

Silva, H. D.; ANUNCIACÃO, C. E. Avaliação da Incidência de adenovírus em águas fluviais da Bacia do Rio Meia Ponte. In: CONGRESSO DE PESQUISA, ENSINO E EXTENSÃO DA UFG - CONPEEX, 2., 2005, Goiânia. *Anais eletrônicos do XIII Seminário de Iniciação Científica* [CD-ROM], Goiânia: UFG, 2005. n.p.

---

## **AVALIAÇÃO DA INCIDÊNCIA DE ADENOVÍRUS EM ÁGUAS FLUVIAIS DA BACIA DO RIO MEIA PONTE**

SILVA, H. D<sup>1</sup>.; CAVALCANTE, L. A<sup>2</sup>.; SANTOS, O. F. S<sup>3</sup>.; SOUTO, R. L<sup>4</sup>.; SILVA, E. A<sup>5</sup>.; MACHADO, L. S<sup>6</sup>.; ANUNCIACÃO, C. E<sup>7</sup>

Palavras-chave: adenovírus, PCR, monitoramento,

### **1. INTRODUÇÃO**

Apesar da importância vital da água, infelizmente, o que se tem observado é uma considerável depreciação na qualidade da mesma pelo mundo. Fato justificável pelo aumento da população urbana no final do século, acarretando um expressivo acréscimo de fontes poluidoras, e conseqüentemente, da população de microrganismos entéricos patogênicos. Dentre estes microrganismos, uma atenção especial deve ser dedicada aos vírus, pois os métodos tradicionais de detecção/monitoramento baseados na pesquisa de coliformes permitem apenas prever a existência destes. Assim, o presente estudo tem o objetivo de padronizar uma metodologia molecular para o diagnóstico/monitoramento de adenovírus em águas fluviais da cidade de Goiânia. Foi escolhido este vírus por ser constituído de DNA fita dupla, esta constituição do genoma viral permite que se empregue uma PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) convencional na detecção dos vírus, diminuindo etapas e custos com a utilização de enzimas, já que vários vírus patogênicos possuem o RNA como material genético, sendo necessária a utilização de enzimas que convertam o RNA em DNA para posterior detecção. Outro fator importante na escolha dos adenovírus como indicadores da qualidade da água é a sua importância médico-sanitária, acometendo uma ampla parcela da população, principalmente as populações ribeirinhas, estas que tem contato direto com as águas contaminadas, afetando especialmente crianças, idosos e imunossuprimidos. Em Goiânia, o ribeirão João Leite, afluente do córrego Meia Ponte é uma importante fonte de água potável para a cidade de Goiânia e recebe grande descarga de esgotos urbanos, agropecuários e industriais dos municípios circunvizinhos, além de dejetos agro-industriais, o que pode levar a proliferação de um grande número de patógenos, dentre estes, de adenovírus.

### **2. Metodologia**

#### 2.1 - Coleta das amostras

As amostras de água (20L) foram coletadas mensalmente em 6 pontos específicos da Bacia do Rio Meia Ponte e lagos da capital (Bosque dos Buritis e Vaca Brava). As amostras foram coletadas a uma profundidade de 20 centímetros abaixo da superfície e encaminhadas para processamento no Laboratório de Diagnóstico Genético e Molecular/UFG.

## 2.2 - Concentração da amostra e Extração de DNA

A amostra foi filtrada à vácuo em filtro Millipore com membrana Hybond-N<sup>+</sup>, com o objetivo de reter microrganismos e DNA livre. O material retido foi eluído, dividido em alíquotas, e utilizado para a extração de DNA pela técnica de Boom modificada (1990) e pelo método do fenol-clorofórmio (SAMBROOK et al., 1986).

## 2.3 - Amplificação pela PCR

Uma alíquota do DNA extraído foi submetida a amplificação pela técnica da PCR e em seguida, processada uma Nested-PCR. Foram utilizados iniciadores específicos para adenovírus (RIGOTTO et al., 2005)

## 2.4 - Eletroforese e análise dos dados

A visualização do DNA amplificado foi realizada através de gel agarose 1,5% corado com Brometo de Etídeo (0,5 µg/µl), tendo-se como referência um marcador de massa molecular.

