

## Artículo original

# Avaliação de métodos de concentração e detecção molecular de adenovírus em águas não tratadas - uma metanálise

Hugo Delleon Silva<sup>a,b</sup>, Murilo Rodrigues Melo<sup>a</sup>, Carlos Eduardo Anunciação<sup>b</sup>,  
Marco Tulio Antonio García-Zapata<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup>Núcleo de Pesquisas em Agentes Emergentes e Re-emergentes, Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, Universidade Federal de Goiás. <sup>b</sup>Laboratório de Diagnóstico Genético e Molecular, Instituto de Ciências Biológicas II, Universidade Federal de Goiás.

Recibido 5 de agosto de 2009; aceptado 3 de febrero de 2010

**Resumo:** Metodologias moleculares baseadas em PCR têm sido utilizadas para detectar adenovírus (AdVs) em amostras ambientais. É consenso entre os pesquisadores que estas metodologias oferecem vantagens sobre os métodos tradicionais de isolamento viral por cultura celular, sendo mais sensíveis, específicas e propiciando menor tempo de diagnóstico; contudo, há divergências em relação ao método de concentração viral a ser utilizado em amostras ambientais. Assim sendo, realizou-se uma metanálise com o intuito de responder aos questionamentos concernentes à eficácia do uso de três metodologias de concentração viral associadas à detecção molecular de AdVs em amostras de águas não tratadas, para a qual foram selecionados 33 estudos. Concluiu-se que: a) PCR não deve ser o método de escolha para detectar AdVs em amostras ambientais, devendo-se priorizar qPCR ou Nested-PCR; b) para detectar AdVs em amostras de rios ou lagos, a metodologia de escolha deve ser a associação entre ultracentrifugação e Nested-PCR; c) é aconselhável utilizar associação entre microfiltração em membrana, ultrafiltração e qPCR para detectar AdVs em amostras de esgotos tratados e não tratados. Estudos adicionais são necessários para avaliar os métodos que foram empregados em um único estudo e/ou com número escasso de amostras.

**Palavras chave:** adenovírus, águas não tratadas, concentração, metanálise, PCR

## Evaluación de métodos para concentración y detección molecular de adenovirus en agua no tratada: un meta-análisis

**Resumen:** La detección de adenovirus (AdVs) en muestras ambientales se realiza por medio de metodologías moleculares basadas en PCR. Existe consenso entre los investigadores que estas metodologías ofrecen algunas ventajas en comparación con los métodos tradicionales de aislamiento de virus por medio de cultivos celulares; sin embargo, el método que se debe usar para concentrar los virus en muestras ambientales todavía es controversial. Por consiguiente, realizamos un meta-análisis dirigido a responder las preguntas respecto a la eficacia de tres métodos de concentración de virus asociados a la detección molecular de AdVs en muestras de agua no tratada, seleccionando 33 estudios. Concluimos que: a) el PCR no debe ser el método de elección para la detección de AdVs en muestras ambientales y que en vez debe usarse prioritariamente el método de qPCR o PCR-Anidada; b) para la detección de AdVs en muestras de agua tomadas de ríos o lagos, el método de elección debe ser una asociación de ultracentrifugación y PCR-Anidada; c) es aconsejable usar una asociación de membrana de microfiltración, ultrafiltración y qPCR para la detección de AdVs en muestras de aguas negras tratadas o no tratadas. Se necesitan más estudios para evaluar los métodos que se han usado en un solo estudio y/o con un número escaso de muestras.

**Palabras clave:** adenovirus, agua no tratada, concentración, meta-análisis, PCR

## Assessment of methods for the concentration and molecular detection of adenovirus in untreated water: a meta-analysis

**Abstract:** Molecular methodologies based on PCR have been used for the detection of adenovirus (AdVs) in environmental samples. It is a consensus among researchers that these methodologies offer some advantages compared with traditional methods for the isolation of virus by cell culture, since they are more sensitive and specific and also require less processing time; however, the method to be used for virus concentration in environmental samples is still controversial. Consequently, we carried out a meta-analysis, aiming at responding the questions concerning the efficacy of three methods for virus concentration associated to the molecular detection of AdVs in untreated water

samples, by selecting 33 studies. We concluded that: a) PCR should not be the method of choice for the detection of AdVs in environmental samples, and instead the use of qPCR or Nested-PCR should be prioritized; b) for the detection of AdVs in water samples collected in rivers or lakes, the method of choice should be an association of ultracentrifugation and Nested-PCR; c) it is advisable to use an association of microfiltration membrane, ultrafiltration, and qPCR for the detection of AdVs in treated and untreated sewage samples. Further studies are needed to evaluate the methods that have been used in only one study and/or with a limited number of samples.

**Keywords:** adenovirus, untreated water, concentration, meta-analysis, PCR

\* Correspondencia:

E-mail: nupereme@gmail.com

## Introdução

De forma sistematizada o diagnóstico de vírus em ambientes aquáticos ocorre em duas etapas: a concentração e a detecção viral.

