



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS  
INSTITUTO DE PATOLOGIA TROPICAL E SAÚDE  
PÚBLICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA DA  
RELAÇÃO PARASITO-HOSPEDEIRO**

**GRAZIELA PICCIOLA BORDONI**

---

**Indicadores de contaminação viral em amostras de água  
consumida em regiões rurais de Goiás**

---

**Goiânia  
2022**



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS  
INSTITUTO DE PATOLOGIA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA

## TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO (TECA) PARA DISPONIBILIZAR VERSÕES ELETRÔNICAS DE TESES E DISSERTAÇÕES NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a [Lei 9.610/98](#), o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou download, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

O conteúdo das Teses e Dissertações disponibilizado na BDTD/UFG é de responsabilidade exclusiva do autor. Ao encaminhar o produto final, o autor(a) e o(a) orientador(a) firmam o compromisso de que o trabalho não contém nenhuma violação de quaisquer direitos autorais ou outro direito de terceiros.

### 1. Identificação do material bibliográfico

Dissertação     Tese     Outro\*: \_\_\_\_\_

\*No caso de mestrado/doutorado profissional, indique o formato do Trabalho de Conclusão de Curso, permitido no documento de área, correspondente ao programa de pós-graduação, orientado pela legislação vigente da CAPES.

Exemplos: Estudo de caso ou Revisão sistemática ou outros formatos.

### 2. Nome completo do autor

GRAZIELA PICCIOLA BORDONI

### 3. Título do trabalho

Indicadores de contaminação viral em amostras de água consumida em regiões rurais de Goiás

### 4. Informações de acesso ao documento (este campo deve ser preenchido pelo orientador)

Concorda com a liberação total do documento  SIM     NÃO<sup>1</sup>

[1] Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. Após esse período, a possível disponibilização ocorrerá apenas mediante:

- a) consulta ao(a) autor(a) e ao(a) orientador(a);
- b) novo Termo de Ciência e de Autorização (TECA) assinado e inserido no arquivo da tese ou dissertação.

O documento não será disponibilizado durante o período de embargo.

Casos de embargo:

- Solicitação de registro de patente;
- Submissão de artigo em revista científica;
- Publicação como capítulo de livro;
- Publicação da dissertação/tese em livro.

**Obs. Este termo deverá ser assinado no SEI pelo orientador e pelo autor.**



Documento assinado eletronicamente por **Lilian Carla Carneiro, Professor do Magistério Superior**, em 13/12/2022, às 09:26, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Graziela Picciola Bordoni, Discente**, em 13/12/2022, às 10:04, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://sei.ufg.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **3398606** e o código CRC **95C1CF9A**.

**GRAZIELA PICCIOLA BORDONI**

---

**Indicadores de contaminação viral em amostras de água  
consumida em regiões rurais de Goiás**

---

Dissertação de Mestrado apresentada ao  
Programa de Pós-Graduação em Biologia da  
Relação Parasito-Hospedeiro da Universidade  
Federal de Goiás para obtenção do Título de  
Mestre.

Área de concentração: Biologia da Relação  
Parasito-Hospedeiro

Orientadora: Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Lilian Carla Carneiro

**Goiânia  
2022**

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFG.

Bordoni, Graziela Picciola  
Indicadores de contaminação viral em amostras de água consumida em regiões rurais de Goiás [manuscrito] / Graziela Picciola Bordoni. - 2022.  
CXIII, 113 f.

Orientador: Profa. Dra. Lilian Carla Carneiro.  
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Goiás, Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública (IPTSP), Programa de Pós Graduação em Biologia da Relação Parasito-Hospedeiro, Goiânia, 2022.  
Bibliografia. Anexos.  
Inclui siglas, mapas, abreviaturas, símbolos, gráfico, tabelas, lista de figuras, lista de tabelas.

1. Comunidades rurais. 2. Contaminação fecal . 3. Fontes de água.  
4. Vírus entéricos . I. Carneiro, Lilian Carla , orient. II. Título.

CDU 579



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS

INSTITUTO DE PATOLOGIA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA

### ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO

**ATA DA REUNIÃO DA BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE GRAZIELA PICCIOLA BORDONI** - Aos vinte e oito dias do mês de novembro do ano de 2022 (28/11/2022), às 09h00min, reuniram-se os componentes da Banca Examinadora: Profs. Drs. **LILIAN CARLA CARNEIRO** (UFG), **ANTÔNIO JOÃO CARVALHO DE ALBUQUERQUE** (UBI) e **BRUNO FRANCESCO RODRIGUES DE OLIVEIRA** (UFF) para, sob a presidência da primeira, e em sessão pública realizada por WEBCONFERÊNCIA, procederem à avaliação da defesa de dissertação intitulada: “**Indicadores de contaminação viral em amostras de água consumida em regiões rurais de Goiás**”, em nível de MESTRADO, área de concentração em **BIOLOGIA DA RELAÇÃO PARASITO-HOSPEDEIRO**, de autoria de **GRAZIELA PICCIOLA BORDONI**, discente do PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA DA RELAÇÃO PARASITO-HOSPEDEIRO, da Universidade Federal de Goiás. A sessão foi aberta pela Orientadora, Profa. Dra. **LILIAN CARLA CARNEIRO**, que fez a apresentação formal dos membros da Banca e orientou a Candidata sobre como utilizar o tempo durante a apresentação de seu trabalho. A palavra a seguir, foi concedida à autora da dissertação que, em 30 minutos procedeu à apresentação de seu trabalho. Terminada a apresentação, cada membro da Banca arguiu a Candidata, tendo-se adotado o sistema de diálogo sequencial. Terminada a fase de arguição, procedeu-se à avaliação da defesa. Tendo-se em vista o que consta na Resolução nº. 1492/2017 do Conselho de Ensino, Pesquisa, Extensão e Cultura (CEPEC), que regulamenta o Programa de Pós-Graduação em Biologia da Relação Parasito-Hospedeiro a Banca, em sessão secreta, expressou seu Julgamento, considerando a candidata Aprovada ou Reprovada:

Banca Examinadora	Aprovada / Reprovada
Profa. Dra. <b>Lilian Carla Carneiro</b>	<u>    Aprovada    </u>
Prof. Dr. <b>Antônio João Carvalho de Albuquerque</b>	<u>    Aprovada    </u>
Prof. Dr. <b>Bruno Francesco Rodrigues de Oliveira</b>	<u>    Aprovada    </u>

Em face do resultado obtido, a Banca Examinadora considerou a candidata **Habilitada**, cumprindo todos os requisitos para fins de obtenção do título de **MESTRA EM BIOLOGIA DA RELAÇÃO PARASITO-HOSPEDEIRO**, na área de concentração em **BIOLOGIA DA RELAÇÃO PARASITO-HOSPEDEIRO**, pela Universidade Federal de Goiás. Cumpridas as formalidades de pauta, às 10\_h\_50 min, a presidência da mesa encerrou esta sessão de defesa de dissertação e para constar eu, HELOÍSA DE SOUSA VIEIRA, secretária do Programa de Pós-Graduação em Biologia da Relação Parasito-Hospedeiro, lavrei a presente Ata que depois de lida e aprovada, será assinada pelos membros da Banca Examinadora.

TÍTULO SUGERIDO PELA BANCA



Documento assinado eletronicamente por **Antonio João Carvalho de Albuquerque, Usuário Externo**, em 07/12/2022, às 13:37, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Lilian Carla Carneiro, Professor do Magistério Superior**, em 09/12/2022, às 05:01, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Bruno Francesco Rodrigues de Oliveira, Usuário Externo**, em 09/12/2022, às 16:21, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://sei.ufg.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **3387804** e o código CRC **17DEAC8B**.

Referência: Processo nº 23070.061042/2022-11

SEI nº 3387804

**Programa de Pós-Graduação em Biologia da Relação Parasito-Hospedeiro  
da Universidade Federal de Goiás**

**BANCA EXAMINADORA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**Aluno (a): Graziela Picciola Bordoni**

---

**Orientador (a): Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Lilian Carla Carneiro**

---

**Membros Titulares:**

**1. Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Lilian Carla Carneiro**

**2. Prof<sup>o</sup> Dr<sup>o</sup> Antônio João Carvalho de Albuquerque**

**3. Prof<sup>o</sup> Dr<sup>o</sup> Bruno Francesco Rodrigues de Oliveira**

**Membros Suplentes:**

**4. Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Mônica de Oliveira Santos**

**5. Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Laura Maria Barbosa Gonçalves**

**Data: 28/11/2022**

**Horário: 09:00**

## ***DEDICATÓRIA***

*Dedico este trabalho aos meus pais Ornela e Waldir, à minha irmã Giulia e ao meu noivo Gabriel, por sempre me apoiarem e me incentivarem a alcançar os meus objetivos.*

## AGRADECIMENTOS

---

Agradeço à Deus, por sempre estar à frente de tudo e ter abençoado os meus caminhos para que eu tenha chegado aonde cheguei hoje.

À minha mãe e ao meu pai, por toda sua paciência, amor e compreensão, sem vocês eu não seria nada. À minha irmã Giulia, que pelo seu exemplo de vida, me faz ser melhor a cada dia e me deu forças para continuar. Obrigada por sempre me aconselharem e me mostrarem o caminho certo, vocês são a minha rocha. Amo vocês.

Ao meu noivo Gabriel, pelo seu amor e todo seu apoio. Obrigada por me aguentar em inúmeras situações. Você sempre será meu melhor amigo e amor da minha vida. À toda sua família, que sempre me acolheu como parte deles e por todo o seu amor.

À Prof<sup>a</sup> Lilian Carla Carneiro, por ter me recebido tão bem sem nunca ter tido contato. Agradeço sua confiança para que eu possa ter concluído este trabalho. Obrigada pela oportunidade, orientação e paciência.

Ao Prof<sup>o</sup> Paulo Sérgio Scalize coordenador do Projeto SanRural, por ter apoiado este trabalho. Agradeço sua permissão pelo uso do Laboratório de Análise de Água (LAnA-UFG) para realização de parte das análises.

Aos meus companheiros do Laboratório de Biotecnologia de Microrganismos (LBMic), em especial Lucas Gonçalves, Thais Reis, Adailton Pereira, Monica Santos, Célia Malveste e Paulo Alex, por toda sua ajuda e amizade.

À Fundação Nacional da Saúde (FUNASA), pelo suporte financeiro através do projeto “Saneamento e Saúde em Comunidades Rurais e Tradicionais de Goiás” (Sanrural)

## SUMÁRIO

---

1	INTRODUÇÃO / REVISÃO DA LITERATURA .....	1
1.1	SANEAMENTO BÁSICO RURAL.....	1
1.2	CONTAMINAÇÃO DA ÁGUA DE CONSUMO HUMANO NO MEIO RURAL.....	3
1.3	VÍRUS ENTÉRICOS: CARACTERÍSTICAS GERAIS, TRANSMISSÃO, E CONTAMINAÇÃO DO AMBIENTE AQUÁTICO .....	12
1.4	EPIDEMIOLOGIA DAS DOENÇAS DE VEICULAÇÃO HÍDRICA .....	20
1.5	DETECÇÃO DOS VÍRUS ENTÉRICOS .....	22
1.6	VÍRUS X BACTÉRIAS INDICADORAS DE CONTAMINAÇÃO.....	25
1.7	OPÇÕES PARA O TRATAMENTO DE ÁGUA NAS COMUNIDADES RURAIS E REMOÇÃO DOS VÍRUS ENTÉRICOS NA ÁGUA.....	27
2	JUSTIFICATIVA.....	31
3	OBJETIVOS.....	34
3.1	OBJETIVO GERAL .....	34
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	34
4	MÉTODOS.....	35
4.1	LOCAL E POPULAÇÃO DO ESTUDO .....	35
4.2	COLETA DAS AMOSTRAS .....	42
4.3	CONCENTRAÇÃO VIRAL NAS AMOSTRAS.....	43
4.4	EXTRAÇÃO DO MATERIAL GENÉTICO VIRAL .....	44
4.5	ANÁLISE MOLECULAR .....	46
4.6	ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	52
5	RESULTADOS .....	53
6	DISCUSSÃO.....	60
7	CONCLUSÕES.....	69
	REFERÊNCIAS .....	70

## LISTA DE TABELAS

---

---

Tabela 1. Localização dos pontos de coleta das amostras. ....	36
Tabela 2. Relação da quantidade de amostras coletadas, o tipo de fonte coletada e subtipo de fontes. ....	43
Tabela 3. Oligonucleotídeos utilizados para a amplificação de HAdV, EV e RV na qPCR e RT-qPCR. ....	48
Tabela 4. Quantidade de indicadores virais em relação aos tipos de fontes de água. ....	53
Tabela 5. Média geométrica da concentração dos indicadores virais. A concentração foi dada por CG/L. ....	56
Tabela 6. Valores mínimos, médios e máximos em relação as médias geométricas das concentrações dos indicadores HAdV, RV e EV. Concentrações em CG/L. ....	56
Tabela 7. Associação entre Rotavírus e poços rasos, resultados detalhados. ....	58
Tabela 8. Regressão logística binária, resultados sem significância estatística. ....	58

## LISTA DE FIGURAS

---

---

Figura 1. Esquema representativo das principais fontes de água no planeta. Fonte: CDC (2022). ....	3
Figura 2. Distribuição vertical da água em subsuperfície. Modificado de Teixeira, et al. 2000. ....	4
Figura 3. Aquíferos confinados e não confinados. Fonte: Chen et al. 2018. ....	6
Figura 4. Tipos de poços. Adaptado de MPMS, 2017. ....	8
Figura 5. Fontes de contaminação da água. Adaptado de Purohit et al. 2017. ....	11
Figura 6. Fontes de transmissão de vírus entéricos. Próprio autor. ....	12
Figura 7. Esquema ilustrativo do capsídeo de Enterovírus, demonstrando as proteínas VP1 a VP4. Adaptado de Viral Zone, 2008. ....	15
Figura 8. Representação esquemática da partícula de Adenovírus. Fonte: Dreamstime, 2017. ....	17
Figura 9. Representação esquemática da estrutura da partícula de Rotavírus. Fonte: Mossel et al. 2016. ....	19
Figura 10. Amplificação por qPCR. Adaptado de ATT Bioquest©. ....	24
Figura 11. Diagramas esquemáticos dos ensaios <i>SybrGreen</i> ® e <i>TaqMan</i> ® durante procedimentos de qPCR. Adaptado de Cao et al. 2020. ....	25

Figura 12. Esquema geral da metodologia utilizada no trabalho: coleta das amostras de água, concentração viral, extração do ácido nucleico e análise molecular (qPCR e RT-qPCR). .....	35
Figura 13. Mapa do Estado de Goiás localizando os municípios em que foram realizadas as coletas nas comunidades rurais participantes deste estudo. ....	42
Figura 14. Indicativo da frequência de contaminação pelos indicadores virais. ....	54
Figura 15. Indicativo de contaminação fecal de acordo com os tipos de fontes de água e indicadores virais. ....	55
Figura 16. Contaminação pelos indicadores virais, de acordo com o subtipo de fonte subterrânea. ....	55
Figura 17. Gráfico de Venn mostrando a distribuição das amostras em relação aos indicadores analisados. ....	57
Figura 18. Associação entre presença de Rotavírus e os tipos de fontes “poço raso escavado” e “poço tubular raso” .....	58

## SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS

---

%	Porcentagem
/g	Por grama
ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
atm	Atmosfera padrão
CCL	Lista de Candidatos a Contaminantes
cDNA	DNA complementar
CG/L	Cópias Genômicas por Litro
CREA	Conselho Regional de Engenharia e Agronomia
DDA	Doença Diarreica Aguda
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dsRNA	RNA fita dupla
DURH	Declaração de Uso de Recursos Hídricos
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EV	Enterovírus
FIME	Filtração em Múltiplas Etapas
FUNASA	Fundação Nacional de Saúde
g	Gravidade
GM/MS	Gabinete do Ministro/Ministério da Saúde
HAdV	Adenovírus
HAdV-C	Adenovírus espécie C
HMI	Hospital Materno Infantil de Goiânia
mL	Mililitro
mm	Milímetro
mM	Milimolar
mmHg	Milímetro de mercúrio
nm	Nanômetro
NSP	Proteína Não Estrutural
°C	Graus Celsius
ODS	Objetivos de Desenvolvimento Sustentável
OMS	Organização Mundial da Saúde
ONU	Organização das Nações Unidas
OR	Odds Ratio

PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
pH	Potencial Hidrogeniônico
PLANSAB	Plano Nacional de Saneamento Básico
PNI	Programa Nacional de Imunização
PNSR	Programa Nacional de Saneamento Rural
PVC	Policloreto de vinila
qPCR	Reação em Cadeira da Polimerase quantitativa
RNA	Ácido Ribonucleico
ROX	Carboxi-x-Rhodamina
RT-qPCR	Reação em Cadeira da Polimerase quantitativa por Transcriptase Reversa
RV	Rotavírus
RV-A	Rotavírus grupo A
SALTA-z	Solução Alternativa Coletiva Simplificada de Tratamento de Água – zeólita
SEMAD	Secretaria de Estado de Meio-Ambiente e Desenvolvimento Sustentável
SESGO	Secretaria de Estado da Saúde do Estado de Goiás
SINAN	Sistema de Informação de Agravos de Notificação
TE	Tris-EDTA
UNICEF	Fundo das Nações Unidas
USEPA	Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos
UV	Ultravioleta
VP	Proteína Viral
WASH	Água, saneamento e higiene
µg/µL	Micrograma por Microlitro
µm	Micrômetro

## RESUMO

---

As comunidades rurais estão localizadas longe dos centros urbanos, onde o fornecimento adequado de água potável é prejudicado. Na falta de uma rede pública de distribuição, a obtenção de água, é feita a partir de fontes superficiais e subterrâneas, onde a qualidade microbiana é muitas vezes desconhecida. Goiás possui 9,7% da população em áreas rurais e estudos anteriores feitos em algumas dessas comunidades rurais e tradicionais já demonstraram vulnerabilidade da água para o consumo desses residentes por patógenos de veiculação hídrica, como os vírus entéricos. Logo, o objetivo do trabalho foi continuar a avaliação da contaminação fecal de amostras de água provenientes de fontes individuais e coletivas, de 24 comunidades em áreas rurais do Estado de Goiás. Foram coletadas 160 amostras, cujas fontes de água eram poço tubular raso, poço tubular profundo, poço raso escavado e nascente, mananciais superficiais, água da chuva armazenada em cisternas e caminhão pipa. Utilizou-se como indicadores de contaminação fecal os vírus entéricos Adenovírus humano (HAdV), Rotavírus (RV) e Enterovírus (EV), analisados por qPCR. Ao todo, 30% das amostras apresentaram indicativo de contaminação fecal. As taxas de detecção foram de 20% para RV, 9,4% para HAdV e 4,4% para EV. As médias geométricas de concentração desses indicadores foram  $1,5 \times 10^6$  CG/L,  $1,9 \times 10^6$  CG/L e  $7,1 \times 10^5$  CG/L, respectivamente. RV foi o indicador viral de maior prevalência em fontes subterrâneas, sendo estatisticamente associado a poços tubulares rasos. Em amostras de nascente, destaca-se o HAdV com 11,8%. Nas amostras de cisterna, tanto HAdV quanto RV, foram encontrados na mesma prevalência. Esses resultados revelam que a população analisada está vulnerável a doenças de veiculação hídrica causadas por patógenos entéricos, servindo para orientar a futuras decisões e aprimorar as práticas cotidianas de tratamento de água nestas comunidades.

Palavras-Chave: Comunidades rurais; Contaminação fecal; Fontes de água; Vírus entéricos.

## ABSTRACT

---

Rural communities are located far from urban centers, where the adequate supply of potable water is hampered. In the lack of a public distribution network, water is obtained from surface and groundwater sources, where the microbial quality is often unknown. Goiás has 9.7% of the population in rural areas and previous studies carried out in some of these rural and traditional communities have already demonstrated the vulnerability of water for the consumption of these residents by waterborne pathogens, such as enteric viruses. Therefore, the aim of the work was to continue the evaluation of fecal contamination of water samples from individual and collective sources, from 24 communities in rural areas of the State of Goiás. 160 samples were collected, whose water sources were shallow tubular well, deep tubular well, dug well and spring, surface water, rainwater stored in cisterns and water truck. The enteric viruses Human *Adenovirus* (HAdV), *Rotavirus* (RV) and *Enterovirus* (EV) were used as indicators of fecal contamination, analyzed by qPCR. In all, 30% of the samples showed signs of fecal contamination. Detection rates were 20% for RV, 9.4% for HAdV and 4.4% for EV. The geometric means of concentration of these indicators were  $1.5 \times 10^6$  GC/L,  $1.9 \times 10^6$  GC/L and  $7.1 \times 10^5$  GC/L, respectively. RV was the most prevalent viral indicator in underground sources, being statistically associated with shallow tubular wells. In spring samples, HAdV stands out with 11.8%. In the cistern samples, both HAdV and RV were found in the same prevalence. These results reveals that the analyzed population is vulnerable to waterborne diseases caused by enteric pathogens, serving to guide future decisions and improve daily water treatment practices in these communities.

Keywords: Rural communities; Fecal contamination; Water sources; Enteric viruses

## 1.1 SANEAMENTO BÁSICO RURAL

As atividades socioeconômicas realizadas por um indivíduo dependem da sua qualidade de vida, que é possibilitada pelo acesso à moradia, à educação, à saúde e ao saneamento básico. O saneamento básico é definido como o conjunto de ações e serviços, que incluem abastecimento de água para consumo, gestão de resíduos e limpeza pública, esgotamento sanitário e drenagem de água pluvial (BRASIL 2007; Fortes et al. 2019).

Esses conjuntos de ações tendem alcançar a máxima melhoria das condições de vida, controlando assim os motivos que podem causar efeitos prejudiciais sobre o bem-estar físico, mental e social, do indivíduo, tanto no meio urbano como rural (Follador et al. 2015; Massa & Filho 2020). O acesso ao saneamento é tido como a circunstância fundamental à dignidade e à sobrevivência humana, assim como o fornecimento adequado de água em quantidade e qualidade (Fortes et al. 2019).

No entanto, aproximadamente 75% da população global, que vive em áreas rurais, não têm acesso a fontes de água potável e saneamento básico (Cabral & Araújo 2016). Dados recentes da OMS/UNICEF (Organização Mundial da Saúde/ Fundo das Nações Unidas para a Infância) sobre o acesso a água potável, saneamento inadequado e higiene (WASH), apresentam que oito a cada dez pessoas sem acesso à água potável, e sete a cada dez pessoas sem acesso ao saneamento básico, vivem em áreas rurais (WHO/UNICEF 2019; Calgaro & Filho 2020; CDC 2022).

De modo a exercer a barreira primária contra patógenos de transmissão hídrica, o saneamento básico evita o contato das pessoas com as excretas despejadas nos recursos hídricos, tornando-se diretamente relacionado à qualidade microbiológica da água (Ercumen et al. 2017; WHO 2018). As águas contaminadas por patógenos microbianos causam risco considerável à saúde pública em geral, pois são responsáveis por surtos de doenças de veiculação hídrica e, assim, levam a uma alta incidência de morbidade e mortalidade, principalmente em países subdesenvolvidos (Toze 1999; Subekti et al. 2002).

Segundo a Organização Mundial da Saúde, a água de baixa qualidade e a precariedade no saneamento básico causam a morte de 829.000 pessoas no mundo, a cada ano, por casos de diarreia. E ainda, 80% das doenças diarreicas são transmitidas pela água (da Costa et al. 2016; Fortes et al. 2019). No ano de 2018, foram registrados mais de 230

mil internações e 2.180 óbitos por doenças de veiculação hídrica no país (Trata Brasil 2018).

Vírus e bactérias estão entre os principais patógenos causadores de doenças de veiculação hídrica. São de origem entérica, tanto humana como animal, e transmitidos pela via fecal-oral, isto é, quando são excretados nas fezes de indivíduos infectados e ingeridos na forma de água ou alimento contaminados (Ashbolt 2015; Nóbrega et al. 2015).

O saneamento básico é um direito previsto na Constituição e amparado pela Lei Federal nº 11.445 de 5 de janeiro de 2007, principal lei que estabelece o Saneamento Básico no Brasil. Porém, observa-se na lei que não há o esclarecimento sobre o atendimento do saneamento em comunidades rurais, referindo-se a serviços públicos em locais que possuem economia de escala e com soluções coletivas (BRASIL 2007; Scaratti & Bezerra 2020).

A lei prevê a implantação do Plano Nacional de Saneamento Básico (Plansab) e ordena a elaboração e execução do Programa Nacional de Saneamento Rural (PNSR). O PNSR tem como objetivo de universalizar o acesso às ações de saneamento básico nas áreas rurais, beneficiando inclusive comunidades tradicionais, incluindo ações para abastecimento de água, esgotamento sanitário, melhorias sanitárias domiciliares, manejo de resíduos sólidos, educação e mobilização social (Costa & Pinheiro 2018; Calgaro & Filho 2020).

No entanto, nota-se ainda no Brasil grande desigualdade quando comparada a oferta de saneamento entre áreas urbanas e rurais. O abastecimento de água por rede de distribuição atende cerca de 94% dos domicílios urbanos, enquanto apenas 34,5% dos domicílios nas áreas rurais estão ligados a redes de abastecimento de água com ou sem canalização interna (FUNASA 2018; Calgaro & Filho 2020).

Em relação ao esgotamento sanitário, apenas 5,45% dos domicílios rurais estão ligados à rede de coleta de esgotos (FUNASA 2018; Calgaro & Filho 2020). Nas regiões rurais, 49% da população ainda convive com práticas consideradas inadequadas pela OMS e UNICEF, como o uso de banheiros compartilhados, a defecação ao ar livre ou ainda o lançamento dos dejetos sem qualquer tratamento diretamente no solo ou em corpos d'água (WHO/UNICEF 2015; Tonetti et al. 2018).

As comunidades rurais normalmente estão localizadas longe dos centros urbanos, onde a capacidade de fornecer um sistema centralizado de água potável é drasticamente reduzida, tornando-as isoladas. Isso ocorre devido ao difícil acesso, à grande distância e

afastamento entre domicílios e dos domicílios à sede do município, à baixa densidade populacional, e à situação de irregularidade fundiária. Assim, os indivíduos obtêm água de fontes superficiais e subterrâneas, onde a qualidade microbiana é muitas vezes desconhecida (Ashbolt 2004; Pronk et al. 2008; Gibson et al. 2011; WHO 2018; Tonetti et al. 2018).

## 1.2 CONTAMINAÇÃO DA ÁGUA DE CONSUMO HUMANO NO MEIO RURAL

### a) Fontes de Água

O homem dispõe de dois tipos de fontes de água para consumo, que são as águas subterrâneas e as águas superficiais. As águas subterrâneas se encontram abaixo da superfície do solo, preenchendo completamente os poros das rochas e dos sedimentos, constituindo assim os chamados aquíferos. São extraídas por meio das nascentes, poços rasos e poços tubulares. As águas superficiais, que são corpos d'água formados pela água que escorre sobre a superfície do solo, como córregos, rios, lagos, reservatórios e/ou oceanos. Menos de 5% da água doce que existe no globo terrestre encontra-se disponível superficialmente, estando o restante armazenado em reservas subterrâneas (Figura 1) (BRASIL 2006; Guimarães et al. 2007; Hirata et al. 2019).

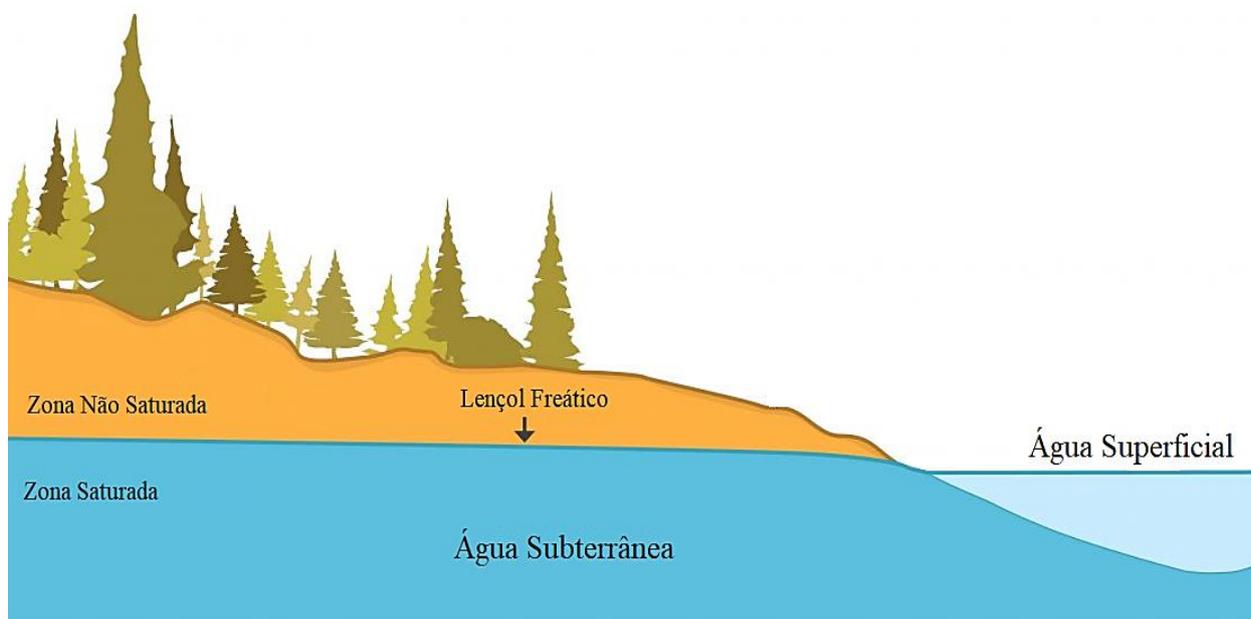


Figura 1. Esquema representativo das principais fontes de água no planeta. Fonte: CDC (2022).

Quando ocorre uma precipitação, uma parcela da água que está em contato com o solo se infiltra e percola no interior do subsolo. Parte da água, durante a infiltração, devido a ação da força de adesão ou capilaridade, fica contida nas regiões mais perto da superfície do solo, chamada Zona Não Saturada. Já por ação da gravidade, outra parcela da água fica retida em zonas mais profundas do subsolo, resultando na Zona Saturada (Figura 2) (Borghetti et al. 2011; ANA 2015).

Caso a chuva exceda o potencial máximo de infiltração no solo, o excesso irá inicialmente se acumular em depressões e, em seguida, gerar o escoamento superficial. Este se dá por meio de trajetórias preferenciais, como sulcos, ravinas, vales e cursos d'água, os quais finalmente irão desaguar nos mares e oceanos (Heller & Pádua 2006).

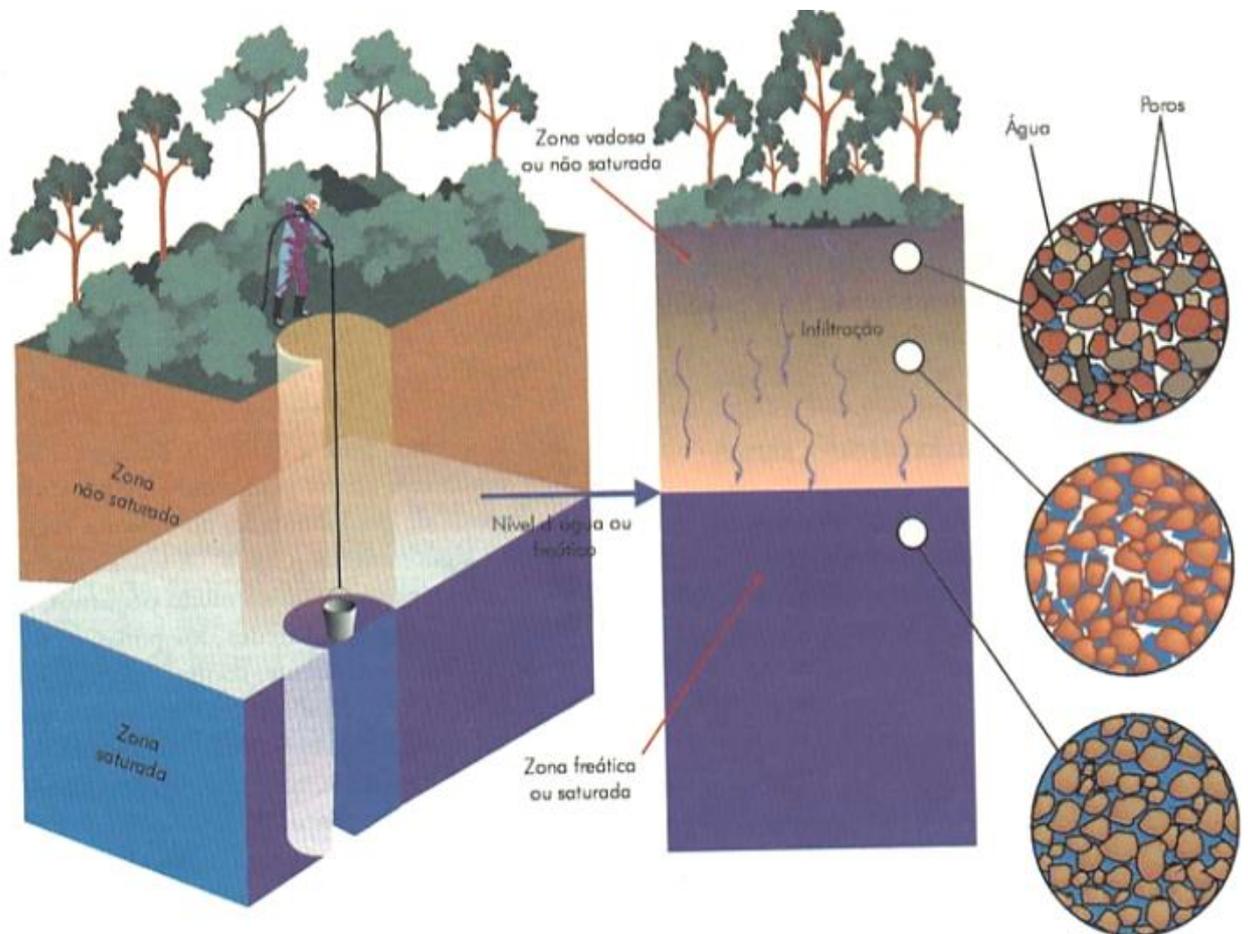


Figura 2. Distribuição vertical da água em subsuperfície. Modificado de Teixeira, et al. 2000.

