

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-graduação em Microbiologia

André Felipe Leal Bernardes

**AVALIAÇÃO DAS COMUNIDADES DE BACTERIA, ARCHAEA E VÍRUS
ENTÉRICOS DO ESGOTO SANITÁRIO DO AEROPORTO E DA RODOVIÁRIA DE
BELO HORIZONTE**

Belo Horizonte
2017

André Felipe Leal Bernardes

**AVALIAÇÃO DAS COMUNIDADES DE BACTERIA, ARCHAEA E VÍRUS
ENTÉRICOS DO ESGOTO SANITÁRIO DO AEROPORTO E DA RODOVIÁRIA DE
BELO HORIZONTE**

Versão final

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Microbiologia.

Orientador: Luiz de Macêdo Farias

Coorientadora: Paula Prazeres Magalhães

Belo Horizonte
2017

043

Bernardes, André Felipe Leal.

Avaliação das comunidades de bactéria, archaea e vírus entéricos do esgoto sanitário do aeroporto e da rodoviária de Belo Horizonte [manuscrito] / André Felipe Leal Bernardes. – 2017.

115 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Luiz de Macêdo Farias. Coorientadora: Paula Prazeres Magalhães.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia.

1. Microbiologia. 2. Metagenômica. 3. Esgotos. 4. Microbiota. I. Farias, Luiz de Macêdo. II. Magalhães, Paula Prazeres. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 579



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA

ATA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE ANDRÉ FELIPE LEAL BERNARDES
Nº REGISTRO: 2015662817
Relatora e Suplente: Profa. Simone Gonçalves dos Santos

Às 08:30 do dia 07 de fevereiro de 2017, reuniu-se, no Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, a Comissão Examinadora composta pela Dra. Patrícia Costa Lima da Silva (Centro Universitário UNA), pela Profa. Sílvia Bezeza de Moura (Departamento de Microbiologia/ICB/UFMG), pela Profa. Paula Prazeres Magalhães (Coorientadora) e pelo Prof. Luiz de Macêdo Farias (Orientador), para julgar o trabalho final "AVALIAÇÃO DAS COMUNIDADES DE BACTÉRIA, ARCHAEA E VÍRUS ENTÉRICOS DO ESGOTO SANITÁRIO DO AEROPORTO E DA RODOVIÁRIA DE BELO HORIZONTE", do aluno André Felipe Leal Bernardes, requisito final para a obtenção do Grau de **MESTRE EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: MICROBIOLOGIA**. Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, Prof. Flávio Guimarães da Fonseca - Coordenador do Programa, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra ao candidato, para a apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos Examinadores, com a respectiva defesa do candidato. Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença do candidato e do público, para julgamento e expedição de resultado final. O candidato foi considerado **APROVADO**. O resultado final foi comunicado publicamente ao candidato pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ata, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. Belo Horizonte, 07 de fevereiro de 2017.

Dra. Patrícia Costa Lima da Silva Patrícia Costa Lima da Silva

Profa. Sílvia Bezeza de Moura Sílvia Bezeza de Moura

Profa. Paula Prazeres Magalhães (Coorientadora) Paula Prazeres Magalhães

Prof. Luiz de Macêdo Farias (Orientador) Luiz de Macêdo Farias

Flávio Guimarães da Fonseca
Prof. Flávio Guimarães da Fonseca
Coordenador

Belo Horizonte
2017

COLABORAÇÃO

Instituto Octávio Magalhães

Divisão de Vigilância Sanitária

Serviço de Microbiologia de Produtos

Fundação Ezequiel Dias

Anna Gabriella Guimarães Oliveira

Laboratório de Microbiologia Oral e Anaeróbios

Departamento de Microbiologia

Andréa Maria Amaral Nascimento

Laboratório de Genética de Microrganismos

Departamento de Biologia Geral

Instituto de Ciências Biológicas

Universidade Federal de Minas Gerais

Luciano dos Santos Rodrigues

Laboratório de Saneamento

Departamento de Medicina Veterinária Preventiva

Gislaine Fongaro

Laboratório de Microbiologia e Bioprospecção Tecnológica

Departamento de Ciências Biológicas -UFOP

APOIO FINANCEIRO

CNPq

FAPEMIG

CAPES

PRPq/UFMG

AGRADECIMENTO

Ao meu orientador, Luiz de Macêdo Farias, muito obrigado por me receber no MOA durante esses últimos anos. A sua atenção, preocupação, interesse e disponibilidade foram fundamentais para a realização do projeto.

À minha coorientadora, Paula Prazeres Magalhães, por carinhosamente me receber no MOA, confiar em mim, compartilhar seus conhecimentos e contribuir de maneira fundamental para construção deste trabalho.

A todos os pesquisadores (estudantes ou professores) do Laboratório de Microbiologia Oral e Anaeróbios, que compartilharam as experiências, o aprendizado, a angústia, o tempo e intelecto de vocês comigo. Em especial, Anna Gabriela e Diego Marquioli, que se tornaram grandes colaboradores na execução desse projeto.

À Marcela que tão gentilmente nos ajudou no sequenciamento e análise de dados.

À Gislaïne por nos receber e compartilhar seus conhecimentos sobre as ferramentas de análise na pesquisa dos vírus entéricos.

Aos colegas da Funed, Serviço de Microbiologia de Produtos, muito obrigado por todo apoio durante o mestrado. As conversas e o incentivo de vocês foram fundamentais. Em especial, agradeço a Junara Vianna, enquanto chefia de serviço sempre demonstrou apoio às minhas ideias, mesmo perante as adversidades.

Aos meus pais, José Bernardes e Nildecy, o carinho e compreensão de vocês sempre me deram a tranquilidade necessária para seguir meu caminho da melhor forma.

Ao meu irmão Vitor por ser um grande amigo e demonstrar seu apoio.

À minha noiva Luanda, que sempre esteve ao meu lado e me auxiliou em todos os momentos desse projeto. A realidade é que você já dava o suporte que eu precisava antes mesmo de minha aprovação na seleção do mestrado. Você poderia ter somente assistido a minha pós-graduação, mas fez mais que isso ... mais que me ajudar, ou torcer por mim, você estendeu as mãos e caminhou comigo por essa estrada, trazendo equilíbrio e discernimento. O seu apoio nos momentos em que o desespero poderia se tornar maior que a razão trouxe harmonia para que eu pudesse me manter em paz comigo mesmo (*in memorian*).

Fonte: Elaborado pelo autor

“Somos um planeta vivo! Somos um grande barco navegando ao redor de um sol incandescente no universo. Mas cada um de nós é um barco em si mesmo, um barco carregado de genes navegando pela vida” (Jostein Gaarder, O Mundo de Sofia, 1991).