Métodos moleculares têm sido utilizados para a detecção viral devido às vantagens de alta sensibilidade, especificidade e velocidade diagnóstica [1]. Assim, são escassos os trabalhos de virologia ambiental que não utilizam algum método biomolecular, sumariamente PCR [2,3], Nested-PCR [4,5] ou Real time PCR [6,7], sendo que, cada método agrega especificidade quanto ao uso, e a utilização de um a outro é controversa.

Em relação aos métodos de concentração viral, deve-se dar maior importância, pois existe uma ampla gama de metodologias, e não há consenso sobre qual método utilizar em estudos de virologia ambiental.

Metodologias diversas têm sido utilizadas para a concentração de vírus em ambientes aquáticos. Como exemplos, a ultrafiltração [8,9], separação imunomagnética [10], ultracentrifugação [11-13], adsorção viral utilizando partículas de sílica amino-fracionalizadas [14], floculação orgânica [15], precipitação com sais multivalentes, também chamada de floculação inorgânica [2,16], precipitação com polietilenoglicol [17], e utilização de membranas de microfiltração simples ou em cartuchos, sendo polarizadas negativamente ou positivamente, e neste caso, há diferenças significativas quanto à utilização destas. Membranas eletronegativas requerem tratamentos prévios da água para propiciar a interação entre a membrana e o vírus carregado negativamente [18]. Estes tratamentos podem incluir acidificação da água, maximizando a interação dos vírus com membranas carregadas positivamente ou a adição de sais catiônicos, que acarreta uma inversão na carga das partículas virais promovendo interações eletrostáticas entre o vírus e a superfície eletronegativa das membranas [14].

Recentemente, alguns pesquisadores têm proposto a detecção de adenovírus (AdVs) através de técnicas moleculares para monitorar a presença de vírus entéricos em ambientes aquáticos [19-21]. Os AdVs são altamente prevalentes no meio ambiente [22] e resistentes à tratamentos de desinfecção por cloração e UV [23,24], sendo bons indicadores de contaminação humana [25], entretanto são fastidiosos (especial os sorotipos 40 e 41) [1].

A concentração é uma etapa crítica no diagnóstico viral, pois o número de partículas virais em águas é geralmente muito baixo [8,14], necessitando-se de um grande volume para a concentração destes. Assim, a utilização de um bom

método diagnóstico é crucial para a identificação molecular destes patógenos.

Dentre os métodos de concentração, os mais amplamente utilizados são: adsorção-eluição em membrana de microfiltração (MF), ultrafiltração (UF) e ultracentrifugação (UC), ocorrendo combinações entre estes e demais métodos considerados secundários, usualmente métodos de precipitação, destacando-se a floculação orgânica com extrato de carne [1,15], precipitação com polietilenoglicol [5,26,27] ou precipitação com sais multivalentes [1].

Como ainda não há consenso entre os pesquisadores na utilização das metodologias de concentração, e mesmo na escolha do método de detecção molecular, se faz pertinente a realização de uma Revisão Sistemática com metanálise sobre o assunto.

A metanálise é um estudo de elevado respaldo acadêmico, tradicionalmente utilizado em Ciências Sociais e Médicas. Segundo Egger & Smith [28] uma metanálise bem conduzida permite uma avaliação mais objetiva sobre a utilidade de um tratamento, podendo antecipar a introdução de um eficiente tratamento clínico.

Em suma, a metanálise é uma metodologia robusta que permite através de tratamento estatístico responder a perguntas previamente elaboradas utilizando os dados de vários estudos primários afins criteriosamente selecionados em bancos de dados.

Dessa forma, foi objetivo deste estudo avaliar a efetividade da utilização de metodologias de concentração viral em associação com metodologias de detecção molecular para diagnosticar adenovírus em águas não tratadas.

## Material e métodos

Foram realizadas buscas sistematizadas de artigos em bases de dados indexadas no intuito de responder ao seguinte questionamento: "Qual a efetividade da utilização dos métodos de concentração por MF, UC, UF e associações de MF+UC e MF+UF acoplados à detecção molecular de AdVs em amostras de águas não tratadas?"

**Definições:** As seguintes definições são pertinentes e fazem parte dos critérios de inclusão e exclusão dos artigos selecionados: *Microfiltração (MF)*: utilização de membrana filtrante plana (simples) ou sob a forma de cartucho, com porosidade de 0,2 a 0,45 µm de diâmetro, podendo ou não ser polarizada, e constituída de nylon, nitrocelulose, ou qualquer outro material; *Ultrafiltração (UF)*: utilização de membrana filtrante de variação composicional, retendo

moléculas com peso molecular entre 10,000 a 150,000 KDa; *Ultracentrifugação (UC)*: centrifugação a velocidade superior a 100,000 x g por tempo mínimo de 30 min; *Adenovírus*: qualquer sorotipo dentre as 6 espécies (A a F); *Deteção molecular*: técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) ou variações desta, como Nested-PCR ou Real time PCR (qPCR); *Águas não tratadas*: qualquer tipo de água fluvial que não recebeu prévio tratamento para consumo humano, incluindo águas sanitárias (esgotos) tratadas e não tratadas.