Os aquíferos são formações geológicas do subsolo feitas por rochas, tendo como principal característica a capacidade de suprir e armazenar água subterrânea, através de poços e nascentes. Podem ser classificados conforme suas características geológicas e

hidrodinâmicas. A constituição geológica (porosidade/permeabilidade intergranular ou de fissuras), determina a velocidade da água em seu meio, sua qualidade como reservatório e qualidade da água. Devido à sua classificação hidrodinâmica, podem ser considerados aquíferos livres (não confinados ou freáticos) ou confinados/artesianos (Figura 3) (Foster et al. 2003; Borghetti et al. 2011; ANA 2015).

Os aquíferos livres são aqueles que estão submetidos à pressão atmosférica. São constituídos por uma formação geológica superficial e permeável, limitado por uma base impermeável e completamente aflorante em toda sua extensão. São os mais comuns e explorados. Sua variação no nível de água está influenciada pelas estações chuvosas, recebendo então a chamada recarga direta. Devido a isso, é o tipo de aquífero mais suscetível a contaminação (Figura 3) (Borghetti et al. 2011; ANA 2015).

Os aquíferos confinados ou artesianos são aqueles em que a pressão no topo da zona saturada é maior do que a pressão atmosférica, o que faz com que a água atinja o poço acima da zona aquífera. Logo, como o nível da água encontra-se sob pressão, é capaz de produzir artesianismo nos poços que captam sua água. Sua formação geológica é permeável, estando confinada entre duas camadas impermeáveis ou semipermeáveis. Recebem a recarga indireta e seu reabastecimento ocorre preferencialmente em locais onde a formação aflora a superfície (Figura 3) (Tucci & Cabral 2003; Borghetti et al. 2011; ANA 2015; BRASIL 2020).

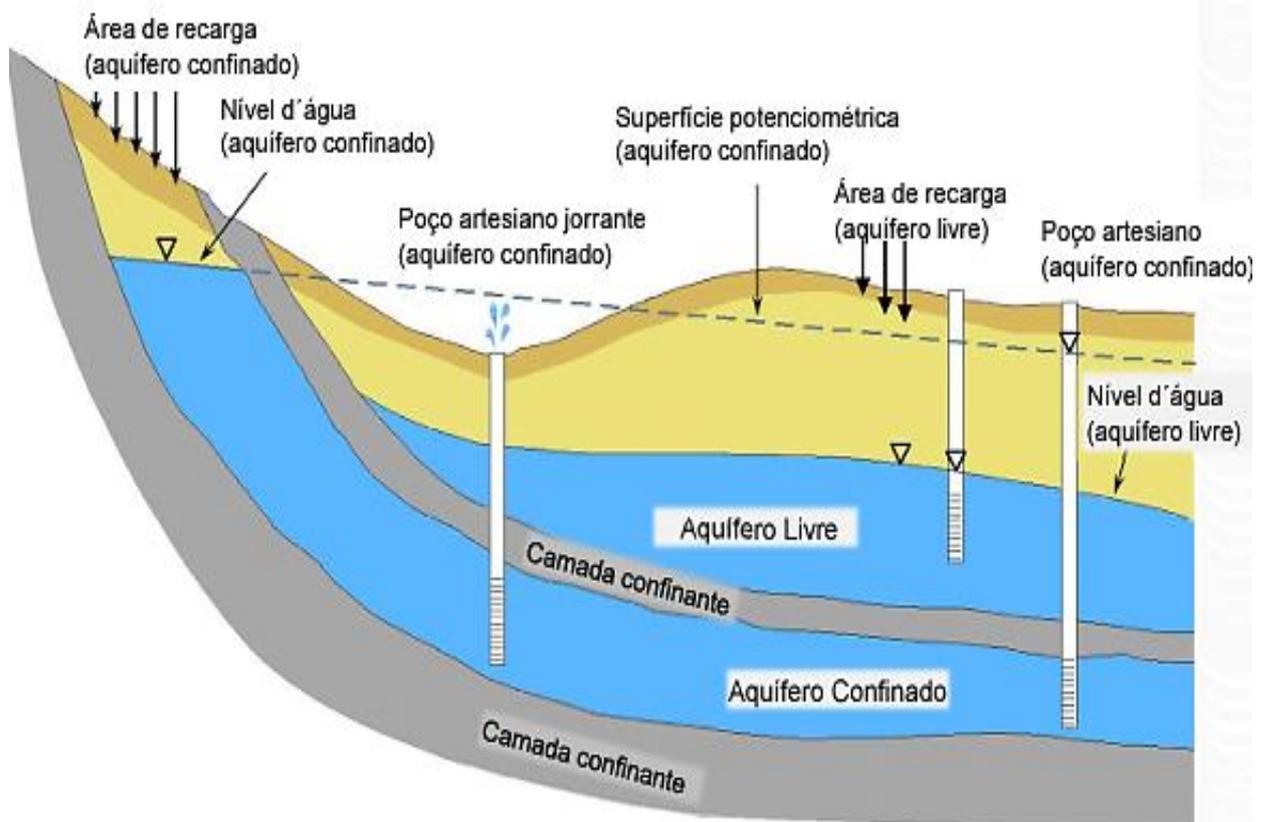


Figura 3. Aquíferos confinados e não confinados. Fonte: Chen et al. 2018.

O recurso hídrico subterrâneo é quase sempre a única opção de água potável no campo e nas periferias das cidades, sendo seu uso uma característica comum em áreas rurais. O uso dessas fontes é devido à sua manutenção e operação facilitadas, além dos baixos custos para implantação e funcionamento do sistema de abastecimento (captação, adução, tratamento e distribuição), e presume-se que sua qualidade seria melhor quando comparada as fontes superficiais (Leite et al. 2018; Hirata et al. 2019).

No âmbito rural, o fornecimento de água para consumo humano se difere de regiões urbanizadas e populosas. São utilizadas soluções alternativas de abastecimento de água (coletivas e/ou individuais), distintas do sistema de abastecimento encontrado nos grandes centros. Na falta de uma rede pública de distribuição de água a partir das fontes de captação, sua obtenção no meio rural é feita a partir de lagos, rios, nascentes, poços rasos, poços profundos, água da chuva etc. As nascentes e cisternas que armazenam a água da chuva são opções interessantes, pois a água da chuva pode ser utilizada em regiões em que outras matrizes apresentam variação na sua disponibilidade sazonal e o uso das nascentes pode não necessitar de infraestrutura (Palla et al. 2012; Leite et al. 2018; Bernardino et al. 2020; Peres et al. 2020).

Os poços rasos são construídos manualmente, escavando-se o terreno, podendo ser revestidos de alvenaria ou com peças pré-moldadas. Possui inúmeras denominações, como: cacimba, cisterna, cacimbão, poço amazonas, poço escavado manualmente, poço caipira. São ainda amplamente utilizados para o suprimento hídrico da população rural no Brasil, principalmente em regiões que não são atendidas por rede de abastecimento de água. São de grandes diâmetros (1 metro ou mais), e podem chegar a até 20 metros de profundidade. A retirada da água se dá por bombas hidráulicas ou manualmente, com balde. A autorização governamental dos órgãos gestores ou licenciamento para construção não é necessária para este tipo de poço (Figura 4) (BRASIL 2006; Heller & Pádua 2006; ANA 2015; BRASIL 2020).

Os poços tubulares são muitas vezes o único modo para fazer a captação de mananciais subterrâneos. Possuem pequeno diâmetro comparado à profundidade, são revestidos parcial ou completamente com tubos metálicos ou de plástico (PVC), juntamente com a argamassa ou cimento, afim de evitar que a água superficial possivelmente contaminada atinja a zona subterrânea do aquífero, e são construídos com equipamentos mecânicos. Compreendendo uma profundidade de até 20 metros, os poços tubulares rasos ou minipoços podem ser perfurados por meio de trados, ou cravados, a partir da cravação de tubos metálicos providos de ponteiros. São frequentemente utilizados em situações de emergência em lençóis freáticos de pequena profundidade e grande vazão (Figura 4) (Vasconcelos 2015; BRASIL 2020).

Já os poços tubulares profundos chegam a uma profundidade de 20 a cerca de 4.500 metros. Sua construção carece de mão de obra e equipamentos especiais, de acordo com as normas técnicas específicas. Conforme as condições geológicas do local, podem ser totais ou parcialmente revestidos com tubos e filtros, metálicos ou de plástico (Figura 4) (Vasconcelos 2015; BRASIL 2020).

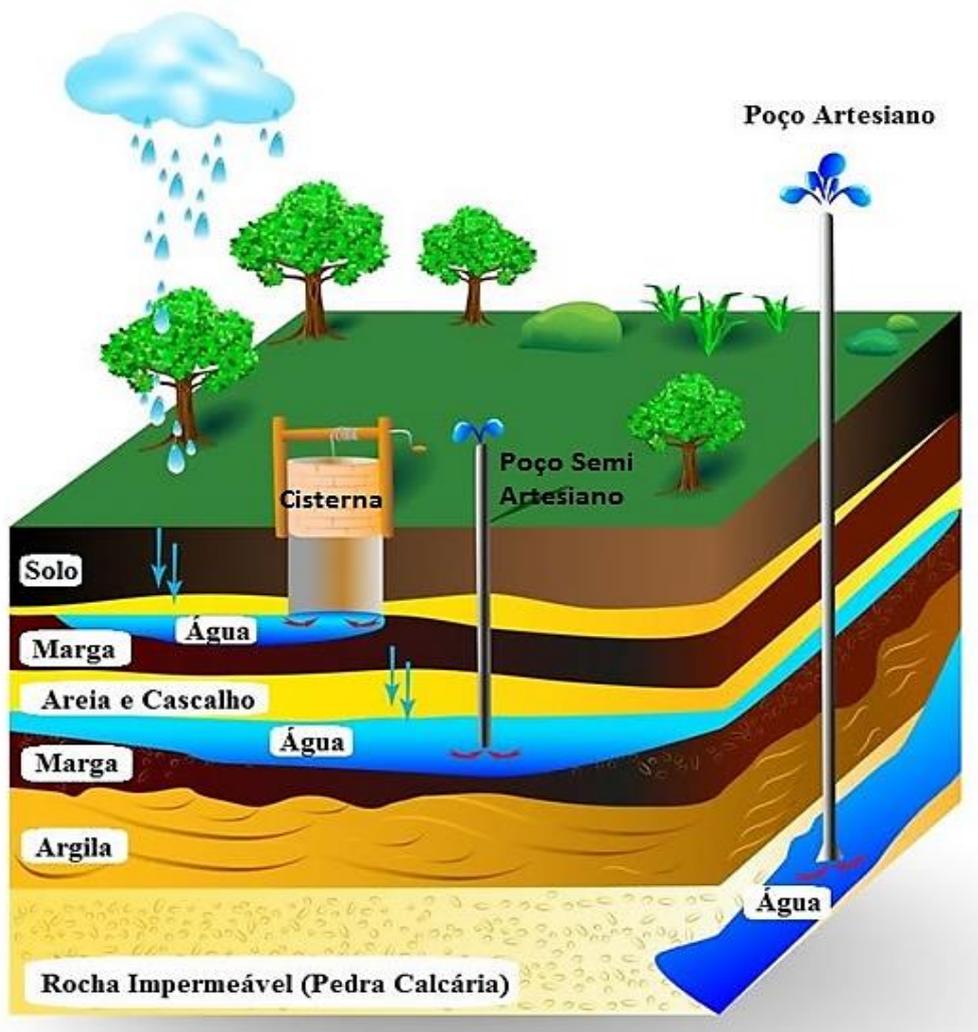


Figura 4. Tipos de poços. Adaptado de MPMS, 2017.

A realização da extração da água de aquífero subterrâneo para consumo final ou insumo de processo produtivo, compreende duas fases que envolvem a solicitação de outorgas. A outorga de direito de uso de recursos hídricos dispõe como objetivos assegurar o controle quantitativo e qualitativo dos usos da água e o efetivo exercício dos direitos de acesso à água, sendo este um dos seis instrumentos da Política Nacional de Recursos Hídricos, da Lei Federal nº 9.433, de 08 de janeiro de 1997 (BRASIL 1997; SEMARH 2012; CERHí 2019).

O uso de recursos hídricos quando é para a satisfação das necessidades de pequenos núcleos populacionais, que estão no meio rural; as derivações, captações e lançamentos considerados insignificantes, bem como as acumulações de volumes de águas consideradas insignificantes, não necessitam de outorga. Mesmo assim, a dispensa requer a tramitação do processo nos órgãos ambientais a fim de conseguir uma Declaração de Dispensa de Outorga (CERHí 2019).

Para perfurar um poço artesiano é preciso pedir uma licença de perfuração para os órgãos competentes. No estado de Goiás, o órgão responsável pela concessão da outorga é a Secretaria de Estado de Meio Ambiente e Desenvolvimento Sustentável (SEMAD). Primeiro, é necessária a autorização por meio da Declaração de Uso de Recursos Hídricos (DURH). Posteriormente, o protocolo de solicitação sendo analisado e validado pela SEMAD, se faz disponível a criação de processo de outorga (BRASIL 1997; SEMARH 2012; CERHí 2019). As formas de outorgas no Estado de Goiás são concessão (quando a utilização dos recursos hídricos for de utilidade pública), autorização (se a utilização dos recursos hídricos não for de utilidade pública) e permissão (se a utilização dos recursos hídricos não for de utilidade pública e demandar vazão insignificante) (SEMARH 2012).

A documentação exigida no momento de solicitação de outorga corresponde ao perfil litológico descrevendo a litologia com as profundidades e a formação a que pertence; o perfil construtivo final indicando os diâmetros de perfuração inicial e final, revestimento utilizado com diâmetro e trecho revestido, intervalo de colocação dos filtros, profundidade de instalação da bomba, intervalo de cimentação, tubo de boca, colocação de pré-filtro e laje de proteção. Também são necessários os estudos geológicos e hidrogeológicos com apresentação de dados da região e do local de instalação do poço, anotação de responsabilidade técnica (CREA) do responsável técnico pelo projeto técnico, e pela perfuração; relatório fotográfico apresentando a construção do poço (caso seja possível), a realização do teste de bombeamento e a instalação de hidrômetro ou sistema de medição de vazão ou similar e o teste de bombeamento (CERHí 2019).

Ao solicitar a posse da Outorga do uso da água, é necessária a contratação de empresa de engenharia regularizada no CREA (Conselho Regional de Engenharia e Agronomia) e capacitação técnica, para a realização do projeto de construção do poço. A captação da água subterrânea, segundo a Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT), a partir de poços, deve ser explorada seguindo às normas NBR 12212 e NBR 12444, que dizem respeito ao projeto e construção de poços. O tipo de construção, a proteção, localização e a forma da retirada da água do poço, são os requisitos a serem analisados ao se perfurar um poço (Lima 2009; de Castro 2011).

Para a captação de mananciais superficiais, recomenda-se captar a água de melhor qualidade, pois há maior risco sanitário, devido a sua maior exposição às poluições e contaminações. A tomada de água deve estar posicionada adequadamente e suas devidas medidas de proteção sanitárias implementadas. O nível da água do manancial, em termos

de quantidade e qualidade, e sua variabilidade ao longo do ano, são características que influenciam na técnica de escolha para a captação de água superficial (Heller & Pádua 2006; BRASIL 2020).

#### b) Contaminação das Fontes de Água

O conceito de One Health (Saúde Única) mostra uma visão global da saúde, constituindo uma abordagem colaborativa, multisetorial e transdisciplinar que tem como objetivos atingir resultados ideais de saúde, reforçando a relação entre animais, seres humanos e nosso meio ambiente compartilhado. A qualidade e o bem-estar de um grupo podem impactar direta e indiretamente a qualidade dos outros dois grupos. Um dos problemas mais comuns trabalhados pela One Health é a contaminação da água usada para beber e recreação que pode deixar pessoas e animais doentes (CDC 2022).

A qualidade da água superficial e subterrânea é condicionada por variáveis naturais ligadas, como o regime de chuvas, escoamento superficial, geologia e cobertura vegetal, e por impactos antropológicos, como o descarte de esgotos domésticos ou industriais, tratados ou não, e o manejo dos solos. A consequência direta da perda da qualidade da água recai não apenas na população que a consome ou está em contato direto com ela, mas põe em risco a vida de todos os seres vivos (ANA 2018; Mendonça et al. 2019).

O lançamento de esgoto em mananciais superficiais é uma importante fonte de patógenos fecais, pois muitas vezes corpos de águas receptores de esgoto sem tratamento ou sujeitos a um tratamento pouco eficiente, vão constituir mananciais de abastecimento público de água, tornando-os um risco a quem os utiliza. A razão para a contínua prática dessa poluição, parte dos pressupostos que o tratamento de água tornaria esse manancial potável, a diluição pela água solucionaria o problema da poluição e que haveria o efetivo controle dos parâmetros microbiológicos da água (Spilki et al. 2015; Mackowiak et al. 2018).

O risco de transmissão de doenças de veiculação hídrica pelo consumo de mananciais de propriedades rurais é 22 vezes maior do que o consumo de água da rede pública de abastecimento. Cerca de 65% das residências rurais captam a água em poços e nascentes, muitas vezes contaminados. As doenças relacionadas com a contaminação da água potável constituem um grande ônus para a saúde pública. O principal risco para a saúde é a ingestão de água contaminada com fezes contendo patógenos que causam

doenças infecciosas, como cólera e outras doenças diarreicas, disenterias e febres entéricas (Jacintho et al. 2005; Staggemeier et al. 2015; Senar 2019).

No meio rural, a qualidade da água é afetada principalmente pela agricultura, pecuária e atividades domésticas. As águas residuais domésticas são uma importante fonte de patógenos fecais, visto que no meio rural, a maior parte da destinação final do esgoto ocorre em fossas rudimentares, fossas sépticas, valas ou, diretamente, no solo ou em córregos, rios e lagoas, contaminando corpos d'água e aumentando os riscos de doenças de veiculação hídrica (Figura 5) (Akunna et al. 2017; Senar 2019).



Figura 5. Fontes de contaminação da água. Adaptado de Purohit et al. 2017

Poluentes advindos da agricultura surgem a partir de práticas incorretas de manejo do solo e do uso desregrado de fertilizantes e agrotóxicos. Mais da metade de todas as infecções que as pessoas podem contrair podem ser transmitidas por animais. A sucessiva contaminação do solo por resíduos orgânicos animais aumenta o risco da contaminação das fontes de águas subterrâneas, por estes serem reservatórios de diversos microrganismos que podem migrar através do solo. Dentre eles estão as bactérias, vírus entéricos e protozoários (Amaral et al. 2003; Sodré 2012; da Luz et al. 2017; CDC 2020).

O uso de fossas sépticas como destino final do esgoto, precipita o e infiltra o de aterros sanitários, além de perdas de volume no transporte ou entupimento de partes

da rede de condutos pluviais, são importantes fatores para a contaminação de aquíferos. A construção desordenada de poços artesianos ou cavados, podem não apresentar elementos de proteção sanitária, filtros ou revestimentos, servindo de aporte para contaminantes, através do escoamento superficial e paredes permeáveis (Amaral et al. 2003; Piranha & Pacheco 2004; Sodré 2012).

### 1.3 VÍRUS ENTÉRICOS: CARACTERÍSTICAS GERAIS, TRANSMISSÃO, E CONTAMINAÇÃO DO AMBIENTE AQUÁTICO

Os vírus entéricos estão entre os principais microrganismos patogênicos responsáveis por surtos de doenças de veiculação hídrica. Sua contaminação é responsável por causar doenças significativas e sua manifestação varia de infecções assintomáticas ou com sintomas leves, que podem evoluir para quadros graves ou com risco de vida. São transmitidos através da via fecal-oral, podendo ser diretamente de pessoa a pessoa, indiretamente pelo consumo de alimentos ou água contaminados e até mesmo por transmissão zoonótica (Figura 6) (Fong & Lipp 2005; Gamazo et al. 2018; Bouseettine et al. 2020; Upfold et al. 2021).

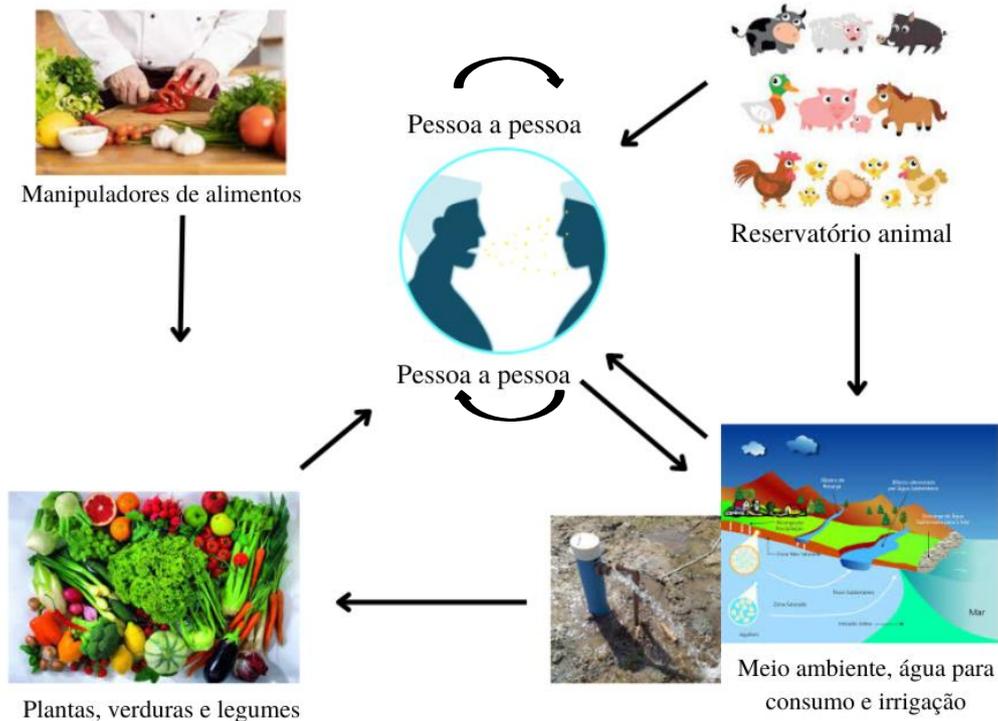


Figura 6. Fontes de transmissão de vírus entéricos. Próprio autor.

Sua característica mais significativa é possuir alta infectividade, mesmo com baixas doses infecciosas, variando de uma a dez partículas, promovendo uma elevada disseminação e transmissão. Indivíduos infectados são capazes de eliminar números extremamente elevados nas fezes, normalmente entre  $10^5$  e  $10^{12}$  partículas de vírus/grama de fezes, e ao longo de várias semanas após a infecção. Além de humanos infectados; animais e vegetais também podem excretar grandes quantidades de vírus patogênicos humanos (Fong & Lipp 2005; Tavares et al. 2005; Rodríguez-Lázaro et al. 2011; Health Canada 2019; Chen et al. 2021).

Os vírus são parasitas intracelulares obrigatórios e têm uma necessidade absoluta de células vivas para se replicarem. Logo, quando as partículas virais ficam suspensas na água, significa que a contagem viral permanecerá a mesma ou diminuirá com o tempo (Carter 2005; Fong & Lipp 2005; Pinon & Vialette 2018).

No ambiente, as partículas virais são caracterizadas por sua estabilidade fora do seu hospedeiro. A maioria dos vírus entéricos são vírus não-envelopados, fazendo com que possam suportar diferentes estresses ambientais (a depender do vírus), como ácido, calor, pressão, radiação ultravioleta (UV), além de sobreviverem em uma ampla faixa de pH e por longos períodos em baixas temperaturas. São capazes de resistir à maioria dos métodos de desinfecção utilizados no tratamento de água potável e esgoto (Gamazo et al. 2018; Bouseettine et al. 2020; Chen et al. 2021; Panizzolo et al. 2022).

Os vírus transmitidos pela via aquática estão frequentemente envolvidos em surtos de doenças gastrointestinais e hepatite aguda. Os surtos estão associados à água recreativa, à água potável e à água dos aquíferos. Estas epidemias devem-se principalmente à introdução de material fecal na água ou a um tratamento inadequado ou interrompido da água potável. Além disso, 20% a 80% dos vírus entéricos não são inativados por tratamentos de águas residuais, permitindo uma carga viral significativa no ambiente, incluindo a água do rio, água do mar e águas subterrâneas (Bouseettine et al. 2020).

São diversas as maneiras em que pode ocorrer a contaminação viral em água potável: através do sistema de esgoto não tratado ou insuficientemente tratado, do escoamento de águas pluviais poluídas e de resíduos sólidos urbanos. Os vírus são capazes de entrar no sistema de distribuição de água em diferentes fases, por exemplo, através das próprias fontes de água utilizadas para beber e no próprio sistema de tratamento, distribuição e armazenamento (Chen et al. 2021).

Os vírus entéricos são uma preocupação particular nas águas subterrâneas. Nas áreas rurais nem todos os domicílios estão ligados à rede coletora de esgoto, mas sim às fossas sépticas, de onde o esgoto pode escorrer para o solo e migrar para camadas mais profundas, atingindo lençóis freáticos. São os menores patógenos entéricos e são capazes de sobreviver por longos períodos no subsolo, pois estes locais possuem baixas temperaturas, proteção da luz solar e microbiota ausente. Pontoisoeletrico dos vírus e sua capacidade de adsorção aos sedimentos, além de outras condições favoráveis, como por exemplo seu conteúdo genético (DNA ou RNA) e proteção do capsídeo, aumentam sua sobrevivência no subsolo. No meio subterrâneo, possuem maior potencial de transporte, ao compará-los a outros patógenos de veiculação hídrica (Borchard et al. 2007; Staggemeier et al. 2015; Sorensen et al. 2021).

Quando atingem a água subterrânea, os vírus entéricos podem ser inativados, retornar à superfície junto com a água retirada de poços ou ainda ser transportados até os cursos de águas superficiais, a partir das laterais do lençol freático (Corsi et al. 2014). Os vírus quando adsorvidos aos sedimentos podem permanecer retidos, porém as forças envolvidas nessa interação vão depender das características químicas da água e do sedimento. Sua ressuspensão na água pode representar um risco potencial para a saúde humana, devido aos sedimentos atuarem como reservatórios para vírus entéricos (de Flora et al. 1975; Borchard et al. 2007; Xagorarakis et al. 2014).

No caso de vírus zoonóticos, a zona rural possui um ambiente favorável, devido à proximidade entre animais e humanos (Figura 6). De acordo com dados da CDC - One Health, a cada ano, em todo o mundo, estima-se que as zoonoses causam 2,5 bilhões de casos de doenças e 2,7 milhões de mortes. A transmissão zoonótica, pode acontecer diretamente, através do contato direto com o animal infectado, ou indiretamente, quando são consumidos alimentos provenientes de animais infectados (consumo de carne ou produtos cárneos destes animais). O poder zoonótico de alguns vírus foi demonstrado (como o vírus da hepatite E transmitido pela carne suína), e tem sido suspeitado para alguns outros vírus, como Rotavírus (Huang et al. 2016; Bouseettine et al. 2020; CDC 2020).

Existem mais de 200 vírus entéricos distribuídos na natureza e, de todos, os comumente detectados no ambiente e que foram propostos como indicadores de contaminação em ambiente aquático, incluem *Enterovirus* (EV), *Rotavirus* (RV), e *Adenovirus* (HAdV) (Barardi et al. 2012; Lin & Ganesh 2013; Bouseettine et al. 2020).

a) *Enterovirus* (EV)

Os vírus do gênero *Enterovirus* pertencem à família *Picornaviridae* e estão entre os menores vírus conhecidos. Possuem em seu genoma um RNA de fita simples (RNAs) de sentido positivo que está inserida em um capsídeo icosaédrico de 20 a 30 nm de diâmetro e não possuem envelope. É estruturado em quatro proteínas estruturais, VP-1 a VP-4, sendo a VP-1 responsável pela ligação do parasito à célula hospedeira. Já foram identificados mais de 300 tipos de EV e são classificados em 15 espécies (Figura 7). (Fong & Lipp 2005; Tavares et al. 2005; Upfold et al. 2021).

Os *Enterovirus* humanos fazem parte de doze espécies, porém apenas quatro (Enterovírus A-D), incluem vírus que infectam o trato gastrointestinal. O gênero *Enterovirus* foi inicialmente dividido por análises genômicas, antigênicas e de patogenicidade em subgrupos, tais como: Poliovírus, Coxsackievírus e Echovírus (Fong & Lipp 2005; Comerlato et al. 2010; Salvador et al. 2020; Upfold et al. 2021).

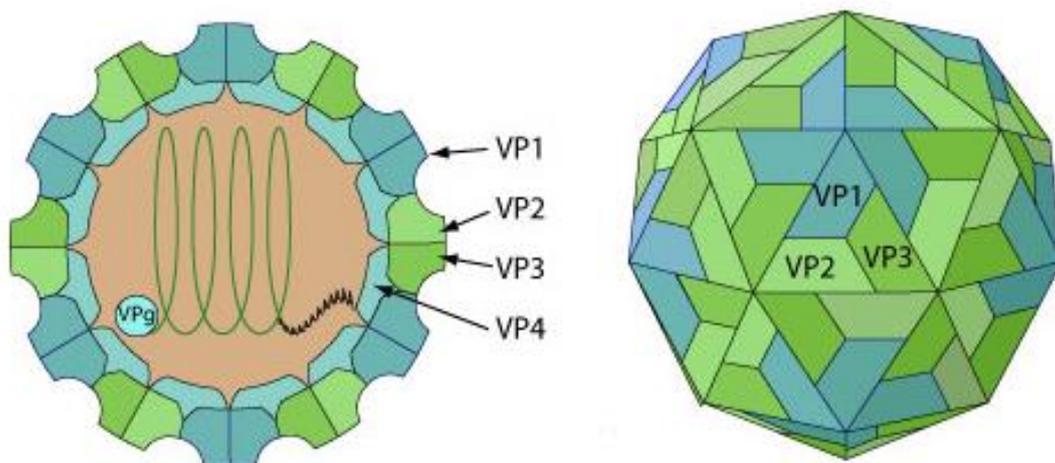


Figura 7. Esquema ilustrativo do capsídeo de Enterovírus, demonstrando as proteínas VP1 a VP4. Adaptado de Viral Zone, 2008.

Têm sido encontrados em diferentes tipos de águas subterrâneas e superficiais. São isolados em rios, esgoto, em água de poços, água marinha, água fresca, e o mais importante pelo ponto de vista epidemiológico, da água potável, após seu tratamento convencional. A presença do enterovírus é considerada pela OMS como sendo de alta severidade e possível de causar epidemias, ainda mais pelo fato de ser um frequente causador de doenças habituais ou doenças mais graves, além de apresentar alta infectividade. No ambiente, são estáveis em pH 3 a 10, e são sensíveis ao cloro e radiação UV (Wyn-Jones & Sellwood 2001; Comerlato et al. 2010).

Os enterovírus se multiplicam no trato gastrointestinal dos indivíduos infectados e são excretados em altas concentrações pelas fezes e por longos períodos (um mês ou mais). Assim, sua transmissão é principalmente pela via fecal-oral e oral-oral, mas também pode ser transmitido por contato direto com secreções oftálmicas e lesões de dermatites, além de aerossóis. Seu período de incubação pode durar entre dois e trinta e cinco dias, com uma média de sete a quatorze dias (Tavares et al. 2005; Comerlato et al. 2011; Health Canada 2019).

Embora possuam disseminação universal, vários fatores, incluindo idade, sexo e condições socioeconômicas têm efeitos previsíveis na dinâmica das infecções (da Silva et al. 2005). São mais predominantes entre pessoas de baixo nível socioeconômico, em aglomerados populacionais onde as condições de higiene e saúde são precárias (Rotbart 1995). Suas infecções têm o pico no verão e início do outono, o que coincide com a época na qual as atividades recreacionais são mais frequentes, e logo após vão diminuindo o número de indivíduos afetados (Tavares et al. 2005; Comerlato et al. 2011).

