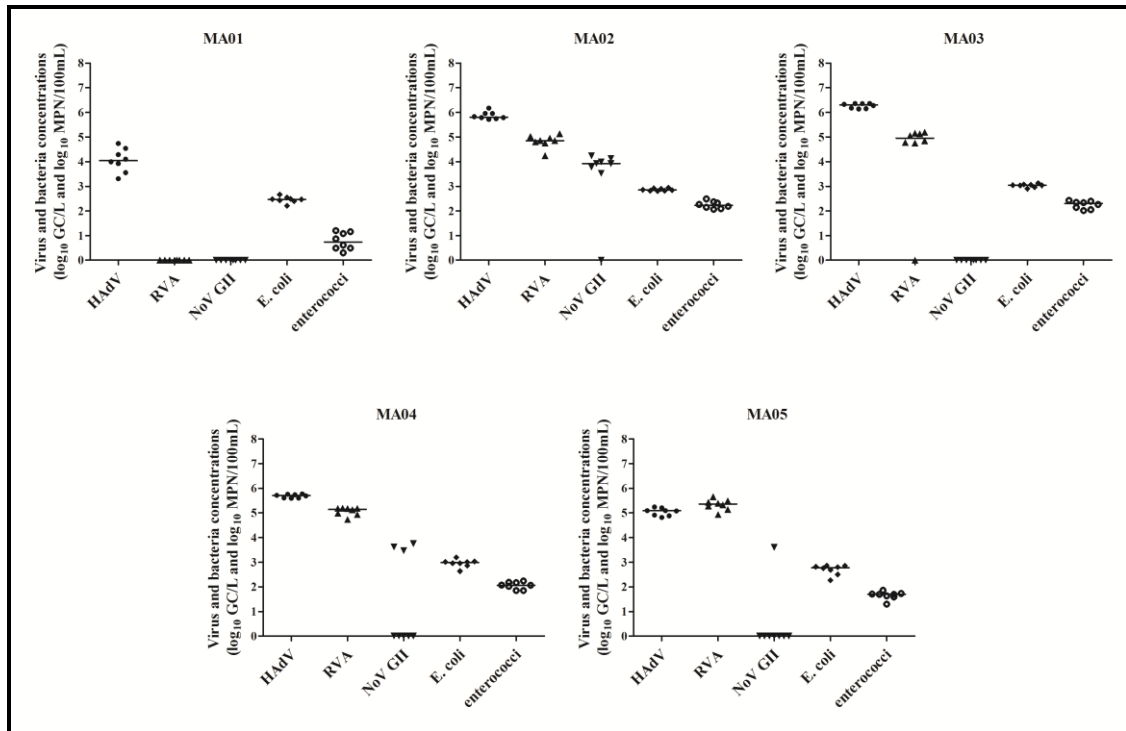


Fig. 3. Virus and bacteria quantifications in each of the eight samples collected according to sampling location during flood season on Negro River, in Manaus, 2012. Horizontal lines represent median of concentrations. HAdV - human adenovirus, RVA - group A rotavirus, NoV GII - genogroup II norovirus, *E. coli* - *Escherichia coli*. MA01- Ponta Negra Beach, MA02 - São Raimundo (*igarapé*), MA03 - Educandos (*igarapé*), MA04 - Negro River/Educandos and MA05 - Negro River (end of urban area of Manaus)

Viruses concentration obtained during this extreme flood event were compared to those previously obtained (Vieira et al., submitted) in samplings carried out in the same points in the dry (October) and flood (July) seasons in 2011 (Table 3 and Fig. 4). Different rates of detection were observed, mainly for RVA and NoV GII, and therefore concentrations could not be compared: RVA was not detected either in sampling points in the flood or in the dry season in 2011 and NoV GII was only detected in the extreme flood event in 2012. Significant differences on viruses concentrations were observed for HAdV and RVA.