Fonte: Elaborado pelo autor

RESUMO

O conceito de Saúde Única (One Health) engloba uma rede interdisciplinar de conhecimentos voltados ao controle de zoonoses e da disseminação de doenças infecciosas. Nesse contexto, a saúde ambiental fornece informações cruciais e desempenha um importante papel na saúde preventiva. O aumento na circulação de pessoas entre diferentes áreas geográficas recebe atenção especial, uma vez que microrganismos membros da microbiota ou que estejam colonizando os viajantes podem ser introduzidos nos ambientes visitados. Ao utilizar sanitários públicos, por exemplo, as pessoas eliminam estes microrganismos. Ambientes especialmente propícios são aeroportos e rodoviárias. A metagenômica e a qPCR são ferramentas empregadas no estudo da diversidade microbiana ambiental e pesquisa de potenciais patógenos. Assim, pareceu-nos oportuno empregar estas abordagens para investigação da diversidade microbiana de esgotos sanitários do Aeroporto Carlos Drummond de Andrade e Terminal Rodoviário Governador Israel Pinheiro, Belo Horizonte, ambientes públicos com alta concentração de pessoas de diferentes localidades. Em 2016, foram coletadas amostras de esgoto sanitário dos locais mencionados em dois momentos, com circulação normal de pessoas e em período de aumento do movimento. As amostras foram submetidas à extração de DNA e RNA para pesquisa de vírus entéricos (enterovírus totais, adenovírus, rotavírus e vírus das hepatites A e E), Bacteria and Archaea. Todos os vírus entéricos estudados foram detectados em pelo menos uma das amostras obtidas no aeroporto e na rodoviária. O domínio Bacteria foi observado com abundância relativa muito superior ao domínio Archaea. O filo Firmicutes foi o mais abundante, apresentando maior frequência relativa em dias de intensa circulação de pessoas. *Aeromonas* e *Arcobacter*, potenciais patógenos, foram encontrados em todas as amostras pesquisadas. As ações de monitoramento ambiental associadas ao contexto de Saúde Única podem auxiliar na prevenção de doenças infecciosas, constituindo uma importante ferramenta para subsidiar ações de políticas públicas que visem à proteção, à promoção e à recuperação da saúde coletiva.

Palavras-chave: metagenômica, qPCR, esgoto sanitário, diversidade microbiana.

Fonte: Elaborado pelo autor

ABSTRACT

The one health one world concept is related to an interdisciplinary knowledge that targets the control of zoonosis and infectious diseases dissemination. In this sense, environmental health gives crucial information and plays an important role in preventive health. The increase of people circulation between different geographical areas increases the concern regarding the fact that microorganisms harboured by travelers may be introduced in these areas. Therefore, when using public toilets such microorganisms may be eliminated and after this they may circulate through sanitary sewage. Airports and bus stations require special attention. Metagenomics and qPCR are considered as adequate tools to be used in studies that aim to evaluate microbial diversity in a wide range of environments. This investigation addressed the microbial diversity of sanitary sewer of Carlos Drummond de Andrade Airport and Governador Israel Pinheiro Bus Station, Belo Horizonte, places where a lot of people from different regions circulate. In 2016 two samples have been collected from these places one in an ordinary day and another one in a day with increased circulation of people. The collected samples were centrifuged and submitted to DNA and RNA extraction. After that we investigated enteric viruses (enterovirus, adenovirus, rotavirus e hepatitis A and E viruses), Bacteria, and Archaea. All enteric viruses have been detected in at least one sample obtained from each studied place. The relative abundance of Bacteria was higher than that of Archaea. Firmicutes presented the higher relative abundance, mainly when more people circulated in the airport and bus station. *Aeromonas* and *Arcobacter*, considered as potential pathogens, have also been detected in all studied samples. Environmental monitoring associated to the concept of One Health helps preventing infectious diseases constituting a relevant tool and may contribute to the development of public politics to protect, promote, and restore collective health.

Keywords: metagenomics, qPCR, sanitary sewer, microbial diversity.

Fonte: Elaborado pelo autor

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Evolução do conceito de saúde ao longo do tempo	33
Figura 2. Região metropolitana de Belo Horizonte, destacando o Aeroporto Carlos Drummond de Andrade e o Terminal Rodoviário Governador Israel Pinheiro, pontos de coleta das amostras de esgoto a serem estudadas.	52
Figura 3. Abundância relativa das principais classes microbianas detectadas nas amostras de esgoto sanitário do Aeroporto Carlos Drummond de Andrade e do Terminal Rodoviário Governador Israel Pinheiro.....	62
Figura 4. Abundância relativa dos principais táxons detectados nas amostras de esgoto sanitário do Aeroporto Carlos Drummond de Andrade e do Terminal Rodoviário Governador Israel Pinheiro.....	63
Figura 5. Abundância relativa dos principais filos microbianos detectados nas amostras de esgoto sanitário do Aeroporto Carlos Drummond de Andrade e do Terminal Rodoviário Governador Israel Pinheiro.....	65
Figura 6. Abundância relativa dos principais táxons microbianos do filo Firmicutes detectados nas amostras de esgoto sanitário do Aeroporto Carlos Drummond de Andrade e do Terminal Rodoviário Governador Israel Pinheiro.	66
Figura 7. Abundância relativa dos principais táxons microbianos do filo Bacteroidetes detectados nas amostras de esgoto sanitário do Aeroporto Carlos Drummond de Andrade e do Terminal Rodoviário Governador Israel Pinheiro.	68
Figura 8. Abundância relativa dos principais táxons microbianos do filo Proteobacteria detectados nas amostras de esgoto sanitário do Aeroporto Carlos Drummond de Andrade e do Terminal Rodoviário Governador Israel Pinheiro.	69
Figura 9. Abundância relativa dos principais táxons microbianos do filo Actinobacteria detectados nas amostras de esgoto sanitário do Aeroporto Carlos Drummond de Andrade e do Terminal Rodoviário Governador Israel Pinheiro.	70
Figura 10. Alfa diversidade biológica do esgoto sanitário do Aeroporto Carlos Drummond de Andrade e do Terminal Rodoviário Governador Israel Pinheiro avaliada pelos índices de Chao1, ACE, Shannon, Simpson.	72
Figura 11. Beta diversidade entre as amostras esgoto sanitário do Aeroporto Carlos Drummond de Andrade e do Terminal Rodoviário Governador Israel Pinheiro.....	73

Figura 12. A figura ilustra o número de OTUs dos principais patógenos nas amostras de esgoto sanitário do Aeroporto Carlos Drummond de Andrade e do Terminal Rodoviário Governador Israel Pinheiro. 74

Fonte: elaborado pelo autor

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Resultado das análises físico-químicas dos ambientes de esgoto sanitário do Aeroporto (AN e AA) e Rodoviária (RN e RA).....	60
Tabela 2. Abundância relativa dos principais filos microbianos detectados nas amostras de esgoto sanitário do Aeroporto Carlos Drummond de Andrade e do Terminal Rodoviário Governador Israel Pinheiro. Filos com abundância menor que 1% para todas as amostras não foram representados.	64
Tabela 3. Alfa diversidade biológica do esgoto sanitário do Aeroporto Carlos Drummond de Andrade e do Terminal Rodoviário Governador Israel Pinheiro avaliada pelos índices de Chao1, ACE, Shannon, Simpson.	71
Tabela 4. Quantificação de vírus entéricos nas amostras de esgoto sanitário do Aeroporto Carlos Drummond de Andrade e do Terminal Rodoviário Governador Israel Pinheiro.	74

Fonte: Elaborado pelo autor

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Contribuições importantes para a microbiologia ao longo da história.....	22
Quadro 2. Principais alterações contemporâneas nas relações entre o ser humano, os outros animais e o meio ambiente.	35
Quadro 3. Reações de amplificação (qPCR) empregadas para identificação de Vírus Entéricos.....	58

Fonte: Elaborado pelo autor

LISTA DE ABREVIATURAS

AN: Aeroporto em dia de circulação normal de pessoas.