Por mais que a maioria das suas infecções sejam assintomáticas, os EVs são capazes de causar uma ampla variedade de doenças, como doença da mão, pé e boca, chamada assim pois é uma doença febril aguda com erupção maculopapular na palma das mãos e sola dos pés, com ou sem úlceras vesiculares na boca, miocardite, meningoencefalite, poliomielite e paralisia facial aguda, que tendem a ser mais graves em recém-nascidos e indivíduos imunocomprometidos. No Brasil, a doença de mão, pé e boca não é de notificação compulsória, tornando escassos os dados de circulação de genótipos e relato de agravos. Porém, os surtos da doença devem ser notificados (Fong & Lipp 2005; Comerlato et al. 2011; Tapparel et al. 2013; Mortari et al. 2018; Apostol et al. 2020; Upfold et al. 2021).

Dada a evidência de que EVs humanos podem ser comumente encontrados em outras espécies de mamíferos, é possível que EVs que circulam naturalmente em populações de animais também possam infectar populações humanas. Com múltiplos genótipos, alta taxa de mutação e recombinação frequente, os EVs têm um potencial considerável para infecção entre diferentes hospedeiros (Fieldhouse et al. 2018).

#### b) *Adenovirus* (HAdV)

Os Adenovírus humanos são da família *Adenoviridae*, e os 30% dos sorotipos que infectam seres humanos estão inclusos no gênero *Mastadenovirus*. Existem 60 sorotipos de HAdV e estão distribuídos em sete espécies (A-G), sendo sua classificação baseada no

perfil sorológico das proteínas dominantes do capsídeo. Os sorotipos 40 e 41 (espécie F) são responsáveis pelos surtos de gastroenterites, principalmente em crianças, sendo a terceira maior causa de gastroenterite na infância depois de Rotavírus e Norovírus (Carter 2005; Jiang 2006; Barardi et al. 2012; Prado & Miagostovich 2014; Wobus & Svoboda 2018; Upfold et al. 2021).

Os sorotipos B, C, D e G também podem infectar através do trato gastrointestinal, replicar-se e ser eliminados nas fezes. Todos estes sorotipos podem ser encontrados com frequência em águas contaminadas por fezes humanas (Jiang 2006; Barardi et al. 2012; Wobus & Svoboda 2018; Upfold et al. 2021).

O HAdV possui 70 a 100 nm de diâmetro, capsídeo de simetria icosaédrica, não possui envelope e confere um genoma de DNA de fita dupla (DNAfd). É formado por 11 proteínas, que são os polipeptídeos II, III, IIIa, IV, V, VI, VII, VIII, IX, X e TP. Sete dessas proteínas estão no capsídeo viral (II, III, IIIa, IV, VI, VIII e IX) e quatro estão associadas ao DNAfd, no core viral (V, VII, X, TP). Seu capsídeo é formado por 252 capsômeros, destes, 240 são do tipo hexon (polipeptídeo II) e formam as 20 faces do triângulo do icosaedro e 12 são do tipo penton (polipeptídeo III), que vão formar os vértices do icosaedro (Figura 8) (Vellinga et al. 2005; Jiang 2006; Barardi et al. 2012; Wobus & Svoboda 2018; Upfold et al. 2021).

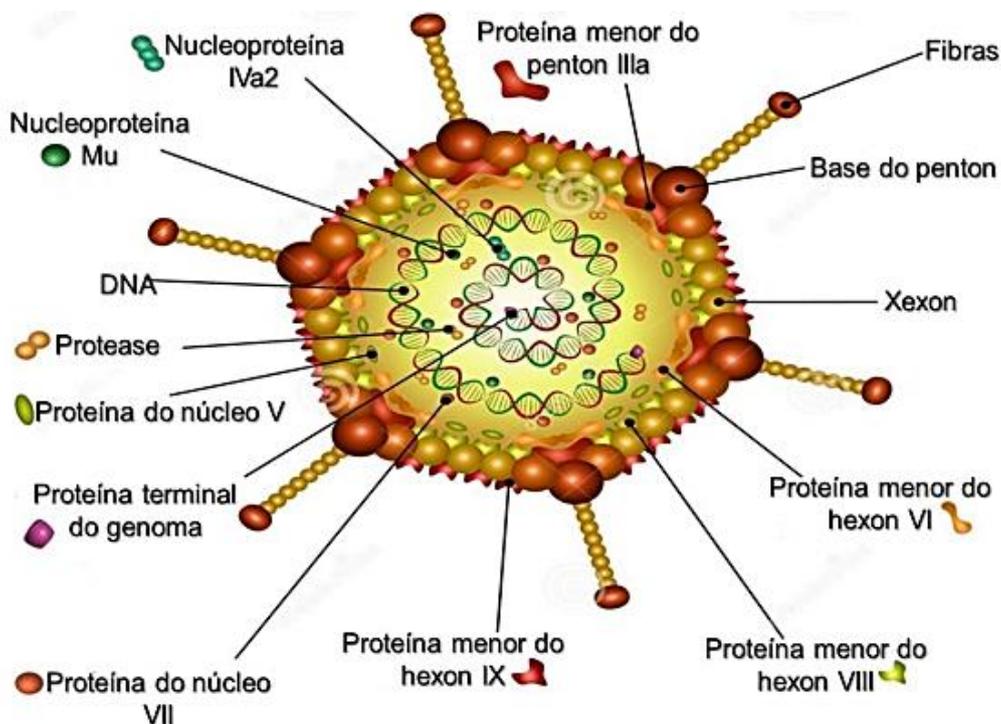


Figura 8. Representação esquemática da partícula de Adenovírus. Fonte: Dreamstime, 2017.

Nos Estados Unidos, desde 1998, o HAdV está incluído na Lista de Candidatos à Contaminação de Água Potável (CCL) da Agência de Proteção Ambiental (EPA), revelando que esses vírus estão potencialmente envolvidos em surtos de veiculação hídrica. São transmitidos por via fecal-oral de forma prolongada e descontínua e se disseminam em águas de consumo, de recreação, na forma de aerossóis, além de alimentos contaminados e fômites. O período de incubação varia de 3 a 10 dias e são considerados um dos vírus entéricos mais persistentes no ambiente. Possuem uma prevalência maior em regiões de clima temperado, entretanto, no Brasil e em outros países de clima tropical, o adenovírus veiculado pela água, tem sido detectado durante todos os meses do ano (Fong & Lipp 2005; Tavares et al. 2005; Bosch 2007; Barardi et al. 2012; Silva 2018; Girardi et al. 2019).

Possuem tropismo para variadas células e podem infectar várias mucosas, causando múltiplas doenças, como no trato gastrointestinal (gastroenterites), respiratório (faringite, pneumonia e doença respiratória aguda), geniturinário (uretrite e cistite) e superfícies oculares (conjuntivite). Em menor frequência podem infectar o fígado, pâncreas, miocárdio e o sistema nervoso central. Sua infecção é mais incidentes em crianças nas faixas etárias de 0 a 4 anos e insignificantes em adultos saudáveis (Carter 2005; Fong & Lipp 2005; Prado & Miagostovich 2014).

#### c) *Rotavirus (RV)*

Os vírus do gênero Rotavírus pertencem à família *Sedoreoviridae*, e apresentam um diâmetro de aproximadamente 70 a 100 nm. O genoma viral é constituído de 11 segmentos de RNA de fita dupla (RNAfd) e cada um desses segmentos codifica uma proteína viral específica, sendo seis dessas estruturais, chamadas de viral protein (VP) – VP1, VP2, VP3, VP4, VP6 e VP7 e seis não estruturais, as non structural protein (NSP) – NSP1, NSP2, NSP3, NSP4, NSP5 e NSP6. Possui um capsídeo com simetria icosaédrica, que é formado por três camadas de proteínas: capsídeo interno (core), onde está localizado seu genoma, formado pelas proteínas VP1, VP2 e VP3, a camada intermediária, formada pelo VP6, e a camada externa, que é formada pelo VP7 e VP4 (Figura 9) (Carter 2005; Barardi et al. 2012; Santos & Soares 2015; Upfold et al. 2021).

A partir de suas diferenças antigênicas e das diferenças da sequência da proteína do capsídeo VP6, os RVs são classificados em dez espécies (A-J), cujas espécies A, B, C e H causam infecções no ser humano. O grupo A (RVA) é a causa predominante de gastroenterite por RV e é ainda classificado em genótipos 32 G e 47 P com base nas

diferentes sequências que codificam as proteínas do capsídeo exposto à superfície VP7 (antígeno G) e VP4 (antígeno P), respectivamente. Várias combinações G e P foram identificadas, no entanto, os genótipos G1P (8), G2P (4), G3P (8), G4P (8), G9P (8) e G12P(8) são mais comumente detectados em todo o mundo (Figura 9) (Iturriza-Gomara et al. 2004; Carter 2005; Barardi et al. 2012; Upfold et al. 2021).

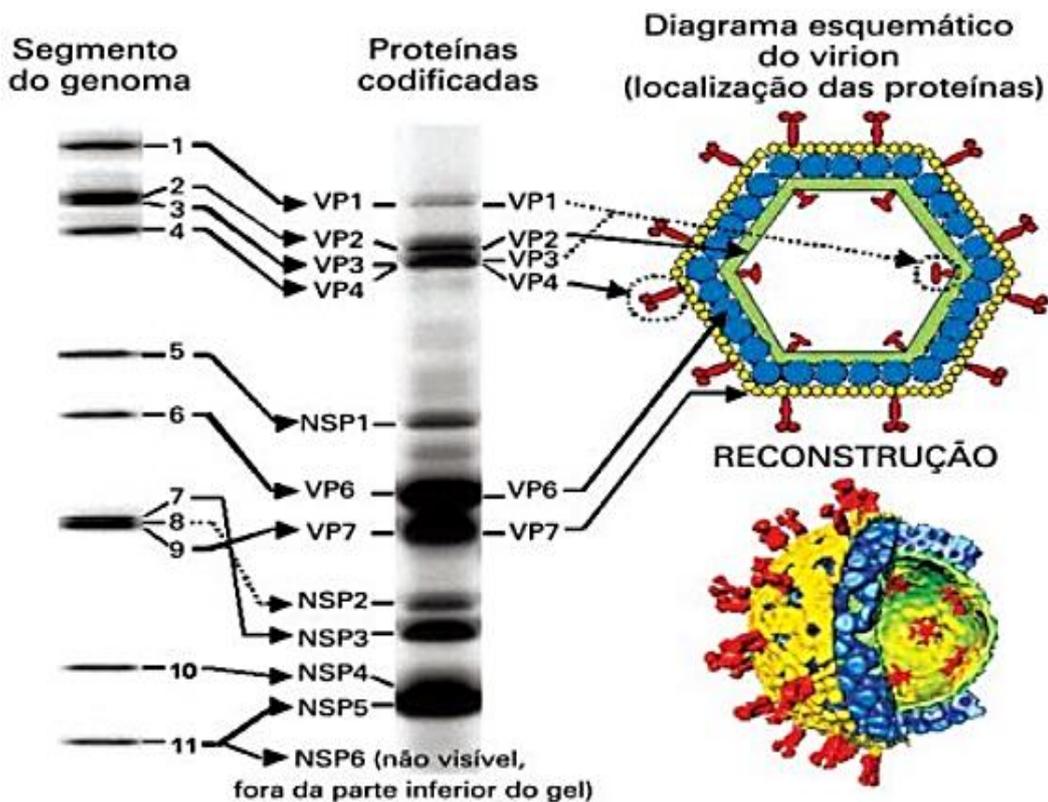


Figura 9. Representação esquemática da estrutura da partícula de Rotavírus. Fonte: Mossel et al. 2016.

Globalmente, é uma das principais causas de gastroenterite viral grave na população pediátrica, entre crianças menores que cinco anos, sendo 600.000 crianças atingidas anualmente em todo o mundo, causando uma proporção significativa de mortes (29,3% em 2015). É transmitido por via fecal-oral e os pacientes contaminados excretam os vírus em altas concentrações nas fezes. Contaminam a água ou alimentos e também são transmitidos por contato pessoa a pessoa e através de objetos. Os RVs demonstram grande resistência aos fatores ambientais e aos tratamentos físico-químicos utilizados para o tratamento de água para abastecimento e o tratamento de esgoto (Meng et al. 1987; Estes & Kapikian 2007; Barardi et al. 2012; Upfold et al. 2021).

Surtos por RV são relacionados a indivíduos que habitam e frequentam comunidades fechadas como creches, escolas, casas de repouso e hospitais, servindo como locais de infecção. Alguns indivíduos apresentam sintomatologia leve mas, em outros, a infecção pode se tornar grave, levando à desidratação e até mesmo à morte. Os principais sintomas são febre, vômito e diarreia frequentes (Carter 2005; Barardi et al. 2012). A introdução de vacinas contra o Rotavírus conseguiu reduzir significativamente o número de casos de gastroenterites com diarreia e mortes em alguns países da América Latina, América do Norte, Europa e na Austrália, sendo o Brasil um dos pioneiros na introdução da vacina RV-A em seu Programa Nacional de Imunização (PNI) (Barardi et al. 2012).

#### 1.4 EPIDEMIOLOGIA DAS DOENÇAS DE VEICULAÇÃO HÍDRICA

A água segura e facilmente disponível é importante para a saúde pública. É capaz de fornecer diversas aplicações econômicas, sendo ela matéria prima em indústrias, na agricultura, insumos, uso doméstico, práticas de esporte, lazer e geração de energia. A gestão inadequada de águas residuais urbanas, rurais, industriais e agrícolas significa que a água potável de centenas de milhões de pessoas está perigosamente contaminada ou quimicamente poluída (de Andrade & de Barros 2019; OMS 2019).

A insuficiência de saneamento e tratamento de água, ou mesmo a sua vulnerabilidade em estrutura, eficiência e qualidade, pode causar um quadro de tragédia com aumento atípico de doenças, principalmente as de origem hídrica, tendo como exemplo, a diarreia, que é responsável por aproximadamente 1,4 milhões de mortes anuais em todo o mundo. Os patógenos entéricos causadores de doenças hídricas podem estar nas águas por meio de entradas de esgoto bruto e tratado, defecação a céu aberto, escoamento em terra e por lançamento de resíduos (Boehm et al. 2019; Ferreira et al. 2021).

É visto que cada dispensa por doenças como diarreia ou vômito apresenta uma perda de produtividade média maior que três dias úteis (no total, foram quase 50 milhões de dias de trabalho ou R\$870 milhões, de custo de horas não trabalhadas, em 2013). Outros dados levantados em 2013, mostram que a diarreia e vômito causaram 14 milhões de casos de baixa por doença, dos quais 340 mil casos foram internados no hospital (cerca de R\$ 121 milhões para o sistema nacional de saúde). Dessa maneira é fácil concluir que o tratamento da água e as melhores condições de saneamento previnem efetivamente a proliferação de doenças de veiculação hídrica (Ferreira et al. 2021).

Tem-se que 17 a 25% da população mundial não tenha acesso a água potável, e que ambientes aquáticos contaminados são responsáveis por causarem 88% das mortes por diarreia (Haramoto et al. 2011). Conforme a Organização Mundial da Saúde (OMS), globalmente, existem cerca de 1,7 bilhão de casos de doenças diarreicas que ocorrem na infância (menores de 5 anos de idade) a cada ano, o que resulta em uma estimativa de 525.000 mortes de crianças por ano (Jagai & Naumova 2018). As doenças de transmissão fecal-oral foram responsáveis por mais de três quartos das internações hospitalares causadas por serviços de água e saneamento inadequado na primeira década do século 21 (Ferreira et al. 2021).

No Brasil, entre os anos de 2000 e 2010, ocorreram 22.933 mortes de crianças menores de 5 anos em consequência das doenças diarreicas (80,3% em menores de 1 ano) e 1.209.622 internações (62,6% entre 1 e 4 anos). Em 2009, os índices de mortalidade causados por doença diarreica, na faixa etária entre as crianças menores de 1 ano, foram classificados em microrregiões. Os maiores índices de mortalidade estavam localizados nas Regiões Norte e Nordeste, que mostraram, respectivamente, cinco e quatro vezes mais óbitos que na Região Sul (Müller et al. 2017).

De acordo com o Ministério da Saúde, no período 2006 a 2009 no Brasil, o Rotavírus teve uma representatividade de 30% do total de casos de doenças diarreicas agudas (DDAs) em relação aos outros vírus entéricos. Entre as regiões do país, a prevalência da causa de DDAs por Rotavírus foi de 35% dos casos na Região Norte, 26% dos casos na Região Nordeste e 21%, 17% e 20% dos casos de DDAs nas regiões Centro-oeste, Sudeste e Sul, respectivamente (BRASIL 2009).

Os Rotavírus humanos demonstram um padrão sazonal que é uma particularidade para sua epidemiologia. A dificuldade em encontrar uma associação entre a doença por rotavírus e fatores climáticos, geográficos, econômicos ou comportamentais está relacionada ao fato de que a maioria das atividades e condições humanas está intrinsecamente ligada ou afetada pelo clima. Outro aspecto desafiador das explicações das descobertas de um padrão sazonal do rotavírus é que, os estudos feitos que pesquisavam a prevalência de rotavírus eram bastante limitados em muitas regiões do mundo e o desenho dos estudos eram amplamente variáveis, além de diferentes usos de ensaios laboratoriais e relatórios de dados (Patel et al. 2014).

Sua infecção em climas temperados ocorre nos meses mais frios e secos do ano (outono e inverno) e, a infecção em climas tropicais, acontece distribuída da mesma forma ao longo do ano. No Brasil, cada região demonstra um tipo de variedade sazonal. Nos

Estados das regiões Centro-Oeste, Sul e Sudeste acontece o aumento de incidência entre os meses de maio a setembro (período mais frio e seco) e no Norte e Nordeste do país, os episódios de RV se distribuem de maneira uniforme durante o ano todo (Costa et al. 2016; Luchs & Timenetsky 2016).

O sistema de vigilância em unidades sentinelas de doenças de transmissão hídrica ou alimentar inclui os agravos: Rotavírus, Doença Diarreica Aguda (DDA) e Síndrome Hemolítica Urêmica. Em Goiás, a Vigilância Epidemiológica Ampliada para *Rotavirus* foi implantada no ano de 2007, criando cinco Unidades Sentinelas para Rotavírus. Atualmente, no Estado, estão em funcionamento duas Unidades Sentinelas, que são: Hospital Materno Infantil de Goiânia (HMI) e Centro Municipal de Saúde Dr. Serafim de Carvalho (SESGO 2014).

Em 2010 no Estado de Goiás, houve um surto de rotavírus, atingindo 24 municípios, com 207 casos notificados, 124 confirmados laboratorialmente e um óbito, registrado no município de Goiânia. Em 2011, foram notificados 60 casos suspeitos e nenhum confirmado no SINAN. Recomendada como prioridade pela OMS em 2013, a vacinação contra o Rotavírus, levou à diminuição dos casos de mortalidade em crianças, porém ainda é estimado que as rotavirose são capazes de causar mais de 200 mil mortes por ano de pessoas de todas as idades (SESGO 2014; Arakaki et al. 2021).

Quando baseada nas manifestações clínicas, a infecção por gastroenterite adenoviral não é facilmente distinguível de outras gastroenterites e é menos prevalente que as infecções por rotavírus. O pico da ocorrência da infecção pelo HAdV ocorre em lactentes e crianças entre 6 meses e 5 anos de idade. Aos 5 anos, 70% a 80% das crianças têm anticorpos neutralizantes para HAdV 1 e, 50% para HAdV tipo 5. São a causa de 2% a 15% das doenças diarreicas agudas em crianças, ocorrendo frequentemente em crianças menores que 4 anos. Possuem uma predileção na população pediátrica, pois as crianças passam a maior parte dos seus dias em ambientes fechados, como orfanatos, creches e escolas. Sua transmissão e doença clínica associadas podem ser esporádicas ou epidêmicas, sendo o padrão correlacionado com o tipo de HAdV e idade da população que está sujeita a infecção (Shieh 2022).

## 1.5 DETECÇÃO DOS VÍRUS ENTÉRICOS

A cultura celular foi o método mais empregado para detectar e isolar vírus entéricos infecciosos, nas primeiras pesquisas sobre a ocorrência dos vírus em ambiente aquático. Métodos como fixação de complemento, ensaio imunoenzimático e

radioimunoensaio, também eram utilizados para detecção viral nas amostras clínicas, porém eram caros e não possuíam sensibilidade para detectá-los em amostras de água (Fong & Lipp 2005). Técnicas desenvolvidas em biologia molecular possibilitaram o crescimento da Virologia Ambiental, pelo fato de a reação em cadeia da polimerase (PCR) ser uma técnica mais rápida, barata, e mais específica que o método de detecção por cultura de células (Haramoto et al. 2005).

O desenvolvimento de técnicas, como a PCR em tempo real (qPCR), proporcionam a detecção e quantificação, ciclo a ciclo, da intensidade de fluorescência emitida devido à amplificação da sequência de DNA-alvo em uma amostra, realizada *in vitro*, com elevada especificidade e sensibilidade. O método é fundamentado em um ciclo térmico, que envolve a desnaturação do DNA molde, ligação de oligonucleotídeos (ou iniciadores) e extensão da cadeia através da DNA polimerase. A escolha certa da sequência dos oligonucleotídeos é muito importante para o sucesso da técnica (Nascimento et al. 2010; Tajadini et al. 2013; Coelho 2020).

Logo após a coleta das amostras de água, para a realização da análise utilizando a qPCR são necessárias etapas prévias de processamento das amostras: concentração do vírus (filtração, centrifugação etc) e extração do material genético. Após a extração dos ácidos nucleicos, este é colocado junto a uma mistura com uma solução tampão e outros componentes, que permitem um ambiente químico adequado para a reação e estabilidade da DNA polimerase. Em seguida, o ácido nucleico será amplificado quando a mistura for colocada em um termociclador, que faz ciclos de temperaturas pré-definidos (Coelho 2020).

O material genético será amplificado por meio de três passos fundamentais. Primeiro ocorre a desnaturação daquele DNA na amostra, que por meio da ação do calor, separa as ligações de hidrogênio entre as bases complementares. Nesta etapa a enzima DNA polimerase é ativada para a replicação. O segundo passo é o emparelhamento dos oligonucleotídeos por meio de ligações de hidrogênio ao DNA alvo de cadeia simples. Quando estes iniciadores possuem baixa especificidade existe maior probabilidade de ligações indesejáveis em locais inespecíficos do DNA molde. E o último passo, a extensão da fita (Figura 10) (Coelho 2020).

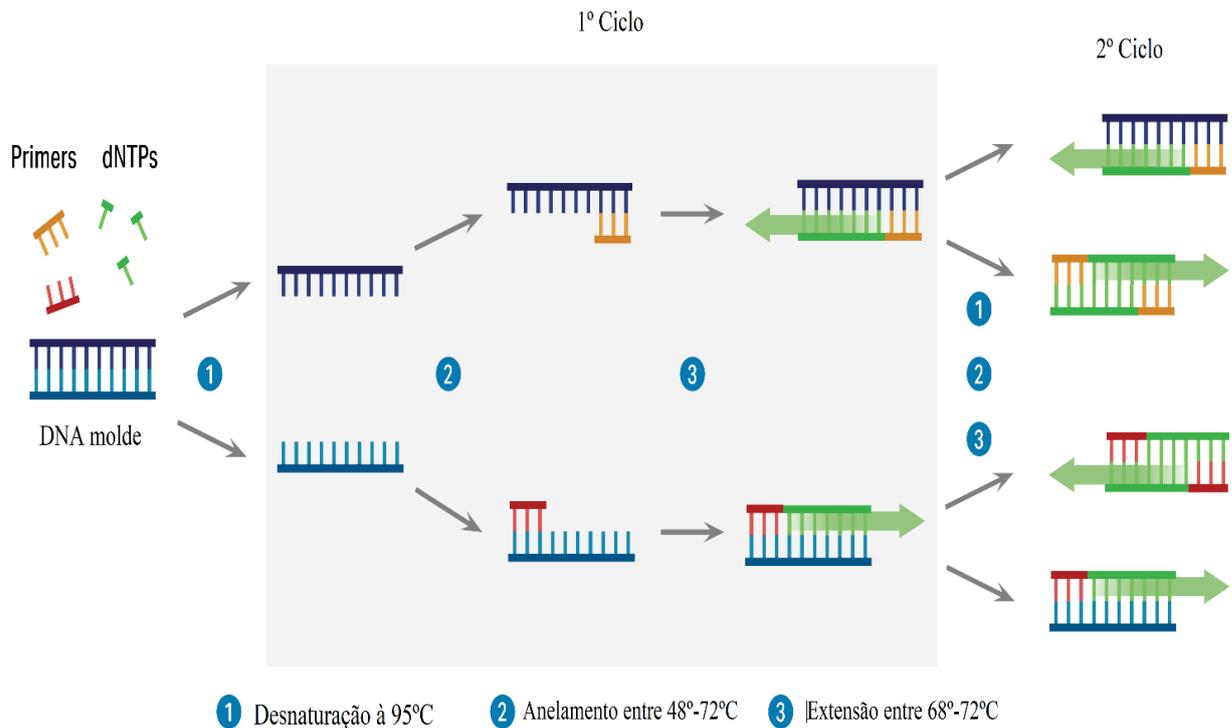


Figura 10. Amplificação por qPCR. Adaptado de ATT Bioquest©.

São diversas as especificações comercialmente existentes para os instrumentos disponíveis para realização da qPCR, sendo eles, diferentes formatos de sondas de ácidos nucleicos aplicáveis, comprimentos de onda de excitação e detecção de fluoróforos específicos, o número máximo de amostras por corrida, volumes de reação e tempos de termociclagem. Em relação aos reagentes de amplificação, há dois sistemas precursores, *SybrGreen*® e *TaqMan*® (Figura 11) (Nascimento et al. 2010; Tajadini et al. 2013).

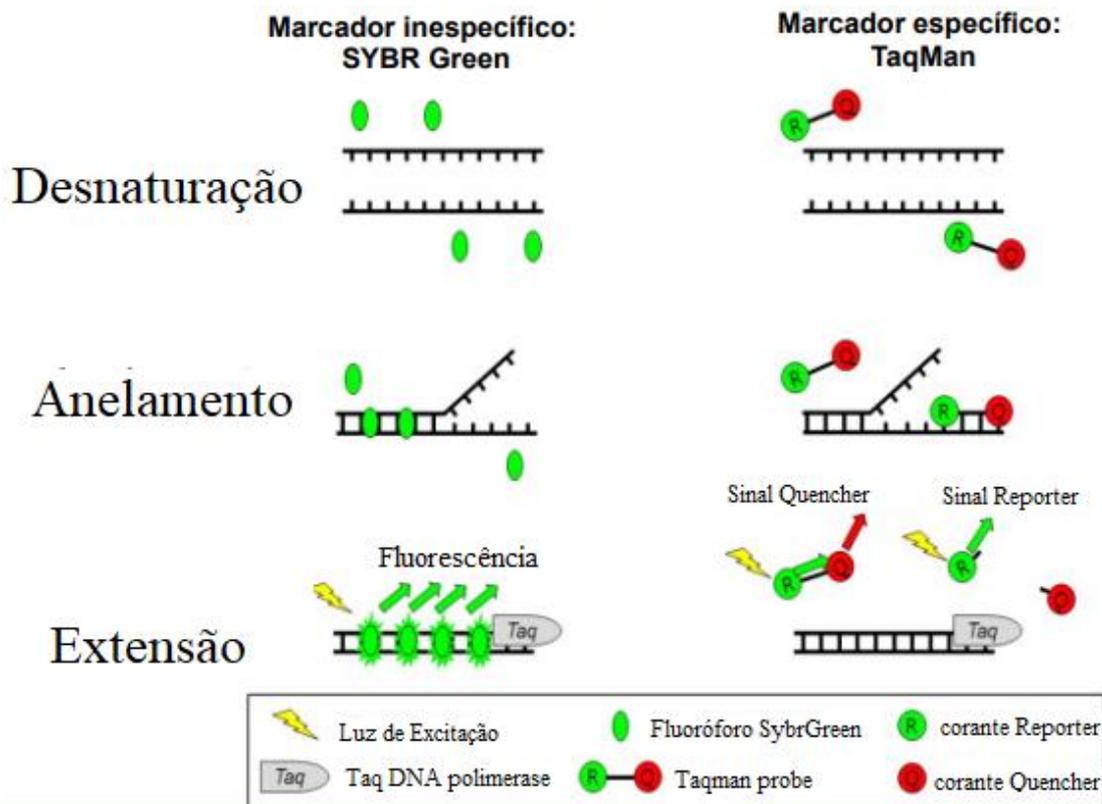


Figura 11. Diagramas esquemáticos dos ensaios *SybrGreen*® e *TaqMan*® durante procedimentos de qPCR. Adaptado de Cao et al. 2020.

*SybrGreen*® é um corante que emite fluorescência por possuir uma ligação altamente específica quando se liga ao DNAfd, detectando o produto da PCR conforme se acumula na reação. As sondas *TaqMan*®, são sondas de hidrólise de oligonucleotídeos de DNA duplamente marcados com fluoróforos específicos da sequência-alvo, proporcionando um desempenho alternativa para o problema da especificidade. Cada um destes sistemas apresenta vantagens e desvantagens (Nascimento et al. 2010; Tajadini et al. 2013).

## 1.6 VÍRUS X BACTÉRIAS INDICADORAS DE CONTAMINAÇÃO

Para se ter um microrganismo indicador de contaminação fecal ideal, ele deve estar associado a uma fonte de patógenos e ser ausente em áreas não poluídas, estar presentes nas fezes de humanos e animais em grande número, não crescer em águas naturais ou nos sistemas de distribuição, deve ocorrer em densidades mais elevadas do que os patógenos e ser detectado por procedimentos simples, rápidos e baratos. Além disso, deve possuir a mesma resistência à inativação natural e artificial do que patógenos e principalmente não ser patogênico (Bosch 1998; Lin & Ganesh 2013).

Para a análise ou o monitoramento da qualidade da água potável, são utilizados indicadores biológicos específicos. Os organismos indicadores comumente usados são coliformes totais e/ou *Escherichia coli* (Lin & Ganesh 2013). A Legislação Brasileira dispõe sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade, que define que a água potável deve ser ausente de coliformes totais e/ou *E. coli* a cada 100 mL de amostras analisadas (BRASIL 2017). A legislação também recomendava a inclusão do monitoramento de vírus entéricos nos pontos de captação de água provenientes de mananciais superficiais de abastecimento. No entanto, a nova Portaria GM/MS nº 888 de 4 de maio de 2021, que altera o Anexo XX da Portaria de Consolidação nº 5, retirou a recomendação (BRASIL 2017; BRASIL 2021).

Apesar da presença de *E. coli* ser considerada um indicador adequado e específico de poluição fecal e os coliformes totais terem um padrão de sobrevivência semelhante ao de patógenos bacterianos, nem sempre indicam a presença de outros patógenos no ambiente, sendo, portanto, a detecção de vírus no ambiente recomendada, pois as bactérias indicadoras, normalmente utilizadas para esta finalidade, nem sempre podem ser relacionadas com a presença dos vírus, que também são mais persistentes e estáveis do que bactérias (Rigotto et al. 2010; Lin & Ganesh 2013).

Muitas vezes há a falta de correlação entre os indicadores bacterianos e vírus em amostras de água, já que os testes podem reproduzir resultados falsos-positivos e falsos-negativos, seja quando o indicador bacteriano está presente na água e o vírus ausente ou vice-versa. Ao contrário dos indicadores bacterianos utilizados, a maioria dos vírus entéricos são específicos do hospedeiro, se reproduzindo somente em células vivas, sendo assim capazes de rastrear a fonte primária de contaminação fecal em um determinado ambiente e não fazem parte da microbiota natural. A persistência da infectividade dos vírus e sua alta concentração quando são excretados pelas fezes, entre outras características como possuem maior resistência a fatores ambientais, como pH, variações de temperatura e salinidade, impossibilita a utilização do perfil bacteriológico na avaliação da presença viral na água. Os vírus também resistem a processos físicos e químicos no tratamento de água, ao contrário dos indicadores bacterianos convencionais (Bosch 1998; Faccin-Galhardi et al. 2013; Lin & Ganesh 2013; Staggemeier et al. 2015; Pachepsky et al. 2016).

O grupo de vírus selecionados para serem indicadores de poluição fecal na água, deve seguir à maioria das seguintes características: a) ter alta circulação na população

e/ou estabelecer um modelo de infecção persistente no hospedeiro (permitindo a detecção do vírus durante todo o ano); b) ser excretado por um hospedeiro específico (para caracterizar a fonte de contaminação do meio aquático); c) informar a presença de vírus infectante; d) demonstrar a presença de outros vírus patogênicos humanos em níveis em que o risco de doença pode ocorrer (Masachessi et al. 2020).

Desse modo, o monitoramento da água de consumo com contaminantes fecais constitui uma importante medida de prevenção às doenças que afetam a saúde pública. Logo, além dos indicadores bacterianos comuns, os Adenovírus, Enterovírus e Rotavírus são importantes patógenos de veiculação hídrica, que também podem ser usados como indicadores de contaminação. São detectados em diversos tipos de fontes de água para consumo em todo mundo e pertencem à Lista Cinco de Contaminantes Candidatos da Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos, que compreende contaminantes que não estão regularizados como critério de análise, mas que apresentam grande prevalência em águas contaminadas por resíduos fecais (Rigotto et al. 2010; La Rosa et al. 2012; Girardi et al. 2019; Upfold et al. 2021).