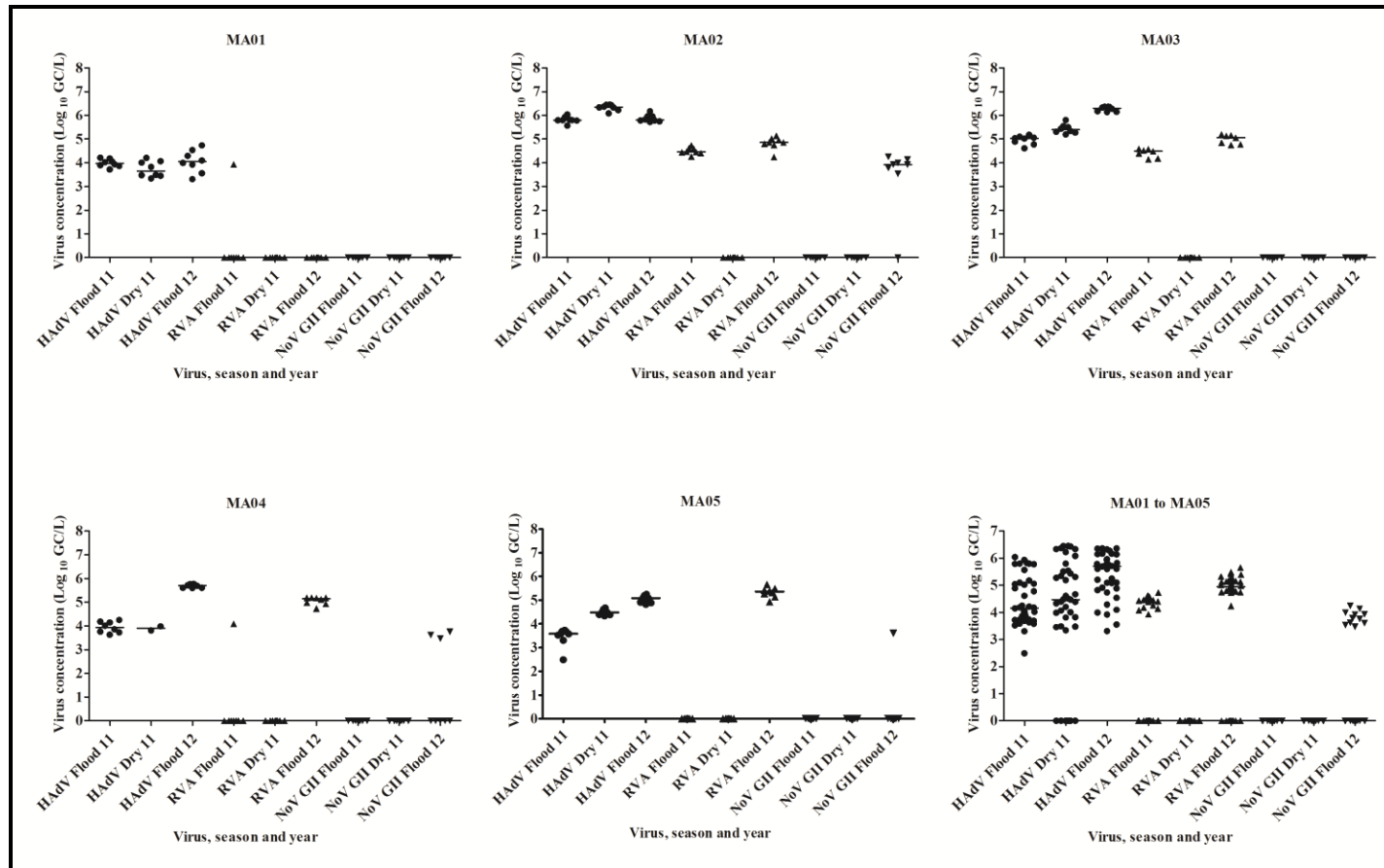
1 **Table 3**

2 P-values obtained from Mann-Whitney test for comparison of virus concentration in the
 3 extreme flood season in 2012 and dry and flood seasons in 2011.

| Sampling points | HAdV | | RVA | | NoV GII | |
|-----------------|----------------------|---------------------|----------------------|-----|---------|-----|
| | Flood | Dry | Flood | Dry | Flood | Dry |
| MA01 | 0.6454 | 0.1949 | - | - | - | - |
| MA02 | 0.8785 | 0.0003 ¹ | 0.0104 ² | - | - | - |
| MA03 | 0.0002 ² | 0.0002 ² | 0.0006 ² | - | - | - |
| MA04 | 0.0002 ² | 0.0444 ² | - | - | - | - |
| MA05 | 0.0002 ² | 0.0002 ² | - | - | - | - |
| Total | <0.0001 ² | 0.0693 | <0.0001 ² | - | - | - |

4 ¹lower concentrations in extreme flood season in 2012; ²higher concentrations in extreme
 5 flood season in 2012; MA01- Ponta Negra Beach, MA02 - São Raimundo (*igarapé*), MA03 -
 6 Educandos (*igarapé*), MA04 - Negro River/Educandos and MA05 - Negro River (end of
 7 urban area of Manaus)

8
 9
 10
 11
 12
 13
 14
 15
 16
 17
 18
 19
 20
 21
 22
 23
 24
 25
 26



1
2
3
4
5

Fig. 4. Human adenovirus (HAdV), group A rotavirus (RVA) and genogroup II norovirus (NoV GII) concentrations during the extreme flood season of Negro River in 2012 and in the dry and flood seasons in 2011. MA01 - Ponta Negra Beach, MA02 - São Raimundo (*igarapé*), MA03 - Educandos (*igarapé*), MA04 - Negro River/Educandos and MA05 - Negro River (end of urban area of Manaus)

3.2. Correlation between river level and gastrointestinal illness

Data collected under the Brazilian Program of Monitoring Acute Diarrheal Diseases (MDDA, 2015) showed that reported gastroenteritis cases increased from 5942 in April to 6158 in May and to 8867 in June 2012 and it was observed an increase in the number of these cases in association with in Negro River level (Fig. 5). Calculated Spearman correlations between river level and monthly reported gastroenteritis cases were -0.256 ($p=0,422$) and 0,713 ($p=0,009$) for 2011 and 2012, respectively.

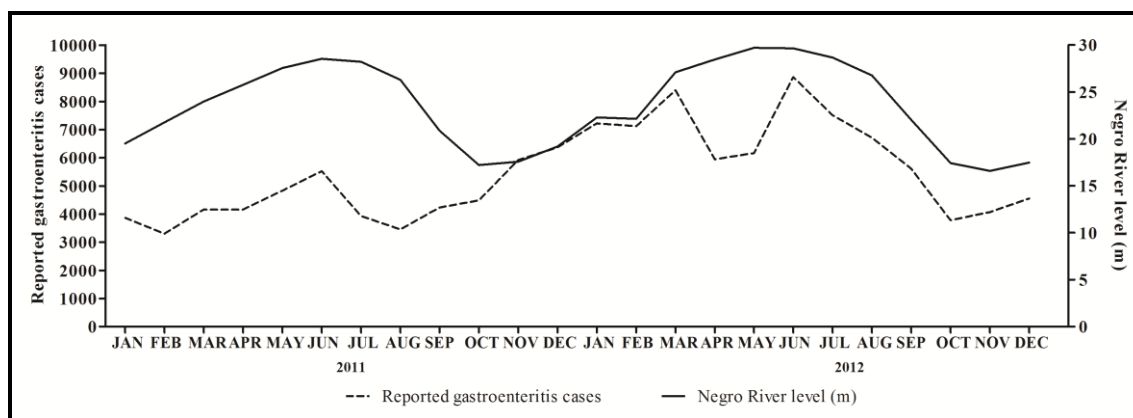


Fig. 5. Number of reported gastroenteritis cases and Negro River level in Manaus in 2011 and 2012. Sources: Brazilian Program of Monitoring Acute Diarrheal Diseases (MDDA, 2015) and Port of Manaus (2015).