AA: Aeroporto em dia de circulação aumentada de pessoas

AIDS: Síndrome da Imunodeficiência Adquirida

APHA, AWWA, WEF: Métodos Padronizados para o Exame de Água e Esgoto

DAEC: *E. coli* difusamente aderente

DAS: *deep amplicon sequencing*

DBO: Débito Biológico de Oxigênio

DECD: Divisão de Epidemiologia e Controle de Doenças

DHPMC: Divisão de Planejamento e Gestão da Qualidade e Unidade de Higienização e Produção de Meios de Cultura

DIVISA: Divisão de Vigilância Sanitária

dsRNA: Fita Dupla de RNA

DNA: ácido desoxirribonucleico

DQO: Débito Químico de Oxigênio

DTA: Doença Transmitida por Alimentos

DVA/SES-MG: Diretoria de Vigilância Ambiental

cDNA: DNA formado a partir de RNA

CDC: Centro de Controle e Prevenção de Doenças

CG: Cópias genômicas

dNTP: desoxirrinonucleotídeo trifosfatado

EAEC: *E. coli* enteroagregativa

EIEC: *E. coli* enteroinvasiva

EHEC: *E. coli* enterohemorrágica

EPA: Agência Americana de Proteção ao Meio Ambiente

EPEC: *E. coli* enteropatogênica

ETEC: *E. coli* enterotoxigênica

ETE: Estação de Tratamento de Esgoto

EV: Enterovírus totais

F: *forward*

FAO: Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação

FIFA: Federação Internacional de Futebol

FUNED: Fundação Ezequiel Dias

HADV: Adenovírus Humano

HAV: Vírus da Hepatite A

HEV: Vírus da Hepatite E

IOM: Instituto Octávio Magalhães

LA/FUNED: Laboratório de Águas/FUNED

Lacen: Laboratório Central

LPS: Lipopolissacarídeo

mRNA: RNA mensageiro

NTU: unidades nefelométricas de turbidez

PBS: Tampão Fosfato Salino

PCR: reação de polimerização em cadeia

PMAC: Programa de Monitoramento Ambiental de Cólera

qPCR: PCR em tempo real

R: *reverse*

RA: Rodoviária em dia de circulação aumentada de pessoas

rDNA: DNA ribossômico

RN: Rodoviária em dia de circulação normal de pessoas.

RNA: Ácido ribonucleico

RVA: Rotavírus

RNA: ácido ribonucleico

rRNA: RNA ribossômico

RT: Transcriptase reversa

RT-PCR: Transcriptase reversa - PCR

RT-qPCR: Transcrição reversa - PCR em tempo real

SES-MG: Secretaria Estadual de Saúde de Minas Gerais

SGA/FUNED: Serviço de Gerenciamento de Amostras/FUNED

SRS: Superintendência Regional de Saúde

SUS: Sistema Único de Saúde

TTSS III: Sistema de Secreção do tipo III

OTU: unidade taxonômica operacional

ORF: Open Reed Frame

OIE: Organização Mundial de Saúde Animal

WHO: Organização Mundial de Saúde

Fonte: Elaborado pelo autor

Sumário

1.1	MICROBIOLOGIA: DOS PRIMÓRDIOS À ERA METAGENÔMICA	21
1.2	METAGENÔMICA	24
1.2.1	BREVE HISTÓRICO	24
1.2.2	CONCEITO E ABORDAGENS	25
1.2.3	ANÁLISE DO rDNA 16S	27
1.3	A ÁGUA, SUA UTILIZAÇÃO E SEUS SUBPRODUTOS	28
1.4	ASSOCIAÇÃO ENTRE MICROBIOMA HUMANO E AMBIENTE DE ESGOTO	30
1.5	MEIO AMBIENTE E SUA RELAÇÃO COM OS AGRAVOS À SAÚDE: O CONCEITO DE SAÚDE ÚNICA (<i>ONE HEALTH ONE WORLD</i>)	31
1.6	VIGILÂNCIA AMBIENTAL, EPIDEMIOLÓGICA E MONITORAMENTO DE DOENÇAS INFECCIOSAS	35
1.7	DOENÇAS TRANSMITIDAS POR ALIMENTOS E ÁGUA	38
1.8	PRINCIPAIS AGENTES DIARREIOGÊNICOS	39
1.8.1	VÍRUS	39
1.8.1.1	ADENOVÍRUS (HADV)	39
1.8.1.2	VÍRUS DA HEPATITE A (HAV)	40
1.8.1.3	VÍRUS DA HEPATITE E (HEV)	42
1.8.1.4	ENTEROVÍRUS	43
1.8.1.5	ROTAVÍRUS (RVA)	44
1.8.2	BACTÉRIAS	45
1.8.2.1	<i>Aeromonas</i>	45

1.8.2.2	<i>Arcobacter</i>	46
2	JUSTIFICATIVA	48
3	OBJETIVOS	50
3.1	OBJETIVO GERAL	50
3.1.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	50
4	MATERIAL E MÉTODOS	51
4.1	ÁREAS DE ESTUDO	51
4.2	OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS	52
4.2.1	RODOVIÁRIA	53
4.2.2	AEROPORTO	54
4.3	ANÁLISE FÍSICO-QUÍMICA	54
4.4	ANÁLISE DAS COMUNIDADES DE BACTERIA E ARCHAEA	54
4.5	PESQUISA DE VÍRUS ENTÉRICOS	56
4.5.1	CONCENTRAÇÃO E CLARIFICAÇÃO VIRAL	56
4.5.2	EXTRAÇÃO DE ÁCIDOS NUCLEICOS	56
4.5.3	QUANTIFICAÇÃO VIRAL	56
5.1	ANÁLISE FÍSICO-QUÍMICA	59
5.2	ANÁLISE DAS COMUNIDADES DE BACTÉRIA E ARCHAEA	61
5.3	PESQUISA DE VÍRUS ENTÉRICOS	67
6.1	FATORES FÍSICO-QUÍMICOS	75
6.3	PESQUISA DE VÍRUS ENTÉRICOS	83
7	CONSIDERAÇÕES FINAIS	90
7	CONCLUSÕES	91
9	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	92

Fonte: Elaborado pelo autor

INTRODUÇÃO

1.1 MICROBIOLOGIA: DOS PRIMÓRDIOS À ERA METAGENÔMICA

A descoberta do microscópio ocorreu no final do século XVI, rompendo a barreira do que era, até então, invisível para o ser humano e revolucionando a biologia e quase todas as ciências que a constituem, entre elas, em especial, a microbiologia. A partir deste período, foi possível observar seu objeto de estudo, os microrganismos, e, então, foram criados, estimulados e explorados diversos campos dessa disciplina. Logo, as relações intermicrobianas, bem como entre os microrganismos, o ser humano e o ambiente, começaram a ser esclarecidas (MADIGAN *et al.*, 2014).

O campo da biologia de microrganismos começou a ganhar notoriedade, no mundo científico e na sociedade, há cerca de trezentos anos, com a descoberta de agentes microbianos associados a determinadas manifestações clínicas (Quadro 1). Nesta época, diversos cientistas tornaram-se conhecidos como “caçadores de micróbios”. Atuavam elucidando a ação de agentes de doenças até então descritas, contribuindo e começando a moldar o conhecimento sobre microbiologia (BULLEID, 1954, KOPROWSKI; OLDSTONE, 1997).