## 1.7 OPÇÕES ALTERNATIVAS PARA O TRATAMENTO DE ÁGUA NAS COMUNIDADES RURAIS E REMOÇÃO DOS VÍRUS ENTÉRICOS NA ÁGUA

Segundo o Artigo 24, do Anexo XX da Portaria de Consolidação nº5/GM/MS, 2017, toda água para consumo humano, fornecida coletivamente, deverá passar por processo de desinfecção ou cloração, e as águas provenientes de manancial superficial devem ser submetidas ao processo de filtração, antes da desinfecção. Porém, somente cerca de 84,1% dos brasileiros consomem água tratada (BRASIL 2017; SNIS 2021).

De acordo com a Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (USEPA), os vírus entéricos transmitidos pela água têm sido considerados significantes poluentes emergentes. Como os vírus entéricos são transmitidos pela via fecal-oral, o tratamento da água deve impedir a liberação de vírus na água potável (Xagorarakis et al. 2014; Ibrahim et al. 2021). As fontes de água que serão utilizadas como água potável, para garantir sua qualidade, devem ser obtidas de locais afastados de possíveis contaminações. O tratamento convencional é composto pelo tratamento da água bruta a partir do processo de aplicação de coagulantes na etapa de mistura rápida, seguindo de uma etapa de mistura lenta, para a formação de flocos mais densos, para consecutiva sedimentação (Di Bernardo & Paz 2008; dos Santos et al. 2021).

Após esta etapa, a água seguirá para uma unidade de filtração descendente com material filtrado de granulometria apropriada e por fim passará pelo processo de desinfecção, realizado com a adição do cloro. Seu principal benefício está na eficiência da eliminação de possíveis patógenos, além da remoção da turbidez e cor que estão presentes na água de consumo. No entanto, torna-se inviável para pequenas comunidades, pois apresenta elevado custo para implantação, sendo necessário o desenvolvimento de tecnologias alternativas, de baixo custo e fácil operação, que irão disponibilizar água potável para a população (Di Bernardo & Paz 2008; Paterniani 2017; dos Santos et al. 2021).

O tamanho dos vírus é de grande importância ao considerar sua remoção no tratamento da água. O tamanho reduzido dos vírus (na ordem de nanômetros), fazem com que consigam atravessar pela técnica de filtração, e são capazes de se adsorverem às partículas suspensas, se comportando como partículas maiores, devido a sua área de superfície muito alta em relação ao seu volume, além de uma carga negativa (que está associada ao ponto isoelétrico do vírus), que dependem da cepa e do tipo do vírus. Logo, a eficiência das etapas de coagulação, sedimentação e filtração, será importante para a remoção dos vírus. A associação dos vírus às partículas auxilia na sua remoção, inibindo, porém, a sua desinfecção, sendo que o efeito contrário ocorre para os vírus livres. No entanto, a desinfecção permanece como a barreira final para os vírus (Springthorpe & Sattar 2007; Ghernaout 2020).

A filtração lenta, por ter simples construção, operação e manutenção, é ideal para pequenas comunidades ou regiões com poucos recursos técnicos e financeiros. É um dos primeiros sistemas de tratamento de água a serem utilizados. Além de produzir menos quantidade de lodo, que pode ser utilizado na agricultura. Não necessita do uso de coagulantes ou qualquer tipo de produto químico, além de não precisar de mão de obra qualificada para sua operação (Paterniani 2017).

A utilização de métodos como, o método de desinfecção solar (SODIS) e de pasteurização solar (SOPAS) são alternativas viáveis e sustentáveis que usam a radiação solar para o tratamento microbiológico da água. O SODIS consiste na exposição da água em garrafas transparentes, onde a luz solar possa atravessá-las, por um período de seis horas. Neste método a ação dos raios ultravioletas (UV-A), atuam como desinfetante na inativação microbiana e eliminação de microrganismos através do aquecimento de água a partir da radiação infravermelha (ondas acima de 700 nm). Já a pasteurização solar (SOPAS) é um método onde a água é mantida em uma temperatura de 60° a 70°C, por

mais de uma hora. Não é necessário neste modelo a fervura da água, reduzindo o consumo de energia durante o tratamento e possibilitando a utilização da energia solar no processo (Cerqueira et al. 2019; dos Santos et al. 2021). O capsídeo viral, ácidos nucleicos e enzimas responsáveis pela replicação dos vírus são danificados quando presentes em altas temperaturas, impedindo a adsorção do vírus ao seu hospedeiro (Fong & Lipp 2005).

Outro sistema que pode ser utilizado em comunidades rurais é a filtração em múltiplas etapas (FIME). Este sistema propicia água filtrada com baixa turbidez e sem a presença de impurezas e microrganismos patogênicos, pois seu funcionamento é dividido em etapas com remoção gradativa de impurezas e atenuação de picos de concentração de sólidos suspensos. Possui tecnologia de simples construção e baixo custo de instalação (Franco 2010).

Entre as técnicas alternativas para desinfecção da água, tem-se o Clorador Embrapa. É um aparelho muito simples, barato e de fácil instalação para clorar a água do reservatório (caixas d'água) das residências rurais. A cloração ainda é a tecnologia mais barata e não necessita de manutenção ou treinamento especializado para a aplicação. Indica-se utilizar o cloro granulado, do tipo hipoclorito de cálcio 65%. O aparelho pode ser montado pelo próprio usuário, devendo ser instalado entre a entrada de captação de água e o reservatório da residência. Possui efeito comprovado na eliminação de microrganismos e não afeta o sabor da água (Silva 2014).

O processo de cloração também é responsável pela inativação viral (torna os vírus não-infecciosos para o hospedeiro, mesmo se estiverem presentes na água tratada). Indica-se a cloração, pois o cloro vai atuar na oxidação de materiais celulares do microrganismo alvo. O tempo de contato e a dose do cloro são essenciais para a remoção do vírus. Quanto maior a dose e o tempo, maior a eficácia na remoção. Concentrações de 3,75 a 6,26 mg/l, normalmente utilizados para tratar água potável, são eficazes na inativação de poliovírus, rotavírus e bacteriófago F2 (Faccin-Galhardi et al. 2013; Xagorarakis et al. 2014).

A utilização da radiação ultravioleta (UV) surgiu por volta do século 20 e, devido à cloração possuir custo menor, inviabilizou o seu uso. É possível ser utilizado em comunidades rurais, por ser um processo que não necessita de armazenamento de produtos tóxicos, perigosos ou corrosivos, manipulação e transporte. Possui eficiência na inativação de microrganismos, não há efeito residual danoso ao homem, é de fácil operação e requer menores tempos de contato, quando comparada a outros desinfetantes. Seu custo é em função do modelo de reator adotado, lâmpadas a serem utilizadas,

capacidade de tratamento, consumo de energia, produtos químicos utilizados na limpeza das lâmpadas, reparos em equipamentos e substituição de lâmpadas e reatores (Follmann et al. 2018).

A desinfecção viral através da luz UV depende do tipo de lâmpada UV. Lâmpadas com pressão média atingem inativações maiores quando comparadas às lâmpadas de baixa pressão com a mesma intensidade. A irradiação UV penetra nas estruturas celulares, danifica o material genético e interfere na reprodução celular. O adenovírus humano é bastante resistente à inativação por luz UV, porém altas doses podem aumentar sua inativação (Xagorarakis et al. 2014).

A FUNASA, com a finalidade de proporcionar um tratamento de água simplificado, desenvolveu o SALTA-z (Solução Alternativa de Tratamento de Água, o z refere-se a zeólita, o mineral-chave da proposta). É um sistema que simplifica todas as etapas do tratamento convencional. Ela se difere de outros modelos ao utilizar a zeólita como meio filtrante. A zeólita é um mineral natural proveniente de cinzas vulcânicas, com poros menores que dois nanômetros de diâmetro, tornando-a totalmente adsorvente. Quando os vírus são atraídos até elas, se aderem em sua superfície. Sua utilização permite a remoção de ferro, manganês e outros metais pesados, amônia, cloroaminas, matéria orgânica, proteína e lipídios (CNM 2019).

Considera-se que a saúde não se define somente pela ausência de doença, mas, tem como fatores determinantes e condicionantes: a moradia, o transporte, a educação, o meio ambiente, a alimentação, o trabalho, o lazer, o acesso a bens e serviços essenciais, além do saneamento básico. A saúde dos indivíduos depende das ações setoriais, com destaque no saneamento e no meio ambiente, sendo necessária a obrigatoriedade do Estado em exercer essas condições ao público (BRASIL 2015; de Andrade & de Barros 2019).

Segundo a Organização das Nações Unidas (ONU), um total de 4,5 bilhões de pessoas no mundo, não possuem saneamento básico seguro, e uma a cada três pessoas não têm acesso à água potável em suas casas, deixando um total de 2,2 bilhões de pessoas sem água tratada (ONU 2017; dos Santos 2021). Essa situação tornou-se tão alarmante que em 2015 os Estados-membros da ONU adotaram os 17 Objetivos de Desenvolvimento Sustentável (ODS), que devem ser cumpridos até 2030, como um projeto para tentar tornar o mundo mais justo. Os ODS são um apelo global a ações para acabar com a pobreza, proteger o meio ambiente e o clima. Em particular a ODS número seis busca assegurar a disponibilidade e gestão sustentável da água e saneamento para todos. Seu principal objetivo é que, até 2030, deve ser alcançado o acesso universal e equitativo a água potável e segura para todos (BRASIL 2020; Taing et al. 2021).

Devido ao rápido crescimento populacional, urbanização e pressão crescente da agricultura, indústria e setor de energia, a demanda por água cresce cada vez mais. Má gestão e extração excessiva, uso indevido e contaminação de água doce e subterrânea aumentam o estresse hídrico e danificam os ecossistemas relacionados à água. A proporção da população mundial que usa serviços de água potável gerenciados com segurança aumentou de 70% em 2015 para 74% em 2020. É necessária uma ação urgente para mudar a tendência atual e no ritmo atual de progresso, caso o contrário, a cobertura para água potável alcançará 81% até 2030, não cumprindo a meta e deixando 1,6 bilhão de pessoas sem abastecimento de água potável administrado com segurança (SDG 2022).

As áreas rurais brasileiras, continuam sendo as mais prejudicadas em termos de infraestrutura e saneamento básico. Apenas 64,6% possuem em suas residências alguma rede de abastecimento de água adequada conectadas às suas casas e 67,2% da população rural capta água de chafarizes e poços, sendo eles protegidos ou não, em cursos de água que não dispõem de tratamento, e em outras fontes geralmente insalubres. Em relação ao

acesso a esgotamento sanitário, 66,5% dos domicílios rurais tem como escoadouro das fossas rudimentares, as valas e corpos hídricos e somente 5,2% possuem rede coletora de esgoto. (IBGE 2010; FUNASA 2011).

Nestas comunidades, o conceito de One Health (Saúde única), uma abordagem nova e com o objetivo de alcançar resultados de saúde ideais para todos, através da integração e equilíbrio da saúde humana, saúde animal e a saúde ambiental, pode enfrentar problemas como: vazamento de fossas sépticas, aplicação no solo de bio sólidos derivados de águas residuais humanas não tratadas e águas superficiais o escoamento de estrume espalhado e utilizado como adubo durante a produção agrícola, e fontes de água mal ou totalmente desprotegidas. Tudo isso pode estar contribuindo para a contaminação da água com vírus entéricos, afetando os indivíduos e animais que consomem destas fontes, além da poluição do meio ambiente com estes patógenos (Bofill-Mas et al. 2013; Fornari et al. 2020; Pang et al. 2021).

Goiás possui 90,3% da sua população em áreas urbanas e 9,7%, em rurais (Lopes & da Silva, 2013), entre as comunidades rurais temos os Assentamentos, Quilombolas e Ribeirinhas, onde 115 destas comunidades são acompanhadas pelo projeto SanRural - Saneamento e Saúde Ambiental em Comunidades Rurais e Tradicionais de Goiás, para promover conhecimento acerca das condições de saneamento e saúde ambiental em comunidades rurais e tradicionais. A partir da abordagem da Saúde Única para combater doenças virais relacionadas à água, a realização de três etapas é apropriada e pode ser realizada nas comunidades rurais do Estado de Goiás (O'Brien & Xagorarakí 2019; Fornari et al. 2020).

O primeiro passo é encontrar o problema, que no presente estudo são as fontes de água utilizadas pelos moradores de comunidades rurais que podem estar contaminados por vírus. O segundo passo é usar esses resultados, através de publicações, para orientar as decisões e aprimorar as práticas cotidianas, visando minimizar os impactos negativos. E a etapa final é projetar procedimentos de intervenção. Metodologias descentralizadas e inclusivas de tratamento de água acessíveis à estas comunidades como discutidas na introdução e ao longo da discussão do trabalho podem melhorar a saúde dos seres humanos, dos animais e do meio ambiente (O'Brien & Xagorarakí 2019; Fornari et al. 2020).

Diante do exposto, e considerando que a maior parte do fornecimento de água para consumo, uso doméstico, e até mesmo para a agricultura familiar das comunidades rurais, é obtida a partir de fontes individuais e coletivas, como mananciais superficiais e

subterrâneos, que podem estar contaminados, o estudo através da metodologia de concentração do material viral nas amostras de água e identificação dos indicadores virais se faz necessário para servir como prevenção, alerta e conscientização à população rural sobre o uso correto desses recursos, e para o conhecimento sobre os principais patógenos que podem estar presentes nessas águas, que já foram encontrados nos trabalhos do grupo de pesquisa como os de Gama et al. (2019) e Lima et al. (2021), e que são prejudiciais à saúde.

## 3 OBJETIVOS

---

### 3.1 OBJETIVO GERAL

- Detectar os indicadores virais de contaminação fecal em amostras de fontes de água utilizadas para o consumo em comunidades rurais no interior do estado de Goiás.

### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Pesquisar a presença de *Adenovirus* (HAdV), *Enterovirus* (EV) e *Rotavirus* do grupo A (RV);
- Quantificar a possível carga viral em determinada concentração amostral;
- Analisar a associação entre as Fontes de água utilizadas para coleta e a presença de vírus entéricos, e analisar estatisticamente a sensibilidade e especificidade do reagente de amplificação.

## 4 MÉTODOS

Um esquema da metodologia geral utilizada no trabalho pode ser resumido pela figura 12.

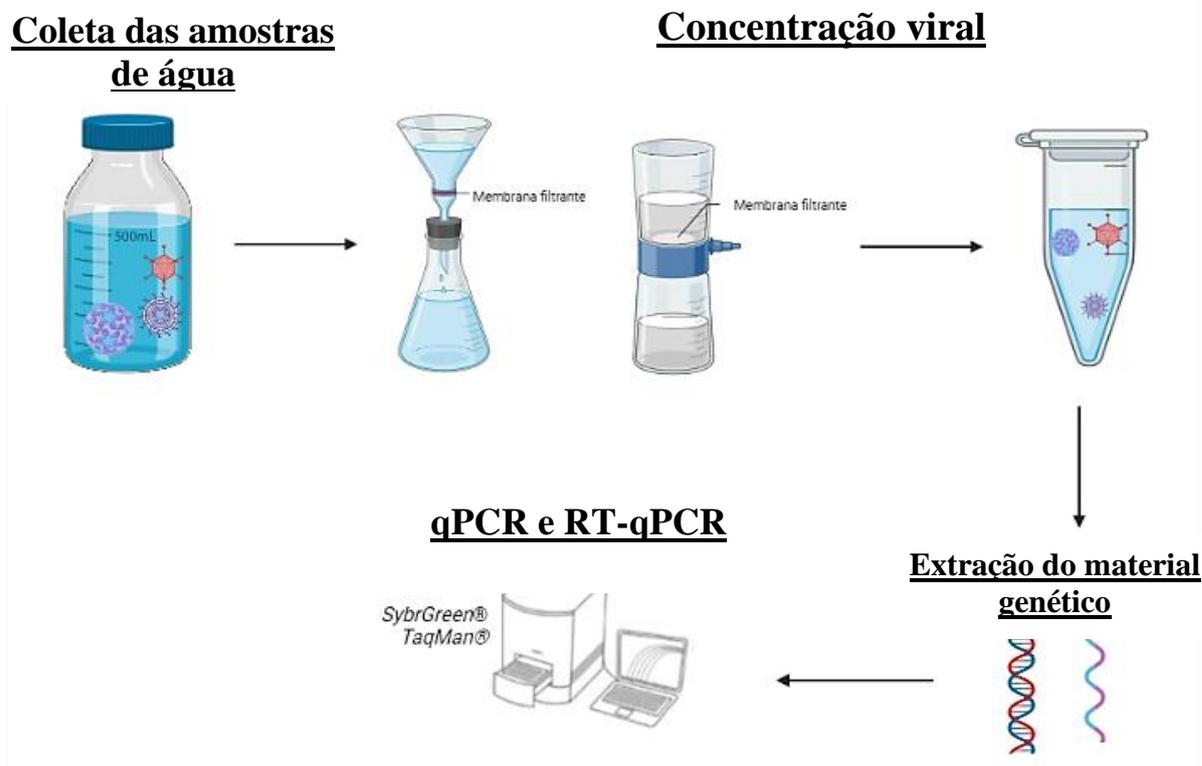


Figura 12. Esquema geral da metodologia utilizada no trabalho: coleta das amostras de água, concentração viral, extração do ácido nucleico e análise molecular (qPCR e RT-qPCR).

Os detalhes de cada abordagem são explicados a seguir:

### 4.1 LOCAL E POPULAÇÃO DO ESTUDO

O estudo foi realizado a partir de amostras coletadas em fontes coletivas e individuais em comunidades rurais e tradicionais de diferentes municípios do Estado de Goiás (Figura 13). As comunidades de Assentamento, Quilombolas e Ribeirinhas, seus municípios, e as coordenadas geográficas dos respectivos pontos de coleta, que fizeram parte da pesquisa, estão detalhados na Tabela 1.

Tabela 1. Localização dos pontos de coleta das amostras.

Município	Comunidade	Latitude	Longitude
Água Limpa	Arraial da Ponte	-18,1452	-48,8474
		-18,1459	-48,85
Posse	Baco Pari	-14,1356	-46,4452
		-14,0932	-46,3518
		-14,9767	-46,6511
		-14,9924	-46,6497
		-14,9758	-46,6453
		-15,004	-46,6427
		-14,9888	-46,6488
		-14,978	-46,6296
		-14,9776	-46,6292
		-14,9767	-46,6443
Flores de Goiás	Canabrava	-14,9711	-46,6428
		-14,9433	-46,6495
		-14,978	-46,6279
		-15,0004	-46,6138
		-15,024	-46,6424
		-14,9887	-46,6973
		-14,4894	-46,6614
		-14,4926	-46,6901
		-14,4508	-46,7039
		-14,4048	-46,6791
Simolândia	Castelo Retiro Três Rios	-14,4056	-46,7063
		-14,4278	-46,6292

Município	Comunidade	Latitude	Longitude
		-14,0505	-46,6489
		-14,0479	-46,6462
		-14,0498	-46,6463
		-14,0504	-46,6462
		-14,0499	-46,647
		-14,0501	-46,6485
Iaciara	Extrema	-14,0501	-46,6488
		-14,0498	-46,6487
		-14,0494	-46,6475
		-14,0501	-46,6494
		-14,05	-46,6501
		-14,0512	-46,6553
		-14,049	-46,6568
		-14,0493	-46,6555
		-14,8857	-47,3094
São João da Aliança	Forte	-14,3113	-47,299
		-14,3087	-47,2878
		-14,3028	-47,2955
		-15,2939	-49,3196
		-15,2834	-49,3151
		-15,2932	-49,3225
		-15,2909	-49,3194
		-15,2725	-49,3172
		-15,2732	-49,3123
Goianésia	Itajá 2	-15,2731	-49,3113
		-15,274	-49,3052
		-15,2883	-49,3227
		-15,2817	-49,3189
		-15,2964	-49,3123
		-15,2956	-49,3146
		-15,2905	-49,3243
		-16,5562	-48,4571
		-16,5532	-48,4576
		-16,5538	-48,4685
		-16,5568	-48,4676
		-16,5588	-48,4687
Silvânia	João De Deus	-16,5532	-48,4733
		-16,5496	-48,4723
		-16,5513	-48,4745
		-16,5778	-48,4559
		-16,5562	-48,4746
		-16,5579	-48,4665

Município	Comunidade	Latitude	Longitude
		-13,0077	-49,9277
		-13,009	-49,9301
		-13,0106	-49,9429
		-12,9998	-49,9446
		-13,0049	-49,9402
		-13,0005	-49,9346
São Miguel do Araguaia	Lageado	-13,0023	-49,9283
		-12,9866	-49,9284
		-12,9933	-49,9444
		-12,9994	-49,9495
		-13,0025	-49,9585
		-13,0063	-49,9582
		-13,0123	-49,9509
		-13,0065	-49,945
		-13,9415	-50,8338
		-13,9333	-50,8395
		-13,9227	-50,8374
		-13,9291	-50,8378
		-13,9298	-50,8377
		-13,9251	-50,8374
Nova Crixás	Landi	-13,9415	-50,8335
		-13,942	-50,831
		-13,9243	-50,8374
		-13,9391	-50,8418
		-13,9364	-50,8402
		-13,9258	-50,8385
		-13,9258	-50,8385
		-16,2939	-48,6408
		-16,2927	-48,6402
Gameleira	Olho d'água	-16,2947	-48,641
		-16,2917	-48,6468
		-13,4408	-47,2014
		-13,4206	-47,1628
		-13,4374	-47,2011
		-13,4437	-47,2193
		-13,4441	-47,2178
		-13,4477	-47,1963
Monte Alegre de Goiás	Pelotas	-13,4322	-47,1938
		-13,4294	-47,1776
		-13,4289	-47,1773
		-13,4233	-47,178
		-13,4305	-47,1698
		-13,4234	-47,168
		-13,422	-47,1641

Município	Comunidade	Latitude	Longitude
Alto paraíso	Povoado Moinho	-14,0588	-47,4644
Goiandira	Povoado Verissimo	-17,973	-48,1748
Niquelândia	Povoado Vermelho	-13,5672	-48,0562
		-13,5654	-48,0558
		-14,7002	-48,8147
		-14,657	-48,7743
		-14,743	-48,8026
		-14,6664	-48,7748
Barro Alto	Santo Antônio Da Laguna	-14,669	-48,7753
		-14,6916	-48,8121
		-14,7226	-48,7953
		-14,6692	-48,7795
		-14,6555	-48,7736
		-14,6587	-48,771
		-14,6892	-48,8094
Cavalcante	São Domingos	-13,5714	-47,6264
		-13,5796	-47,6291
		-13,5832	-47,6383
		-16,6603	-48,2774
		-16,6526	-48,2775
		-16,6557	-48,2696
		-16,6458	-48,2686
		-16,6574	-48,2458
		-16,6613	-48,2522
		-16,6617	-48,2417
Silvânia	São Sebastião Da Garganta	-16,6689	-48,2763
		-16,6586	-48,2754
		-16,6646	-48,2666
		-16,6654	-48,2659
		-16,655	-48,2793
		-16,6641	-48,243
		-16,6686	-48,2682
		-16,6687	-48,2714
		-16,6418	-48,2683

Município	Comunidade	Latitude	Longitude
		-12,965	-46,6045
		-12,9649	-46,5968
		-12,964	-46,6036
		-12,969	-46,6072
		-12,9664	-46,6112
Campos Belos	Taquarussu	-12,9575	-46,6052
		-12,9593	-46,6143
		-12,9594	-46,6164
		-12,9604	-46,6147
		-12,9619	-46,6153
		-12,9609	-46,6148
		-12,9717	-46,5981
Divinópolis de Goiás	Vazante	-13,29	-46,6001
		-13,2809	-46,6084
		-17,3961	-49,2704
		-17,3965	-49,2586
		-17,3919	-49,2524
		-17,3917	-49,2592
		-17,3894	-49,2554
		-17,3956	-49,2628
		-17,4021	-49,2666
		-17,3953	-49,2656
		-17,4016	-49,2704
		-17,4031	-49,2744
		-17,397	-49,2744
Professor Jamil	Rochedo	-17,3905	-49,2668
		-17,3845	-49,2788
		-17,3828	-49,2755
		-17,3922	-49,2829
		-17,3925	-49,286
		-17,3954	-49,2811
		-17,396	-49,2781
		-17,3991	-49,2772
		-17,4056	-49,2831
		-17,4057	-49,2873
		-17,4035	-49,2892
		-17,4025	-49,292
		-17,4005	-49,2899

Município	Comunidade	Latitude	Longitude
		-15,1502167	-48,3480389
		-15,1692139	-48,3535889
		-15,1695861	-48,3526444
		-15,1781028	-48,3401556
		-15,1501889	-48,359075
		-15,1508889	-48,3601778
		-15,1503611	-48,3600583
Padre Bernardo	Sumidouro	-15,1408472	-48,3536722
		-15,1432278	-48,3548611
		-15,1244861	-48,3650944
		-15,1190722	-48,3562972
		-15,1045722	-48,3896194
		-15,124836	-48,3574739
		-15,1597417	-48,3294861
		-15,12905	-48,3582472
		-15,1471389	-48,3565278
		-14,59883	-49,418241
		-14,5976222	-49,4162
		-14,5865389	-49,4147
		-14,5875222	-49,4092667
		-14,5846568	-49,4084616
		-14,5802806	-49,4064361
Uruaçu	São Lourenço	-14,5719778	-49,4025583
		-14,5715944	-49,4001778
		-14,56895	-49,397075
		-14,5654611	-49,3937722
		-14,5688083	-49,4042083
		-14,5708972	-49,4071917
		-14,5800528	-49,4086472
		-14,5733363	-49,4135481
Mineiros	Pouso Alegre	-17,195	-52,5925

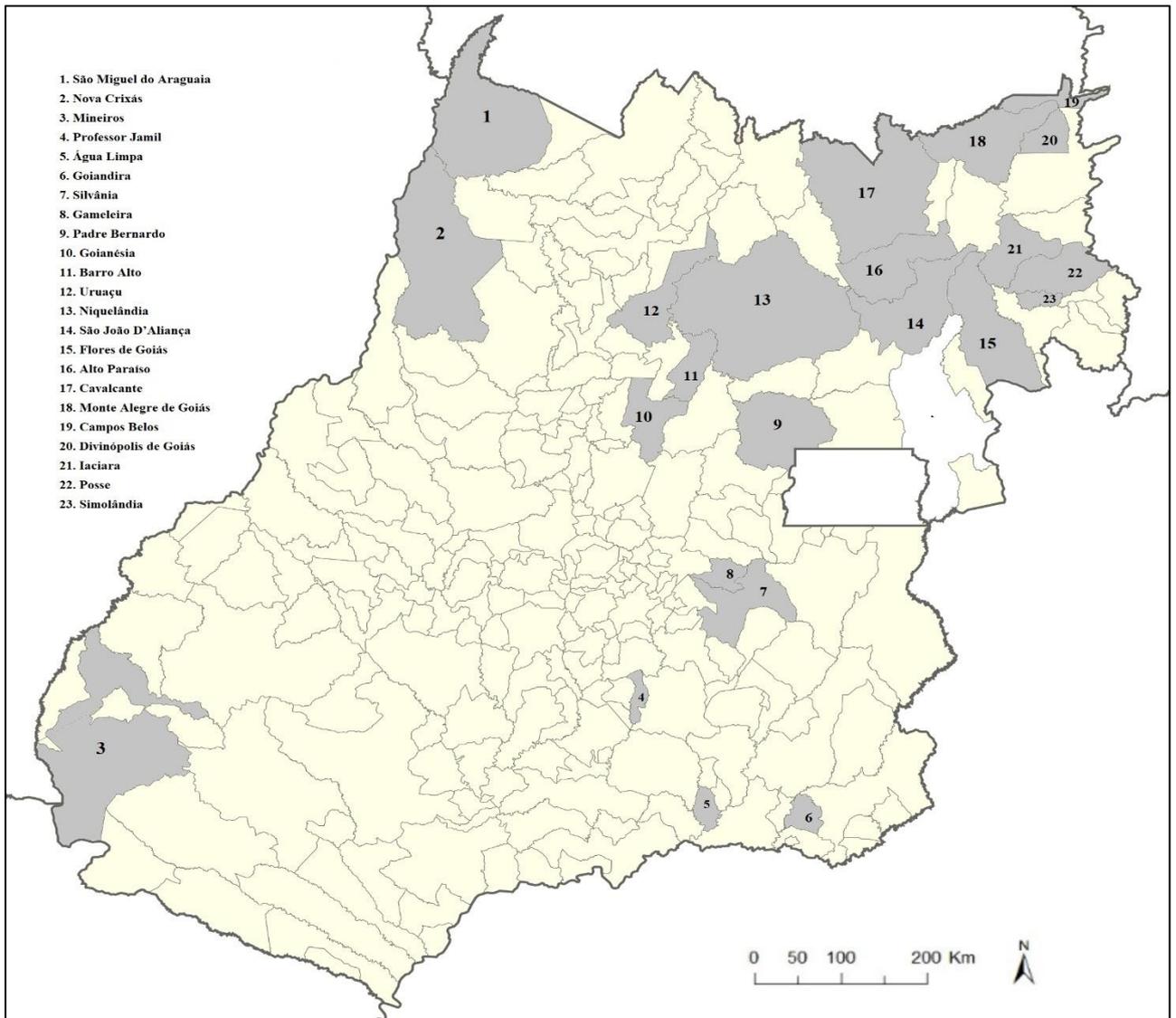


Figura 13. Mapa do Estado de Goiás localizando os municípios em que foram realizadas as coletas nas comunidades rurais participantes deste estudo.

#### 4.2 COLETA DAS AMOSTRAS

As amostras utilizadas no estudo foram coletadas entre os meses de outubro a dezembro de 2021. A concentração e quantificação viral foram feitas em amostras com volume de 500mL de água coletadas em frascos esterilizados. Os frascos de polipropileno utilizados na coleta foram previamente lavados com água e detergente, enxaguados com água destilada e autoclavados a 121°C e 1 atm por 15 minutos.

Foram coletadas 160 amostras de água, cujas fontes eram de água subterrânea, representada por poço tubular raso, poço tubular profundo, poço raso escavado e nascente, além de mananciais superficiais, água da chuva armazenada em cisternas e caminhão pipa (Tabela 2). Após a coleta, as amostras foram mantidas em caixa térmica contendo gelo e

transportadas ao Laboratório de Análise de Águas (LAnA) da Escola de Engenharia Civil e Ambiental, e depois ao Laboratório de Biotecnologia de Microrganismos (LBMic), onde foram realizadas as análises virais, ambos na Universidade Federal de Goiás, localizado na cidade de Goiânia. No LBMic, as amostras foram mantidas sob refrigeração a 4°C até as próximas análises.

Tabela 2. Relação da quantidade de amostras coletadas, o tipo de fonte coletada e subtipo de fontes.

Amostras de Água		
Tipo de Fonte	Subtipo de Fonte	
Subterrânea	Poço tubular raso (minipoço)	31
	Poço tubular profundo (artesiano)	26
	Poço raso escavado	48
	Nascente	17
Manancial Superficial	Rios, córregos, lagos, correntes, ribeirão	18
Cisterna	Chuva	19
Caminhão Pipa	Rios, córregos, lagos, correntes, ribeirão	1
<b>TOTAL</b>		<b>160</b>

#### 4.3 CONCENTRAÇÃO VIRAL NAS AMOSTRAS

Para concentração das amostras de água, foi usada a metodologia de adsorção-eluição descrita por Katayama et al. (2002) com modificações, de forma semelhantes ao realizado por Vecchia et al. (2012). Inicialmente, misturou-se 0,6 g de  $MgCl_2 \cdot 6H_2O$  à amostra de água e, em seguida, o seu pH foi ajustado a  $5 \pm 0,5$  usando solução de HCl 10% e de NaOH 1 M. Na sequência, as amostras foram filtradas à vácuo através de uma membrana de 47 mm de diâmetro e poro de 0,45  $\mu m$  composta de ésteres mistos de celulose (Millipore HAWP04700), que confere à membrana carga elétrica negativa. Após a filtração da amostra de água, 87,5 mL de solução  $H_2SO_4$  0,5 mM (pH 3) foram passados pela membrana, utilizando-se o mesmo sistema de filtração, para liberação dos cátions adsorvidos.

Em seguida, a membrana foi transferida para um tubo de centrifugação, estéril, de 5 mL (tipo Eppendorf), que continha 2,5 mL de NaOH 1 mM (pH 10,5), a qual foi submetido a agitador vórtex por 5 minutos para eluição das partículas virais adsorvidas na membrana. Ao final, a membrana foi retirada do tubo e a mistura restante nele foi neutralizada com 12,5  $\mu L$  de  $H_2SO_4$  50 mM e 12,5  $\mu L$  de tampão Tris-EDTA (TE) 100x

concentrado. As amostras concentradas foram congeladas a  $-80^{\circ}\text{C}$  até a etapa de extração dos ácidos nucleicos.