*Pesquisa em bases de dados*: Foram selecionados estudos nas seguintes bases de dados: *LILACS*; *PubMed Central (PMC)*; *SciELO*, *REPIDISCA*, *Biblioteca Cochrane BVS*, *SCOPUS* e *CSA Illumina*. No decorrer do estudo, comunicações pessoais com os autores viam e-mail e fax foram realizados para sanar dúvidas pertinentes. O período de busca foi de 1990 até data de busca, sem restrições concernentes a idiomas, e utilizado os unitermos: adenovir\* AND (water OR wastewater OR effluent OR sewage) AND (pcr OR detection OR diagnostic OR molecular techniques). Com exceção do PubMed, que permite buscas com associações de vários unitermos, nas demais bases os unitermos foram associados de três em três até esgotar todas as combinações possíveis.

*Coleta e análise dos dados*: Os estudos selecionados foram avaliados por dupla entrada, de forma independente, com utilização de formulários padronizados, obedecendo a critérios previamente estipulados de inclusão e exclusão contidos no Teste de Relevância I, que foi aplicado apenas aos resumos dos artigos, e ao Teste de Relevância II, aplicado ao artigo na íntegra a partir dos estudos previamente selecionados pelo Teste de Relevância I. Discordâncias foram resolvidas por consenso, em casos de divergências um terceiro revisor era consultado.

Os estudos selecionados de forma independente pelos dois revisores a partir do Teste de Relevância II foram analisados quanto ao índice de concordância (IC) [29]. Os dados dos estudos consensualmente selecionados através do Teste de Relevância II foram coletados em formulário específico (não mostrado). Os formulários do Teste de Relevância I e II são mostrados na figura 1. Na figura 2 é mostrado fluxograma com o desenho do estudo.

Durante a seleção dos estudos, amostras de águas contaminadas por esgoto foram consideradas viáveis, e não viáveis as amostras de água do mar ou de águas salobras (salinidade superior a 5%), ou qualquer outro tipo de amostra que não obedecia às definições de água não tratada. Assim, estudos em que as coletas foram realizadas na vazão de rios com águas do mar ou em proximidades destas, foram excluídos pelos revisores para evitar vieses de amostragem, o mesmo ocorreu com artigos que apresentaram dados insuficientes para análise ou que não respeitassem alguns dos critérios de inclusão definidos nos Testes de Relevâncias.

Para evitar vieses de amostragem a metodologia de concentração por MF foi subdividida em MFc (microfiltração por cartuchos) e MFm (microfiltração por membrana

simples).

Amostras de águas não tratadas foram subdivididas em águas de rios ou lagos, esgoto bruto (não tratado), esgoto

Formulário de aplicação do Teste de Relevância I		
Critérios de inclusão	Sim	Não
1. O estudo trata de adenovírus diagnosticados em águas não tratadas?		
2. O diagnóstico realizado é molecular?		
Critérios de exclusão	Sim	Não
1. É relato de caso, editorial, comunicação ou revisão?		
2. A cultura celular é utilizada em associação com o diagnóstico molecular?		
Formulário de aplicação do Teste de Relevância II		
Critérios de inclusão	Sim	Não
1. O objetivo do estudo tem relação com a questão que os avaliadores estão estudando?		
2. É água fluvial não tratada?		
3. É utilizada ao menos uma das metodologias de concentração virial previamente selecionadas?		
4. As membranas utilizadas (MF e UF) possuem porosidade dentro do limite máximo e mínimo estipulado pelos pesquisadores?		
5. É Utilizada a PCR ou variações desta no diagnóstico?		
Critérios de exclusão	Sim	Não
1. Dentre as metodologias de MF, UF e UC ocorrem combinações diferentes das pesquisadas na realização da Revisão Sistemática?		
2. Na concentração ou detecção são utilizadas associações com cultura celular?		
3. O estudo apresenta dados insuficientes para análise?		

Figura 1. Formulários de aplicação dos Testes de Relevância I e II.

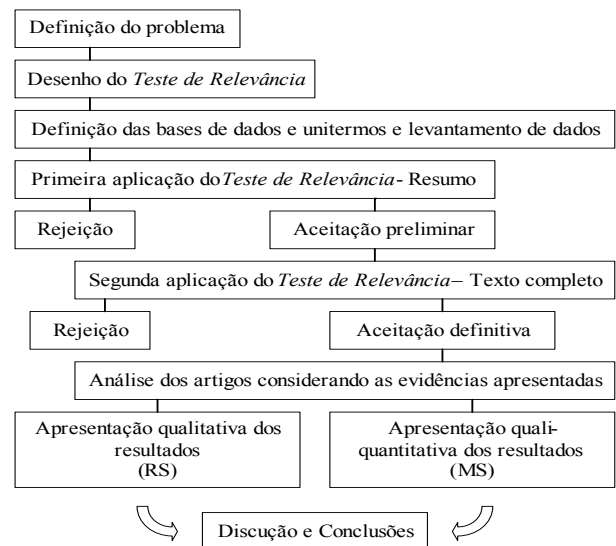


Figura 2. Fluxograma esquematizando o delineamento do estudo, em que os artigos que não se adequavam aos testes eram sumariamente excluídos. (Muñoz *et al.*, 2002).

tratado, e águas de enxurradas.