Concomitantemente, a bacteriologia progrediu, utilizando ferramentas já desenvolvidas, como o microscópio, e implementando novos procedimentos e técnicas, por exemplo, meios de transporte reduzidos e diferentes corantes celulares, o que permitiu cultivar um número maior de microrganismos e ampliar a quantidade de espécies bacterianas conhecidas. Além disso, o desenvolvimento de meios seletivos e indicadores permitiu o direcionamento da pesquisa microbiana para determinados grupos específicos (OPLUSTIL *et al.*, 2004).

Quadro 1. Contribuições importantes para a microbiologia ao longo da história.

Cientista (ano de nascimento)	Contribuição
Anton van Leeuwenhoek (1632)	Descoberta dos micróbios e formulação de meios de cultivo
Pierre Fauchard (1678)	Cárie causada por germes
Lazzaro Spallanzani (1729)	Forma de replicação bacteriana
Pierre Bretonneau (1771)	Difteria
Agostini Bassi (1773)	“Pai dos micróbios patogênicos”
Charles Cagniard de la Tour(1777)	Brotamento de células leveduriformes
Charles Darwin (1809)	Teoria da origem das espécies
Theodor Schwann (1810)	Um dos propositores da teoria celular
John Tyndall (1820)	Propriedades antibióticas do mofo e destilação fracionada
Louis Pasteur (1822)	Teoria da fermentação por germes (microrganismos causam doenças em animais)
Joseph Lister (1827)	Pulverizador carbólico (ambiente descontaminado, agente bactericida sanguíneo)
Robert Koch (1843)	Pai da bacteriologia moderna [<i>Bacillus anthrax</i> (formação de esporo), <i>Mycobacterium tuberculosis</i> e <i>Vibrio cholerae</i> , cultura em meio sólido, coloração de microrganismos]
Ilya Ilyich Mechnikov (1845)	Teoria da imunidade fagocítica
Friedrich Loeffler (1852)	Sugestão de produção de exotoxinas por microrganismos
Pierre Paul Émile Roux (1853)	Produção de exotoxinas pelo bacilo causador da difteria
Emil Adolf von Behring (1854)	Princípios da soroterapia
Paul Ehrlich (1854)	Teoria da imunidade e quimioterapia
Theobald Smith (1859)	Transporte do vírus da febre Texas por carrapatos
Alexander Fleming (1881)	Penicilina
Francis Crick (1916) e James Watson (1928)	Estrutura do DNA

As características das colônias observadas a partir das técnicas de cultivo associadas às características bioquímico-fisiológicas permitiram agrupar as bactérias em hierarquias taxonômicas. A cultura microbiana a partir das fezes de indivíduos saudáveis e doentes permitiu descrever situações em que os organismos estariam presentes como membros da microbiota indígena e em quais condições eles estariam associados à etiopatogenia de doenças infecciosas. Além disso, as técnicas dependentes de cultivo permitiram estabelecer a relação entre o isolamento de microrganismos patogênicos veiculados por diferentes vias, tais como água ou alimentos (HARRIS, 1972, TANNOCK *et al.*, 2000, IVANOVA *et al.*, 2001, LEAL BERNARDES; DIAS, 2014).

Grande parte do conhecimento sobre a fisiologia, bioquímica, genética e diversidade bacteriana foi produzida e acumulada pela utilização de métodos microbiológicos tradicionais, dependentes de cultivo. Os dados gerados evidenciaram diversos tipos de interações das quais os microrganismos participam, demonstrando que elas são muito mais amplas do que se imaginava. Se, no início, a bacteriologia os relacionava somente às doenças infecciosas, há algum tempo, este conceito não é mais aceito. Atualmente, os microrganismos foram alçados a outra posição, sendo reconhecidos como constituintes ativos dos mais variados ecossistemas terrestres e aquáticos e de uma gama de organismos hospedeiros, como animais e vegetais, contribuindo substancialmente para a sua manutenção e equilíbrio (BINNEWIES *et al.*, 2006, CHO; BLASER, 2012).

Independente das funções ecológicas que um organismo realize, é instintiva a associação que todos os seres apresentam características que, de alguma maneira, serão transmitidas as gerações posteriores. Entretanto, os fenômenos envolvidos nesse processo tornaram-se conhecidos há pouco mais de sessenta anos, através dos estudos de Frederick Griffith (1928), culminando no modelo proposto por Watson e Crick (1953).

Um dos desdobramentos da elucidação da estrutura do DNA foi esclarecer como ocorre a transmissão da informação genética e a realização de funções celulares, sendo a base para a compreensão de como a hereditariedade ocorre nos organismos. Além disso, outra consequência envolvida foi o desenvolvimento da

síntese de oligonucleotídeos, gerando sustentação prática e teórica para a criação das técnicas de PCR e sequenciamento (KORNBERG, 1960).

O sequenciamento de DNA trouxe novo enfoque e profundidade à microbiologia (SANGER; NICKLEN; COULSON, 1977). Entretanto, foi somente a partir dos anos 1980, com a consolidação do conhecimento sobre o DNA e maior familiaridade e utilização das técnicas de genética molecular criadas a partir dos anos de 1960, que houve campo para o desenvolvimento da PCR, técnica baseada na amplificação de uma sequência de DNA alvo (MULLIS, 1990, BUCK, 2007).

A PCR é uma técnica extremamente versátil e contribuiu para diferentes campos da biologia, por exemplo, no diagnóstico de doenças, testes de paternidade, elucidação de crimes, identificação de contaminação indesejada por microrganismos em águas e alimentos, reestruturação de árvores evolutivas, identificação e caracterização de famílias virais, entre outros. Por apresentar, enorme utilidade em diferentes áreas, essa técnica vem sendo amplamente utilizada, principalmente, a partir da década de 1990, sendo, desde então, uma das ferramentas mais empregadas na área da bacteriologia (GARIBYAN; AVASHIA, 2013).

Ao longo dos anos, diversas variações das técnicas de PCR e sequenciamento foram propostas, com objetivos específicos e aplicações diversas. Mais recentemente, a abordagem metagenômica foi introduzida. Comparada à revolução que a microscopia proporcionou no século XVI, essa abordagem exerceu profundo impacto na microbiologia contemporânea, auxiliando a superar barreiras metodológicas e estabelecer novos conceitos na pesquisa biológica (HANDELSMAN *et al.*, 2004, BINNEWIES *et al.*, 2006).

1.2 METAGENÔMICA

1.2.1 BREVE HISTÓRICO

Os microrganismos se distribuem em praticamente, todos os ambientes conhecidos (ar, solo, água e em associações diversas com organismos micro e macroscópicos) e o estudo da composição das comunidades microbianas nos diferentes ambientes mostra-se relevante, uma vez que, dependendo do contexto,

podem promover a saúde ou desencadear doenças, influenciam na decomposição de matéria orgânica e impactam diretamente na ciclagem de substâncias inorgânicas (BROOK, 2008).

Ainda há muito a se explorar sobre as comunidades microbianas presentes nestes diversos *habitats*, pois há carência de técnicas/conhecimentos que possibilitem o cultivo de boa parte dos microrganismos. Um exemplo é a espécie *Mycobacterium leprae*, que, apesar de ser conhecida há, pelo menos, 500 anos, ainda não foi cultivada em laboratório (SCHUENEMANN *et al.*, 2013). Para Aman *et al.* (1990), já no final do século XX, noventa e nove por cento dos microrganismos ainda permaneciam incultiváveis.