Na filtração, foram usados sistemas de filtração reutilizáveis para membrana de 47 mm, confeccionados em polissulfona (Millipore/Nalgene) e conectados a bombas de vácuo, ajustadas a uma pressão de 530 mmHg. Antes do início do processo de filtração e para a sua reutilização, o sistema era sempre antecedido por esterilização. Previamente ao seu uso, eram seguidas as seguintes etapas: lavagem com água e detergente e enxague com água de torneira; hipoclorito de sódio 2,5% borrifado à superfície do sistema e enxague com água destilada, seguido de álcool 70% também borrifado no sistema. A cada vez que o sistema era reutilizado, também era deixado por 15 minutos em cabine de segurança biológica sob luz UV para secagem e esterilização.

#### 4.4 EXTRAÇÃO DO MATERIAL GENÉTICO VIRAL

As técnicas moleculares como a PCR, utilizadas para amostras ambientais, são capazes de detectar os patógenos virais com rapidez, alta sensibilidade e especificidade (Silva et al. 2011). *SybrGreen*<sup>®</sup> e *TaqMan*<sup>®</sup> são os reagentes fluorescentes mais utilizados para detecção destes patógenos por qPCR. Devido ao fato do *SybrGreen*<sup>®</sup> se ligar em todo o DNA fita dupla (incluindo dímeros) e as amostras de água possuírem inúmeras substâncias orgânicas e inibidores que podem ser co-concentrados durante o processamento de amostras, afetando a qPCR, a detecção dos vírus alvos da pesquisa por este reagente pode ser superestimado e/ou causarem contaminação cruzada, além de que, a ocorrência de reações inespecíficas tem sido apontada como um dos problemas do *SybrGreen*<sup>®</sup> (Guimarães 2007), fazendo com que a sua padronização seja cara e bastante trabalhosa (Lima et al. 2016). A *TaqMan*<sup>®</sup> é uma sonda de DNA marcada que, durante a PCR, hibridiza com a sequência da fita simples de DNA complementar alvo e têm como vantagem serem mais sensíveis quando comparadas com *SybrGreen*<sup>®</sup> na detecção dos vírus. Para detecção de vírus ambientais em diferentes matrizes, a sonda *TaqMan*<sup>®</sup> é amplamente preferida (Fongaro et al. 2015). Inicialmente foi utilizado o fluoróforo *SybrGreen*<sup>®</sup> para a realização da análise molecular, mas ao longo do trabalho também foi optado por utilizar o fluoróforo *TaqMan*<sup>®</sup> para comparação, devido os motivos citados em relação ao *SybrGreen*<sup>®</sup>.

#### 4.4.1 Extração do ácido nucleico das amostras - *SybrGreen*®

Os ácidos nucleicos virais foram extraídos utilizando o kit de extração Mini Spin Vírus DNA/RNA (KASVI®), seguindo as instruções do fabricante. Logo após o descongelamento e homogeneização das amostras, em um tubo de 1,5 mL fornecido pelo kit, foram adicionados 250 µL da amostra, seguidos de 5µL de Proteinase K (fornecido pelo kit). A mistura resultante foi agitada moderadamente em vórtex. Em todas as etapas de adição de reagente, a mistura era homogeneizada em vórtex. A seguir, foram adicionados 200 µL de Tampão de Lise V à mistura, que então foi homogeneizada por 10-15 segundos e centrifugada brevemente (1 segundo a 2.000xg), para retirar gotículas da tampa do tubo (short spin). Foram adicionados 5,6 µL de solução estoque de Carreador RNA (1 µg/µL) e, em seguida, a solução foi incubada em temperatura ambiente (18°-25°C) por 3 minutos. Após o tempo de incubação, um volume de 200 µL de etanol absoluto (96%-100%) foram adicionados e incubado por 5 minutos em temperatura ambiente (18°-25°C).

Toda a mistura (660 µL) foi transferida para um Tubo Spin V (fornecido pelo kit), que possui um tubo de coleta acoplado, seguido de centrifugação por 3 minutos a 4.000xg. Um novo tubo de coleta foi acoplado ao Tubo Spin V e foram adicionados 400 µL de Tampão de Lavagem V1 à solução, que foi então centrifugada por 30 segundos a 11.000xg. Logo após, 400 µL de Tampão de Lavagem V2 foram adicionados e centrifugados por 30 segundos a 11.000xg e colocado um novo tubo de coleta.

Foi feita uma segunda lavagem com o Tampão de Lavagem V2, porém, dessa vez, adicionando somente 200 µL e centrifugando a 20.000xg por 5 minutos. O filtro foi acoplado em um novo tubo de 1,5 mL (fornecido pelo kit) e incubado por 5 minutos a 56°C. Após a incubação, foram adicionados 30 µL de água livre de RNase/DNase (pré-aquecida a 70°C) para obtenção do eluato e incubada por 3 minutos em temperatura ambiente. Para uma última etapa, a solução foi centrifugada por 3 minutos a 20.000xg para eluir os ácidos nucleicos do tubo-filtro. O eluato foi armazenado ao freezer -80°C até a etapa seguinte.

#### 4.4.2 Extração de ácido nucleico das amostras - *TaqMan*®

A extração foi realizada a partir de 200 µL de amostra, por meio do Biospin Virus DNA/RNA Extraction Kit (BIOFLUX®), seguindo as instruções do fabricante. Ao iniciar, em um tubo de 1,5 mL da marca Eppendorf® foram pipetados 10 µL de Proteinase K (fornecido pelo Kit), depois adicionados 200 µL da amostra e também 200 µL de

Tampão de Lise. A solução foi homogeneizada em vórtex por 30 segundos. Na etapa seguinte, a mistura foi incubada a 56°C por 15 minutos em um termobloco. Para a retirada de gotículas na tampa do tubo, foi feita uma breve centrifugação da amostra (10.000xg por 3 segundos).

Um total de 250 µL de etanol 96%-100% (não fornecidos pelo kit) foram adicionados ao tubo e homogeneizados por 15 segundos em vórtex no modo pulsar. Nesta etapa, também foi feita a centrifugação para retirada de gotículas na tampa do tubo (10.000xg por 3 segundos). A mistura total (660 µL) foi transferida para um Spin Column (tubo-filtro), que possui um tubo de coleta acoplado, e centrifugada a 10.000xg por 1 minuto, e o fluido que havia passado através da membrana foi descartado do tubo de coleta acoplado.

Para a etapa de lavagem, foram adicionados 500 µL de Tampão de Lavagem I no tubo-filtro e centrifugado à 10.000xg por 1 minuto, descartando o fluido restante no tubo de coleta acoplado. Logo após, foram adicionados 500 µL de Tampão de Lavagem II no tubo-filtro e centrifugado à 10.000xg por 1 minuto, descartando o fluido restante no tubo de coleta acoplado. Em uma última etapa de lavagem, foram adicionados 500 µL de Tampão de Lavagem II na Spin Column e centrifugada uma última vez a 10.000xg por 1 minuto, descartando o fluido restante do tubo de coleta acoplado.

O tubo-filtro foi colocado em tubo novo de 1,5 mL (não fornecido pelo kit) e centrifugado a 10.000xg por 2 minutos para secagem completa da membrana. Depois, foram adicionados 60 µL de Tampão de Eluição e incubado em temperatura ambiente por 2 minutos. Ao final da extração, o tubo foi centrifugado por 1 minuto a 12.000xg, para eluição dos ácidos nucleicos extraídos. O eluato foi armazenado ao freezer -80°C até a etapa seguinte.

## 4.5 ANÁLISES MOLECULARES (qPCR e RT-qPCR)

### 4.5.1 Controles Virais

Os controles-padrão para HAdV, EV e RV consistiram, respectivamente, de DNA de sorotipo 5 (espécie C) de HAdV e RNA de poliovírus 1 (*Enterovirus C*). O controle positivo para HAdV-5 foi a cepa viral modelo Ad5 cultivada em células A549 seguindo procedimentos padrão. O controle EV foi um Poliovírus tipo 1 isolado em células da vacina Sabin. Os controles virais para HAdV e EV usados nesta pesquisa foram cedidos pelo Prof. Dr. Fernando Rosado Spilki, da Universidade Feevale, e a sua aluna Ma. Meriane Demoliner. Já o controle positivo para RV, foi sintetizado em laboratório, pela

empresa Molecular Biotecnologia LTDA®, escolhido e alinhado através do Banco de Dados do NCBI (*GenBank*), número de acesso HM348746 (Rotavírus humano A cepa mani-265/07 da proteína estrutural gene VP6).

#### 4.5.2 Detecção e quantificação dos indicadores virais

##### 4.5.2.1 Detecção e Quantificação dos vírus entéricos usando o fluoróforo *SybrGreen*®

Para detecção e quantificação dos indicadores virais, foram realizadas as etapas de qPCR para HAdV, e RT-qPCR para RV e EV, utilizando o intercalante de DNA de fita dupla *SybrGreen*® como fluoróforo. Para detecção de RV e EV nas amostras, foi realizada a etapa de RT-qPCR em uma única etapa, pois seu genoma consiste de RNA. O primeiro passo da RT-qPCR consiste na síntese de DNA utilizando como molde uma fita de RNA da amostra, em uma reação catalisada pela enzima transcriptase reversa, formando o cDNA. Na época do experimento, não foi possível realizar a síntese de cDNA por meio de kit específico.

No caso em estudo, os ensaios de uma etapa combinaram a transcrição reversa e PCR em um único tubo: combinando uma solução de *mastermix*, uma transcriptase reversa junto com uma DNA polimerase e o material genético extraído da amostra. A enzima foi cedida pela Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz). O RT-qPCR de uma etapa utiliza apenas oligonucleotídeos específicos de sequência. Logo, ao final da reação, obteve-se a detecção e quantificação do cDNA das amostras tanto para EV, como RV. Os ciclos de qPCR e RT-qPCR foram realizados usando o equipamento *LightCycler*® 480 *Real-Time PCR System* (Roche Molecular Systems®, Inc) com placas de 96 poços e analisadas no *Light Cycler*® 480 *Software*, Versão 1.5.

As condições das reações foram previamente otimizadas e padronizadas utilizando-se os controles virais. Os resultados da qPCR e RT-qPCR foram dados em cópias genômicas por litro (CG/L). Os oligonucleotídeos utilizados para HAdV são específicos para a espécie C sorotipos 1, 2, 5 e 6, os oligonucleotídeos para RV são específicos para o grupo A de RV, já os oligonucleotídeos para EV são da região 5' altamente estruturada, compartilhada pelos Enterovírus. Os oligonucleotídeos utilizados estão descritos na Tabela 3.

Tabela 3. Oligonucleotídeos utilizados para a amplificação de HAdV, EV e RV na qPCR e RT-qPCR.

Vírus	Gene alvo	Iniciadores				Ta* utilizada na pesquisa	Tamanho esperado amplicon (bp)
		Nome	Sequência	Polaridade	Posição		
HAdV	Hexon	VTB2-HAdVCf	5'-GAGACGTA <del>CTTC</del> CAGCCTGAAT-3'	Positivo	106-126 <sup>a</sup>	60°C	101
		VTB2-HAdVCr	5'-GATGAACCGCAGCGTCAA-3'	Negativo	190-207 <sup>a</sup>		
EV	5'UTR	ENT-F1	5'-GATGAACCGCAGCGTCAA-3'	Positivo	443-459 <sup>b</sup>	62°C	116
		ENT-F2	5'-ACACGGACACCCAAAGTAG-3'	Negativo	541-559 <sup>c</sup>		
GARV	VP6	ROTA <del>FEEVALE</del> -FW	5'-GATGTCCTGTACTCCTTGT-3'	Positivo	7-25 <sup>d</sup>	60°C	160
		ROTA <del>FEEVALE</del> -REV	5'-GGTAGATTACCAATTCCTCC-3'	Negativo	148-167 <sup>d</sup>		

<sup>a</sup>Sequência de oligonucleotídeos descrita por Wolf et al. (2010)

<sup>b</sup>Sequência de oligonucleotídeos descrita por Tsai et al. (1993)

<sup>c,d</sup>Sequência de oligonucleotídeos descrita por Vecchia et al. (2012)

Ta: Temperatura de anelamento

#### a) Curva-padrão para qPCR e RT-qPCR

Para a quantificação absoluta das partículas virais nas amostras, curvas-padrão de cinco pontos foram obtidas em reação de qPCR e RT-qPCR. Elas foram geradas a partir da amplificação do controle-padrão de HAdV por qPCR e RV e EV, que a partir da reação RT-qPCR, foi padronizado o cDNA do controle positivo, em diluições seriadas de cinco pontos, no fator 10.

O número de cópias genômicas virais do controle-padrão de HAdV foi obtido a partir de sua massa de DNA e, do controle-padrão de EV e RVA, a partir de sua massa de RNA, ambas quantificadas em 1 µL de cada controle por meio do espectrofotômetro NanoVue™ Plus® (GE Healthcare Life Sciences). Posteriormente, essas massas foram convertidas em número de moléculas de DNA genômico para HAdV (NHAdV) e de RNA genômico para EV (NEV) e para RVA (NRVA). Para esses cálculos, foi assumido que o genoma do HAdV sorotipo 5 continha 35.938 pares de bases, que o genoma do poliovírus 1 continha 7.441 pares de bases e que para o genoma da proteína estrutural VP6 do Rotavírus humano continha 1.266 pares de bases. Para o controle de EV e RV, também foi considerado que todo o RNA genômico foi convertido em cDNA. A conversão das massas de DNA e RNA genômicos em número de moléculas de DNA e RNA genômicos foi realizada utilizando as equações seguintes:

$$\text{NHAdV} = [\text{massa DNAd}/(\text{tamanho DNAd} \times 617,96) + 36,04] \times 6,022 \times 10^{23}$$

$$\text{NEV e NRVA} = [\text{massa RNAs}/(\text{tamanho RNAs} \times 321,47) + 18,02] \times 6,022 \times 10^{23}$$

As curvas-padrão foram validadas observando-se os parâmetros de coeficiente de correlação ( $\geq 0,98$ ), eficiência de reação (entre 90 e 110%) e inclinação (entre  $-3,44$  e  $-3,26$ ). Para consideração de detecções foi considerado o limite considerado para positividade (threshold - T) igual a 2,8, para RV, 7,0 para HAdV e 2,2 para EV, levando em consideração a elevação da especificidade e redução da sensibilidade da técnica de qPCR e RT-qPCR do tipo *SybrGreen*®. Foi considerado as amplificações positivas até o ciclo 38 (CT – ciclo Threshold) ou inferior.

#### b) RT-qPCR para RV

Para a amplificação e quantificação do material genético, o volume da reação de 15  $\mu\text{L}$ , foi composto por 7,5  $\mu\text{L}$  de solução de *mastermix* PCR Tempo Real – *SybrGreen*/ROX 2x (QuatroG®), 0,5  $\mu\text{L}$  de cada oligonucleotídeo (10 pmol/  $\mu\text{L}$ ), 0,5  $\mu\text{L}$  da enzima Transcriptase Reversa, 5  $\mu\text{L}$  de amostra e 1  $\mu\text{L}$  de água ultrapura livre de DNase/RNase. O ciclo de RT-qPCR foi composto de somente 1 ciclo de 15 minutos a 45°C e 1 ciclo de 2 minutos a 95°C, para ocorrer a ativação da enzima RT e DNA polimerase, respectivamente. Depois dessa etapa inicial, foram seguidos 40 ciclos compostos de um passo de 15 segundos à 95°C para a desnaturação da fita e um passo de 1 minuto à 60°C para anelamento dos oligonucleotídeos à fita e extensão. A aquisição de fluorescência foi gerada sempre na última etapa. Para geração da curva-padrão, foram usadas diluições seriadas de fator 10 do controle-padrão de rotavírus, da diluição  $10^{-1}$  até a  $10^{-5}$ , partindo-se de  $5,6 \times 10^8$  cópias genômicas por reação. Em cada rodada de qPCR, foi utilizado uma amostra negativa (NTC – *no template control*), que continha água livre de DNase/RNase no lugar da amostra.

#### c) RT-qPCR para EV

Do mesmo modo como RV, a reação tem volume de volume 15  $\mu\text{L}$ , sendo composta por 7,5  $\mu\text{L}$  de solução de *mastermix* PCR Tempo Real – *SybrGreen*/ROX 2x (QuatroG®), 0,5  $\mu\text{L}$  de cada oligonucleotídeo (10 pmol/  $\mu\text{L}$ ), 0,5  $\mu\text{L}$  da enzima Transcriptase Reversa, 5  $\mu\text{L}$  de amostra e 1  $\mu\text{L}$  de água ultrapura livre de DNase/RNase. O ciclo de RT-qPCR foi composto de somente 1 ciclo de 15 minutos a 45°C e 1 ciclo de 2 minutos a 95°C, para ocorrer a ativação da enzima RT. Depois dessa etapa inicial, foram seguidos 40 ciclos compostos de um passo de 15 segundos a 95°C para a desnaturação da

fita e um passo de 1 minuto a 62°C para anelamento dos oligonucleotídeos à fita e extensão. A aquisição de fluorescência foi gerada sempre na última etapa. Para geração da curva-padrão, foram usadas diluições seriadas de fator 10 do controle-padrão de enterovírus, da diluição  $10^{-1}$  até a  $10^{-5}$ , partindo-se de  $3,5 \times 10^8$  cópias genômicas por reação. Em cada rodada de qPCR, foi utilizada uma amostra negativa (NTC – *no template control*).

#### d) qPCR para HAdV

O volume da reação foi preparado por 7,5 µL de solução de *mastermix* PCR Tempo Real – *SybrGreen/ROX 2x* (QuatroG®), 0,5 µL de cada oligonucleotídeo (10 pmol/ µL), 6 µL de amostra e 0,5 µL de água ultrapura livre de DNase/RNase. O ciclo da qPCR foi composto por 1 ciclo inicial de 2 minutos a 95°C, seguido de 40 ciclos compostos por um passo de desnaturação de 15 segundos a 95°C e um passo de anelamento de 1 minuto a 60°C. Para a quantificação, a aquisição de fluorescência foi gerada sempre na última etapa. Para a geração da curva-padrão, foram usadas diluições seriadas de fator 10 do controle-padrão de adenovírus, da diluição  $10^{-1}$  até a  $10^{-5}$ , partindo-se de  $5,6 \times 10^7$  cópias genômicas por reação. Em cada rodada de qPCR, foi utilizada uma amostra negativa (NTC – *no template control*).

#### 4.5.2.2 Detecção e Quantificação dos vírus entéricos usando o sistema *TaqMan*®

Quando o fluoróforo *TaqMan*® foi utilizado para a detecção e quantificação da carga viral de HAdV, EV e RV, foi realizada somente a reação de qPCR, pois o *kit* para a síntese de cDNA já estava disponível.

O conjunto de oligonucleotídeos de sonda *TaqMan*® utilizados na reação foi adquirido pela empresa *ThermoFisher Scientific*®. Foram utilizados os produtos: *TaqMan*™ *Gene Expression Assays*® (FAM) da *Applied Biosystems*™, em específico para EV, a sonda *TaqMan*™ *Gene Expression Assay (20X)*, para RV, *Custom TaqMan*™ *Gene Expression Assay (20X)* e para HAdV foi utilizado o *TaqMan*® *Microbe Assays Small (20x)*. Os ciclos de qPCR foram realizadas utilizando o equipamento *StepOnePlus*™ *Real-Time PCR System* (*Applied Biosystems*™) com placas de 96 poços e analisadas no *StepOne* Software, Versão 2.3.

Os resultados da qPCR foram dados em cópias genômicas por litro (CG/L). Os oligonucleotídeos utilizados para HAdV são específicos para espécie A, B, E e F. Os

oligonucleotídeos para RV foram customizados e são específicos para o grupo A. Já os oligonucleotídeos para EV são específicos para todas as espécies de *Enterovirus*.

a) Síntese de cDNA das amostras de EV e RV

Devido ao seu genoma viral ser representado por um RNA, para análise e quantificação de EV e RV, foi necessária a realização da etapa da síntese da fita de DNA complementar (cDNA) antes da realização do qPCR, das amostras de água após a extração dos ácidos nucleicos e também foi realizada a síntese de cDNA do controle positivo padrão de EV. Para esse fim, foi utilizado o *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kits* (Applied Biosystems©), seguindo as instruções do fabricante. De acordo com o manual, todos reagentes devem ser mantidos no gelo para o preparo da solução *2X Reverse Transcription Master Mix*. Esta solução consiste em: 2,0 µL de 10X Tampão RT, 0,8 µL de 25x dNTP Mix (100mM), 2,0 µL de 10X RT *Primers* Randômicos, 1,0 µL de *MultiScribe™ Reverse Transcriptase* e 4,2 µL de água livre de nuclease foram adicionados

Logo após, a solução *2X Reverse Transcription Master Mix* foi deixada no gelo e agitado levemente. Em seguida, foram pipetados 10 µL da solução em microtubo de PCR de 200 µL, e também foram pipetado 10 µL das amostras extraídas, e a mistura foi homogeneizada. A mistura final foi incubada de acordo com a seguinte sequência: 10 minutos a 25°C, 120 minutos a 37°C, 5 minutos a 85°C e uma última etapa de HOLD a 4°C, ∞. A incubação foi realizada no termociclador Eppendorf® Vapo.protect Mastercycler® Pro (Eppendorf®, Alemanha). O produto da síntese foi congelado a -80 °C até que a reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (qPCR) fosse realizada.

b) qPCR para HAdV, EV e RV

A reação da detecção e quantificação de HAdV, EV e RV se deu em um volume final de 10 µL. Para as reações de EV e RV, em um tubo de 1,5 mL, livre de nucleases, foram pipetados 5 µL de MasterMix *TaqMan®* (FioCruz), 0,5 µL do reagente *TaqMan™ Gene Expression Assay (20X)*, para EV, e *Custom TaqMan™ Gene Expression Assay (20X)*, para RV; 0,1 µL de ROX, 0,4 µL de DNA polimerase e 3 µL de água livre de nuclease. Para HAdV, foram pipetados 5 µL de MasterMix *TaqMan®* Fio Cruz, 0,5 µL de *TaqMan® Microbe Assays Small (20x)*, 0,4 µL de DNA polimerase, 0,1 µL de ROX e

1 µL de água livre de nuclease. A solução foi então homogeneizada em vórtex e centrifugado à 10.000 rpm por 2 segundos, para a retirada de gotículas na tampa do tubo.

Logo após, para a qPCR de EV e RV, 9 µL da solução foram transferidos para placa de qPCR de 96 poços, e então 1 µL da amostra contendo cDNA (EV e RV) foi adicionado aos respectivos poços da placa de qPCR. Já para HAdV foram transferidos 7 µL da solução para a placa de qPCR e adicionados 3 µL de DNA da amostra. A reação consistiu em 1 ciclo de 95°C por 10 minutos para ativação da enzima polimerase, seguidos de 40 ciclos compostos pela etapa de desnaturação por 15 segundos a 95°C e uma etapa de anelamento/extensão por 1 minuto a 60°C.

Em cada rodada de qPCR, foi utilizada amostra negativa em duplicata (água livre de nuclease no lugar da amostra). A quantificação absoluta das partículas virais nas amostras foi realizada por meio de curvas-padrão de cinco pontos em duplicata, que foram obtidas em cada rodada de qPCR amplificando o controle padrão de HAdV, RV e EV. Para HAdV, as diluições começaram com  $8,1 \times 10^7$  cópias genômicas por litro (CG/L), já para RV começaram com  $5,6 \times 10^9$  cópias genômicas por litro (CG/L). Para EV, eles começaram com  $6,2 \times 10^8$  cópias genômicas por litro (CG/L). As curvas padrão foram validadas observando-se os parâmetros de coeficiente de correlação ( $\geq 0,98$ ), eficiência de reação (entre 90 e 110%) e inclinação (entre  $-3,44$  e  $-3,26$ ). Para consideração de detecções foi considerado o limite considerado para positividade (threshold - T) igual a 0,2 para todos os vírus, levando em consideração a elevação da especificidade e sensibilidade da técnica de qPCR do tipo *TaqMan*®. Foi considerado as ampliações positivas até o ciclo 38 ou inferior (CT – Thresholdcycle).

#### 4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para avaliação da associação entre o tipo de fonte de coleta e a presença do tipo do vírus, foi realizado o teste de regressão logística, dessa forma foi possível determinar as Razões de Chances (OR – *Odds Ratio*) para estimação do tamanho de efeito. Para aceitação da hipótese de associação e rejeição da hipótese nula (H0), foi considerado o limite de significância de 5%. A presença dos vírus foi considerada a variável dependente, e os tipos de fontes as variáveis independentes. As análises estatísticas e confecção gráfica foram realizados com o auxílio dos *softwares* Jamovi® versão 2.2 (Jamovi, 2022), Minitab® versão 19 (Minitab, 2022) e GraphPad Prism® versão 9.0 (GraphPad, 2020).

## 5 RESULTADOS

Foram analisadas 160 amostras de água oriundas de fontes coletivas e individuais, adquiridas de propriedades rurais. Realizou-se a análise quanto a contaminação fecal por meio dos três indicadores virais: HAdV, EV e RV. A quantidade dos vírus entéricos encontrados em cada tipo de fonte, encontra-se na Tabela 4.

Tabela 4. Quantidade de indicadores virais em relação aos tipos de fontes de água.

Amostras de Água		Vírus Entéricos		
Tipo de Fonte	Subtipo de Fonte	HAdV	RV	EV
Subterrânea	Poço tubular raso (minipoço)	4	10	3
	Poço tubular profundo (artesiano)	3	7	1
	Poço raso escavado	3	11	2
	Nascente	2	1	1
Manancial Superficial	Rios, córregos, lagos, correntes, ribeirão	0	0	0
Cisterna	Chuva	3	3	0
Caminhão Pipa	Manancial superficial	0	0	0
<b>TOTAL</b>		<b>15</b>	<b>32</b>	<b>7</b>

Quando utilizado o fluoróforo *SybrGreen®*, a presença de contaminação fecal por meio dos indicadores virais foi encontrada em 30% (48/160) das amostras, nas quais pelo menos um dos indicadores estava presente. O indicador viral encontrado com maior frequência foi RV, identificado em 20% (32/160) das amostras, seguido por HAdV, identificado em 9,4% (15/160) das amostras, e por EV, identificado em 4,4% (7/160) das amostras, representado pela Figura 14.

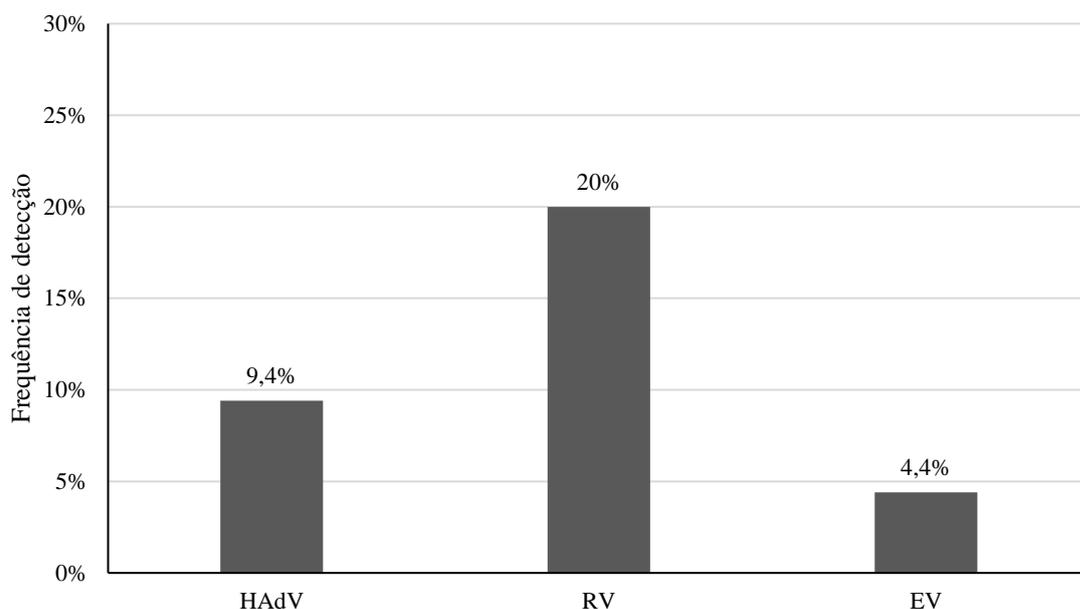


Figura 14. Indicativo da frequência de contaminação pelos indicadores virais.

Na figura 15, é possível notar que nas amostras positivas de fontes subterrâneas, o RV foi o indicador viral de maior prevalência, com taxa de detecção de 23,8% (29/122), seguido de HAdV com taxa de 9,8% (12/122) e EV, com 5,7% (7/122). Nas amostras de cisterna, tanto HAdV quanto RV foram encontrados na mesma frequência, com 15,8% (3/19). Não foi encontrado nenhum vírus pelas técnicas adotadas nas amostras de manancial superficial e caminhão pipa.

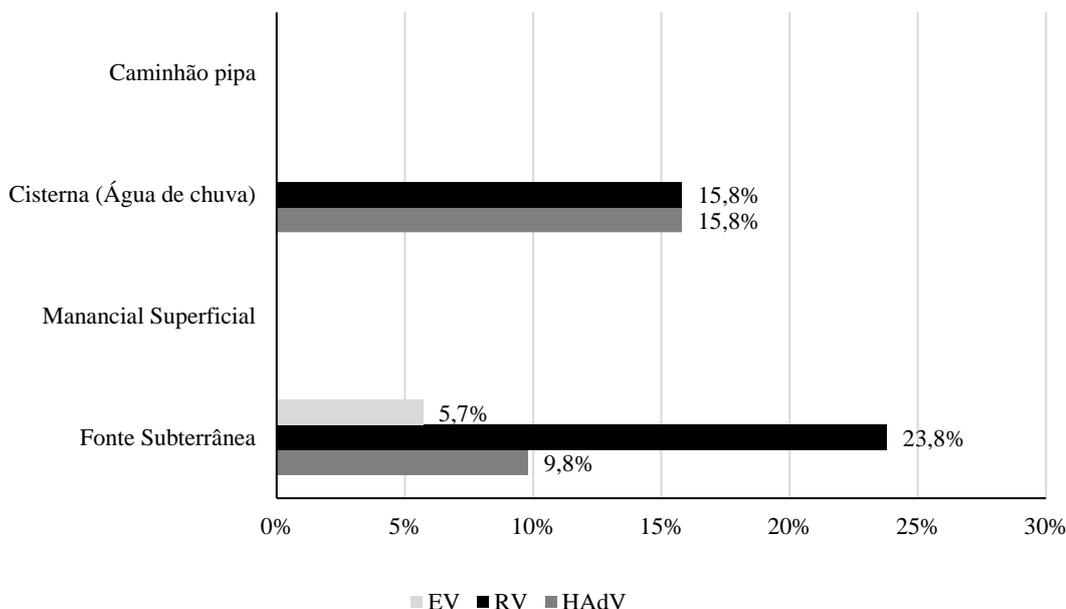


Figura 15. Indicativo de contaminação fecal de acordo com os tipos de fontes de água e indicadores virais.

Comparando os subtipos de fontes subterrâneas, RV foi o indicador mais frequentemente encontrado em poço tubular raso, poço tubular profundo e poço raso escavado, com taxas de detecção de 32,2% (10/31), 27% (7/26), 23% (11/48), respectivamente. HAdV foi o indicador mais frequente encontrado em nascente, com frequência de 11,8% (2/17). Já EV, teve sua maior prevalência em poço tubular raso, com 9,7% (3/31) (Figura 16).

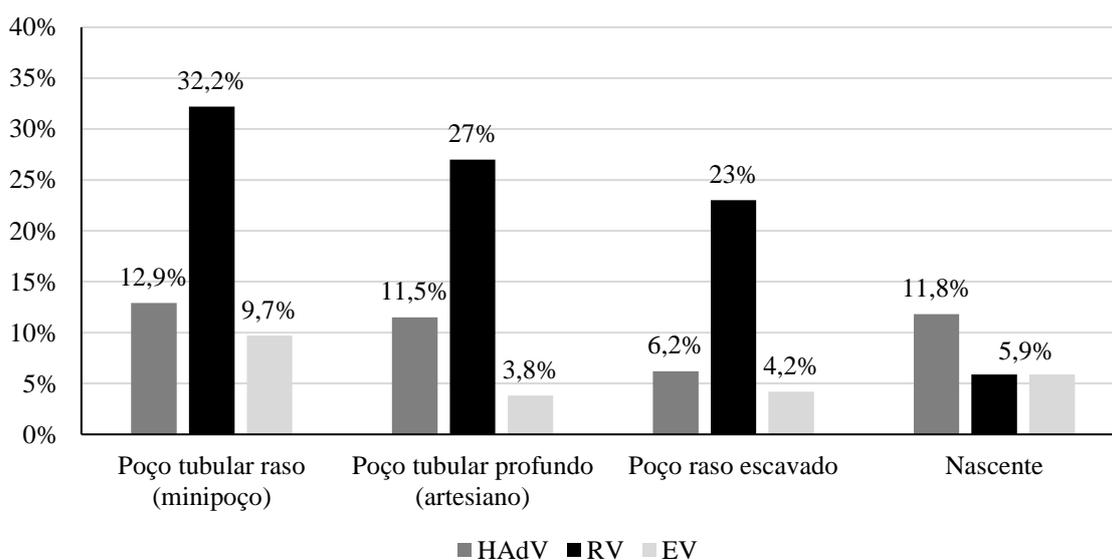


Figura 16. Contaminação pelos indicadores virais, de acordo com o subtipo de fonte subterrânea.