Foram incluídas amostras de esgotos tratados de qualquer natureza, este critério é respaldado pelo estudo de He & Jiang [12], em que não foram obtidas diferenças entre efluentes primários e secundários em relação à detecção de

AdVs por qPCR.

Depois de apropriada coleta das variáveis de cada estudo utilizando validação por dupla digitação em formulário específico (não mostrado), os dados foram digitalizados em planilhas do programa Microsoft Office Excel 2007. Alguns estudos tiveram mais de uma entrada nos formulários de tratamento estatístico. Isso ocorreu nas seguintes circunstâncias: detecção de adenovírus em diferentes amostras de águas, comparação de distintas metodologias de concentração e/ou detecção molecular de adenovírus utilizando amostras em comum, considerando cada um desses casos como estudos independentes dentro de um mesmo artigo.

Durante a seleção dos artigos os revisores reservaram-se no direito de realizar exclusões de dados que não estavam em concordância com os critérios estabelecidos durante a seleção dos estudos.

## Resultados

Não foram encontrados estudos nas bases de dados Cochrane BVS e Scielo, a tabela 1 mostra o número de estudos delimitados pelos Testes de Relevância I e II nas demais bases de dados. Dos 59 estudos selecionados no Teste de Relevância II, 23 artigos foram excluídos, pois se repetiam entre as bases, e já na fase de coleta dos dados, foram excluídos 3 artigos. O índice de concordância entre os revisores foi de 90,1%.

A tabela 2 mostra os 33 artigos selecionados com a combinação dos respectivos métodos de concentração e detecção molecular assim com os resultados de amostras positivas. Como um artigo pode ter mais de uma entrada, ao todo foram 54 estudos analisados.

Foram selecionados 18 estudos que diagnosticaram AdVs em águas de rios e lagos, sendo encontradas 9 combinações diferentes de diagnóstico de AdVs nestas águas. Dentre os estudos selecionados, a metodologia que obteve maior positividade foi UC + Nested-PCR com 83,31% de positividade, seguida de MFc + UC + Nested-PCR com 78,3% de positividade. A método menos expressivo para diagnosticar AdVs em rios ou lagos foi UF + qPCR com

nenhuma amostra positiva (0/39).

Em relação às amostras de esgoto bruto, foram selecionados 23 estudos, destes, as seguintes combinações metodológicas apresentaram 100% de eficácia diagnóstica: UF + Nested-PCR, UF + qPCR e UC + qPCR. A metodologia menos expressiva foi MFm + PCR com 20% [15/3] de amostras positivas.

Em amostras de esgotos tratados, dos 9 estudos selecionados, foram realizadas 6 combinações diagnósticas, as que apresentaram 100% de positividade foram: MFc + Nested-PCR, MFc + qPCR e UF + Nested-PCR. A metodologia com menor positividade foi UF + Nested-PCR (25%).

Em amostras de enxurradas, foram selecionados 3 estudos, cada um utilizando um método diagnóstico diferente, e em nenhum estudo foi encontrado expressivo número de amostras positivas (Tabela 2).

## Discussão

Considera-se aceitável  $IC \geq 80\%$ , no presente estudo o índice foi de 90,1%, este número aumenta a probabilidade de que os resultados da pesquisa sejam entendidos como passíveis de credibilidade.

Foram excluídas todas as amostras de águas salgadas ou salobras porque o uso de microfiltração nessas amostras é diferenciado, podendo acarretar vieses de amostragem. Membranas eletronegativas normalmente requerem tratamento de acidificação da água [18], porque muitos vírus são carregados negativamente em meio ambiente [30], sem este passo, o vírus não se ligará à membrana, todavia esta etapa normalmente não é realizada em águas salgadas devido à alta concentração salina da água [6]. Outro motivo para exclusão é que a alcalinidade da água pode promover baixa adsorção viral [18]. Assim, todos os estudos com água salgada ou suspeitos de água salobra foram excluídos. Quando o estudo oferecia dados em relação à porcentagem de sal, eram inclusos somente as amostras que não ultrapassavam a porcentagem de 5%, isso aconteceu na seleção do estudo de Jiang *et al.* [31], em que três amostras de rio foram excluídas pois tinham alta salinidade.

O mesmo aconteceu com estudos que utilizaram cultura celular em algum passo da metodologia de detecção. Os AdVs, sobretudo os sorotipos 40 e 41 são vírus fastidiosos, de difícil visualização do efeito citopático [1]. Além disso, a cultura celular tem a desvantagem de ser trabalhosa e onerosa [11].