Frente aos desafios para a elucidação da composição dos diferentes microbiomas, coleções de microrganismos, suas informações genéticas e suas interações com o meio que habitam (CHO; BLASER, 2012), tornou-se necessário o desenvolvimento de novos protocolos para o cultivo de microrganismos até então incultiváveis em laboratório ou de técnicas independentes de cultivo (SULTANA; NEELAKANTA, 2013).

O estudo das comunidades microbianas sem o isolamento de seus componentes tornou-se possível a partir de uma série de descobertas científicas, que culminaram na metagenômica. Nos últimos anos, tem-se observado um grande aumento no número de publicações que utilizam essa abordagem como ferramenta para análise de comunidades microbianas diversas (SIMON; DANIEL, 2009, JU *et al.*, 2013).

1.2.2 CONCEITO E ABORDAGENS

O termo metagenômica foi proposto por Handelsman e colaboradores (1998), ancorado nos conceitos de meta-análise e genômica. Metagenoma é o genoma coletivo da microbiota total encontrada em um determinado *habitat*. Metagenômica, por sua vez, consiste na análise genômica da comunidade de microrganismos de um determinado ambiente por técnicas independentes de cultivo (SLEATOR; SHORTALL; HILL, 2008).

Atualmente, existem duas abordagens amplamente empregadas nos estudos de metagenoma: *target* e método de *shotgun*. No primeiro, o material é submetido a uma PCR pré-sequenciamento, visando aumentar a quantidade de alvos taxonômicos de interesse, geralmente, genes conservados. A técnica permite identificar novos microrganismos, descrever o microbioma de uma espécie e quantificar a abundância dos vários *taxa* em uma amostra. A segunda abordagem emprega o sequenciamento de todo o material genético presente em uma dada amostra. Por isso, tem a capacidade potencial de catalogar todos os microrganismos detectados, avaliando as relações taxonômicas entre eles e a presença de organismos desconhecidos e elementos genéticos (MILLER *et al.*, 2013). Embora seja possível o sequenciamento de todo o material genético da amostra, não é incomum o direcionamento do estudo para um grupo específico. Sendo assim, poderá ser útil a adoção de medidas que restrinjam a busca ao organismo de interesse ou à comunidade microbiana em questão (MILLER *et al.*, 2013).

As análises metagenômicas envolvem a coleta do material, armazenamento, transporte, extração, purificação, amplificação e sequenciamento do material genético, seguidos da análise dos resultados. Para isso, utilizam-se bancos de dados e *softwares* específicos (RIESENFELD; SCHLOSS; HANDELSMAN, 2004).

Como já mencionado, o primeiro método de sequenciamento genético foi desenvolvido por Sanger, Nicklen e Coulson (1977), sendo denominado de método de terminação de cadeia. Basicamente, o método sequencia o material genético (cerca de 500 pb) pela marcação de dideoxynucleotídeos que, pela falta de um grupo hidroxila, impedem a continuidade do processo de amplificação. Então, por meio de uma corrida eletroforética, é possível identificar os fragmentos de DNA com massas moleculares diferentes e determinar sua sequência de nucleotídeos. Posteriormente, o método de pirosequenciamento, que evidencia a ordem dos nucleotídeos a partir da liberação do grupo pirofosfato (RONAGHI, 1998), foi desenvolvido.

Mais recentemente, o sequenciamento de nova geração foi desenvolvido. A técnica utiliza uma abordagem denominada tecnologia de sequenciamento por síntese, em que um marcador terminal fluorescente reversível é visualizado com a adição de dNTPs e, em seguida, é clivado para permitir a incorporação da base

seguinte. Todos os quatro dNTPs terminais reversíveis estão presentes durante cada ciclo de sequenciamento. O resultado final é o sequenciamento base por base (MARDIS, 2008).

1.2.3 ANÁLISE DO rDNA 16S

Os ribossomos são organelas complexas, constituídas por proteínas e rRNA. Apresentam uma subunidade grande e uma subunidade pequena, designadas de acordo com sua velocidade de sedimentação quando submetidas à força centrífuga, expressa na unidade denominada *svedberg* (S). As bactérias apresentam três tipos de rRNA (rRNA 23S, rRNA 16S e rRNA 5S) (WOESE, 1987; PIERCE, 2003).

Tanto o DNA como o RNA podem ser empregados para identificação e classificação de microrganismos, por meio de procedimentos como hibridização de DNA e PCR, por exemplo. O rDNA 16S é amplamente utilizado como marcador filogenético, pois é uma molécula ancestral conservada, possui distribuição universal e é pouco afetado por transferência gênica horizontal. Possui regiões conservadas e variáveis, o que favorece sua utilização (LANE *et al.*, 1985, STAHL; LANE; OLSEN, 1985, WOESE, 1987, HANDELSMAN, 2004, BRUIJN, 2011).

A sequência de rDNA 16S apresenta ~1650 pb divididos em nove regiões hipervariáveis que são separadas por nove regiões conservadas. Devido à quantidade de pares de bases que podem ser sequenciadas pela maioria das plataformas de nova geração, utiliza-se somente o sequenciamento de uma região variável ou a combinação de duas destas regiões (YANG; WANG; QIAN, 2016). A utilização do rDNA 16S apresenta importância fundamental no estudo da biodiversidade de um sistema, avaliada de acordo com a quantidade do organismo em um determinado *habitat* (riqueza) e com a sua distribuição no espaço (equitatividade). Para isso, são empregados índices estatísticos que são utilizados pela ecologia de metazoários e plantas desde os anos de 1970 e pela microbiologia desde os anos de 1990 (FINLAY; MABERLY; COOPER, 1997).

Atualmente, os graus de similaridades obtidos entre os produtos amplificados são utilizados para agrupar os microrganismos em graus taxonômicos OTU (Unidade Taxonômica Operacional). As OTUs são definidas de acordo com o nível da escala

de classificação que se pretende estudar. Usualmente, define-se que, para similaridades maiores que 97%, trata-se de organismos relacionados no nível de espécie, entre 95% e 97%, organismos do mesmo gênero, e acima de 80% e abaixo de 95%, incluídos no mesmo filo (RIESENFELD; SCHLOSS; HANDELSMAN, 2004).

As comunidades microbianas dependem do número de *habitats* microbianos habitáveis e das interações dessas comunidades com os fatores físicos, químicos e biológicos presentes. Por meio do sequenciamento do rDNA 16S e da metagenômica, é possível identificar a composição das comunidades bacterianas em diversos ambientes, inclusive em águas residuais, objeto deste estudo (CHAO *et al.*, 2013).

1.3 A ÁGUA, SUA UTILIZAÇÃO E SEUS SUBPRODUTOS

A água é um dos recursos essenciais para que os organismos desempenhem suas atividades metabólicas basais. O acesso a água de boa qualidade é um fator preponderante para a manutenção da saúde humana. Apesar de sua abundância no planeta, menos de 1% dela se encontra em condições adequadas para o consumo humano (WHO, 2011).

Esse recurso apresenta suas próprias características físicas, químicas, biológicas e, devido a essas propriedades, há a necessidade de seu beneficiamento para adequá-la aos processos industriais, que variam desde a lavagem de materiais à produção de medicamentos (GLEICK, 1998).

A água destinada ao consumo humano deve apresentar características microbiológicas e físico-químicas próprias. Sua contaminação por agentes biológicos ou químicos pode ser associada a diversos fatores, como transmissão de doenças, modificação do microbioma residente do hospedeiro humano ou alteração da manutenção da morfologia intestinal em outros animais (SOFI *et al.*, 2013, AMOROSO *et al.*, 2015).