Quando feita a média geométrica das concentrações dos indicadores virais, a concentração média para HAdV foi  $1,9 \times 10^6$  CG/L, sua concentração mínima foi de  $3 \times 10^2$  CG/L, e a concentração máxima de  $2,4 \times 10^7$  CG/L, cuja amostra foi encontrada em poço raso escavado. Para RV, a média geométrica de sua concentração foi de  $1,5 \times 10^6$  CG/L, sendo sua concentração máxima de  $1,7 \times 10^7$  CG/L, encontrada em amostra de poço tubular raso (minipoço), e a concentração mínima  $4,5 \times 10^3$  CG/L. Já para EV, sua média geométrica foi  $7,1 \times 10^5$  CG/L, sendo sua concentração mínima encontrada de  $1,6 \times 10^2$  CG/L, e sua concentração máxima de  $5 \times 10^6$  CG/L, encontrada em amostra de poço raso escavado (Tabela 5).

Tabela 5. Média geométrica da concentração dos indicadores virais. A concentração foi dada por CG/L.

	HAdV	RV	EV
Concentração	Mínima	$3 \times 10^2$	$4,5 \times 10^3$
	Média	$1,9 \times 10^6$	$1,5 \times 10^6$
	Máxima	$2,4 \times 10^7$	$1,7 \times 10^7$

O maior valor da concentração média em CG/L, em amostras de fontes subterrâneas foi de  $5,3 \times 10^7$  CG/L para RV, seguido por HAdV, com  $2,9 \times 10^7$  CG/L, e  $5,1 \times 10^6$  CG/L para EV. Em amostras de cisterna, a maior concentração média foi  $2,2 \times 10^6$  CG/L para RV, seguido de  $8,8 \times 10^4$  CG/L para HAdV (Tabela 6).

Tabela 6. Valores mínimos, médios e máximos em relação as médias geométricas das concentrações dos indicadores HAdV, RV e EV. Concentrações em CG/L.

		Fontes de água					
		Subterrânea			Cisterna (chuva)		
Indicadores		HAdV	RV	EV	HAdV	RV	EV
Concentrações	Mínima	$3 \times 10^2$	$4,5 \times 10^3$	$1,6 \times 10^2$	$2,4 \times 10^3$	$2,6 \times 10^5$	*
	Média	$2,9 \times 10^7$	$5,3 \times 10^7$	$5,1 \times 10^6$	$8,8 \times 10^4$	$2,2 \times 10^6$	*
	Máxima	$2,4 \times 10^7$	$1,7 \times 10^7$	$5 \times 10^6$	$7,7 \times 10^4$	$1,8 \times 10^6$	*

\*Não houve detecção de EV em amostras de cisterna.

Para as Fontes "Manancial Superficial" e "Caminhão Pipa", não houve a detecção de nenhum dos indicadores virais pesquisados, por isso não constam na Tabela 6.

Em nenhuma amostra coletada houve detecção simultânea dos três indicadores virais. Em 27 amostras houve identificação exclusiva de RV (16,9%), em 12 amostras para HAdV (7,5%), seguida de somente 4 amostras para EV (2,5%). Não houve nenhuma co-deteção entre amostras com HAdV e EV, já entre RV com EV e RV com HAdV, houve amplificação simultânea de três e duas amostras, respectivamente (Figura 17).

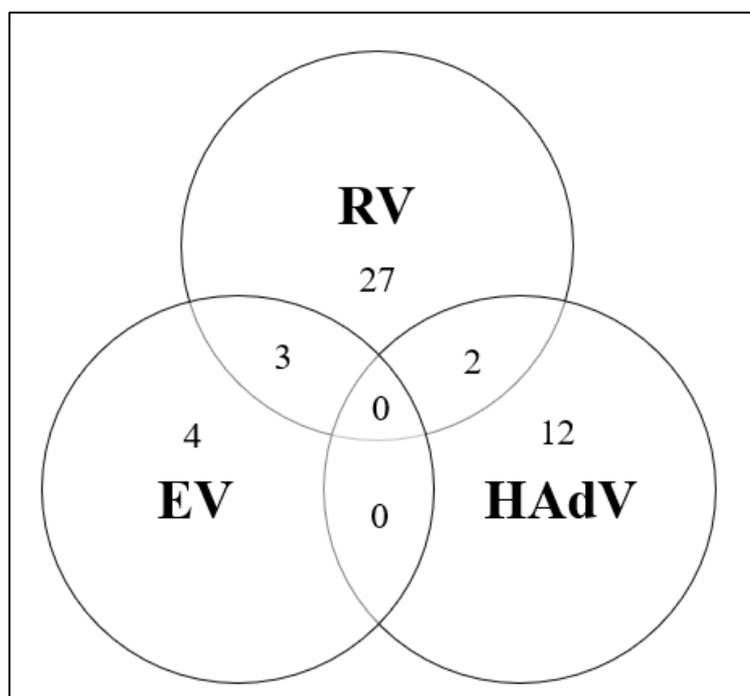


Figura 17. Gráfico de Venn mostrando a distribuição das amostras em relação aos indicadores analisados.

Quando realizadas as análises das associações entre os tipos de fontes de água para consumo com os indicadores virais, a presença de Rotavírus apresentou aproximadamente quatro vezes superior ao de Enterovírus e duas vezes superior ao Adenovírus. As fontes com maiores proporções foram poços rasos escavados e poços tubulares rasos. Rotavírus apresentou associação estatisticamente significativa com poços tubulares rasos (minipoços): OR = 3.03 [1.13 a 8.11; p-valor = 0.02] (Figura 18a), já para poço raso escavado não houve associação estatística, com OR = 1.89 [0.74 a 4.77; p-valor = 0.17] (Figura 18b). Os valores também foram representados na Tabela 7.

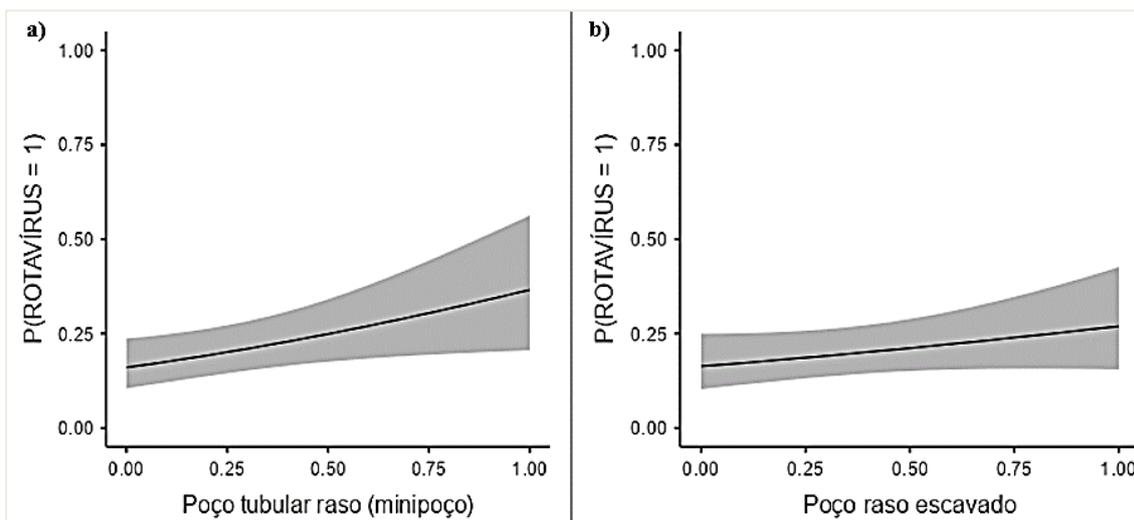


Figura 18. Associação entre presença de Rotavírus e os tipos de fontes “poço raso escavado” e “poço tubular raso”.

Tabela 7. Associação entre Rotavírus e poços rasos, resultados detalhados.

Variáveis independentes	Estimado	SE	Z	p-valor	Odds ratio	95% Intervalo de confiança	
						Inferior	Superior
Intercepto	-1.851	0.324	-5.71	< .001	0.157	0.0832	0.297
Poço tubular raso (minipoço)	<b>1.109</b>	<b>0.503</b>	<b>2.2</b>	<b>0.027</b>	<b>3.03</b>	<b>1.1311</b>	<b>8.118</b>
Poço raso escavado	0.638	0.472	1.35	0.177	1.892	0.7496	4.775

Nota: As estimativas representam o logaritmo da razão de possibilidades (odds ratio) de “ROTAVÍRUS=1” vs “ROTAVÍRUS=0”  
SE: Standard Error (erro padrão)  
Z: Tamanho global de efeito  
p-valor: Indica a probabilidade de se ter uma diferença tão grande ou maior do que a observada em uma hipótese nula. O valor de corte para rejeitar uma hipótese nula é de 0,05 ( $\leq 5\%$ )

As demais fontes e vírus não apresentaram associações estatisticamente significantes (Tabela 8).

Tabela 8. Regressão logística binária, resultados sem significância estatística.

<i>Adenovirus</i>						95% Intervalo de Confiança	
Preditor	Estimado	SE	Z	p-valor	Odds ratio	Inferior	Superior
Poço tubular profundo (artesiano)	0.282	0.684	0.412	0.68	1.3261	0.3468	5.071
Poço raso escavado	-0.588	0.67	-0.877	0.38	0.556	0.1494	2.065
Manancial superficial	-16.43	1537.401	-0.0107	0.991	7.32E-08	0	Inf
Nascente	0.288	0.807	0.356	0.721	1.333	0.2742	6.484

<b>Cisterna (água de chuva)</b>	0.701	0.698	1	0.315	2.0156	0.5134	7.914
<b>Poço tubular raso (minipoço)</b>	0.463	0.622	0.745	0.456	1.5892	0.47	5.374
<b>Caminhão Pipa</b>	-13.3	1455.398	-	0.993	0.00000167	0	Inf
			0.00914				
<b>Rotavirus</b>						<b>95% Intervalo de Confiança</b>	
<b>Preditor</b>	<b>Estimado</b>	<b>SE</b>	<b>Z</b>	<b>p</b>	<b>Odds ratio</b>	<b>Inferior</b>	<b>Superior</b>
<b>Poço tubular profundo (artesiano)</b>	0.474	0.495	0.958	0.338	1.606	0.609	4.235
<b>Manancial superficial</b>	-16.33	932.481	-0.0175	0.986	8.08E-08	0	Inf
<b>Nascente</b>	-1.49	1.051	-1.42	0.157	0.226	0.0288	1.77
<b>Cisterna (água de chuva)</b>	-0.323	0.663	-0.487	0.626	0.724	0.198	2.654
<b>Caminhão Pipa</b>	-14.19	1455.398	-	0.992	6.89E-07	0	Inf
			0.00975				
<b>Enterovirus</b>						<b>95% Intervalo de Confiança</b>	
<b>Preditor</b>	<b>Estimado</b>	<b>SE</b>	<b>Z</b>	<b>p</b>	<b>Odds ratio</b>	<b>Inferior</b>	<b>Superior</b>
<b>Poço tubular profundo (artesiano)</b>	-0.118	1.103	-0.107	0.915	0.8889	0.1024	7.719
<b>Poço raso escavado</b>	-0.0815	0.855	-0.0953	0.924	0.9217	0.1725	4.926
<b>Manancial superficial</b>	-15.61	1537.401	-0.0102	0.992	1.66E-07	0	Inf
<b>Nascente</b>	0.348	1.112	0.313	0.754	1.4167	0.1602	12.5255
<b>Cisterna (água de chuva)</b>	-16.62	2467.14	-	0.995	0	0	Inf
			0.00674				
<b>Poço tubular raso (minipoço)</b>	1.2	0.792	1.52	0.13	3.3214	0.7035	15.6818
<b>Caminhão Pipa</b>	-13.49	2399.545	-	0.996	0.00000138	0	Inf
			0.00562				

Ao utilizar o fluoróforo *TaqMan*®, houveram problemas na amplificação de HAdV e RV. Somente foi possível a amplificação para EV, porém os resultados obtidos demonstraram que não houve a amplificação de cDNA de EV nas amostras de água analisadas.

Os dados das amostras analisadas de fontes individuais e coletivas utilizadas para o consumo humano nas áreas rurais do Estado de Goiás, demonstraram contaminação fecal identificada pelos indicadores virais RV, HAdV e EV. Ao todo, 30% das amostras apresentaram contaminação fecal e todos os subtipos de fontes subterrâneas tiveram a presença de pelo menos uma espécie viral. Isso implica que a qualidade e segurança microbiológica dessas águas estão em risco, pois estão sendo expostas a vírus entéricos e a população rural que a consome está exposta às doenças associadas.

A ineficiência ou ausência de proteção nos recursos hídricos pode introduzir inúmeros patógenos, como vírus, bactérias e outros microrganismos, tornando-os inadequados para o consumo e causando surtos de veiculação hídrica. A identificação desses patógenos por meio da análise de água é essencial para sua identificação e monitoramento, permitindo as devidas ações para a eliminação desses microrganismos, antes que a água seja distribuída para o consumo humano (Faccin-Galhardi et al. 2013).

A presença de HAdV, RV e EV em amostras de água são relatadas em diversos estudos (Vecchia et al. 2012; Vieira et al. 2012; Kluge et al. 2014; Ahmad et al. 2016; da Luz et al. 2017; Lima et al. 2021; Pang et al. 2021; Sorensen et al. 2021), demonstrando serem bons indicadores de contaminação fecal em matrizes de água. RV foi o tipo viral mais efetivo em identificar contaminação fecal em amostras de poço (raso escavado, tubular raso e tubular profundo). Por outro lado, o tipo viral HAdV demonstrou maior contaminação em amostras de nascente e o tipo viral EV, demonstrou maior contaminação em poço tubular raso.

A maioria dos estudos realizados sobre a prevalência de vírus entéricos em amostras de fonte de água em regiões rurais do Brasil, ocorrem na região Sul do país. No estudo feito por Giron et al. (2013) não foi identificado HAdV em nenhuma amostra coletada de rio. Já no estudo feito por Spilki et al. (2013), a prevalência de HAdV foi maior do que encontrada neste estudo, com 66,66%, já RV e EV foram identificados na mesma prevalência, com 6,67%, valores menor e maior, respectivamente, do que encontrados no trabalho (20% e 4,4%). Quando Staggemeier et al. (2015) pesquisaram EV e HAdV em amostras de água e sedimentos, encontraram uma prevalência menor do que no presente estudo para EV, com 1,8%, e uma prevalência superior para HAdV, com 87,3%. Em relação a concentração média, Staggemeier et al. (2015) encontrou valor superior para HAdV ( $4,35 \times 10^6$  CG/L) do que no estudo apresentado ( $1,9 \times 10^6$  CG/L). Em

uma região do país diferente dos estudos encontrados, na região rural do Amazonas, Miagostovich et al. (2008) encontraram uma prevalência para RV superior do que este estudo, com 28,6% e para HAdV sua prevalência foi menor, com 3,6%.

Foi encontrado um estudo que pesquisou a prevalência de vírus entéricos em regiões rurais do Estado de Goiás. Lima et al. (2021), pesquisou HAdV e EV em águas que abastecem residências rurais a partir de fontes individuais. Em seu estudo, foi determinada uma prevalência de 52,6% e 5,1%, para HAdV e EV, respectivamente. RV, HAdV e EV analisados em amostras de água de fontes coletivas e individuais, detectados neste trabalho, apresentaram taxas de detecção de 20%, 9,4% e 4,4%, respectivamente. As concentrações médias encontradas (CG/L) foram maiores para HAdV neste estudo ( $1,9 \times 10^6$  CG/L), enquanto no estudo de Lima et al. (2021), foi encontrado  $7,51 \times 10^5$  CG/L. Já a concentração para EV foi menor, encontrando  $7,1 \times 10^5$  CG/L, e para Lima et al. (2021),  $1,89 \times 10^6$  CG/L.

Alguns estudos sugerem que tanto HAdV quanto EV sejam utilizados como os principais indicadores virais de contaminação fecal humana (Vieira et al. 2012; Lima et al. 2021; Masachessi et al. 2020), devido sua disseminação e estabilidade no meio ambiente, além de sua resistência aos processos de tratamento de água e esgoto. Porém, a maior frequência de RV encontrada em amostras de água neste estudo, confirma que estes vírus também devem ser considerados potenciais indicadores de contaminação fecal (WHO 2017).

Considerado o principal causador de diarreia aguda em humanos e várias espécies de animais, o Rotavírus grupo A é o grupo mais comum e difundido, sendo endêmico em todo o mundo. A espécie A de Rotavírus tem sido encontrada com elevada frequência em amostras de água de recreação, águas residuais e em água tratada (Vieira et al. 2012; Staggemeier et al. 2017; Miura et al. 2019; Cioffi et al. 2020). RV se apresentou como um bom indicador de contaminação fecal no atual trabalho, pois em 16,9% (27/160) das amostras contaminadas houve detecção exclusiva desse vírus. Surtos de infecção não relatados nas áreas do estudo, a eliminação de fezes com altas concentrações do vírus (que podem chegar de  $10^8$  a  $10^{11}$  partículas/grama de fezes) por pacientes infectados, além de características próprias do vírus, podem explicar sua maior detecção nas amostras comparada aos outros indicadores virais (Meng et al. 1987; Fong & Lipp 2005, Espinosa et al. 2008, Barardi et al. 2012; Cioffi et al. 2020).

Em relação a suas características virais que auxiliam na sua maior prevalência, os RVs demonstram grande resistência aos fatores ambientais e aos processos físico-

químicos utilizados para o tratamento de água para abastecimento e de esgoto. Possuem resistência a alterações de pH, sendo inativados apenas em pH de 11,5, além de manterem estabilidade em umidades relativamente baixas. Seu RNA fita dupla está envolto por um capsídeo com camada tripla de proteína, características que conferem ao vírus maior resistência às atividades de endonucleases e proteção contra radiações através da luz UV. (Meng et al. 1987; Fong & Lipp 2005, Espinosa et al. 2008, Barardi et al. 2012; Cioffi et al. 2020).

A frequência dos vírus entéricos presentes no meio ambiente representa a sua prevalência na população local (Apostol et al. 2012; Tiwari & Dhole, 2018). No presente estudo, a baixa prevalência encontrada para EV (espécie C) pode ser explicada em função da sua baixa circulação na população estudada (Lima et al. 2021) e possivelmente fatores intrínsecos ao vírus, como RNA de fita simples, conferiu ao vírus menor resistência a fatores que afetam sua presença nas fontes de água, como luz UV, temperatura e pH. O RNA é lábil e pode ser hidrolisado em pH ácido e alcalino e destruído por radiação ou processos enzimáticos (Carter 2005).

Para o presente estudo, foram utilizados oligonucleotídeos específicos para a espécie C de HAdV (1, 2, 5, 6), que é principalmente relacionada à infecção respiratória em crianças, porém sua importância nas gastroenterites não pode ser excluída. Indivíduos infectados no trato superior respiratório por HAdV-C são capazes de excretá-los nas fezes em infecções assintomáticas e com sintomas de gastroenterite (Vetter et al. 2015; La Rosa et al. 2015; Esposito et al. 2016; Wu et al. 2019; Lima et al. 2021). Corroborando com os estudos de Quandelacy et al. (2022) e Liu et al. (2022), que devido ao fato de ser um vírus respiratório e as coletas das amostras de água terem sido feitas ainda durante a pandemia da COVID-19, situações como uso de máscaras, distanciamento social e lavagem e higienização das mãos pela população estudada, podem ter diminuído a sua transmissão e assim, implicado na sua baixa prevalência no estudo.

Todos os tipos de fontes de água podem estar sujeitos a contaminação viral, sendo essencial considerar os fatores que influenciam a presença dos vírus nessas matrizes. Os patógenos de interesse para saúde pública, que são transmitidos por veiculação hídrica, podem adentrar em aquíferos por vários meios e mecanismos, como: vazamento de sistemas sépticos, descarga de esgoto com vazamento, a introdução direta de água residual e a percolação de águas superficiais através de poços (John & Rose 2005).

Menor diâmetro de abertura, revestimentos da parede feitos de plástico PVC e maior profundidade, garantindo isolamento e durabilidade, são alguns fatores que tornam

os poços tubulares menos sujeitos a contaminação. Porém, somente essas características não foram suficientes para garantir água livre de contaminação, especialmente por RV (Lima et al. 2021). A análise estatística demonstrou que as fontes com maiores proporções de serem contaminadas por algum dos indicadores virais foram o poço raso escavado e poço tubular raso. O poço tubular raso foi a fonte com maior prevalência dos três indicadores virais, sendo o RV o único indicador viral estatisticamente com mais chances de contaminá-lo (OR = 3.03 [1.13 a 8.11; p-valor = 0.02]).

Os vírus entéricos são os microrganismos mais prováveis de contaminar águas subterrâneas. São capazes de sobreviver por mais tempo nessa fonte, em razão das baixas temperaturas, proteção à luz solar e menor atividade microbiana. Em razão do seu tamanho extremamente pequeno – entre 25 a 100 nm – permite que se infiltrem e passem facilmente pelos poros dos solos, que são capazes de reter bactérias e protozoários maiores, atingindo estas fontes (Borchardt et al. 2007). Ao contrário deste estudo, Haramoto et al. (2018) não encontraram RVA em amostras de poço tubular raso, somente o encontrando em poço raso escavado (5%). No estudo de Ferguson et al. (2012), rotavírus foram encontrados com prevalência de 40% em poços tubulares. Os vírus conseguem se mover a distâncias consideráveis no ambiente subsuperficial. Já foram encontrados em profundidades de 67 metros e migração horizontal de 408 metros até 1.600 metros (Borchardt et al. 2003; Pinon & Vialette 2018).

As chuvas podem aumentar o transporte de vírus, infiltrando-os para baixo até as águas subterrâneas. Além disso, a água de baixa força iônica, como é característica da precipitação, pode ressuspender o vírus que foram aderidos aos grãos do sedimento, aumentando sua concentração nos aquíferos (Allen et al. 2017). As coletas do presente estudo foram realizadas no período chuvoso, podendo este ser um fator que afetou na detecção dos vírus em amostras de fontes subterrâneas.

No que diz respeito ao aspecto construtivo dos poços, Allen et al. (2017) demonstraram que a probabilidade de detecção de vírus foi positivamente associada ao comprimento do intervalo aberto no poço (por exemplo, parte do poço sem revestimento, em contato direto com o aquífero). Poços tubulares com intervalos abertos mais longos são mais propensos a capturar um maior fluxo de águas subterrâneas, aumentando assim a probabilidade de incluir no fluxo um gradiente de fonte de vírus.

Em áreas ao redor de poços com bombeamento, o potencial de contaminação aumenta porque a água da zona de contribuição, que corresponde à área de recarga do aquífero e que flui em direção à captação, é puxada para o poço e para o aquífero

circundante. Sob certas condições, o bombeamento também pode fazer com que a água subterrânea (e contaminantes associados) de outro aquífero entre no que está sendo bombeado (USEPA 1991).

Além de problemas na estrutura e vedação do poço, fontes de contaminação que estão a uma distância de até 10 metros, problemas com a vedação da bomba do poço, e latrinas próximas ao poço, que devido a sua falta de encanamento e facilitam na percolação de excretas no solo, são alguns dos fatores de risco que contribuem para a contaminação viral em poços tubulares (Lutterodt et al. 2018). A presença de latrinas em um raio de 50 m dos locais de coleta do estudo de Verheyen et al. (2009) foi um fator de risco significativo para contaminação viral de poços.

Bradbury et al. (2013) encontraram vírus entéricos humanos em poços tubulares profundos, e seu estudo demonstra que mesmo poços municipais profundamente revestidos em aquíferos confinados podem ser suscetíveis à contaminação por patógenos virais, e o fato de poços tubulares serem considerados livres de contaminação não evitou a contaminação por vírus, nem reduziu substancialmente a porcentagem de sua detecção.

No estudo realizado por Goel et al. (2019), a contaminação microbiana entre os domicílios com poços tubulares profundos foi maior do que entre os domicílios com poços tubulares rasos, sendo que o risco de contaminação microbiana variou de risco intermediário a muito alto. Dado que os usuários de poços tubulares profundos tiveram tempos de armazenamento significativamente maiores e percorreram distâncias maiores para coletar água potável, levanta-se a possibilidade de que a rede esparsa de instalações de poços profundos e problemas subsequentes de acesso possam comprometer o armazenamento seguro e resultar em aumento do risco de qualidade microbiana inadequada. Em muitas comunidades no presente estudo, poços tubulares são utilizados como forma de abastecimento coletivo da região, e a água captada e distribuída à população em algumas comunidades não passa por processo de filtração, e não conta com sistema ativo de desinfecção, podendo armazenar por longos períodos os vírus presentes nessa fonte.

Por mais que a detecção tenha tido prevalência em poços tubulares, não se deve ignorar a ocorrência da contaminação em poços rasos escavados. Tais poços possuem menores profundidades e muitas vezes não têm fatores de proteção, logo falhas nas tubulações e/ou transbordamento de fossas sépticas, presença de animais ao entorno e contaminantes da superfície podem ser levados para os poços através das precipitações,

umentando a contaminação viral nesta fonte (Gotkowitz et al. 2016; Murphy, et al. 2020).

Para a utilização da água de poço para consumo humano ou para abastecer processos produtivos, é necessário passar por processos de tratamento para que, assim atenda aos parâmetros de potabilidade da portaria GM/MS nº 888, de 4 de maio de 2021, do Ministério da Saúde. Além da filtração, na etapa de desinfecção, é possível usar tecnologias como o sistema UV e o gerador de ozônio industrial. Por fim, um sistema de cloração é essencial. Esse processo consiste, geralmente, na adição de uma solução de hipoclorito de sódio à água a fim de gerar cloro residual livre no sistema, podendo ser feito através de bombas dosadoras ou pastilhas (BRASIL 2021).

As águas subterrâneas, ao contrário das superficiais, são um ambiente mais estável sofrendo com poucas mudanças nos seus parâmetros físico-químicos, constituindo uma matriz favorável para a sobrevivência dos vírus (Panizzolo et al. 2022). No estudo de Steyer et al. (2011), a prevalência de RV em águas subterrâneas foi maior que em superficiais. De fato, sua presença em fontes subterrâneas pode ser encontrada em até sete meses após sua contaminação (Espinosa et al. 2008). Nenhum dos vírus pesquisados neste estudo foi encontrado nas matrizes superficiais e por caminhão pipa, que é abastecido por matrizes superficiais.

Em águas superficiais, a maioria dos microrganismos patogênicos e vírus são prontamente inativados quando expostos à radiação solar (luz UV). Outros fatores como a temperatura, dessecação, e presença de microbiota, contribuem efetivamente para a decomposição do patógeno na superfície (John & Rose 2005; Krauss & Griebler 2011). Sabe-se que estes fatores são capazes de desnaturar proteínas, causar danos ao ácido nucleico, ou dissociação do capsídeo. A presença de microrganismos aquáticos nativos, como as bactérias, levaria à produção bacteriana de enzimas proteolíticas, que tem sido sugerida como um mecanismo para a atividade antiviral das bactérias. Outros fatores, como grande diluição dos vírus na água, e a presença de inibidores da PCR também podem ser possíveis causas pela ausência da detecção (Bosch et al. 2007; Gibson et al. 2011; Pinon & Vialette 2018; Health Canada 2019). No caso do caminhão pipa, seu estado de conservação, correta higienização e desinfecção do tanque, além da água que está transportando, receber tratamento com cloro adicional, podem estar prevenindo a contaminação da água pelos indicadores virais.

De todos os subtipos de fontes subterrâneas, as nascentes foram as únicas em que o HAdV demonstrou maior prevalência em relação ao restante dos vírus (11,8%). No

estudo de Lima et al. (2021), sua prevalência chegou a ser maior que o presente estudo, com 52,6%. As amostras positivas para adenovírus e rotavírus, em nascentes, encontrados por Gonella et al. (2016), são explicadas pela presença de animais em seu entorno, que podem estar transmitindo estes agentes, já que está localizada em um parque ecológico. Nascentes que estão dispostas em regiões mais baixas podem estar mais sujeitas a contaminações do que em regiões altas; a densidade humana e atividades agropecuárias também são fatores que podem levar a contaminação dessa fonte (Lima et al. 2021).

Em uma das comunidades que tiveram resultado positivo para contaminação viral em nascente, existe um domicílio em que a fonte de água é uma mina, porém sua água é levada até um poço raso escavado. No entanto, esta nascente estava sem os seus dispositivos de proteção, que são cruciais para evitar a contaminação desta fonte por agentes externos. Em outra comunidade onde foram feitas as coletas, que também tiveram resultado positivo, as nascentes estavam protegidas, mas 100% dos residentes utilizavam fossas negras/rudimentares, estando mais passíveis a contaminação por excretas humanas. Ressalta-se que as fossas se encontravam praticamente no mesmo nível do solo, o que poderia facilitar a entrada de água pluvial no interior da fossa e o extravasamento de efluente, contaminando a nascente.

O uso da água da chuva e sua captação irão variar de acordo com as condições climáticas e hidrológicas, que influenciam no desenho das estruturas usadas para a sua captação. A qualidade da água da chuva também varia de acordo com o clima, localização geográfica, presença de vegetação e sazonalidade (Asghari et al. 2019; Yousefi et al. 2018; Luna et al. 2011). O risco de contaminação por microrganismos é um dos maiores problemas associados à coleta da água de chuva. Nas amostras de cisterna, tanto RV quanto HAdV obtiveram a mesma frequência de detecção (15,8%).

Em todas as amostras de cisterna coletadas, Scalize et al. (2021) encontraram a presença de 100% das amostras com HAdV e 50% com EV. Detritos presentes nas calhas que captam estas chuvas podem ser fontes dos vírus encontrados neste estudo. Os vírus adsorvidos a estes detritos e sedimentos podem ser levados pelo fluxo de água no telhado e nas calhas (Staggemeier et al. 2015; Bae et al. 2019). Outras explicações seriam contaminação fecal por pássaros que defecam na superfície de captação e animais que defecam próximo às cisternas (Waso et al. 2016).

Em uma das comunidades que são feitas as coletadas todos os moradores que captam água da chuva em cisternas, utilizam de fossas negras, localizadas próximas às casas, corroborando com a hipótese de Waso et al. (2016) e Scalize et al. (2021), em que

a contaminação por esses vírus pode ter sido através da atmosfera, por bioaerossóis, já que a digestão do esgoto dentro das fossas, produz gases, que podem levar à aerossolização de partículas virais presentes nas fossas e sua posterior deposição nos telhados.

Uma técnica comumente empregada para a melhoria da qualidade da água que é armazenada em cisternas, consiste no desvio dos primeiros milímetros de chuva, para a diminuição dos índices de impurezas que podem ser trazidas da atmosfera e do telhado, que seriam conduzidas para o tanque. Entretanto, ainda é necessária a desinfecção da água antes do seu consumo. No caso, recomenda-se duas opções para o tratamento dessa água. A primeira opção conta com a filtração da água (filtro de barro), sua fervura por no mínimo três minutos e aeraração (passagem de água várias vezes de um recipiente para outro). A segunda opção é filtrar a água (com filtro de barro), desinfetar utilizando hipoclorito de sódio a 2,5% (duas gotas para cada 1 L) e deixar descansar por meia hora antes de seu consumo (Zanella 2015; Cerqueira et al. 2019).

A técnica de detecção molecular por PCR está surgindo muito rapidamente como um método para detecção de vírus em amostras ambientais. Comparando com a cultura de células, as principais vantagens ao utilizar a PCR para diagnóstico viral incluem alta sensibilidade e especificidade, capacidade de detectar vírus que são cultiváveis ou não, e resultados rápidos, na ordem de horas. A principal desvantagem dos métodos de PCR é que, ao contrário do método de cultura de células, que podem detectar potencialmente qualquer vírus infeccioso capaz de causar infecção na célula cultivada, o método de PCR pode detectar potencialmente vírus infecciosos e vírus não infecciosos. Existem também problemas associados aos limites de detecção e inibição ambiental. Ácidos húmicos e fúlvicos, metais pesados e compostos fenólicos presentes no meio ambiente podem inibir a atividade da enzima polimerase (Fong & Lipp 2005; Hsu et al. 2009; Haramoto et al. 2018).

Neste estudo, o método para concentração das amostras é baseado na estrutura do vírus, dessa forma, a detecção de material genético livre será reduzida, contudo não significa que a estrutura viral seja infecciosa (Hamza et al. 2009; Fongaro et al. 2013). Logo, o genoma viral detectado pode não ser considerado risco à saúde da população devido à infecção pelo vírus em específico, porém revela que há contaminação fecal e riscos que estão associados a ela (La Rosa et al. 2017).

Algumas medidas como uso de ponteiras de pipeta resistentes a aerossóis ou pipetas de deslocamento positivo, descontaminação de instrumentos entre experimentos

e separação física de produtos pré e pós-PCR, são necessárias no processamento das amostras, evitando a contaminação cruzada e garantindo a qualidade dos produtos de PCR, e assim diminuindo a taxa de resultados falso-positivos (Fong & Lipp 2005).