3.3. Quantification of *E. coli* and enterococci as microbiological standards of human fecal contamination of water and correlation with viruses

E. coli and enterococci were detected in all samples, but the most contaminated areas were Educandos *igarapé* (MA03) and Negro River near the mouth of this stream (MA04), where their counts were 10^2 - 10^3 MPN/100 mL and 10^1 - 10^2 MPN/100 mL, respectively (Fig. 3). MA02 also presented high concentrations of enterococci. Considering Brazilian regulation, all water samples, including those from the recreational area (MA01), was compliant with the standards for both indicators.

3.4. Physicochemical parameters

Median of pH, conductivity, turbidity and temperature at each sampling area are shown in Fig. 7. Physicochemical parameters did not present different values between sampling sites, except turbidity and conductivity, which were higher in MA01 and in MA02 and M03, respectively.

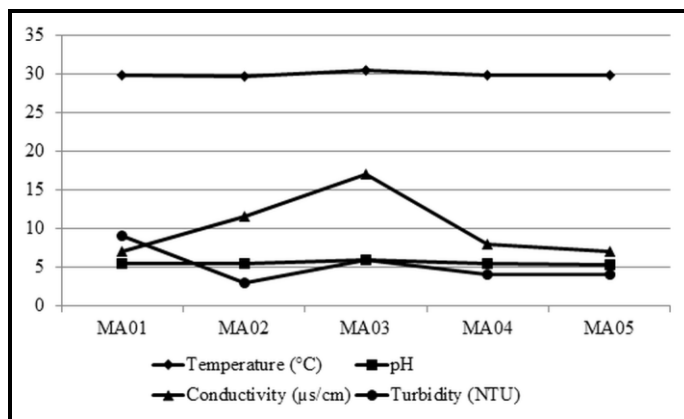


Fig. 7. Median values of physicochemical parameters at each sampling point during Manaus flood event in 2012. MA01- Ponta Negra Beach, MA02 - São Raimundo (*igarapé*), MA03 - Educandos (*igarapé*), MA04 - Negro River/Educandos and MA05 - Negro River (end of urban area of Manaus)

4. Discussion

This study shows the occurrence and concentration of human enteric viruses in river waters of Manaus during the worst flood season of Negro River in more than 100 years via PCR assays. Given floods are part of the natural climate variability in Manaus, the city featured the long-lasting and second-worst (2009) and most intense (2012) floods in recent history (Marengo et al., 2013), and the lack of basic sanitation in the city, it is especially important that more data on pathogen concentrations in aquatic environments of Manaus are collected to make a more reliable scenario of human exposure and health risks.

qPCR data showed the dissemination of enteric viruses in all aquatic environments of Manaus, being the *igarapés* the most contaminated areas. The dissemination and high concentrations of viruses observed in these small streams directly affect the riverine communities

1 whose houses were flooded and who use these waters for many purposes, such as home activities
2 and transport. The risk of exposure to these flood-associated pathogens could be mitigated by
3 keeping inhabitants away from flooded areas. However, in Manaus, most people stay at home by
4 the construction of wooden floors above the floodwater and also wooden bridges in the flooded.
5 As the receding of Negro River increases, populations remove these structures and start again
6 their housing conditions. However, the risk cannot be neglected, since the risk of gastrointestinal
7 diseases seems to be important also in the post-flood periods by clean-up procedures or by
8 secondary person-to-person transmission (Fewtrell & Smith, 2007; Fewtrell et al., 2011;
9 Hashizume et al., 2008; Schmid et al., 2005).

10 As these sewage-like *igarapés* are tributaries of the Negro River, they transport those
11 viruses through the environment by natural water flow to it, increasing viruses concentration in
12 this main river, despite the Negro River dilution capacity due to its water volume. Although being
13 the least contaminated site, HAdV was detected at the recreational area (MA01), as it has been
14 observed in freshwater beaches in USA (Lee et al., 2014; Wong et al., 2009).

15 Infectious diarrheal diseases appear as a major concern of public health problems in areas
16 impacted by flooding, especially in areas where the population does not have access to clean
17 water and sanitation (Schwartz et al 2006; Ding et al., 2013). Despite being decreed a state of
18 emergency in Manaus during this flood event and the distribution of medicines, diarrhea was as
19 an important disease in flooded areas. Accounting for a large number of waterborne
20 gastrointestinal illnesses around the world, gastroenteric viruses were detected in the aquatic
21 environments of Manaus and therefore could cause infection and illness in people who were
22 exposed to these contaminated waters. The lack of laboratory data characterizing etiological
23 agents of diarrhea in Manaus did not allow carrying out specific correlation studies between
24 gastroenteritis cases and those viral pathogens. However, Spearman correlations demonstrated
25 that there was a positive correlation between river level and monthly reported gastroenteritis
26 cases in 2012. Studies carried out in China and Germany also showed that flooding contributed to
27 an increased risk of infectious diarrheas in flooded areas, being the contact with floodwater the
28 major risk factor (Ding et al., 2013; Schnitzler et al., 2007).