O AdVs possivelmente venha a se tornar o indicador virológico de escolha para a realização de monitoramentos ambientais de rotina. Obviamente, o emprego de cultura celular não é o método de escolha para implementação de análises virológicas em ambientes aquáticos. Por isso, essa metodologia foi excluída. Ademais, a inclusão de cultura poderia mascarar a eficácia das metodologias de concentração aqui pesquisadas. Estudos recentes demonstram a eficácia de se utilizar a cultura celular para incrementar a detecção de AdVs [1,32], todavia, o próprio

Tabela 1. Bases de dados com a aplicação dos respectivos Testes de Relevância I e II (T.R.I e T.R.II).

Base de Dados	Data	Horário (Brasil)	Nº Resumos	T. R. I	T. R. II	
PubMed	20.12.08	08:11	178	48	32	
Repidisca	20.12.08	12:32	5	2	0	
AsFA	30.12.08	12:50	41	27	11	
CSA Illumina	CSA Technology	30.12.08	12:50	48	25	14
	Res Oceanic Abstract	30.12.08	12:50	5	2	0
Scopus	30.12.08	16:51	16	5	2	
Total			293	109	59	

Tabela 2. Artigos selecionados com seus respectivos dados sobre positividade e métodos de diagnóstico de AdVs em águas não tratadas.

Amostra	Referência	Método	n(1)	n(2)	pos%(1)	pos%(2)
Rios e lagos	35	UC + Nested-PCR	18	18	83,3	83,3
	13/36/19	MFc + UC + Nested-PCR	14/9/23	46	92,9/88,9/65,2	78,3
	5/22	MFm + Nested-PCR	36/58	94	52,8/70,7	63,8
	37/4	MFm + UF + qPCR	36/58	94	52,8/70,7	63,8
	26/38/32	MFc + Nested-PCR	6/12/29	47	66,7/83,3/10,3	36,2
	3	MFm + UF + PCR	52	42	30,8	30,8
	1	MFc + qPCR	58	58	24,1	24,1
	27/39/31	UF + Nested-PCR	12/15/17	44	0,0/6,7/52,9	22,7
	39/40	UF + qPCR	15/24	39	0,0/0,0	0,0
Esgoto	6/7	MFm + UF + qPCR	17/72	89	100,0/100,0	100,0
	41/25	UF + Nested-PCR	2/2	4	100,0/100,0	100,0
	41/25	UF + qPCR	2/2	4	100,0/100,0	100,0
	42	UC + qPCR	6	6	100,0	100,0
	35/13/38/10/21/41/ 43/44/19/34/15/44	UC + Nested-PCR	12/5/9/25/10/9/92/12 /15/16/24/15	244	50,0/100,0/100,0/96,0/90,0/ 56,6/81,15/91,17/93,3/100, 0/58,3/0,0	77,0
	27	UF + PCR	12	12	7	58,3
	34/15	UC + PCR	16/24	40	7/5	30,0
	2	MFm + PCR	15	15	3	20,0
	Esgoto tratado	26	MFc + Nested-PCR	5	5	100,0
42		MFc + qPCR	7	7	100,0	100,0
12		UF + Nested-PCR	7	7	100,0	100,0
6/7		MFm + UF + qPCR	17/143	160	82,4/99,3	97,5
10/19/15		UC + Nested-PCR	16/3/24	43	93,3/66,7/0,0	39,5
27		UF + Nested-PCR	12	12	25,0	25,0
15		UC + PCR	52	52	0,0	0,0
Águas de enxurradas	45	UC + Nested-PCR	57	57	3,5	35,0
	4	MFc + UF + Nested PCR	58	58	3,4	3,4
	9	UF + qPCR	61	61	1,6	1,6

n(1): número de amostras por estudo, n(2): número total de amostras por método, pos%(1): frequência de amostras positivas por estudo, pos%(2): frequência de amostras positivas dentro do método.

Xagorarakí *et al* [1] enfatizam que este tipo de método é de difícil aplicação na análise simultânea de grande número de amostras.

O método de escolha para detecção de vírus em meio ambiente é a detecção molecular, como a PCR que inclui alta sensibilidade, especificidade, baixo custo e curto prazo de realização [33].

As metodologias de concentração estudadas, não raro, podem ser associadas com outras metodologias, tidas como secundárias, as mais amplamente empregadas nos estudos selecionados foram floculação orgânica [15], floculação inorgânica [1] e precipitação com polietilenoglicol [26,27] [dados não mostrados]. A utilização destas metodologias está estritamente relacionada ao tipo de vírus, as soluções de eluição utilizadas assim como o tipo de amostra e o volume utilizado. Não há dúvidas que estas metodologias podem interferir no resultado final do diagnóstico, todavia, analisar todas estas variáveis seria dispendioso para um único estudo, de forma que estes dados foram coletados e serão analisados adequadamente em um segundo momento.

Acreditamos que todas as amostras ambientais analisadas são contaminadas por AdVs. O que vai influenciar o diagnóstico destes patógenos são as metodologias de

detecção moleculares utilizadas e, sobretudo as metodologias de concentração, já que a concentração pode variar de amostra para amostra.

Dos estudos selecionados que pesquisaram AdVs em amostras de rios ou lagos, de acordo com os resultados de positividade, a metodologia mais eficaz seria UC + Nested-PCR seguido de MFc + UC + Nested-PCR. Ultrafiltração em associação com qPCR não deve ser o método de escolha para isolar AdVs em amostras de rios ou lagos, pois das 39 amostras analisadas nenhuma foi positiva para AdVs.