O corante *SybrGreen*<sup>®</sup> é um corante de fluorescência que se liga em qualquer DNA de fita dupla, emitindo sinal somente quando ligado. A cada ciclo de PCR que aumenta a quantidade de fragmentos de DNA, maior seu sinal de fluorescência. Uma desvantagem no uso desse corante é que as sondas de oligonucleotídeos usadas às vezes não são tão específicas quanto deveriam, causando ruído que ocorre devido à amplificação de DNA não viral e/ou amplificação inespecífica (Ibrahim et al. 2021).

Devido a isso, o método *TaqMan*<sup>®</sup> foi proposto para corrigir esse problema. Seu método baseia-se na fluorescência através de sondas de DNA, específicas para o fragmento de DNA. Esta sonda contém um marcador de fluoróforo que é liberado e se torna ativo quando a sonda se liga ao seu alvo. Portanto, à medida que mais DNA viral é amplificado a cada ciclo de PCR, mais fluoróforo é liberado e o sinal é aumentado. Sua utilização não é tão abrangente, devido a seu alto custo quando comparado ao *SybrGreen*<sup>®</sup> (Ibrahim et al. 2021).

Neste estudo foram feitas pesquisas utilizando-se os dois métodos. Ao contrário do que foi encontrado para *SybrGreen*<sup>®</sup>, a sonda *TaqMan*<sup>®</sup> não conseguiu detectar as espécies de Enterovírus pesquisadas nas amostras. Diferenças nos *kits* comerciais utilizados para extração do material genético, substâncias orgânicas capazes de interferir na etapa da formação de cDNA para EV e RV, além de possível degradação do RNA durante o transporte das amostras com prováveis ciclos de congelamento/descongelamento ou mau pareamento dos oligonucleotídeos utilizados, podem ser fatores na diferença da detecção.

- Comparado aos demais indicadores virais, Rotavírus apresentou uma maior prevalência nas amostras de água (20%), principalmente em fontes subterrâneas (23,8%). Apresentou associação estatística com fonte de poço tubular raso, onde também foi sua maior prevalência (32,2%). RV podem sobreviver por até sete meses nas águas subterrâneas.
- Foi observada uma menor prevalência de adenovírus com 9,4%, frente aos rotavírus, sendo que em amostras de nascentes apresentou a maior indicação de contaminação viral entre os três vírus (11,8%).
- EV apresentou a menor prevalência, com 4,4%. Sua maior prevalência foi em poço tubular raso, com 9,7%.
- Nenhuma amostra para manancial superficial e caminhão-pipa apresentou contaminação pelos indicadores virais.
- A maior concentração média em cópias genômicas/L foi encontrada por HAdV, com  $1,9 \times 10^6$  CG/L. Em amostras de fontes subterrâneas e água de chuva armazenada em cisterna, RV teve a maior média geométrica, com  $5,3 \times 10^7$  e  $7,4 \times 10^5$ , respectivamente.
- A falta ou ineficácia dos serviços de saneamento básico contribuem para agravar os níveis de degradação dos ecossistemas aquáticos e a disseminação viral no ambiente. Ao todo, 30% das amostras tiveram contaminação por um dos indicadores virais. Os resultados deste trabalho revelam a necessidade de um maior incentivo aos serviços de saneamento básico em áreas rurais, além da adoção de um ou mais métodos para o tratamento de água citados ao longo do trabalho junto com as informações destes vírus nestas comunidades, para que se diminuam os riscos à saúde da população por patógenos de veiculação hídrica, principalmente no nosso Estado.

## REFERÊNCIAS

---

Ahmad T, Arshad N, Adnan F, et al. Prevalence of Rotavírus, adenovirus, hepatitis A virus and enterovirus in water samples collected from different region of Peshawar, Pakistan. *Ann Agric Environ Med* 23(4):576-580, 2016. doi:10.5604/12321966.1226849.

Akunna JC, O'Keeffe J, Allan R. Reviewing factors affecting the effectiveness of decentralised domestic wastewater treatment systems for phosphorus and pathogen removal. *Desalination and Water Treatment Journal* 91(1): 40-47, 2017.

Allen A, Borchardt MA, Kieke JBA, Dunfield K, Parker BL. Virus occurrence in private and public wells in a fractured dolostone aquifer in Canada. *Hydrogeol J* 25:1117-1136, 2017.

Amaral LA, Filho AN, Junior ODR, Ferreira FLA, Barros LSS. Água de consumo humano como fator de risco à saúde em propriedades rurais. *Rev Saude Publica* 37:510-514, 2003.

ANA. AGÊNCIA NACIONAL DE ÁGUAS. Brasil. Conjuntura dos recursos hídricos no Brasil 2018: informe anual / Agência Nacional de Águas. - Brasília: ANA, 2018.

Apostol LN, Miao MMA, Oshitani H. Characterization of enteroviruses from hand, foot and mouth disease cases in the Philippines, 2012–2017. *IJID* 101(1):501, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2020.09.1304>

Apostol LNG., Imagawa T, Suzuki A, Masago Y, Lupisan S, Olveda R, Oshitani H. Genetic diversity and molecular characterization of enteroviruses from sewage-polluted urban and rural rivers in the Philippines. *Virus genes* 45(2): 207-217, 2012.

Arakaki L, Tollefson D, Kharono B, Drain PK. Prevalence of rotavírus among older children and adults with diarrhea: A systematic review and meta-analysis. *Vaccine* 39:4578-4588, 2021.

Asghari FB, Jaafari J, Yousefi M, Mohammadi AA, Dehghanzadeh R. Evaluation of water corrosion, scaling extent and heterotrophic plate count bacteria in asbestos and polyethylene pipes in drinking water distribution system. *Hum Ecol Risk Assess Int J* 24(4):1138–1149, 2018. <https://doi.org/10.1080/10807039.2017.1407632>

Ashbolt NJ. Microbial contamination of drinking water and disease outcomes in developing regions. *Curr Res Toxicol* 198: 229 – 238, 2004.

Ashbolt NJ. Microbial Contamination of Drinking Water and Human Health from Community Water Systems. *Curr Envir Health Rpt* 2: 95–106, 2015.

Bae S, Maestre JP, Kinney KA, Kirisits MJ. An examination of the microbial community and occurrence of potential human pathogens in rainwater harvested from different roofing materials. *Water Res* 159:406–413, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.watres.2019.05.029>.

Barardi CRM, Viancelli A, Rigotto C, Corrêa AA, Moresco V, Souza DSM, ElMahdy MEI, Fongaro G, Pilotto MR, Nascimento MA. Monitoring viruses in environmental samples. *IJESER* 3: 62-79, 2012.

Bernardino KR, Costa DA, de Oliveira VPS. O desafio do saneamento em comunidades rurais e a importância do monitoramento da qualidade da água. *BOAARL* 14: 255-273, Jul/Dez 2020. DOI 10.19180/2177-4560.v14n22020p255-273.

Boehm AB, Silverman AI, Schriewer A, Goodwin K. Systematic review and meta-analysis of decay rates of waterborne mammalian viruses and coliphages in surface Waters. *Water Research* 164: 1-13, 2019.

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: 1-11, 2013.

Borchardt MA, Bertz PD, Spencer SK, Battigelli DA. Incidence of Enteric Viruses in Groundwater from Household Wells in Wisconsin. *Appl. Environ. Microbiol* 69:1172-1180, 2003.

Borchardt MA, Bradbury KR, Gotkowitz, MB, Cherry JA, Parker BL. Human enteric viruses in groundwater from a confined bedrock aquifer. *Environ. Sci. Technol* 41(18): 6606-6612, 2007.

Bosch, A. Human enteric viruses in the water environment: a minireview. *Internatl Microbiol* 1: 191-196, 1998.

Bosch, A. Human Viruses in Water. Elsevier Science. 3 de outubro de 2007.

Bouseettine R, Hassou N, Bessi H, Ennaji MM. Waterborne Transmission of Enteric Viruses and Their Impact on Public Health. In: Emerging and Reemerging Viral Pathogens: Fundamental and Basic Virology Aspects of Human, Animal and Plant Pathogens. Volume 1, cap. 40, p. 907-932, Elsevier, 2020.

Borghetti NRB, Borghetti JR, Filho EFR. Groundwaters and Aquifers. In: *A integração das águas: Revelando o verdadeiro Aquífero Guarani*. Grupo Integrado de Aquicultura e Estudos Ambientais. Curitiba, 2011.

Bradbury KR, Borchardt MA, Gotkowitz M, Spencer SK, Zhu J, Hunt RJ. Source and transport of human enteric viruses in deep municipal water supply wells. *Environ. Sci. Technol* 47(9): 4096-4103, 2013.

BRASIL. Política Nacional de Recursos Hídricos. Lei nº 9.433, 8 de janeiro de 1997.

BRASIL. Orientações técnicas. FUNASA, 2006.

BRASIL, Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Vigilância e controle da qualidade da água para consumo humano. Brasília – DF: Ministério da Saúde, 2006. Disponível em:

[https://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/vigilancia\\_controle\\_qualidade\\_agua.pdf](https://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/vigilancia_controle_qualidade_agua.pdf).

Acessado em: 27 abr 2021.

BRASIL. Boas práticas no abastecimento de água: procedimentos para a minimização de riscos à saúde. Ministério da Saúde, Brasília, 2006.

BRASIL. Lei nº 11.445, de 5 de janeiro de 2007. Estabelece as diretrizes nacionais para o saneamento básico. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 8 jan. 2007. Disponível em: [https://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/\\_ato2007-2010/2007/lei/111445.htm](https://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2007-2010/2007/lei/111445.htm). Acesso em: 12 fev. 2022.

BRASIL, Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde, Coordenação de Vigilância das Doenças de Transmissão Hídrica e Alimentar. Vigilância do Rotavírus no Brasil, 2009.

BRASIL. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. Manual de Saneamento. 4. ed. – Brasília: Funasa, 2015. 642 p. il.

BRASIL. Anexo XX da Portaria de Consolidação Nº 5 de 03 de outubro de 2017. Do controle e da vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade. Ministério da Saúde. Brasília, 2017.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Saúde Ambiental, do Trabalhador e Vigilância das Emergências em Saúde Pública. Curso básico de vigilância da qualidade da água para consumo humano: módulo II: abastecimento de água. Brasília, 2020.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Diagnóstico do abastecimento de água para consumo humano no Brasil em 2019. Boletim Epidemiológico, Brasília, v. 51, n.13, Mar. 2020.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria GM/MS nº 888, de 4 de maio de 2021. Altera o Anexo XX da Portaria de Consolidação GM/MS nº 5, de 28 de setembro de 2017, para dispor sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para

consumo humano e seu padrão de potabilidade. Diário Oficial da União. Brasília, DF, 07 Mai 2021. Disponível em: [https://www.in.gov.br/en/web/dou/-/portaria-gm/ms-n-888-de-4-de-maio-de-2021-](https://www.in.gov.br/en/web/dou/-/portaria-gm/ms-n-888-de-4-de-maio-de-2021-318461562#:~:text=1%C2%BA%20Esta%20Portaria%20disp%C3%B5e%20sobre,Art.)

318461562#:~:text=1%C2%BA%20Esta%20Portaria%20disp%C3%B5e%20sobre,Art. Acesso em: 16 Jan 2022.

Cabral LN, Araújo SMS de. Qualidade da água em áreas rurais: análise bacteriológica e físico-química das águas dos tanques de pedra das comunidades KM 21 (Campina Grande) e Pedra Redonda (Pocinhos). *Rev. Bras. Geogr. Fís* 9: 1737-1753, 2016. DOI 10.26848/rbgf.v9.6.p1737-1753.

Calgaro HF, Filho JB. O Esgoto Doméstico no Meio Rural: Tratamento e Implicações para a Saúde Humana. São Paulo, 2020.

Cao Y, Yu M, Dong G, Chen B, Zhang B. Digital PCR as an Emerging Tool for Monitoring of Microbial Biodegradation. *Molecules* 25(3):1-18, 2020. DOI: 10.3390/molecules25030706.

Carter M. J. Enterically infecting viruses: pathogenicity, transmission and significance for food and waterborne infection. *J Appl Microbiol* 98(6):1354-80, 2005. DOI: 10.1111/j.1365-2672.2005.02635.x.

CDC. Informativo do One Health Office. Centers for Disease Control and Prevention. 2020. Disponível em: [https://www.cdc.gov/onehealth/who-we-are/one-health-office-fact-sheet.html?CDC\\_AA\\_refVal=https%3A%2F%2Fwww.cdc.gov%2Fonehealth%2Fmultimedia%2Ffactsheet.html](https://www.cdc.gov/onehealth/who-we-are/one-health-office-fact-sheet.html?CDC_AA_refVal=https%3A%2F%2Fwww.cdc.gov%2Fonehealth%2Fmultimedia%2Ffactsheet.html). Acesso em: 05 de dezembro de 2022.

CDC. Global WASH (Water, Sanitation, & Hygiene) Fast Facts. US. Centers for Disease Control and Prevention, 2022. Disponível em: [https://www.cdc.gov/healthywater/global/wash\\_statistics.html#:~:text=3.6%20billion%20people%2C%20nearly%20half,million%20people%20practice%20open%20defecation.](https://www.cdc.gov/healthywater/global/wash_statistics.html#:~:text=3.6%20billion%20people%2C%20nearly%20half,million%20people%20practice%20open%20defecation.) Acesso em: 25 de outubro de 2022.

CDC. Fontes de Água US Centers for Disease Control and Prevention, 2022. Disponível em: [https://www.cdc.gov/healthywater/drinking/public/water\\_sources.html](https://www.cdc.gov/healthywater/drinking/public/water_sources.html). Acesso em: 20 de Abril de 2022.

CDC. One Health Basics. Centers for Disease Control and Prevention, 2022. Disponível em: <https://www.cdc.gov/onehealth/basics/index.html>. Acesso em: 05 de Dezembro de 2022.

CERHí. Conselho Estadual de Recursos Hídricos. Resolução CERHí nº22/2019: Estabelece o Regulamento do Sistema de outorga das águas de domínio do Estado de Goiás e dá outras providências. Goiás, 2019.

Cerqueira TB, de Oliveira EJA, da Silva RF, Domingues MAO, Lyra MRCC. CONSIDERAÇÕES SOBRE A QUALIDADE DE ÁGUA PLUVIAL ARMAZENADA EM CISTERNAS E SUA DESINFECÇÃO COM ENERGIA SOLAR. *Revista Brasileira de Energia Solar* X(2): 104-110, 2019.

Chen J, Wilson CR, Famiglietti JS, Scanlon BR. Groundwater Storage Monitoring From Space. In: Liang S. Comprehensive Remote Sensing. *Environ. Earth Sci* 4:295—314, 2018.

Chen L, Deng Y, Dong S, Wang H, Li P, Zhang H, Chu W. The occurrence and control of waterborne viruses in drinking water treatment: A review. *Chemosphere* 281: 1-11, 30 abr. 2021. DOI 10.1016/j.chemosphere.2021.130728.

Cioffi B, Monini M, Salamone M, Pellicanò R, Di Bartolo I, Guida M, La Rosa G, Fusco G. Environmental surveillance of human enteric viruses in wastewaters, groundwater, surface water and sediments of Campania Region. *Reg. Stud. Mar. Sci* 38:1-13, 2020.

CNM. Confederação Nacional de Municípios – CNM Coletânea Guias de Reaplicação (5 volumes) - Programa SALTA-Z - Abaetetuba/PA. Brasília: CNM, 2019.

Coelho CL. Análise microbiológica da água: técnica de PCR. Lisboa [Dissertação de Mestrado em Ciências Farmacêuticas – Faculdade de Farmácia/Universidade de Lisboa], 2020.

Comerlato J, Oliveira LK, Spilki FR. Enterovírus como indicadores de qualidade da água. *R. bras. Bioci* 9(1):114-125, 2011.

Corsi SR, Borchardt MA, Spencer SK, Hughes PE, Baldwin AK. Human and bovine viruses in the Milwaukee River watershed: hydrologically relevant representation and relations with environmental variables. *Sci. Total Environ* 490: 849-860, 2014.

Costa I, Linhares AC, Cunha MH, Tuboi S, Argüello DF, Justino MCA, Gopala K, Ortega-Barria E, Colindres R. Sustained Decrease in Gastroenteritis-related Deaths and Hospitalizations in Children Less Than 5 Years of Age After the Introduction of Rotavirus Vaccination: A Time-Trend Analysis in Brazil (2001-2010). *Pediatr Infect Dis J* 35, n.6, p.180-90, 2016.

Costa RNP, Pinheiro EM. O Cenário do Saneamento Básico no Brasil. *Educação Ambiental em Ação* n. 66, 6 dez. 2018. Disponível em: <https://www.revistaea.org/artigo.php?idartigo=3523>. Acesso em: 2 mar. 2022.

da Costa WF, Teixeira KRS, Mello RR, Marques AAA, Ajuz TML, dos Santos ED, dos Santos LS, Vivi VK. Análise bacteriológica da água e o perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos das *Escherichia Coli* isoladas. *J Health NPEPS* 1(2): 160-177, 2016.

da Luz RB, Staggemeier R, Fratta LXS, Longo L, Schutz R, Soliman MC, Kluge M, Fabres RB, Schenkel GC, Bruni FP, Fleck JD, Picoli SU, Spilki FR. Contaminação viral e bacteriana em águas subterrâneas na porção aflorante do Aquífero Guaraní, município de Ivoti, RS. *Rev. Ambient. e Agua* 12: 871-880, 2017. DOI <https://doi.org/10.4136/ambi-agua.2068>.

da Silva EE, de Azevedo JRM, Costa EV. Enterovírus de Importância Médica. In: Coura JR. *Dinâmica das Doenças Infecciosas e Parasitárias*. Rio de Janeiro: Guanabara & Koogan; 2005. p. 1681 – 1700.

de Andrade GF, de Barros DB. Bioindicadores Microbiológicos para Indicação de poluição Fecal. *Revista Eletrônica Acervo Saúde* 34: 1-7, 2019. DOI: <https://doi.org/10.25248/reas.e1099.2019>

de Castro RPT. Avaliação das condições construtivas das captações de água do Assentamento Canudos em Goiás. Goiânia [Programa de Graduação da Escola de Engenharia Civil da Universidade Federal de Goiás – EECA/UFG], 2011.

de Flora S, De Renzi GP, Badolati G. Detection of animal viruses in coastal sea water and sediments. *Appl. Microbiol* 30(3): 472–475, 1975.

Di Bernardo L, Paz LPS. Seleção de Tecnologias de Tratamento de Água. São Carlos: Editora LDiBe, v2, p. 1560, 2008.

dos Santos WB, Bernardino FG, Silva LLS, Ferreira WB. Sistemas alternativos coletivos de abastecimento de água no Brasil. E-Book V CONAPESC. Campina Grande: Realize Editora, p. 1047-1061, 2021. Disponível em: <<https://www.editorarealize.com.br/index.php/artigo/visualizar/74035>>. Acesso em: 25/10/2022.

Silva WTL. Saneamento Básico Rural. Embrapa. Brasília, 2014.

Ercumen A, Pickering AJ, Kwong LH, Arnold BF, Parvez SM, Alam M, Sen D, Islam S, Kullmann C, Chase C, Ahmed R, Unicomb L, Luby SP, Colford Jr JM. Animal feces contribute to domestic fecal contamination: evidence from E. coli measured in water, hands, food, flies, and soil in Bangladesh. *Environ Sci Technol* 51(15): 8725-8734, 2017.

Espinosa AC, Mazari-Hiriart M, Espinosa R, Maruri-Avidal L, Méndez E, Arias CF. Infectivity and genome persistence of rotavirus and astrovirus in groundwater and surface water. *Wat Res* 42: 2618-2628, 2008.

Esposito, S., Zampiero, A., Bianchini, S., Mori, A., Scala, A., Tagliabue, C., ... Principi, N. Epidemiology and clinical characteristics of respiratory infections due to adenovirus in children living in Milan, Italy, during 2013 and 2014. *PloS one* 11(4): 2016.

Estes MK, Kapikian AZ. Rotavirus and their replication. *Fields Virology* 5 ed. Philadelphia: Lipincott p.1917-1974, 2007.

Faccin-Galhardi LC, Lopes N, Espada SF, Linhares REC, Pelayo JS, Nozawa C. Waterborne Viral Pathogens: Detection, Control And Monitoring Of Water Quality For Human Consumption. *Sociedade Brasileira de Virologia* 18: 1-9, 10 jun. 2013. DOI 10.17525/vrrjournal.v18i1-2.65.

Ferguson AS, Layton AC, Mailloux BJ, Culligan PJ, Williams DE, Smartt AE, Saylor GS, Feighery J, McKay L, Knappett PSK, Alexandrova E, Arbit T, Emch M, Escamilla V, Ahmed KM, Alam MJ, Streatfield PK, Yunus M, van Geen A. Comparison of fecal indicators with pathogenic bacteria and rotavirus in groundwater. *Sci Total Environ* 431:314-322, 2012.

Ferreira DC, Grazielle I, Marques RC, Gonçalves J. Investment in drinking water and sanitation infrastructure and its impact on waterborne diseases dissemination: The Brazilian case. *Environ Sci Technol* 779, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.146279>.

Follador K, Prado GP, dos Passos MG, Nothhaft SC. Sanemaneto Básico: Meio Ambiente e Saúde. *UNINGÁ Review* 23: 24-28, 2015.

Follmann AP, Bittencourt KS, Silva TS, Oliveira JV. Tratamento de água em sistemas rurais de abastecimento: alternativas, viabilidade técnica e econômica. XXVI Seminário de Iniciação Científica. Unijuí, 2018.

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 Ver* 69(2):.357–371, 2005. <https://doi.org/10.1128/MMBR.69.2.357-371>.

Fornari BF, Nicodem LF, Fonseca TG, Rossi P, Knoblauch PM, Reis P, Rosa GA, Michelin W, Fongaro G, Viancelli A. Water Contamination by Enteric Virus and Superbugs in Rural Areas and the Implications in the One Health Context, *Int J Environ Stud* 78(5): 1-13, 2020. DOI: 10.1080/00207233.2020.1842001

Fortes ACC, Barrocas PRG, Kligerman DC. A vigilância da qualidade da água e o papel da informação na garantia do acesso. *Saúde debate* [online] 43(3):20-34, 2019. <https://doi.org/10.1590/0103-11042019s302>.

Foster, S.; Tuinhof, A; Kemper, K; Garduño, H.; Nanni, M. Groundwater Management Strategies: facets of the integrated approach. 2003. GW MATE Briefing Note n.3. DOI: 10.13140/RG.2.1.4268.8081.

FUNASA. FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE. Saneamento Rural. Boletim Informativo, Brasília, n.10, 2011.

FUNASA. FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE. Panorama do Saneamento Rural no Brasil. 2018. Disponível em: <http://www.funasa.gov.br/panorama-do-saneamento-ruralno-brasil>. Acesso em: 05 março de 2022.

Gama AR, Scalize P, Gomes R, Filho AVM, Santos MO, Marino NA, Martins WE, Vieira JDG, Barbosa MS, Filho AG, Bataus LA, Pires DJ, Carneiro LC. EVALUATION OF WATER QUALITY FOR CONSUMPTION AND PREVALENCE OF ANTIBIOTICRESISTANT BACTERIA: A STUDY IN QUILOMBOLA COMMUNITIES OF GOIÁS, BRAZIL. *Revista Sapiência: Sociedade, Saberes e Práticas Educacionais*. 8: 157-180, 2019.

Gamazo P, Victoria M, Schijven JF, Alvareda E, Tort LFL, Ramos J, Burutaran L, Olivera M, Lizasoain A, Sapriza G, Castells M, Colina R. Evaluation of Bacterial Contamination as an Indicator of Viral Contamination in a Sedimentary Aquifer in Uruguay. *Food Environ Virol* 10: 305-315, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12560-018-9341-9>.

Gerba CP, Rose JB, Haas CN, Crabtree KD. Waterborne rotavirus: a risk assessment. *Water Res* 30:2929-2940, 1996.

Gibson KE, Opryszko MC, Schissler JT, Guo Y, Schwab KJ. Evaluation of Human Enteric Viruses in Surface Water and Drinking Water Resources in Southern Ghana. *Am. J. Trop. Med. Hyg* 84: 20-29, 2011. DOI 10.4269/ajtmh.2011.10-0389.

Ghernaout D. Water Treatment Challenges towards Viruses Removal. *OALIB* 7: 1-22, 2020.

Girardi V, Demoliner M, Gularte JS, Spilki FR. ‘Don’t put your head under water’: enteric viruses in Brazilian recreational waters. *New Microbes New Infect* 29: 1-6, 2019. DOI 10.1016/j.nmni.2019.100519.

Giron H, Magrini FE, Bortolin TA, Paesi S, Schneider, VE. INCIDÊNCIA DE VÍRUS ENTÉRICOS EM AMOSTRAS AMBIENTAIS NA BACIA HIDROGRÁFICA DO RIO TEGA – RS. XX SIMPÓSIO BRASILEIRO DE RECURSOS HÍDRICOS, 2013. ISSN 2318-0358

Goel V, Islam MS, Yunus M, Ali MT, Khan AF, Alam N, Faruqye ASG, Bell G, Sobsey M, Emch M. Deep Tubewell Microbial Water Quality and Access in Arsenic Mitigation Programs in Rural Bangladesh. *Sci Total Environ* 659:1577-1584, 2019

Gonella JM, Tonani KAA, Fregonesi BM, Machado CS, Trevilato RB, Zagui GS, Alves RIS, Munõz SIS. Adenovírus e rotavírus em águas superficiais do córrego Ribeiro Preto, São Paulo, Brasil. *O Mundo da Saúde* 40(4): 474-480, 2016.

Gotkowitz MB, Bradbury KR, Borchardt MA, Zhu J, Spencer SK. Effects of Climate and Sewer Condition on Virus Transport to Groundwater. *Environ. Sci. Technol* 50: 8497-8504, 2016. DOI: 10.1021/acs.est.6b01422.

GraphPad. GraphPad Software. Versão 9.0. San Diego, California, 2020. Disponível em: <https://www.graphpad.com/>. Acesso em: 6 de Novembro de 2022.

Guimarães AJA, Carvalho DF, Silva LDB. Saneamento e meio ambiente. 2007. Disponível em: [http://www.ufrj.br/institutos/it/deng/leonardo/downloads/APOSTILA/Apostila%20IT%20179/Cap %203.pdf](http://www.ufrj.br/institutos/it/deng/leonardo/downloads/APOSTILA/Apostila%20IT%20179/Cap%203.pdf).

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* 71, 2403-2411, 2005.

Haramoto E, Yamada K, Nishida K. Prevalence of protozoa, viruses, coliphages and indicator bacteria in groundwater and river water in the Kathmandu Valley, Nepal. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 105(12): 711-716, 2011.

Haramoto E, Kitajima M, Hata A, Torrey JR, Masago Y, Sano D, Katayama H. A review on recent progress in the detection methods and prevalence of human enteric viruses in water. *Water Res* 135: 168-186, 2018.

Haramoto, E. Detection of waterborne protozoa, viruses, and bacteria in groundwater and other water samples in the Kathmandu Valley, Nepal. In IOP Conference Series: *Environ. Earth Sci* 120 (1): 2018.

Hamza, I. A., Jurzik, L., Stang, A., Sure, K., Überla, K., Wilhelm, M. Detection of human viruses in rivers of a densely-populated area in Germany using a virus adsorption elution method optimized for PCR analyses. *Water Research* 43(10): 2657-2668, 2009.

Health Canada. Guidelines for Canadian Drinking Water Quality: Guideline Technical Document – Enteric Viruses [online]. Disponível em: <https://www.canada.ca/content/dam/canada/health-canada/migration/healthy-Canadians/publications/healthy-living-vie-saine/water-enteric-virus-enterique-eau/alt/water-enteric-virus-enterique-eau-eng.pdf> . Acesso em: 16 mar 2021.

Heller, L.; Pádua, V. L. Abastecimento de água para consumo humano. Minas Gerais: UFMG, 2006.

Hirata R, Suhogusoff A, Marcellini SS, Villar PC, Marcellini L. As águas subterrâneas e sua importância ambiental e socioeconômica para o Brasil. Instituto de Geociências. São Paulo, 2019. ISBN 978-85-63124-07-4.

Hsu BM, Chen CH, Wan MT, Chang PJ, Fan CW. Detection and identification of enteroviruses from various drinking water sources in Taiwan. *Journal of Hydrology* 365:134-139, 2009.

Huang F, Li Y, Yu W, Jing S, Wang J, Long F, He Z, Yang C, Bi Y, Cao W, Liu C, Hua X, Pan Q. Excretion of infectious hepatitis E virus into milk in cows imposes high risks of zoonosis. *Hepatology* 64(2): 350-359, 2016.

Ibrahim Y, Ouda Kadadou D, Banat F, Naddeo V, Alsafar H, Yousef AF, Barceló D, Hasan SW. Detection and removal of waterborne enteric viruses from wastewater: A comprehensive review. *J. Environ. Chem. Eng* 9(4): 1-25, 2021.

IBGE. INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Censo Brasileiro de 2010. Rio de Janeiro: IBGE, 2012.

Instituto Trata Brasil. Saúde. Disponível em: <http://www.tratabrasil.org.br/saneamento/principais-estatisticas/no-brasil/saude>. Acesso em: 05 de março de 2022.

Iturriza-Gomara M, Green J, Brown DWG, Desslberger U, Gray JJ. Comparison of specific and random priming in the reverse transcriptase polymerase chain reaction for genotyping group A rotaviruses. *J Virol Methods* 78: 93-103, 1999.

Jacinto ACB, Miranda AP, Amaral LA. Avaliação higiênico-sanitária, teores de nitrato, nitrito e cromo em águas de propriedades rurais e suburbanas em Franca, SP. *Brasil. Hig. Aliment.* 19: 92-97, 2005.

Jagai JS, Naumova EN. Waterborne Disease Surveillance. Editor(s): JO Nriagu. *Encyclopedia of Environmental Health*, Elsevier, 2018, pages 715-723.

Jiang SC. Human adenoviruses in water: occurrence and health implications: a critical review. *Environ Sci Technol* 40: 7132-40, 2006.

John DE, Rose JB. Review of Factors Affecting Microbial Survival in Groundwater. *Environ. Sci. Technol.* 39(19): 7345-7356, 2005.

Jamovi. The Jamovi Project. Versão 2.2 [S.l]: [Computer Software], 2021. Disponível em: <https://www.jamovi.org/>. Acesso em: 6 de Novembro de 2022.

Fieldhouse JK, Wang X, Mallinson KA, Tsao RW, Gray GC. A systematic review of evidence that enteroviruses may be zoonotic. *Emerg Microbes Infect* 7: 1-09, 2018. DOI: 10.1038/s41426-018-0159-1.

Fongaro, G., Do Nascimento, M. A., Rigotto, C., Ritterbusch, G., da Silva, A. D. A., Esteves, P. A., Barardi, C. R. Evaluation and molecular characterization of human adenovirus in drinking water supplies: viral integrity and viability assays. *Virology Jornal* 10(1): 166, 2013.

Fongaro G, Silva HD, Elmahdy EM, Magri ME, Schissi CD, Moreira M, Lanna MCS, Silveira-Lacerda EP, Barardi CRM. ENTERIC VIRUSES AS CONTAMINANTS AND BIOINDICATORS IN ENVIRONMENTAL SAMPLES. *Virus Rev. Res* 20(2):1-20, 2015. DOI: 10.17525/vrrjournal.v20i2.255.

Franco, M. Uso de coagulante extraído de sementes de moringa oleífera como auxiliar no tratamento de água por filtração em múltiplas etapas. Campinas, SP, 2010.

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* 68: 1033–39, 2002.

Kluge M, Fleck JD, Soliman MC, Luz RB, Fabres RB, Comerlato J, Silva JVS, Staggemeier R, Vecchia AD, Capalonga R, Oliveira AB, Henzel A, Rigotto C, Spilki FR. Human adenovirus (HAdV), human enterovirus (hEV), and genogroup A rotavirus (GARV) in tap water in southern Brazil. *J Water Health* 12(3): 526-531, 2014.

Krauss S, Griebler C. Pathogenic Microorganisms and Viruses in Groundwater. Alemanha, 2011.

La Rosa G, Fratini M, della Libera S, Iaconelli M, Muscillo M. Emerging and potentially emerging viruses in water environments. *Ann Ist Super Sanita* 48: 397-406, 2012.

La Rosa, G., Della Libera, S., Petricca, S., Iaconelli, M., Donia, D., Saccucci, P., ... Divizia, M. Genetic diversity of human adenovirus in children with acute gastroenteritis, Albania, 2013–2015. *BioMed research international* 2015: 2015.

La Rosa, G., Sanseverino, I., Della Libera, S., Iaconelli, M., Ferrero, V. E. V., Barra Caracciolo, A., Lettieri, T. The impact of anthropogenic pressure on the virological quality of water from the Tiber river, Italy. *Letters in Applied Microbiology* 65(4): 298-305, 2017.

Leite NK, Stolberg J, da Cruz SP, Tavela ADO, Safanelli JL, Marchini HR, Exterkoetter R, Leite GMC, Krusche AV, Johnson, M. S. Hydrochemistry of shallow groundwater and springs used for potable supply in Southern Brazil. *Environ. Earth Sci* 77(3): 80, 2018.

Lima ACP. Avaliação da Qualidade da Água do Aquífero Subterrâneo do Entorno do Centro Industrial de Subaé – Feira de Santana BA. Bahia. 2009.