29 HAdV was the most prevalent virus, being detected in all studied aquatic ecosystems of
30 Manaus during this extreme event. This virus has been pointed out as candidate of viral indicator
31 of human fecal contamination in water samples due to its prevalence in the population and
32 environment, human host specificity, and survival in the environment (Albinana-Gimenez et al.,

1 2009; Bofill-Mas et al., 2000; Hewitt et al., 2013; Lee et al., 2014; Pina et al., 1998). HAdV
2 positive samples were closely related to HAdV 41 and HAdV 2 isolates, which belong to human
3 mastadenovirus species F and C (ICTV, 2015), respectively. HAdV 41 is responsible for
4 gastrointestinal diseases in young patients and have been the most prevalent virus in sewage,
5 sewage-polluted and flood waters (Fumian et al., 2013; Hartmann et al., 2013; Kuo et al., 2015;
6 Ogorzaly et al., 2015; Osulale & Okoh, 2015; Rohayem et al., 2006). It is transmitted by the
7 fecal-oral route, being these impacted surface waters of Manaus a potential risk to public health
8 due to its contagiousness for young swimmers. Even though only one positive sample was
9 characterized as HAdV2 serotype, it causes respiratory diseases and has also been detected in
10 sewage samples (Ogorzaly et al., 2015; Osulale & Okoh, 2015).

11 RVA was detected in all sampling sites, except in MA01. RVA is the most important viral
12 etiological agent of acute gastroenteritis in Brazil and accounted for 45% of cases of acute
13 diarrhea in children under three years attended in public hospitals in Manaus (Carvalho-Costa et
14 al., 2011; Leite et al., 2008; Melo et al., 2013). This virus was the most detected virus in aquatic
15 environments of the city in a study carried out in 2004-2005 (Ferreira et al., 2009; Miagostovich
16 et al., 2008) and higher RVA detection and concentrations were observed in the flood season of
17 Negro River in an eighteen-month surveillance study recently carried out in Manaus (Vieira et
18 al., submitted). RVA was also detected in floodwaters in Thailand (Ngaosuwankul et al., 2013)
19 and was the second most frequently identified flood-associated pathogen in Bangladesh during
20 the three consecutive floods in 1988, 1998, and 2004 (Ahmed et al., 1991; Schwartz et al., 2006),
21 when its detection was associated with an increase in gastroenteritis cases during and/or after the
22 flood.

23 The PCR-based methods for RVA typing provided a useful tool to assess the circulation
24 of G2 and P6 strains in river waters of Manaus. Studies carried out with clinical and
25 environmental samples showed that these genotypes have been detected in Brazil, including in
26 Manaus (Fumian et al., 2011; Gómez et al., 2013; Maestri et al., 2012; Melo et al., 2013; Oliveira
27 et al., 2012). The detection of RVA [P8] demonstrates its low prevalence when compared to other
28 genotypes and indicates its continuous circulation in the population, despite the RVA vaccination
29 program with the monovalent G1[P8] established in 2006. This was the most detected genotype
30 in environmental samples from Manaus in 2004-2005, in the pre-vaccine period (Ferreira et al.,
31 2009). By environmental surveillance, the presence of RVA strains in river waters of Manaus

1 indicates that these viruses are circulating in the human population, despite RVA vaccination
2 program, and can cause infection when in contact with these waters.

3 Genogroup II norovirus presented the lowest detection rate in the flood and was detected
4 in three sampling sites, what corroborates previous qualitative data obtained in Manaus
5 (Miagostovich et al., 2008). It is an important viral etiological agent of acute gastroenteritis in
6 Brazil, being responsible for symptomatic and asymptomatic cases and also outbreaks in the
7 country (Barreira et al., 2010; Fioretti et al., 2011; Ferreira et al., 2012). NoV GII has been
8 detected in floodwaters, being responsible for gastroenteritis cases during and after flood events
9 through direct exposure to polluted waters (de Man et al., 2014; Ngaosuwanikul et al., 2013;
10 Phanuwat et al., 2006; Schmid et al., 2005). It was described as one of the waterborne pathogens
11 identified during outbreaks after extreme events, such as flooding, by Cann et al (2013). The non-
12 characterization of NoV genotypes may be associated with low concentrations of these viruses in
13 the water.

14 The non-detection of HAstV may be attributed to its low concentration in water samples
15 and/or to its seasonality, since this virus was previously detected in Manaus (Miagostovich et al.,
16 2008). To our knowledge, it is the first investigation of NoV GIV, SAV, HBoV, and AiV in
17 water samples in Brazil, since KV was detected by Calgua et al. (2013) in river waters of Rio de
18 Janeiro state. SAV, HBoV, and AiV have been detected in clinical samples from children with
19 acute gastroenteritis in the country (Xavier et al., 2009, Campos et al., 2015; Santos et al., 2015)

20 Physicochemical parameters presented small differences between sampling sites. These
21 are described as factors that can interfere on virus stability, resistance, inactivation and infectivity
22 in the environment (Bertran et al., 2012; Fong & Lipp 2005; John & Rose 2005; Kotwal &
23 Cannon 2014; LaBelle & Gerba., 1979). Detection of viruses in water samples from Manaus
24 indicates that they can resist in these ecosystems, although it is not possible to conclude they are
25 infectious, since they were detected by molecular methods (Choi & Jiang et al., 2005; Girones et
26 al., 2010). The difference on turbidity in MA01 could be due to the sand in this recreational
27 beach and higher conductivities in water samples from two streams of the city could be due to
28 concentration and/or presence of ions derived from sewage directly discharged in these waters.