Dentre os métodos empregados para detectar AdVs em esgoto bruto deve-se destacar o método de MFm + UF + qPCR que demonstrou positividade em 100% (89/89) das amostras. Métodos que utilizaram como detecção molecular a PCR em amostras de esgoto apresentaram baixa positividade, destacando-se a MFm + PCR, em que a positividade foi de apenas 20% (3/15). Os métodos de UF + Nested-PCR e UF + qPCR, UC + qPCR e UC + Nested-PCR demonstraram alta positividade para amostras de esgoto (100%), todavia esses dados devem ser questionados, pois o número de amostras analisadas foi muito pequeno e dentro de um mesmo estudo. Novos estudos sobre a utilização desses métodos definirão melhor a eficácia metodológica.

O mesmo raciocínio é válido para os métodos de MFc + Nested-PCR, MFc + qPCR e UF + Nested-PCR para amostras de esgotos tratados, estes métodos tiveram eficácia de 100% de positividade, todavia, cada método estudado advém de um único estudo, o qual o número de amostras foi inexpressivo. O método de UC + PCR não deve ser utilizado para amostras de esgotos tratados, pois das 52 amostras nenhuma foi positiva para AdVs.

Em relação às amostras de enxurradas, constata-se que nenhum dos métodos utilizados foi eficaz para diagnóstica AdVs nestas águas. É proposto uma reavaliação destes métodos e mesmo a incorporação de novas metodologias, sobretudo as de concentração secundária para maximizar a detecção de AdVs nestas águas.

Através dos dados obtidos, pode-se constatar que a utilização da PCR não é indicada para detecção de AdVs em amostras ambientais, pois o desempenho é muito baixo em relação aos demais métodos (Tabela 2). Este fato pode ser observado nos estudos de Puig *et al* [34] em que onze amostras ambientais foram negativas por PCR e todas positivas após processamento da segunda PCR, outro estudo que corrobora estes dados é o de Vantarakis and Papapetropoulou [15], em que nove amostras também foram negativas na PCR e todas positivas na realização de uma segunda amplificação.

A utilização de duas fases de amplificação prover alta especificidade e sensibilidade na detecção de adenovírus em amostras ambientais [20]. Estudos de Puig *et al* [34] e Noble *et al* [25] já confirmavam que Nested-PCR é mais sensível do que qPCR para diagnosticar AdVs em amostras ambientais. Contraditoriamente, Jiang *et al* [31] sugere que qPCR seja mais sensível do que Nested-PCR em amostras de esgotos. Real time PCR é uma metodologia robusta que oferece menor tempo de diagnóstico e tem a vantagem de realizar a quantificação da carga viral. Para estudos de monitoramento ambiental, em que se deve estipular um limite máximo de certos patógenos nas águas monitoradas, qPCR pode ser a solução para estes problemas.

Concluindo, para amostras ambientais, PCR não deve ser o método de escolha para detectar AdVs em meio ambiente, deve-se priorizar qPCR ou Nested-PCR. Para detectar AdVs em amostras de rios ou lagos a metodologia de escolha deve ser UC + Nested-PCR. Em razão de um maior número de dados analisados, é aconselhável utilizar MFm + UF + qPCR para detectar AdVs em amostras de esgotos tratados e não tratados (Tabela 2). Estudos adicionais são necessários para avaliar os métodos que foram empregados em um único estudo e/ou com número inexpressivo de amostras.