## **3. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Nas extrações de DNA, os dois métodos foram acessíveis em relação a custos e praticas de uso. Contudo, apesar da pureza do material obtido com a extração utilizando fenol, este possui a desvantagem de ser altamente corrosivo, devendo ter um cuidado especial em sua aplicação. Na pesquisa, entre Janeiro e Julho de 2006 foram coletas 19 amostras, destas, somente duas amostras coletadas do Rio Meia Ponte foram positivas para a presença do fragmento viral amplificado. As amostras (05 e 12/05/2006) do Rio Meia Ponte foram inicialmente negativas na primeira amplificação, mas a partir de uma segunda amplificação de uma alíquota do primeiro PCR foi visualizado o DNA viral. Isto ocorreu provavelmente pela inibição da enzima ou pela baixa concentração de DNA do vírus em solução. Para esta reamplificação foram necessários ajustes nas concentrações de magnésio e do volume de tampão. O fragmento amplificado (Figura 1) pelos *primers* (hexAA 1885 e hexAA 1913) foi de aproximadamente 300 pb, de acordo com o citado por Girones (1995). Também Foi realizado a Nested-PCR (nehexAA 1893 e hexAA 1913) de todas as amostras, entretanto não foi ocorreu amplificação.



Figura 1 - Colunas 1-2; PCR convencional (nehexAA 1893 e hexAA 1913), obtenção de fragmentos de aproximadamente 290 pb. Colunas 3, 4 e 6: Nested-PCR, não foi obtido material amplificado. Coluna 8: controle negativo. M: marcador de peso molecular ( $\lambda$  Hind III).

A membrana Hybond-N<sup>+</sup> tem diâmetro de 0,45 µm enquanto o Adenovírus tem cerca de 70 a 90 nm de diâmetro. Logo, estes vírus passaram livremente pelos poros da membrana, restando apenas o DNA livre, o que provavelmente é muito pouco, pois estes vírus são muito resistentes em meio ambiente e não rompem o capsídeo facilmente. Assim, a quantidade de partículas virais por PCR pode ter sido insuficiente para que ocorra amplificação de material genético. Uma outra dificuldade, pode ter sido a extração de DNA, que devido à presença de contaminantes como hemoglobinas fecais de animais, dentre outros inibidores podem ter comprometido a atuação da enzima Taq DNA Polimerase de atuar adequadamente. Outro fato importante que comprometeu a pesquisa foi a queda de energia no ICB em um final de semana, provocada por uma manutenção mal programada, acarretando o descongelamento dos freezers e geladeiras contendo as amostras e reagentes utilizados para o diagnóstico molecular. Estes reagentes precisam ser rigorosamente conservados a -20°C e podem ter perdido sua viabilidade, uma vez que, a partir desta data, amostras de outros experimentos também apresentaram resultados descontínuos.

#### **4. CONCLUSÃO**

Estudos mais aprofundados são necessários para avaliar a incidência dos vírus em águas fluviais, assim como a utilização destes no monitoramento ambiental. Contudo, pode-se destacar que estes microrganismos podem ser isolados através de técnicas biomoleculares, e tem forte potencial para serem utilizados pelas empresas de saneamento com organismos indicadores da qualidade das águas. E a ausência de resultados consistentes pode ter sido provocada pela deteriorização dos reagentes utilizados para o diagnóstico molecular.

#### **5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- BOOM, R; SOL, C.J.A; SALIMANS, M. M. M; JANSEN, C. J; WERTHEIMVAN-DILLEN, P. M. E; VAN DER NOORDA, J. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. **J. Clin. Microbiol.** 28, 495–503, 1990.
- RIGOTTO, C. et al. Detection of adenoviruses in shellfish by means of conventional-PCR, nested-PCR, and integrated cell culture PCR (ICC/PCR). **Water Research**, v.39, p. 297-304, October 2004.
- SAMBOOK, J.; FRITSCH, E.P. and MANIATS, T. (1986). Molecular Cloning. Cold Spring Harbour Laboratory, **Cold Spring Harbour**, N.Y.

Fonte de Financiamento: PIBIC/CNPq

---

<sup>1</sup>Bolsista PIBIC–Lab. Diagnóstico Genético/Molecular [hugoreales7@hotmail.com](mailto:hugoreales7@hotmail.com)

<sup>2</sup> Bolsista PIVIC/UFG

<sup>3</sup> Bióloga/ Mestranda FM/UFG

<sup>4</sup> Graduação Farmácia/UNIFI

<sup>5</sup> Estagiária Lab. Genética Molecular e Citogenética

<sup>6</sup> Bolsista PIVIC/UFG

<sup>7</sup>Orientador/Instituto de Biologia/UFG, carlose@icb.ufg