29
30
31
32

1 5. Conclusions

2
3 During the flood period in Manaus in 2012, not only Negro River reached its maximum
4 water level but also streams rose and overtop their riverbanks. The results obtained during this
5 extreme event demonstrated higher concentration of enteric viruses in Manaus when compared to
6 normal dry and flood seasons, what indicates higher health risks. An understanding of the
7 epidemiology of water-related diseases during extreme events would help clinicians and public
8 health officials to be prepare for future events, not only for the extremes but also for the normal
9 annual flood seasons in the Amazon basin. Moreover, there may also be an increase in morbidity
10 due to infectious waterborne diseases over an extended time period, since it is estimated that
11 climate change can interfere in the dynamic of the Amazon region, changing the number and
12 intensity of floods (Marengo et al., 2012, 2013; Satyamurty et al., 2013). The last ten years have
13 featured the most intense droughts and floods in recent history, and the prospects of this situation
14 continuing in the future are high.

16 Acknowledgements

17
18 We thank to PDTIS DNA Sequence Platform staff at FIOCRUZ-RJ, for technical support in
19 sequencing reactions, and to FIOCRUZ-Manaus team for helping with samplings. This work was
20 funded by VIROCLIME project (www.viroclime.org) as part of the *European Union 7th*
21 *Framework Programme for Research*, contract number 243923.

23 References

24
25 Ahmed MU, Urasawa S, Taniguchi K, Urasawa T, Kobayashi N, Wakasugi F, et al. Analysis of
26 human rotavirus strains prevailing in Bangladesh in relation to nationwide floods brought by the
27 1988 monsoon. *J Clin Microbiol.* 1991; 29(10):2273-9.
28
29 Albiñana-Gimenez N, Clemente-Casares P, Calgua B, Huguet JM, Courtois S, Girones R.
30 Comparison of methods for concentrating human adenoviruses, polyomavirus JC and noroviruses
31 in source waters and drinking water using quantitative PCR. *J Virol Methods.* 2009; 158(1-
32 2):104-9.

1 Alderman K, Turner LR, Tong S. Floods and human health: a systematic review. *Environ Int.*
2 2012; 47:37-47.
3
4 Allard A, Albinsson B, Wadell G. Rapid typing of human adenoviruses by a general PCR
5 combined with restriction endonuclease analysis. *J Clin Microbiol.* 2001; 39(2): 498-505.
6
7 Barreira DM, Ferreira MS, Fumian TM, Checon R, de Sadovsky AD, Leite JP, et al. Viral load
8 and genotypes of noroviruses in symptomatic and asymptomatic children in Southeastern Brazil. *J*
9 *Clin Virol.* 2010; 47(1):60-4.
10
11 Bertrand I, Schijven JF, Sánchez G, Wyn-Jones P, Ottoson J, Morin T, et al. The impact of
12 temperature on the inactivation of enteric viruses in food and water: a review. *J Appl*
13 *Microbiol.* 2012; 112(6):1059-74.
14
15 Beuret C, Kohler D, Baumgartner A, Lüthi TM. Norwalk-like virus sequences in mineral waters:
16 one-year monitoring of three brands. *Appl. Environ. Microbiol.* 2002; 68(4):1925-31.
17
18 Bofill-Mas S, Pina S, Girones R. Documenting The Epidemiologic Patterns of Polyomaviruses in
19 Human Populations by Studying Their Presence in Urban Sewage. *Appl Environ*
20 *Microbiol.* 2000; 66(1):238-45.
21
22 Brasil. CONAMA (National Environment Council, Conselho Nacional do Meio Ambiente).
23 2000. Ministério do Meio Ambiente. Resolução 274 de 29 de novembro de 2000. Diário Oficial
24 da República Federativa do Brasil, Poder Executivo, Brasília, DF.
25
26 Calgua B, Fumian T, Rusiñol M, Rodriguez-Manzano J, Mbayed VA, Bofill-Mas
27 S, Miagostovich M, Girones R. Detection and quantification of classic and emerging viruses by
28 skimmed-milk flocculation and PCR in river water from two geographical areas. *Water*
29 *Res.* 2013; 47(8):2797-810
30
31 Campos GS, Silva Sampaio ML, Menezes AD, Tigre DM, Moura Costa LF, Chinalia FA, et al.
32 Human bocavirus in acute gastroenteritis in children in Brazil. *J Med Virol.* 2015 Jun. *In press*

1 Cann KF, Thomas DR, Salmon RL, Wyn-Jones AP, Kay D. Extreme water-related weather
2 events and waterborne disease. *Epidemiol Infect.* 2013; 141(4):671-86.
3
4 Carvalho-Costa FA, Volotão Ede M, de Assis RM, Fialho AM, de Andrade Jda S, Rocha LN, et
5 al. Laboratory-based rotavirus surveillance during the introduction of a vaccination program,
6 Brazil, 2005-2009. *Pediatr Infect Dis J.* 2011; 30(1 Suppl):S35-41.
7
8 Choi S, Jiang. Real-time PCR quantification of human adenoviruses in urban rivers indicates
9 genome prevalence but low infectivity. *Appl Environ Microbiol.* 2005; 71(11):7426-33.
10
11 Couceiro SRM, Hamada N, Luz SLB, Forsberg BR, Pimentel TP. Deforestation and sewage
12 effects on aquatic macroinvertebrates in urban streams in Manaus, Amazonas,
13 Brazil. *Hydrobiologia.* 2007; 57(1):271-84.
14
15 Dai YC, Xu QH, Wu XB, Hu GF, Tang YL, Li JD, et al. Development of real-time and nested
16 RT-PCR to detect astrovirus and one-year survey of astrovirus in Jiangmen City, China. *Arch*
17 *Viro.* 2010; 155(6):977-82
18
19 Das BK, Gentsch JR, Cicirello HG, Woods PA, Gupta A, Ramachandran M, et al.
20 Characterization of rotavirus strains from newborns in New Delhi, India. *J Clin Microbiol.* 1994;
21 32(7): 1820-1822.
22
23 de Man H, van den Berg HH, Leenen EJ, Schijven JF, Schets FM, van der Vliet JC, et al.
24 Quantitative assessment of infection risk from exposure to waterborne pathogens in urban
25 floodwater. *Water Res.* 2014; 48:90-9.
26
27 Ding G, Zhang Y, Gao L, Ma W, Li X, Liu J, et al. Quantitative analysis of burden of
28 infectious diarrhea associated with floods in northwest of anhui province, china: a mixed method
29 evaluation. *PLoS One.* 2013; 8(6):e65112.
30