Existe grande preocupação das autoridades sanitárias com a água que é ingerida pela população, o que levou à publicação de regras que incluem parâmetros microbiológicos e físico-químicos a serem analisados. A portaria 2914/2011 dispõe sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade. Este padrão visa a afastar os perigos

microbiológicos associados ao consumo de água, estabelecendo condições de proteção a consumidores e à saúde dos indivíduos e da coletividade (BRASIL, 2011).

Os principais grupos de microrganismos que constituem o microbioma da água dos rios são Actinobacteria, Planctomycetes, Betaproteobacteria, Verrucomicrobia, Nitrospirae e Acidobacteria. Nesse *habitat*, apresentam algumas funções, como, por exemplo, a ciclagem de nutrientes. Recentemente, foi descrito que mais de 90% do material genético amplificado de amostras do rio Amazonas era bacteriano (SATINSKY *et al.*, 2015).

A água que é extraída da natureza recebe o processamento adequado nas estações de tratamento de águas e, após essa etapa, é disponibilizada para o consumo da população e diversos outros fins, como atividades industriais, domésticas (banho, lavagem dos mais diversos materiais) e transporte de dejetos humanos. Em conjunto, todos estes processos promovem o depósito de resíduos neste recurso natural antes de seu retorno ao meio ambiente (TUNDISI, 2003).

A contaminação da água pode ser classificada de acordo com as impurezas de características químicas (orgânicos e inorgânicos), físicas (sólidos suspensos, coloidais e dissolvidos e os gases) e biológicas (animais, vegetais, protistas). Com o objetivo de medir as diversas substâncias que podem ser inseridas no corpo d'água e afetar a sua qualidade, foram propostos alguns parâmetros a serem monitorados. Entre eles, destacam-se aqueles que revelam suas propriedades físicas (cor, turbidez, sabor, odor e temperatura), químicas (pH, alcalinidade, acidez, dureza, ferro e manganês, cloretos, nitrogênio, fósforo, oxigênio dissolvido, matéria orgânica, micropoluentes inorgânicos e micropoluentes orgânicos) e os biológicos (bactérias, vírus, fungos, algas e helmintos). A ausência de tratamento desse resíduo ou sua alocação inadequada pode ocasionar agravos à saúde do homem e comprometer o equilíbrio do ecossistema (VON SPERLING, 2005).

Nesse sentido, água residual pode ser definida como proveniente de uso doméstico, comercial ou industrial. Ela apresenta grande diferença em seu grau de pureza, sua composição é rica em matéria orgânica e o odor característico indica metabolismo microbiano (MONTE; ALBUQUERQUE, 2010).

1.4 ASSOCIAÇÃO ENTRE MICROBIOMA HUMANO E AMBIENTE DE ESGOTO

O microbioma humano é extremamente complexo, constituído por amplo espectro de microrganismos, que se organizam dividindo o espaço físico e realizando interações interespecíficas e intraespecíficas. Sua composição é relacionada ao sítio anatômico analisado, apresentando ampla variação na riqueza e na distribuição de espécies (CHO; BLASER, 2012).

A cavidade oral é composta por cerca de 10^{10} células procariotas (BROOK, 2008) e, de acordo com o projeto Microbioma Oral Humano, 700 espécies coabitam este sítio. A saúde oral é influenciada pelas comunidades de microrganismos presentes, sendo o filo Firmicutes o mais abundante, seguido por Bacteroidetes, Proteobacteria e Actinobacteria (LAZAREVIC *et al.*, 2009).

A pele é considerada a barreira primária de defesa contra a agressão por microrganismos e sua microbiota indígena apresenta densidade variando entre 10^2 e 10^7 células/cm² (FREDRICKS, 2001). Actinobacteria, Firmicutes, Proteobacteria e Bacteroidetes são os filos predominantes neste sítio (CHO; BLASER, 2012).

O trato intestinal do ser humano apresenta 10^{12} células/g de fezes (BROOK, 2008) e estima-se que mais de 1.000 espécies coexistam neste ambiente (HUTTENHOWER *et al.*, 2012). No cólon, o filo Firmicutes apresenta maior predominância, seguido por Bacteroidetes, Actinobacteria e Proteobacteria. De acordo com Lozupone *et al.* (2012), a diversidade desse microbioma é influenciada por fatores genéticos, ambientais e da dieta dos indivíduos (CHO; BLASER, 2012, WALKER *et al.*, 2014).

O equilíbrio entre as comunidades microbianas é um fator importante relacionado ao estado de saúde dos seres humanos. O desbalanço da microbiota intestinal é frequentemente associado a enfermidades como doenças infecciosas, obesidade, alergia, câncer e outras doenças. Neste contexto, existem diferentes fatores que necessitam ser identificados e monitorados com a finalidade de avaliar os perigos que representam para a saúde (SLEATOR; SHORTALL; HILL 2008).

Praticamente todo esse microbioma é depositado nos esgotos sanitários, seja pelo ato de lavar as mãos, o rosto, tomar banho, escovar os dentes e, principalmente, por urinar e defecar, evidenciando a importância particular do tratamento desses resíduos antes de seu retorno ao meio ambiente (AMOS *et al.*, 2014).

1.5 MEIO AMBIENTE E SUA RELAÇÃO COM OS AGRAVOS À SAÚDE: O CONCEITO DE SAÚDE ÚNICA (*ONE HEALTH ONE WORLD*)

Com o passar dos anos, tanto o conceito de saúde como as políticas públicas relacionadas a ele sofreram reformulações, muitas vezes, para se adequar às descobertas advindas da ciência, associando-as às necessidades da coletividade. A partir dos anos 1970, os debates, no mundo acadêmico e na sociedade, sobre o papel que o meio ambiente exerceria sobre a saúde individual e coletiva se intensificaram. Se antes dos anos 1970 o foco era restrito aos problemas provocados por vetores e ausência de saneamento, a partir desse período, outras questões ganharam importância e demonstrou-se que outros fatores ambientais e sociais poderiam interferir no equilíbrio mental, social e psicológico de um indivíduo ou de uma coletividade (BARCELLOS; QUITÉRIO, 2006).

A saúde, como bem público associado à qualidade de vida, começou a ganhar força no final dos anos 1980, principalmente, a partir das discussões e dos acordos firmados na Conferência Internacional Sobre a Promoção da Saúde em Ottawa (Canadá) e da VIII Conferência Nacional de Saúde (Brasil). Desse período em diante, as políticas públicas, com a finalidade de implementar os novos paradigmas, passaram por diversas adaptações em sua abrangência e extensão. Tais mudanças (FIG. 1) apresentam o objetivo de alçar o indivíduo ao completo bem-estar físico, mental e social. Nesse sentido, os serviços de atenção à saúde (promoção, proteção e recuperação) passam a integrar o rol de direitos do homem, devendo ser prestados de forma positiva pelo Estado e em igual acesso à população (BACKES *et al.*, 2009).