Lima LR, de Almeida PF, Matos JBTL. PROSPECÇÃO DE TÉCNICAS MOLECULARES (qPCR e FISH) A SEREM UTILIZADAS EM AMOSTRAS AMBIENTAIS PARA PESQUISA NA ÁREA DE BIOTECNOLOGIA. *Cad Prospec.* 9(1): 79-91, 2016. DOI: 10.9771/S.CPROSP.2016.009.010

Lima FS, Scalize OS, Gabriel EFM, Gomes RP, Gama AR, Demoliner M, Spilki FR, Vieira JDG, Carneiro LC. Escherichia coli, Species C Human Adenovirus, and Enterovirus in Water Samples Consumed in Rural Areas of Goiás, Brazil. *Food Environ. Virol* 14(1):77-88, 2022.

Lin J, Ganesh A. Water quality indicators: bacteria, coliphages, enteric viruses. *Int J Environ Health Res* 23(6):484-506, 2013. DOI: 10.1080/09603123.2013.769201. PMID: 23438312.

Liu P, Xu M, Lu L, Ma A, Cao L, Su L, Dong N, Jia R, Zhu X, Xu J. The changing pattern of common respiratory and entericviruses among outpatient children in Shanghai, China:Two years of the COVID-19 pandemic. *J Med Virol* 94: 4696-470, 2022. DOI: doi:10.1002/jmv.27896

Lopes JD, da Silva RM. Aglomerados Rurais: um estudo dos Povoados Goianos. *Conjuntura Econômica Goiana*. 24: 73-88, 2013.

Luchs A, Timenetsky MCST. Group A rotavirus gastroenteritis: post-vaccine era, genotypes and zoonotic transmission. *Basic Sci. Med* 14(2): 278-287, 2016. DOI: doi.org/10.1590/S1679-45082016RB3582.

Luna CF, de Brito AM, Costa AM, Lapa TM, Flint JA, Marcynuk P. The impact of the use of water from water-tanks on the occurrence of diarrhea in the rural population of the central agreste region of the Brazilian state of pernambuco. *Rev Bras Saude Matern Infant* 11:283–292, 2011. <https://doi.org/10.1590/s1519-38292011000300009>

Lutterodt, G., Van de Vossenberg, J., Hoiting, Y., Kamara, A. K., Oduro-Kwarteng, S., Foppen, J. W. A. Microbial groundwater quality status of hand-dug wells and boreholes in the Dodowa area of Ghana. *IJERPH* 15(4): 730, 2018.

Mackowiak, M., Leifels, M., Hamza, I. A., Jurzik, L., Wingender, J. Distribution of *Escherichia coli*, coliphages and enteric viruses in water, epilithic biofilms and sediments of an urban river in Germany. *Science of the Total Environment* 626: 650-659, 2018.

Masachessi G, Prez VE, Michelena JF, Lizasoain A, Ferreyra Ij, Martínez LC, Giordano MO, Barril PA, Paván JV, Pisano MB, Farías AA, Isa MB, Ré VE, Colina R, Nates SV. Proposal of a pathway for enteric virus groups detection as indicators of faecal contamination to enhance the evaluation of microbiological quality in freshwater in Argentina. *Sci. Total Environ* 760:1-8, 2020. DOI 10.1016/j.scitotenv.2020.143400.

Massa KHC, Filho ADPC. Saneamento básico e saúde autoavaliada nas capitais brasileiras: uma análise multinível. *Rev Bras Epidemiol* 23: 1-13, 5 jun. 2020. DOI 10.1590/1980-5497202000050.

Mendonça FC, Almeida RS, de Oliveira DF, Santos AG. Avaliação da qualidade de água para consumo humano em fonte subterrânea na região do recôncavo da Bahia. *Revista Águas Subterrâneas* 33: 1-8, 2 dez. 2019. DOI 10.14295/ras.v33i4.29751.

Meng Z, Birch C, Heath R, Gust I. Physicochemical stability and inactivation of human and simian rotaviruses. *Appl Environ Microbiol* 53: 727-30, 1987.

Miagostovich MP, Ferreira FM, Guimarães FR, Fumian TM, Diniz-Mendes L, Luz SLB, Silva LA, Leite JPG. Molecular Detection and Characterization of Gastroenteritis Viruses Occurring Naturally in the Stream Waters of Manaus, Central Amazônia, Brazil. *Appl Environ Microbiol*. 74(2): 375-382, 2008.

Minitab. Minitab Statistical Software. Versão 19. Pensilvânia, 2022. Disponível em: <https://www.minitab.com/pt-br/>. Acesso em: 6 de Novembro de 2022.

Miura T, Gima A, Akiba M. Detection of Norovirus and Rotavirus Present in Suspended and Dissolved Forms in Drinking Water Sources. *Food Environ Virol*. 11(1): 9-19, 2019.

Mortari N, Yu ALF, Liphaus BL, Ferreira PM, Rodrigues M., Ando JAG, Yassuda YY, Assis DB, Carmona RCC, Machado BC, Timentsky MCS, Carvalhanas TR. Hand-FootMouth Disease: guidelines and outbreaks management. BEPA. Boletim Epidemiológico Paulista (Impresso), v. 15, p. 11-28, 2018.

Mossel E, Estes M, Ramig F. Codificação e localizações de virions de proteínas de Rotavírus e estrutura 3D da partícula de rotavírus [Internet]. 2016. Disponível em: [https://www.reoviridae.org/dsRNA\\_virus\\_proteins/rotavirus%20figure.htm](https://www.reoviridae.org/dsRNA_virus_proteins/rotavirus%20figure.htm). Acesso em 20/04/2022.

Müller ECA, Soares LS, Oliveira DS, Linhares AC, de Sousa MS. Prevalência e diversidade molecular de adenovírus em crianças com gastroenterite aguda grave, em Belém, estado do Pará, antes e após a introdução da vacina contra rotavírus no Brasil. *Rev Pan-Amaz Saude* 8(4): 53-63, 2017. DOI: 10.5123/S2176-62232017000400010.

Murphy HM, McGinnis S, Blunt R, Stokdyk J, Wu JW, Cagle A, Denno DM, Spencer S, Firnstahl A, Borchardt MA. Septic Systems and Rainfall Influence Human Fecal Marker and Indicator Organism Occurrence in Private Wells in Southeastern Pennsylvania. *Environ. Sci. Technol*. 54(6): 3159-3168, 2020. DOI: 10.1021/acs.est.9b05405

Nascimento S, Suarez ER, Pinhal MAS. Tecnologia de PCR e RT-PCR em tempo real e suas aplicações na área médica. *Rev Bras Med* 67(10): 1-9, 2010.

Nóbrega MDAC, Silva NQ, Félix TS, Silva GA, Nóbrega JYL, Soares CM, Coelho DC. Análise físico-química e bacteriológica da água de abastecimento da cidade de São Domingos – PB. *INTESA* 9(1):10, 2015.

OMS. Organização Mundial da Saúde. Mudança Climática e Saúde Humana – riscos e respostas. Brasília, 2008.

OMS. Organização Mundial da Saúde. Fichas Técnicas. Água Potável. 2019. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/drinking-water#:~:text=Water%20and%20health,individuals%20to%20preventable%20health%20risks>.

ONU. Organização Nações Unidas. ONU: 4,5 bilhões de pessoas não dispõem de saneamento seguro no mundo. 2017 Disponível em: <https://nacoesunidas.org/onu-45-bilhoesde-pessoas-nao-dispoem-de-saneamento-seguro-no-mundo/>. Acesso em: 29/10/2022.

Pachepsky Y, Shelton D, Dorner S, Whelan G. Can E. coli or thermotolerant coliform concentrations predict pathogen presence or prevalence in irrigation waters?. *Crit Rev Microbiol* 42(3): 384-393, 2016.

Palla, A., Gnecco, I., Lanza, L. G., La Barbera, P. Performance analysis of domestic rainwater harvesting systems under various European climate zones. *Resources, Conservation and Recycling* 62: 71-80, 2012.

Panizzolo M, Gea M, Carraro E, Gilli G, Bonetta S, Pignata C. Occurrence of human pathogenic viruses in drinking water and in its sources: A review. *Res. J. Environ. Sci.* 2022.

Pang X, Gao T, Qiu Y, Caffrey N, Popadynetz J, Younger J, Lee BE, Neumann N, Checkley S. The prevalence and levels of enteric viruses in groundwater of private wells

in rural Alberta, Canada. *Water Research* 202: 1-7, 10 jul. 2021. DOI 10.1016/j.watres.2021.117425.

Patel MM, Pitzer V, Alonso WJ, Vera D, Lopman B, Tate J, Viboud C, Parashar UD. Global Seasonality of Rotavirus Disease. *Pediatr Infect Dis J* 32(4): 134-147, 2014. DOI: 10.1097/INF.0b013e31827d3b68

Paterniani JES. Tecnologias de Tratamento de Água para pequenas comunidades. Editora Margem da palavra. 2017.

Peres MR, Ebdon J, Purnell S, Taylor H. Potential microbial transmission pathways in rural communities using multiple alternative water sources in semi-arid Brazil. *Int J Hyg Environ Health* 224, 2020.

Pinon A, Vialette M. Survival of Viruses in Water. *Intervirology* 61: 214-222, 10 jan. 2018. DOI 10.1159/000484899.

Piranha JM, Pacheco A. Vírus em águas subterrâneas usadas para abastecimento de comunidades rurais do município de São José do Rio Preto (SP). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ÁGUAS SUBTERRÂNEAS. Cuiabá, 2004.

Potgieter N, Karambwe S, Mudau LS, Barnar T, Traore A. Human Enteric Pathogens in Eight Rivers Used as Rural Household Drinking Water Sources in the Northern Region of South Africa. *Int J Environ Res Public Health* 17: 1-15, 2020.

Prado T, Miagostovich M. P. Virologia ambiental e saneamento no Brasil: uma revisão narrativa. *Cad. Saúde Pública* 30(7): 1367-1378, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1590/0102-311X00109213> .

Pronk W, Zurbrugg C, Swartz C, Pronk W. Decentralized systems for potable water and the potencial of membrane technology. *Wat Res* 43: 245-265, 2008.

Purohit MR, Chandran S, Shah H, Diwan V, Tamhankar AJ, Lundborg CS. Antibiotic Resistance in an Indian Rural Community:A ‘One-Health’ Observational Study on

Commensal Coliform from Humans, Animals, and Water. *Int. J. Environ. Res* 14(4):1-13, 2017.

Quandelacy TM, Adams LE, Munoz J, Santiago GA, Kada S, Johansson MA, Alvarado LI, Rivera-Amil V, Paz-Bailey G. Reduced spread of influenza and other respiratory viral infections during the COVID-19 pandemic in Southern Puerto Rico. *PLoS ONE* 17(4):1-9, 2022. DOI: doi.org/10.1371/journal.pone.0266095

Rigotto C, Victoria M, Moresco V, Kolesnikovas CK, Corrêa AA, Souza DSM, Miagostovich MP, Simões CMO, Barardi CRM. Assessment of adenovirus, hepatitis A virus and rotavirus presence in environmental samples in Florianopolis, South Brazil. *J. Appl. Microbiol* 109: 1979–1987, 2010.

Rodríguez-Lázaro D, Cook N, Ruggeri FM, Sellwood J, Nasser A, Nascimento MSJ, D'Agostino M, Santos R, Saiz JC, Rzezutka A, Bosch A, Girónes R, Carducci A, Muscillo M, Kovac K, Diez-Valcare M, Vantarakis A, von Bonsdorff C-H, Husman AMR, Hernández M, van der Peol WHM. Virus hazards from food, water and other contaminated environments. *FEMS Microbiology Reviews* 36, 2012. DOI 10.1111/j.1574-6976.2011.00306.x.

Rotbart H. Meningitis and encephalitis. In: Rotbart H, ed. *Human Enterovirus Infections*. Washington, DC: ASM Press; 1995; 271–289.

Salvador D, Caeiro MF, Serejo F, Nogueira P, Carneiro RN, Neto C. Monitoring Waterborne Pathogens in Surface and Drinking Waters. Are Water Treatment Plants (WTPs) Simultaneously Efficient in the Elimination of Enteric Viruses and Fecal Indicator Bacteria (FIB)? *Water* 12(10):2824, 2020. Doi: <https://doi.org/10.3390/w12102824>

Santos NOS, Soares, CC. Virologia Clínica: viroses entéricas. In: Santos NSO. *Virologia Humana*. Guanabara Koogan. 3 ed. 209-215p., 2015.

Scalize PS, Gabriel EFM, Lima FS, Arruda PN, Lopes HTL, Reis YP, Carneiro LC, Bezerra NR, Ficcadori FS, Baumann LRF. Physicochemical, microbiological quality, and

risk assessment of water consumed by a quilombola community in midwestern Brazil. *Environ Sci Pollut Res Int* 28(27): 35941-35957, 2021.

Scaratti D, Bezerra NR. Aspectos conceituais e legais do saneamento e sua relação com a saúde. In: Scalize PS, Bezerra, NR. Saneamento Básico Rural. Goiânia: [s. n.], 2020. cap. Tema 1, ISBN 978-65-86422-06-1. Disponível em: [https://files.cercomp.ufg.br/weby/up/688/o/Saneamento\\_Basico\\_Rural.pdf](https://files.cercomp.ufg.br/weby/up/688/o/Saneamento_Basico_Rural.pdf). Acesso em: 2 mar. 2022.

SDG. The Sustainable Development Goals Report. Organização das Nações Unidas. 2022.

SESGO. Secretaria de Estado da Saúde de Goiás Superintendência de Vigilância em Saúde. Situação Epidemiológica do Rotavírus em Goiás. Boletim, Goiás, n 2. 2014.

SENAR. Serviço Nacional de Aprendizagem Rural. Saúde: saneamento rural / Serviço Nacional de Aprendizagem Rural. – Brasília: Senar, 2019.

SEMARH. Secretaria do Meio Ambiente e dos Recursos Hídricos. Superintendência de Recursos Hídricos. Manual Técnico de Outorgas – Goiás, 2012.

Shieh WJ. Human adenovirus infections in pediatric population – an update on clinico-pathologic correlation. *Biomed. J* 45: 38-49, 2022.

Silva HD, Anunciação CE, Santos SFO, García-Zapata MTA. Análise virológica da qualidade da água: uma revisão das metodologias de concentração e detecção viral. *R Bras Bioci* 9(3): 405-415, 2011.

SNIS. Sistema Nacional de Informações sobre Saneamento. Diagnóstico Temático: Serviços de Água e Esgoto. Brasília, 2021. Disponível em: <https://www.gov.br/mdr/pt-br/assuntos/saneamento/snis/produtos-do-snis/diagnosticos>.

Spilki, F. R., Luz, R. B. D., Fabres, R. B., Soliman, M. C., Kluge, M., Fleck, J. D., ... Dasso, M. G. Detection of human adenovirus, rotavirus and enterovirus in water samples

collected on dairy farms from Tenente Portela, Northwest of Rio Grande do Sul, Brazil. *Braz. J. Microbiol* 44(3): 953-957, 2013.

Spilki, F. R. Crise hídrica, saúde e parâmetros de qualidade microbiológica da água no Brasil. *Revista USP* (106): 71-78, 2015.

Springthorpe S, Sattar SA. Virus Removal During Drinking Water Treatment. In: Bosh A. Human Viruses in Water. Elsevier B. V. Canada, 2007.

Sodré FF. Fontes Difusas de Poluição da Água: Características e métodos de controle. *Grupo de Automação, Quimiometria e Química Ambiental* 1: 9-16, 2012.

Sorensen JPR, Aldous P, Bunting SY, McNally S, Townsend BR, Barnett MJ, Harding T, Ragione RML, Stuart ME, Tipper HJ, Pedley S. Seasonality of enteric viruses in groundwater-derived public water sources. *Water Research* 207:1-11, 2021. DOI 10.1016/j.watres.2021.117813.

Staggemeier R, Bortoluzzi M, Heck TMS, da Luz RB, Fabres RB, Soliman MC, Rigotto C, Baldasso NA, Spilki FR, Almeida SEM. Animal and human enteric viruses in water and sediment samples from dairy farms. *Agricultural Water Management* 152:135-141, 2015. DOI 10.1016/j.agwat.2015.01.010.

Staggemeier, R., Heck, T. M., Demoliner, M., Ritzel, R. G., Röhnelt, N. M., Girardi, V., ... Spilki, F. R. Enteric viruses and adenovirus diversity in waters from 2016 Olympic venues. *Science of the Total Environment* 586: 304-312, 2017.

Steyer A, Torkar KG, Gutiérrez-Aguirre I, Poljsak-Prijatelj M. High prevalence of enteric viruses in untreated individual drinking water sources and surface water in Slovenia. *Int J Hyg Environ Health* 214: 392-398, 2014.

Subekti D, Lesmana M, Tjaniadi P, Safari N, Frazier E, Simanjuntak C, Komalarini S, Taslim J, Campbell JR, Oyofa BA. Incidence of Norwalk-like viruses, rotavirus and adenovirus infection in patients with acute gastroenteritis in Jakarta, Indonesia. *FEMS Microbiol. Immunol* 33: 27-33, 2002.

Taing L, Dang N, Agarwal M, Glickman T. Water-related sustainable development goal accelerators: A rapid review. *Wat Secur* 14: 1-10. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.wasec.2021.100100>.

Tajadini M, Panjehpour M, Javanmard SH. Comparison of SYBR Green and TaqMan methods in quantitative real-time polymerase chain reaction analysis of four adenosine receptor subtypes. *Adv. Biomed. Res* 3(85): 1-6, 2014.

Tapparel C, Siegrist F, Petty TJ, Kaiser L. Picornavirus and enterovirus diversity with associated human diseases. *Infect Genet Evol* 14: 282-293, 2013. DOI 10.1016/j.meegid.2012.10.016.

Tavares de MT; Cardoso D das D de P, Brito WMED. Vírus Entéricos veiculados por água: aspectos microbiológicos e de controle de qualidade da água. *Rev. Patol. Trop* 34(2): 85-104. DOI: <https://doi.org/10.5216/rpt.v34i2.1914>.

Teixeira W, Toledo MCM de, Fairchild TR, Taioli F. Decifrando a Terra. São Paulo: Oficina de Textos, 2000. 568 p.

Tiwari, S., Dhole, T. N. Assessment of enteroviruses from sewage water and clinical samples during eradication phase of polio in North India. *Virology journal* 15(1): 157, 2018.

Tonetti AL, Brasil AL, Madrid FJPL, Figueiredo ICS, Schneider J, Cruz LMO, Duarte NC, Fernandes PM, Coasaca RL, Garcia RS, Magalhães T. Tratamento de esgotos domésticos em comunidades isoladas: Referencial para a escolha de soluções. Biblioteca/Unicamp. São Paulo, 2018.

Toze S. PCR and the detection of microbial pathogens in water and wastewater. *Wat. Res.* 33(17), 1999.

Tsai YL, Sobsey MD, Sangermano LR, Palmer CJ. Simple method of concentrating enteroviruses and hepatitis A virus from sewage and ocean water for rapid detection by

reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Appl. Environ. Microbiol* 59(10): 3488-3491, 1993.

Tucci CEM, Cabral JJSP. Qualidade da Água Subterrânea. Prospecção Tecnológica Recursos Hídricos – Centro de Gestão e Estudos Estratégicos, 2003.

Upfold NS, Luke GA, Knox C. Occurrence of Human Enteric Viruses in Water Sources and Shellfish: A Focus on Africa. *Food Environ Virol* 13(1):1-31, 2021. DOI: 10.1007/s12560-020-09456-8.

USEPA (U.S. Environmental Protection Agency). Getting Up to Speed for section C, Ground Water Contamination In: Wellhead Protection: A Guide for Small Communities. Estados Unidos, 1991.

Vasconcelos MB. Poços para captação de Águas Subterrâneas: Revisão de conceitos e proposta de nomenclatura. *Águas Subterrâneas* [S. I.], 2015. Disponível em: <https://aguassubterraneas.abas.org/asubterraneas/article/view/28288>. Acesso em: 27 out. 2022.

Vecchia AD, Fleck JD, Comerlato J, Kluge M, Bergamaschi B, da Silva JVS, da Luz RB, Teixeira TF, Garbinatto GN, Oliveira DV, Zanin JG. First description of Adenovirus, Enterovirus, Rotavirus and Torque teno virus in water samples collected from the Arroio Dilúvio, Porto Alegre, Brazil. *Braz. J. Biol* 72(2): 323-329, 2012.

Vellinga J, Van Den Wollenberg DJM, Van Der Heijdt S, Rabelink MJWE, Hoeben RC. The coiled-coil domain of the adenovirus type 5 protein IX is dispensable for capsid incorporation and thermostability. *J Virol* 79: 3206–3210. 2005.

Verheyen, J., Timmen-Wego, M., Laudien, R., Boussaad, I., Sen, S., Koc, A., ... Pfister, H. Detection of adenoviruses and rotaviruses in drinking water sources used in rural areas of Benin, West Africa. *Appl. Environ. Microbiol* 75(9): 2798-2801, 2009.

Vetter, M. R., Staggemeier, R., Vecchia, A. D., Henzel, A., Rigotto, C., Spilki, F. R. Seasonal variation on the presence of adenoviruses in stools from non-diarrheic patients. *Braz. J. Microbiol* 46(3): 749-752, 2015.

Vieira CB, Mendes ACO, Guimarães FR, Fumian TM, Leite JPG, Gaspar AMC, Miagostovich MP. Detection of enteric viruses in recreational water of an urban lagoon in the city of Rio de Janeiro, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 10(6): 778-784, 2012.

Viral Zone. Enterovirus. Esquema ilustrativo do capsídeo de Enterovírus, demonstrando as proteínas VP1 a VP4. 2008. Disponível em: <https://viralzone.expasy.org/97>. Acesso em: 20/04/2022.

Waso M, Khan S, Khan W. Microbial source tracking markers associated with domestic rainwater harvesting systems: correlation to indicator organisms. *Environ Res* 161:446–455, 2018.

Wobus CE, Svoboda AS. Enteric Viruses. *Encyclopedia of Microbiology* (Fourth Edition). Academic Press. 2019: 156-162, ISBN 9780128117378,. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809633-8.90171-7>.

Wolf S, Hewitt J, Greening GE. Viral multiplex quantitative PCR assays for tracking sources of fecal contamination. *Appl. Environ. Microbiol* 76(5): 1388-1394, 2010.

WHO. World Health Organization. *Guidelines for Drinking-Water Quality*. Geneva, Switzerland: World Health Organization, 1 – 668, 2008.

WHO/UNICEF. *Progress on sanitation and drinking water – 2015 update and MDG assessment*. Geneva: World Health Organization (WHO) And The United Nations Children’s Fund (UNICEF), 2015. 90 p.

WHO. *Guidelines for Drinking-water Quality, 4ª Edição, Incorporating the 1st Addendum*. Geneva: World Health Organization. 2017.

WHO. World Health Organization. *Guidelines on sanitation and health*. 2018.

WHO/UNICEF. World Health Organization/UNICEF. 1 in 3 people globally do not have access to safe drinking water – UNICEF, WHO. Geneva: Geneva: World Health Organization (WHO) And The United Nations Children’s Fund (UNICEF), 2019. Disponível em: <https://www.who.int/news/item/18-06-2019-1-in-3-people-globally-do-not-have-access-to-safe-drinking-water-unicef-who>. Acesso em: 25/10/2022.

Wu, X., Lu, X., Schneider, E., Ahmed, J. A., Njenga, M. K., Breiman, R. F., ... Erdman, D. D. Reassessment of high prevalence human adenovirus detections among residents of two refugee centers in Kenya under surveillance for acute respiratory infections *J. Gen. Virol* 91(3): 385-391, 2019.

Wyn-Jones AP, Sellwood J. Enteric viruses in the aquatic environment. *J. Appl. Microbiol* 91: 945-962, 2001. DOI 10.1046/j.1365-2672.2001.01470.x.

Xagorarakis I, Yin Z, Svambayev Z. Fate of Viruses in Water Systems. *Int. J. Environ. Eng.* 140(7): 1-18, 2014. DOI: 10.1061/(ASCE)EE.1943-7870.0000827.

Yousefi M, Saleh MN, Yaseri M, Mahvi AH, Soleimani H, Saeedi Z, Zohdi S, Mohammadi AA. Data on microbiological quality assessment of rural drinking water supplies in Poldasht county. *J Data Brief* 17:763–769, 2018 <https://doi.org/10.1016/j.dib.2018.02.003>

Zanella, L. Manual para captação emergencial e uso doméstico de água [livro eletrônico]. São Paulo: IPT, 2015.

## Anexo 1 – Artigo: Elevated Mortality Risk from CRKp Associated with Comorbidities: Systematic Review and Meta-Analysis



Review

### Elevated Mortality Risk from CRKp Associated with Comorbidities: Systematic Review and Meta-Analysis

Lucas Candido Gonçalves Barbosa <sup>1</sup>, José Arthur Silva e Sousa <sup>2</sup>, Graziela Picciola Bordoni <sup>1</sup>, Gabriel de Oliveira Barbosa <sup>3</sup> and Lilian Carla Carneiro <sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> Institute of Tropical Pathology and Public Health, Federal University of Goiás (UFG), 235 Street, Neighborhood: Leste Universitário, Goiânia 74605-050, Brazil; lucascandidogomesalves46@outlook.com (L.C.G.B.); grazielapicciola@discente.ufg.br (G.P.B.)

<sup>2</sup> National Institute of Courses, R Six Street, 85 Number, Neighborhood: Oeste, Goiânia 74125-080, Brazil; josearthur231@gmail.com

<sup>3</sup> Biology Department, FAVENI College, Ângelo Altoé Street, 888 Number, Neighborhood: Venda Nova do Imigrante, Goiânia 29375-000, Brazil; gabrieloliveira1296@live.com

\* Correspondence: carlacarneirililian@gmail.com; Tel.: +55-(62)-98183-7605

**Abstract:** Carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* has become a public health problem with therapeutic limitations and high mortality associated with comorbidities. Methods: This is a systematic review and meta-analysis with a search in PubMed, SciELO, and Lilacs. Ten articles were selected, considering cohort, case-control, and cross-sectional studies. Tests for proportions and relative risk of mortality were performed, considering a 5% threshold for significance. Statistical analyses were performed using Rstudio<sup>®</sup> software, version 4.0.2 of Ross Ihaka and Robert Gentleman in Auckland, New Zealand. Results: *Klebsiella pneumoniae*, associated with chronic kidney disease, was responsible for 26%/258 deaths, chronic lung disease 28%/169, diabetes 31%/185, liver disease 15%/262, and heart disease 51%/262 deaths. Carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* associated with chronic kidney disease was responsible for 49%/83 deaths, with diabetes 29%/73, and with liver disease 33%/73 deaths. The risk of death from carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* was twice as high as the number of deaths associated with carbapenem-sensitive *Klebsiella pneumoniae*, RR = 2.07 ( $p < 0.00001$ ). Conclusions: The present study showed an increase in mortality from carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* when associated with comorbidities.

**Keywords:** mortality; health public; *Klebsiella pneumoniae*; carbapenems



**Citation:** Gonçalves Barbosa, L.C.; Silva e Sousa, J.A.; Bordoni, G.P.; Barbosa, G.d.O.; Carneiro, L.C. Elevated Mortality Risk from CRKp Associated with Comorbidities: Systematic Review and Meta-Analysis. *Antibiotics* **2022**, *11*, 874. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11070874>

Academic Editor: Roberto Arrigoni

Received: 12 May 2022

Accepted: 24 June 2022

Published: 29 June 2022

**Publisher's Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Copyright:** © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

#### 1. Introduction

Antibiotic resistance is a major health problem, especially when it comes to the control of infections caused by microorganisms that were sensitive to antimicrobials. Many microorganisms, especially bacteria, have become resistant to almost all clinically important antimicrobials. The biggest problem is that the pharmaceutical industry does not have enough new drugs to complement the growth of resistance of these microorganisms, such as *K. pneumoniae*. The growing number of cases of antibiotic-resistant *Klebsiella pneumoniae* infections stands out as a worldwide health problem, presenting as a clinically important bacterium causing pneumonia in hospital environments [1].

The resistance of *K. pneumoniae* is a consequence of the presence of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases (ESBLs), described as enzymes that, through plasmid mediation, confer resistance to penicillins and cephalosporins, including combinations of sulbactam, clavulanic acid, and monobactams. ESBLs are commonly detected in strains of *Klebsiella pneumoniae*, qualified as an opportunistic pathogen, the etiologic agent of serious infections in hospitalized patients, with emphasis on patients with compromised immunity to serious diseases. *K. pneumoniae* capable of producing  $\beta$ -lactamase was first detected in Germany in 1983, and there has been a steady increase worldwide in subsequent decades [1,2].

## Anexo 2 – Apresentação de trabalho no Congresso Brasileiro de Biomedicina

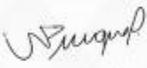


**XVII**  
**Congresso Brasileiro de Biomedicina**  
V Congresso Internacional de Biomedicina  
I Congresso Brasileiro e Internacional de Biomedicina Estética

15 a 18 de Junho de 2022  
Goiânia-GO

# CERTIFICADO

Certificamos que o trabalho **ADENOVÍRUS EM AMOSTRAS DE ÁGUA CONSUMIDA EM REGIÕES RURAIS DE GOIÁS.**, foi apresentado pelos autores **GRAZIELA PICCIOLA BORDONI; PAULO SÉRGIO SCALIZE; LILIAN CARLA CARNEIRO**, na forma de apresentação **E-PÔSTER** no **XVII Congresso Brasileiro de Biomedicina, V Congresso Internacional de Biomedicina e I Congresso Brasileiro e Internacional de Biomedicina Estética**, realizado de 15 à 18 de junho de 2022, no Centro de Convenções em Goiânia.

  
**Dr. Renato Pedreiro Miguel**  
Presidente do XVII Congresso Brasileiro de Biomedicina  
Patrocínio Master

  
**Dr. Sergio Antonio Machado**  
Presidente de Honra do XVII Congresso Brasileiro de Biomedicina  
Patrocínio Diamante

  
**Dr. Cláudio Lôbo Mecnas**  
Presidente da Comissão Organizadora do XVII Congresso Brasileiro de Biomedicina  
Patrocínio Ouro

  
**RENOVA**  
COMPLETA

  
**GALDERMA**

  
**DIAGLAB**

  
**DB**  
DIAGNÓSTICOS

  
**PROTEC**

  
**Lab-to-Lab**  
**PARDINI**

  
**ARSIM**

  
**win**  
EVENTS

## Anexo 3 – Artigo : QUANTIFICAÇÃO DE VÍRUS ENTÉRICOS EM ESGOTO BRUTO E TRATADO NA CIDADE DE GOIÂNIA

### QUANTIFICAÇÃO DE VÍRUS ENTÉRICOS EM ESGOTO BRUTO E TRATADO NA CIDADE DE GOIÂNIA

Graziela Bordoni<sup>A,\*</sup>, Tales Bernardino<sup>B</sup>, Lílian Carneiro<sup>A</sup>, Lucas Gonçalves<sup>C</sup>, Ysabella Reis<sup>B</sup>, Pedro Cerqueira<sup>D</sup>, Paulo Scalize<sup>B</sup>

<sup>A</sup>Universidade Federal de Goiás – Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, Goiânia-Goiás, Brasil

<sup>B</sup>Universidade Federal de Goiás – Escola de Engenharia Civil e Ambiental, Goiânia-Goiás, Brasil

<sup>C</sup>Universidade Federal de Goiás – Faculdade de Medicina, Goiânia-Goiás, Brasil

<sup>D</sup>Saneamento de Goiás S.A, Goiânia-Goiás, Brasil

#### Resumo

A pesquisa de vírus entéricos poderá ser empregada como uma possibilidade para avaliar a qualidade sanitária do esgoto bruto e do efluente tratado. Desta forma, o objetivo do presente trabalho é apresentar a quantidade de vírus entéricos no esgoto bruto e tratado da Estação de Tratamento de Esgoto Goiânia (ETE Goiânia), Goiás – Brasil, e comparar com dados da literatura. Para isso, foram coletadas duas amostras de esgoto bruto e duas amostras de esgoto tratado, às 8h e às 11h da manhã, horário de menor e maior vazão desta ETE, respectivamente. Logo após, as amostras foram submetidas à análise quantitativa de Rotavírus do grupo A, Adenovírus sorotipo 5 (Espécie C) e Enterovírus, por meio de testes moleculares. Como resultados, quando comparado esgoto bruto vs esgoto tratado, obteve-se uma média de  $0,87 \times 10^7$  CG/L vs.  $1,15 \times 10^7$  CG/L, para Rotavírus; Adenovírus =  $2,15 \times 10^7$  CG/L vs.  $2,45 \times 10^7$  CG/L e Enterovírus =  $0,53 \times 10^7$  CG/L vs.  $1,4 \times 10^7$  CG/L. Concluiu-se que as quantidades de cópias genômicas encontradas foram compatíveis com os valores reportados na literatura e que o processo atual da ETE Goiânia não apresentou eficiência na remoção dos vírus pesquisados.

**Palavras-Chave:** adenovírus, contaminação fecal, enterovírus, esgoto, rotavírus.

doi: 11.22151/aei.2022.1103

\*Autor para correspondência  
E-mail: grazip.bordoni@gmail.com