1 Ferreira FF, Guimarães FR, Fumian TM, Victoria M, Vieira CB, Luz S, et al. Environmental
2 dissemination of group A rotavirus: P-type, G-type and subgroup characterization. *Water Sci*
3 *Technol.* 2009; 60(3):633-42.
4
5 Ferreira MS, Xavier Mda P, Tinga AC, Rose TL, Fumian TM, Fialho AM, et al. Assessment of
6 gastroenteric viruses frequency in a children's day care center in Rio De Janeiro, Brazil: a fifteen
7 year study (1994-2008). *PLoS One.* 2012; 7(3):e33754.
8
9 Fewtrell L, Kay D, Watkins J, Davies C, Francis C. The microbiology of urban UK floodwaters
10 and a quantitative microbial risk assessment of flooding and gastrointestinal illness. *J Flood Risk*
11 *Management.* 2011; 4(2):77-87.
12
13 Fewtrell L, Smith K. Flooding and Infections, Urban Flood Management project report for the
14 Flood Risk Management Research Consortium. Aberystwyth: University of Wales; 2007.
15
16 Fioretti JM, Ferreira MS, Victoria M, Vieira CB, Xavier MdaP, Leite JP, et al. Genetic diversity
17 of noroviruses in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2011; 106(8):942-7.
18
19 Fischer TK, Steinsland H, Molbak K, Ca R, Gentsch JR, Valentiner-Branth P, et al. Genotype
20 profiles of Rotavirus Strains from children in suburban community in Guinea-Bissau, Western
21 Africa. *J Clin Microbiol.* 2000; 38(1):264-7.
22
23 Fong TT, Lipp EK. Enteric viruses of humans and animals in aquatic environments: health risks,
24 detection, and potential water quality assessment tools. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2005;
25 69(2):357-71.
26
27 Frappart F, Seyler F, Martinez J-M, Leon JG, Cazenave A. Floodplain water storage in the Negro
28 River basin estimated from microwave remote sensing of inundation area and water levels.
29 *Remote Sens Environ.* 2005; 99(4):387-99.
30

1 Fumian TM, Leite JP, Rose TL, Prado T, Miagostovich MP. One year environmental surveillance
2 of rotavirus specie A (RVA) genotypes in circulation after the introduction of the Rotarix®
3 vaccine in Rio de Janeiro, Brazil. *Water Res.* 2011; 45(17): 5755-63.
4
5 Fumian TM1, Vieira CB, Leite JP, Miagostovich MP. Assessment of burden of virus agents in an
6 urban sewage treatment plant in Rio de Janeiro, Brazil. *J Water Health.* 2013; 11(1):110-9
7
8 Gentsch JR, Glass RI, Woods P, Gouvea V, Gorziglia M, Flores J, et al. Identification of group A
9 rotavirus gene 4 types by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol.* 1992; 30(6):1365-73.
10
11 Girones R, Ferrús MA, Alonso JL, Rodriguez-Manzano J, Calgua B, Corrêa Ade A, et al.
12 Molecular detection of pathogens in water--the pros and cons of molecular techniques. *Water*
13 *Res.* 2010; 44(15):4325-39.
14
15 Gómez MM, da Silva MF, Zeller M, Heylen E, Matthijnssens J, Ichihara MY, et al. Phylogenetic
16 analysis of G1P[6] group A rotavirus strains detected in Northeast Brazilian children fully
17 vaccinated with Rotarix™. *Infect Genet Evol.* 2013; 19:395-402
18
19 Gouvea V, Santos N, Timenetsky MC. Identification of bovine and porcine rotavirus G types by
20 PCR. *J Clin Microbiol.* 1994; 32(5):1338-40.
21
22 Hall TA. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for
23 Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series.* 1999; 41:95-8.
24
25 Hartmann NM, Dartscht M, Szewzyk R, Selinka H-C. Monitoring of adenovirus serotypes in
26 environmental samples by combined PCR and melting point analyses. *Virologia.* 2013; 10:190.
27
28 Haramoto E, Kitajima M, Otagiri M. Development of a reverse transcription-quantitative PCR
29 assay for detection of salivirus/klassevirus. *Appl Environ Microbiol.* 2013; 79(11):3529-32.
30

1 Hashizume M, Wagatsuma Y, Faruque AS, Hayashi T, Hunter PR, Armstrong B, et al. Factors
2 determining vulnerability to diarrhea during and after severe floods in Bangladesh. *J Water*
3 *Health*. 2008; 6(3):323-32.
4

5 Hernroth BE, Conden-Hansson AC, Rehnstam-Holm AS, Girones R, Allard AK. Environmental
6 factors influencing human viral pathogens and their potential indicator organisms in the blue
7 mussel, *Mytilus edulis*: the first Scandinavian report. *Appl Environ Microbiol*. 2002; 68(9):4523-
8 33.
9