## Referências

- Xagorarakis I, Kuo DH-W, Wong K, Wong M, Rose JB. Occurrence of Human Adenoviruses at Two Recreational Beaches of the Great Lakes. *Appl Environ Microbiol.* 2007; 73: 6874-7881.
- Karamoko Y, Ibenyassine K, Aitmhah R, Idaomar M, Ennaji MM. Adenovirus detection in shellfish and urban sewage in Morocco (Casablanca region) by the polymerase chain reaction. *J Virol Methods.* 2005; 126: 135-7.
- Miagostovich MP, Ferreira FFM, Guimarães FR, Fumian TM, Diniz-Mendes L, Luz SLB, Silva LA, Leite JPG. Molecular Detection and Characterization of Gastroenteritis Viruses Occuring Naturally in the Stream Waters of Manaus, Central Amazônia, Brazil. *Appl Environ Microbiol.* 2008; 74: 375-82.
- Loge FJ, Thompson DE, Call DR. PCR Detection of Specific Pathogens in Water; A Risk-Based Analysis. *Environ Sci Technol.* 2002; 36: 2754-9.
- Rohayem J, Dumke R, Jaeger K, Schröter-Bobsin U, Mogel M, Kruse A, Jacobs A, Rethwilm A. Assessing the Risk of transmission of Viral Diseases in Flooded Areas: Viral Load of the River Elbe in Dresden during the Flood of August 2002. *Intervirolog.* 2006; 49: 370-6.
- Haramoto E, Katayama H, Oguma K, Ohgaki S. Quantitative analysis of human enteric adenoviruses in aquatic environments. *J Appl Microbiol.* 2007; 103: 2153-9.
- Katayama H, Haramoto E, Oguma K, Yamashita H, Tajima A, Nakajima H, Ohgaki S. One-year monthly quantitative survey of noroviruses, enteroviruses, and adenoviruses in wastewater collected from six plants in Japan. *Water Res.* 2008; 42: 1441-8.
- Soule H, Genoulz O, Gratacap-Cavallier B, Chevallier P, Liu J-X. Ultrafiltration and reverse transcription-polymerase chain reaction: an efficient process for poliovirus, rotavirus and hepatitis A virus detection in water. *Water Res.* 2000; 34: 1063-7.
- Rajal VB, McSwain BS, Thompson DE, Leutenegger CM, Wuertz S. Molecular quantitative analysis of human viruses in California stormwater. *Water Res.* 2007; 41: 4287-98.
- Myrmel M, Berg EMM, Grinde B, Rimstad E. Immunomagnetic separation of a Norwalk-like virus (genogroup I) in artificially contaminated environmental water samples. *Int J Food Microbiol.* 2006; 62: 17-26.
- Formiga-Cruz M, Hundesa A, Clemente-Casares P, Albiñana-Gimenez N, Allard A, Girones R. Nested multiplex PCR assay for detection of human enteric viruses in shellfish and sewage. *J Virol Methods.* 2005; 124: 111-8.
- He J-W, Jiang S. Quantification of Enterococci and Human Adenoviruses in Environmental Samples by Real-Time PCR. *Appl Environ Microbiol.* 2005; 71: 2250-5.
- Albinana-Gimenez N, Clemente-Casares P, Bofill-Mass S, Hundesa A, Ribas F, Girones R. *Environ Sci Technol.* 2006; 40: 7416-22.
- Chen Z, Hsu F-H, Battigelli D, Chang H-C. Capture and release of viruses using amino-functionalized silica particles. *Anal Chim Acta.* 2006; 569: 76-82.
- Vantarakis A, Papapetropoulou M. Detection of Enteroviruses, Adenoviruses and Hepatitis A Viruses in Raw Sewage and Treated Effluents by Nested-PCR. *Wat, Air, and Soil Pollution.* 1999, 114: 85-93.
- Farrar SR, Bitton G. Low molecular weight substitutes for beef extracts as eluants for poliovirus adsorbed to membrane filters. *Can J Microbiol.* 1979; 25: 1045-51.
- Lewis GD, Metcalf TG. Polyethylene Glycol Precipitation for Recovery of Pathogenic Viruses, Including Hepatitis A Virus and Human Rotavirus, from Oyster, Water, and Sediment Samples. *Appl Environ Microbiol.* 1988; 54: 1983-8.
- Lukasik L, Scott TM, Andryshak D, Farrar SR. Influence of Salts on Virus Adsorption to Microporous Filters. *Appl*