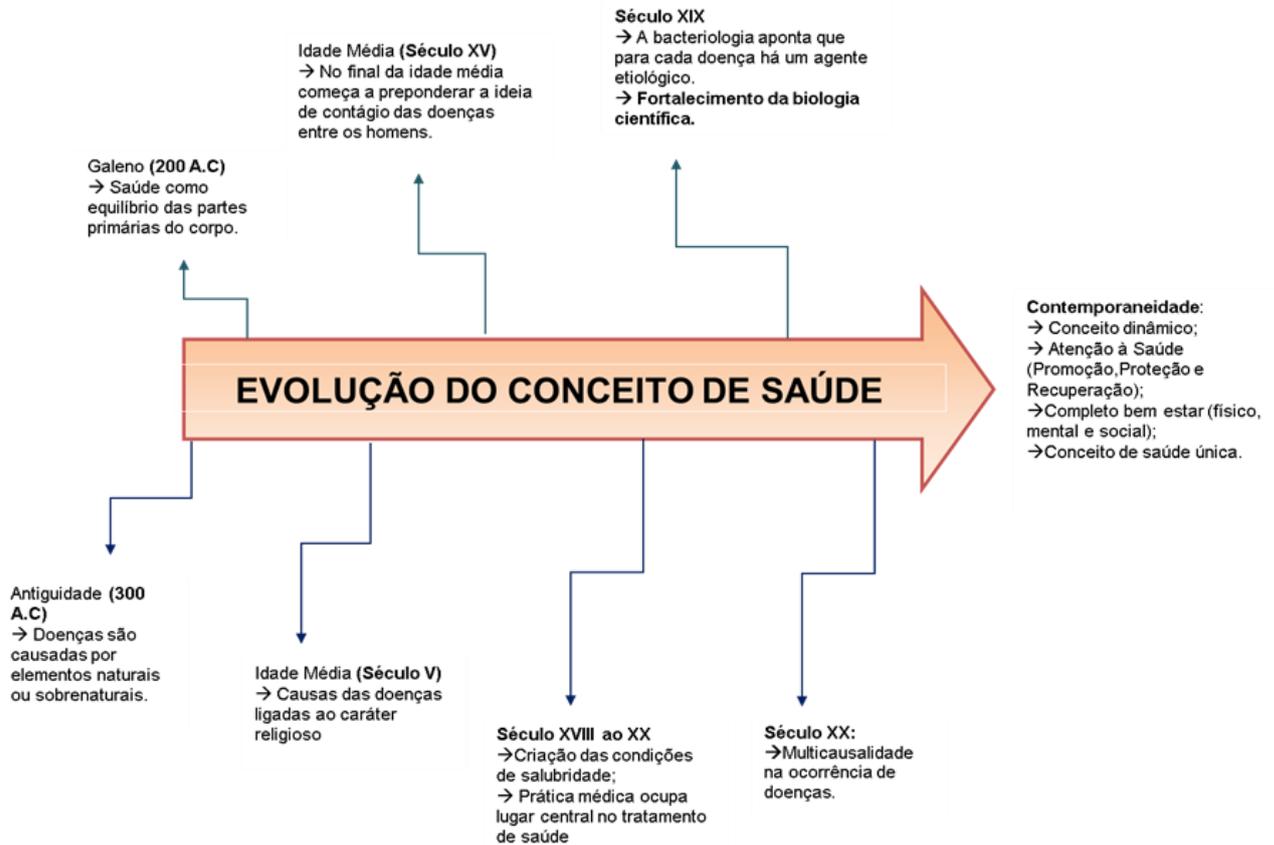
Já no início do século XXI, o conhecimento sobre uma série de patógenos capazes romper as barreiras geográficas, desencadear epidemias globais e causar a morte de diversos indivíduos fomentou uma ação conjunta entre governos, agências

internacionais (FAO, WHO, OIE) e pesquisadores de diferentes áreas (medicina veterinária, epidemiologia, microbiologia, economia, sociologia etc). Esta ação colaborativa foi reconhecida como a maior rede interdisciplinar para a prevenção e controle de zoonoses e disseminação de doenças, sendo denominada “o conceito de Saúde Única” (*one health*) (GIBBS, 2014).

O conceito de Saúde Única reconhece que a saúde dos seres humanos está conectada à dos demais animais e à do meio ambiente. A questão das doenças transmitidas pelo ambiente é alarmante. Em 2003, a WHO declarou que 25% das doenças que acometem o ser humano ocorriam devido a fatores ambientais, sendo que, em crianças, esse número alcança 33%. Para ilustrar, as doenças respiratórias, muitas vezes, decorrentes da poluição atmosférica, levam à morte cerca de 250 mil pessoas somente na América Latina (WASHINGTON, 2010; CDC, 2016).

Desde a revolução industrial, no século XVIII, a humanidade vem transformando os recursos naturais e o ambiente ao seu redor, causando diferentes tipos de impacto. Essas mudanças, em parte, são necessárias para acomodar a população mundial, que aumenta década após década, e fornecer a ela condições de subsistência. Essa complexa rede de necessidades, em que se misturam fatores econômicos, sociais e culturais, gera desequilíbrio no ecossistema, podendo ocasionar uma série de novas doenças. No ano de 2004, cerca de 10 milhões de crianças morreram, sendo 40% dessas mortes associadas a riscos ambientais preveníveis, além de má nutrição e amamentação por período inferior ao ideal (WHO, 2009).

Figura 1. Evolução do conceito de saúde ao longo do tempo



Adaptado: Backes *et al.*, 2009.

De acordo com a Dra. Agnes Soares da Silva (CCD, 2013), os riscos ambientais se distribuem de maneira heterogênea na sociedade. Devido a essa característica, é fundamental identificar as diversas variáveis que compõe um problema, tentando englobar toda a sua extensão. Assim, as políticas públicas de atenção à saúde podem ser construídas de maneira mais assertiva. A compreensão de saúde ambiental engloba, principalmente, a gestão de promoção da saúde e da atenção primária ambiental, a abordagem universal com foco em populações em situação de vulnerabilidade, o desenvolvimento de planos de ação para áreas específicas, o uso de evidência científica para o desenvolvimento de competências em saúde ambiental

e um plano de gestão do conhecimento. Toda essa construção visa evitar a ocorrência de doenças evitáveis e mortes precoces.

A Instrução Normativa nº 1 disciplina, em seu artigo primeiro, que o Subsistema Nacional de Vigilância em Saúde Ambiental (SINVSA) compreende o conjunto de ações e serviços prestados por órgãos e entidades públicas e privadas, relativos à vigilância em saúde ambiental, visando o conhecimento e a detecção ou prevenção de qualquer mudança nos fatores determinantes e condicionantes do meio ambiente que interferem na saúde humana, com a finalidade de recomendar e adotar medidas de promoção da saúde ambiental, prevenção e controle dos fatores de riscos relacionados às doenças e outros agravos à saúde, em especial, água para consumo humano, ar, solo, contaminantes ambientais e substâncias químicas, desastres naturais, acidentes com produtos perigosos, fatores físicos e ambiente de trabalho.

Qualquer fator que pode impactar na saúde do indivíduo pode determinar o aprimoramento do Sistema de Vigilância Ambiental em Saúde. Seus principais objetivos são identificar os riscos e divulgar as informações referentes aos fatores ambientais condicionantes e determinantes das doenças e outros agravos à saúde e intervir com ações diretas de responsabilidade do setor ou demandada para outros setores, com vistas a eliminar os principais fatores ambientais de riscos à saúde humana. Além disso, a construção de informações sobre esse tema necessita de ferramentas da epidemiologia ambiental, que, entre outras formas, utiliza dados relativos aos fatores de risco existentes, que monitoram alimentos e água para consumo humano, vetores de doenças, incidência de doenças e circulação de patógenos no ambiente e em outros animais (FUNASA, 2002).