10 Hewitt J, Greening GE, Leonard M, Lewis GD. Evaluation of human adenovirus and human
11 polyomavirus as indicators of human sewage contamination in the aquatic environment. *Water*
12 *Res*. 2013; 47(17):6750-61.
13

14 IBGE (The Brazilian Institute of Geography and Statistics, Instituto Brasileiro de Geografia e
15 Estatística). 2015 Available, <http://cidades.ibge.gov.br/xtras/perfil.php?codmun=130260>
16 (accessed 2015-05-10)
17

18 ICTV (International Committee on Taxonomy of Viruses). 2015. Available,
19 <http://www.ictvonline.org/index.asp> (accessed 2015-05-10)
20

21 John DE, Rose JB. Review of factors affecting microbial survival in groundwater. *Environ Sci*
22 *Technol*. 2005; 39(19):7345-56.
23

24 Kantola K, Sadeghi M, Antikainen J, Kirveskari J, Delwart E, Hedman K, et al. Real-
25 time quantitative PCR detection of four human bocaviruses. *J Clin Microbiol*. 2010; 48(11):4044-
26 50. Errata em: *J Clin Microbiol*. 2011; 49(11):4029.
27

28 Kitajima M, Hata A, Yamashita T, Haramoto E, Minagawa H, Katayama H. Development of a
29 reverse transcription-quantitative PCR system for detection and genotyping of aichi viruses in
30 clinical and environmental samples. *Appl Environ Microbiol*. 2013; 79(13):3952-8.
31

1 Kotwal G, Cannon JL. Environmental persistence and transfer of enteric viruses. *Curr Opin*
2 *Virol.* 2014; 4C:37-43.
3
4 Kuo HW, Chen LZ, Shih MH. High prevalence of type 41 and high sequence diversity of partial
5 hexon gene of human adenoviruses in municipal raw sewage and activated sludge. *J Appl*
6 *Microbiol.* 2015 Jul 18. *In press*
7
8 Kunii O, Nakamura S, Abdur R, Wakai S. The impact on health and risk factors of the diarrhoea
9 epidemics in the 1998 Bangladesh floods. *Public Health.* 2002; 116(2):68-74.
10
11 LaBelle RL, Gerba CP. Influence of pH, salinity, and organic matter on
12 the adsorption of enteric viruses to estuarine sediment. *Appl Environ Microbiol.* 1979; 38(1):93-
13 101.
14
15 Lee CS, Lee C, Marion J, Wang Q, Saif L, Lee J. Occurrence of human enteric viruses at
16 freshwater beaches during swimming season and its link to water inflow. *Sci Total*
17 *Environ.* 2014; 472:757-66
18
19 Leite JP, Carvalho-Costa FA, Linhares AC. Group A rotavirus genotypes and the ongoing
20 Brazilian experience: a review. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2008; 103(8):745-53.
21
22 Loisy F, Atmar RL, Guillon P, Le Cann P, Pommepuy M, Le Guyader FS. Real-time RT-PCR for
23 norovirus screening in shellfish. *J. Virol. Methods.* 2005; 123(1):1-7.
24
25 Kageyama T, Kojima S, Shinohara M, Uchida K, Fukushi S, Hoshino FB, et al. Broadly reactive
26 and highly sensitive assay for Norwalk-like viruses based on real-time quantitative reverse
27 transcription-PCR. *J Clin Microbiol.* 2003; 41(4):1548-57.
28
29 Kojima S, Kageyama T, Fukushi S, Hoshino FB, Shinohara M, Uchida K, et al. Genogroup-
30 specific PCR primers for detection of Norwalk-like viruses. *J. Virol. Methods.* 2002; 100(10-
31 2):107-14.
32

1 Marengo JA, Tomasella J, Soares WR, Alves LM, Nobre CA. Extreme climatic events in the
2 Amazon basin. *Theor Appl Climatol.* 2012; 107(Issue 1-2): 73-85.
3
4 Marengo JA, Borma LS, Rodriguez DA, Pinho P, Soares WR, Alves LM. Recent Extremes of
5 Drought and Flooding in Amazonia: Vulnerabilities and Human Adaptation. *Am J Climate*
6 *Change.* 2013; 2(2):87-96.
7
8 MDDA - Brazilian Program of Monitoring Acute Diarrheal Diseases (Programa Brasileiro de
9 Monitorização das Doenças Diarreicas Agudas). (2015). Ministério da Saúde, Brasília, DF.
10
11 Melo GZS, da Costa CA, dos Santos IGC. Diversidade molecular de rotavirus do grupo A na
12 cidade de Manaus, estado do Amazonas, Brasil, 2004-2006. *Epidemiol Serv Saúde.* 2013;
13 22(2):265-72.
14
15 Miagostovich MP, Ferreira FFM, Guimaraes FR, Fumian TM, Diniz-Mendes L, Luz SLB, et al.
16 Molecular Detection and Characterization of Gastroenteritis Viruses Occurring Naturally in the
17 Stream Waters of Manaus, Central Amazonia, Brazil. *Appl Environ Microbiol.* 2008; 74 (2): 375-
18 82.
19
20 Ngaosuwanikul N, Thippornchai N, Yamashita A, Vargas RE, Tunyong W, Mahakunkijchareon
21 Y, et al. Detection and characterization of enteric viruses in flood water from the 2011 thai flood.
22 *Jpn J Infect Dis.* 2013; 66(5):398-403.
23
24 Ogorzaly L, Walczak C, Galloux M, Etienne S, Gassilloud B, Cauchie HM. Human
25 Adenovirus Diversity in Water Samples Using a Next-Generation Amplicon Sequencing
26 Approach. *Food Environ Virol.* 2015 Apr; *In press*
27
28 Oka T, Katayama K, Hansman GS, Kageyama T, Ogawa S, Wu FT, et al.
29 Detection of human sapovirus by real-time reverse transcription-polymerase chain reaction. *J*
30 *Med Virol.* 2006 Oct; 78(10):1347-53.
31