- Environ Microbiol. 2000; 66: 2914-20.
19. Pina S, Puig M, Lucena F, Jofre J, Girones R. Viral Pollution in the Environment and in Shellfish: Human Adenovirus Detection by PCR as an Index of Human Viruses. *Appl Environ Microbiol.* 1998; 64: 3376-82.
  20. Castingnolles N, Peti F, Mendel I, Simon L, Cattolico L, Buffet-Janvresse C. Detection of Adenovirus in the waters of the Seine River estuary by Nested-PCR. *Mol Cel Probes.* 1998; 12: 175-80.
  21. Formiga-Cruz M, Allard AK, Condin-Hansson AC, Henshilwood K, Hernroth BE, Jofre J, Lees DN, Lucena F, Papapetropoulou M, Rangdale RE, Tsibouxi A, Vantarakis A, Girones R. Evaluation of Potential Indicators of Viral Contamination in Shellfish with Applicability to Diverse Geographical Areas. *Appl Environ Microbiol.* 2003; 69: 1556-63.
  22. Lee C, Kim S-J. Molecular Detection of Human Enteric Viruses in Urban Rivers in Korea. *J Microbiol Biotechnol.* 2008; 18: 1156-63.
  23. Gerba CP, Gramos DM, Nwachuku N. Comparative inactivation of enteroviruses and adenovirus 2 by UV light. *Appl Environ Microbiol.* 2002; 68: 5167-9.
  24. Thompson SS, Jackson JL, Suva-Castillo M, Yanko WA, El Jack Z, Kuo J, Chen CL, Williams FP, Schunurr DP. Detection of infectious human adenoviruses in tertiary-treated and ultraviolet-disinfected wastewater. *Water Environ Res.* 2003; 75: 163-70.
  25. Noble RT, Allen SM, Blackwood AD, Chu W, Jiang SC, Lovelace L, Sobsey MD, Stewart JR, Wait DA. Use of viral pathogens and indicators to differentiate between human and non-human fecal contamination in a microbial source tracking comparison study. *J Wat Health.* 2003; 1: 195-207.
  26. Greening GE, Hewit J, Lewis GD. Evaluation of integrated cell culture-PCR (C-PCR) for virological analysis of environmental samples. *J Appl Microbiol.* 2002; 93: 745-50.
  27. Carducci A, Verani M, Battistini R, Pizzi F, Rovini E, Andreoli E, Casini B. Epidemiological surveillance of human enteric viruses by monitoring of different environmental matrices. *Water Sci Technol.* 2006; 54: 239-44.
  28. Egger M, Smith GD. Meta-analysis: potentials and promise. *BMJ.* 1997; 315: 1371-4.
  29. Polit DF, Beck CT, Hungler BP. Avaliação da mensuração e da qualidade dos dados. *Fundamentos de Pesquisa em Enfermagem. Métodos, avaliação e utilização.* Porto Alegre. Ed. Artmed. 2004.
  30. Lipp Ek, Lukasiki J, Rose JB. 2001. Human enteric viruses and parasites in the marine environment. *Methods Microbiol.* 2001; 30: 559-88.
  31. Jiang SC, Chu W. PCR detection of pathogenic viruses in southern California urban rivers. *J Appl Microbiol.* 2004; 97: 17-28.
  32. Chapron CD, Ballester NA, Fontaine JH, Frades CN, Margolin A. Detection of Astroviruses, Enteroviruses, and Adenoviruses Types 40 and 41 in Surface Waters Collected and Evaluated by the Information Collection Rule and an Integrated Cell Culture-Nested PCR Procedure. *Appl Environ Microbiol.* 2000; 66: 2520-5.
  33. Jiang S, Noble R, Chu W. Human adenoviruses and coliphages in urban runoff-impacted coastal water of Southern California. *Appl Environ Microbiol.* 2001; 67: 179-84.
  34. Puig M, Jofre J, Lucena F, Allard A, Wadell G, Girones R. Detection of Adenoviruses and Enteroviruses in Polluted Waters by Nested PCR Amplification. *Appl Environ Microbiol.* 1994; 60: 2963-70.
  35. Rodríguez-Díaz J, Querales J, Caraballo L, Vizzi E, Liprandi F, Takiff H. Gastroenteritis Viruses in Urban Sewage and Sewage-Polluted River Waters in Caracas, Venezuela. *Appl Environ Microbiol.* 2009; 75: 387-94.
  36. Hundesa A, de Montes CM, Bofill-Mass S, Albinana-Gimenez N, Girones R. Identification of Human and Animal Adenoviruses and Polyomaviruses for Determination of Sources of Fecal Contamination in the Environment. *Appl Environ Microbiol.* 2006; 72: 7886-93.
  37. Haramoto E, Katayama H, Oguma K, Ohgaki S. Application of Coation-Coated Filter Method to Detection of Noroviruses, Enteroviruses, Adenoviruses, and Torque Teno Viruses in the Tamagawa River in Japan. *Appl Environ Microbiol.* 2004; 71: 2403-11.
  38. Cho HB, Lee S-H, Cho J-C, Kim S-J. Detection of adenoviruses and enteroviruses in tap water and river water by reverse transcription multiplex PCR. *Can J Microbiol.* 2000; 46: 417-24.
  39. Surbeck CQ, Jiang SC, Ahn JH, Grant SB. Flow Fingerprinting Fecal Pollution and Suspended Solids in Stormwater Runoff from an Urban Coastal Watershed. *Environ Sci Technol.* 2006; 40: 4435-41.
  40. Backer LC, Carmichael W, Kirkpatrick B, Williams C, Irvin M, Zhou Y, Johnson TB, Nierenberg K, Hill VR, Kieszak SM, Cheng Y-S. Recreational Exposure to Low Concentrations of Microcystins During an Algal Bloom in a Small Lake. *Mar Drugs.* 2008; 6: 389-406.
  41. Jiang S, Dezfulian H, Chu W. Real-time quantitative PCR for enteric adenovirus serotype 40 in environmental waters. *Can J Microbiol.* 2005; 51: 393-8.
  42. Bofill-Mass S, Albinana-Gimenez N, Clemente-Casares P, Hundesa A, Rodríguez-Manzano J, Allard A, Calvo M, Girones R. Quantification and Stability of Human Adenoviruses and Polyomavirus JCPyV in Wastewater Matrices. *J Appl Microbiol.* 2006; 72: 7894-6.
  43. Kominou G, Vantarakis A, Venieri D, Papapetropoulou M. Evaluation of virological quality of sewage from four biological treatment plants by a nested-PCR technique. *Water Sci Technol.* 2004; 50: 243-57.
  44. de Motes CM, Clemente-Casares P, Hundesa A, Martín M. Detection of Bovine and Porcine Adenoviruses for Tracing the Source of Fecal Contamination. *Appl Environ Microbiol.* 2004; 70: 1448-54.
  45. Jiang SC, Chu W, Olson BH, He J-W, Choi S, Zhang J, Le JY, Gedalanga PB. Microbial source tracking in a small southern California urban watershed indicates wild animals and growth as the source of fecal bacteria. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2007; 76: 927-34.