1 Oliveira A, Mascarenhas JDP, Soares LS, Guerra SFS, Gabbay YB, Sanches N, et al. Rotavirus
2 serotype distribution in northern Brazil trends over a 27 year period pre and post national vaccine
3 introduction. *Trials in Vaccinology*. 2012; 1:4-9.
4

5 Osuolale O, Okoh A. Incidence of human adenoviruses and Hepatitis A virus in the final effluent
6 of selected wastewater treatment plants in Eastern Cape Province, South Africa. *Viol J*. 2015;
7 12:98.
8

9 Phanuwan C, Takizawa S, Oguma K, Katayama H, Yunika A, Ohgaki S.
10 Monitoring of human enteric viruses and coliform bacteria in waters after urban flood in
11 Jakarta, Indonesia. *Water Sci Technol*. 2006; 54(3):203-10.
12

13 Pina S, Puig M, Lucena F, Jofre J, Girones R. Viral pollution in the environment and in
14 shellfish: human adenovirus detection by PCR as an index of human viruses. *Appl. Environ.*
15 *Microbiol*. 1998; 64(9):3376-82.
16

17 Port of Manaus (Porto de Manaus). 2015. Available,
18 <http://www.portodemanous.com.br/?pagina=niveis-maximo-minimo-do-rio-negro> (accessed
19 2015-05-10)
20

21 Rohayem J, Dumke R, Jaeger K, Schröter-Bobsin U, Mogel M, Kruse A, et al. Assessing the risk
22 of transmission of viral diseases in flooded areas: viral load of the River Elbe in Dresden during
23 the flood of August 2002. *Interviol*. 2006; 49(6):370-6.
24

25 Santos N, Mendes GS, Silva RC, Pena GA, Rojas M, Amorim AR, et al. Salivirus
26 and aichivirus A infections in children with gastroenteritis in Brazil. *Clin Microbiol Infect*. 2015;
27 21(8):799.e1-3.
28

29 Satyamurty P, Costa CPW, Manzi AO, Candido LA. A quick look at the 2012 record flood in the
30 Amazon Basin. 2013; 40(7):1396-401.
31

1 Schmid D, Lederer I, Much P, Pichler AM, Allerberger F.
2 Outbreak of norovirus infection associated with contaminated flood water, Salzburg, 2005. *Euro*
3 *Surveill.* 2005; 10(6):E050616.3.
4
5 Schwartz BS, Harris JB, Khan AI, Larocque RC, Sack DA, Malek MA, et al. Diarrheal epidemics
6 in Dhaka, Bagladesh, during three consecutive floods: 1988, 1998, and 2004. *Am J Trop Med*
7 *Hyg.* 2006; 74(6):1067-73.
8
9 Schnitzler J, Benzler J, Altmann D, Mücke I, Krause G. Survey on the population's needs and
10 the public health response during floods in Germany 2002. *J Public Health Manag Pract.* 2007;
11 13(5):461-4.
12
13 Soares LdaS, Lobo PdosS, Mascarenhas JD, Neri DL, Guerra SdeF, de Oliveira AdoS, et al.
14 Identification of lineage III of G12 rotavirus strains in diarrheic children in the Northern Region
15 of Brazil between 2008 and 2010. 2012; 157(1):135-9.
16
17 Trujillo AA, McCaustland KA, Zheng DP, Hadley LA, Vaughn G, Adams SM, et al. Use of
18 TaqMan real-time reverse transcription-PCR for rapid detection, quantification, and typing of
19 norovirus. *J Clin Microbiol.* 2006; 44(4):1405-12.
20
21 Vieira CB, de Abreu Corrêa A, Jesus MS, Luz SLB, Wyn-Jones P, Kay D, et al. *Viruses*
22 *Surveillance under Different Season Scenarios of the Negro River Basin, Amazonia, Brazil.*
23 Submitted.
24
25 Villar JCE, Ronchail J, Guyot JL, Cochonneau G, Filizola N, Waldo L et al. Spatio-temporal
26 rainfall variability in the Amazon basin countries (Brazil, Peru, Bolivia, Colombia, and Ecuador).
27 *Int J Climatol.* 2009; 29(11):1574-94.
28
29 WHO (World Health Organization). WHO/IVB/08.17 - Manual of rotavirus detection and
30 characterization methods, 2009. *Immunization, Vaccines and Biologicals.* World Health
31 Organization.
32

- 1 Xavier MP, Oliveira SA, Ferreira MS, Victoria M, Miranda V, Silva MF, et al. Detection of
2 caliciviruses associated with acute infantile gastroenteritis in Salvador, an urban center in
3 NortheastBrazil. *Braz J Med Biol Res.* 2009; 42(5):438-44.
4
- 5 Wong M, Kumar L, Jenkins TM, Xagorarakis I, Phanikumar MS, Rose JB. Evaluation of public
6 health risks at recreational beaches in Lake Michigan via detection of enteric viruses and a
7 human-specific bacteriological marker. *Water Res.* 2009; 43(4):1137-49.
8
- 9 Zeng SQ, Halkosalo A, Salminen M, Szakal ED, Puustinen L, Vesikari T. One-step quantitative
10 RT-PCR for the detection of rotavirus in acute gastroenteritis. *J Virol Methods.* 2008;
11 153(2):238-40.