Os animais compartilham com o homem a suscetibilidade para desenvolver determinadas enfermidades. Um claro exemplo foi a morte de pássaros antes da infecção e desenvolvimento de doença em humanos associada ao vírus do Oeste do Nilo. Nesse sentido, alguns animais são utilizados como marcadores biológicos naturais para determinadas doenças emergentes e reemergentes. A Saúde Única não é um novo conceito, mas ganhou destaque nos últimos anos, devido às mudanças nas relações entre os homens, os outros animais e o meio ambiente (Quadro 2). Estas

alterações foram responsáveis por causar diversas doenças emergentes e reemergentes (CDC, 2016).

Quadro 2. Principais alterações contemporâneas nas relações entre o ser humano, os outros animais e o meio ambiente.

Fator (Causa)	Mudança (Efeito)
A população humana está aumentando e se expandindo para novas áreas geográficas.	Mais pessoas entram em contato com animais selvagens e domésticos, o que aumenta a probabilidade de transmissão cruzada de microrganismos entre seres humanos e outros animais.
A Terra passa por alterações climáticas e práticas como o desmatamento e a produção animal em larga escala.	Alterações no equilíbrio ambiental e nos <i>habitats</i> propiciam novas oportunidades para que microrganismos infectem o ser humano e outros animais.
Aumento nas viagens nacionais, internacionais e no comércio.	As doenças podem se espalhar mais rapidamente em um país ou através do mundo.

Adaptado de CDC, 2016.

1.6 VIGILÂNCIA AMBIENTAL, EPIDEMIOLÓGICA E MONITORAMENTO DE DOENÇAS INFECCIOSAS

A lei 8.080/1990, que dispõe sobre as condições para a promoção, proteção e recuperação da saúde e para a organização e o funcionamento dos serviços correspondentes, estabeleceu o conceito de Vigilância Epidemiológica. Assim, Vigilância Epidemiológica é definida como um conjunto de ações que proporcionam o conhecimento, a detecção ou a prevenção de qualquer mudança nos fatores

determinantes e condicionantes de saúde individual ou coletiva, com as finalidades de recomendar e adotar as medidas de prevenção e controle das doenças ou agravos (BRASIL, 1990).

Posteriormente, a lei 15.474, de 2005, do Estado de Minas Gerais, estabeleceu o campo de atuação tanto da Vigilância Epidemiológica como da Vigilância Ambiental. A Vigilância Ambiental em Saúde foi definida como o conjunto de ações que proporciona o conhecimento e a detecção de qualquer mudança nos fatores determinantes e condicionantes do meio ambiente que interferem na saúde humana, com a finalidade de identificar as medidas de prevenção e controle dos fatores de risco ambientais relacionados às doenças ou outros agravos à saúde (MINAS GERAIS, 2005).

Nesse contexto, a Fundação Ezequiel Dias (Funed), por meio do Instituto Octávio Magalhães (IOM), Laboratório Central de Minas Gerais (Lacen), integra o sistema de vigilância sanitária, epidemiológica e ambiental nas esferas municipal, estadual e federal. O IOM é constituído pela Divisão de Vigilância Sanitária e Ambiental (DIVISA), Divisão de Epidemiologia e Controle de Doenças (DECD), Divisão de Planejamento e Gestão da Qualidade e Unidade de Higienização e Produção de Meios de Cultura (DHPMC). O trabalho visa a prevenção e o controle de doenças para a promoção da saúde por meio de um extenso rol analítico, entre eles, o monitoramento da qualidade de alimentos e águas (FUNED, 2013).

Desde a sétima pandemia de cólera, ocorrida em 1961, uma série de protocolos foram desenvolvidos por diferentes países, a fim de controlar a epidemia ou evitar seu estabelecimento e disseminação. Nos anos 1970, o Ministério da Saúde, a Organização Pan-Americana de Saúde e a Organização Mundial de Saúde atuaram em conjunto, com o objetivo de implantar um programa nacional de monitoramento da cólera no País, utilizando a estrutura física e analítica dos Lacs brasileiros (LAINSON *et al.*, 1997). Recentemente, em 2010, o surto de cólera no Haiti levou à infecção de 112.000 indivíduos. Os protocolos elaborados inicialmente foram revisados, readaptados e reimplementados em todo o Brasil. Além do tratamento e acompanhamento dos possíveis doentes, busca-se prospectar no ambiente a presença do agente etiológico causador da enfermidade, uma vez que a interface

ambiente e saúde pode ser um ótimo parâmetro para a identificação de perigos que venham a interferir na saúde coletiva (SILVA *et al.*, 2016).

O Regulamento Sanitário Internacional (OMS) institui que os países signatários devem manter a capacidade de identificar, avaliar e notificar eventos de importância para a saúde e estabelecer medidas de controle, a fim de evitar a propagação nacional e internacional de doenças. Nesse contexto, desde 1973, o programa nacional de monitoramento de *V. cholerae* objetiva monitorar e identificar a circulação desse patógeno no ambiente, em tempo oportuno, com o intuito de serem adotadas as medidas de prevenção e controle necessárias para evitar a disseminação, em especial, das amostras *V. cholerae* O1 e *V. cholerae* O139 e a propagação dessa enfermidade no País, uma vez que o Brasil recebe turistas e viajantes provenientes de diversos locais do mundo, onde ocorre a transmissão da cólera, como Haiti, República Dominicana, México, Cuba e alguns países do Continente Africano.

A nota técnica elaborada em conjunto pela Secretaria Estadual de Saúde e Funed (IOM/DIVISA nº005/2015, 11 de fevereiro de 2015 - ANEXO) alinha as ações de monitoramento e trata sobre os procedimentos técnicos a serem adotados durante a coleta de amostras. Para que o monitoramento ocorra, há necessidade do envolvimento da Secretaria de Estado de Saúde de Minas Gerais (SES-MG), por meio da Vigilância Ambiental (DVA/SES-MG), do Laboratório de Águas (LA/FUNED) e do Serviço de Gerenciamento de Amostras (SGA/FUNED), demonstrando a participação da Entidade da administração indireta e o Órgão de Governo para que as políticas públicas possam atingir o cerne de seus objetivos.

Nesse contexto, em 2011, com intuito de promover ações de vigilância e monitorar a possível circulação de *V. cholerae* no país, iniciou-se a coleta de “mechas” (“swab de Moore”) em pontos diferentes do Estado de Minas Gerais. Os locais de amostragem são esgotos de aeroportos, rodoviárias e ETEs (ETE). Essa proposta inicial se transformou, em 2013, em um programa estadual de monitoramento da cólera, principalmente, devido ao aumento de turistas atraídos ao País pela realização da Copa das Confederações (2013), Copa do Mundo (2014) e Olimpíadas (2016).

As Superintendências Regionais de Saúde (SRS) são responsáveis por coletar as amostras de esgoto, utilizando técnica preconizada pelo Ministério da Saúde, em

pontos pré-definidos. O *swab* é exposto, sendo mantido, durante 3 a 5 dias, em águas residuais. Após esse contato, ele é acondicionado em meio de transporte (Água peptonada tamponada a 0,1%) e encaminhado para o LA/Funed, para pesquisa de *V. cholerae*. A execução do programa pactuado (Monitoramento Ambiental de *V. cholerae*) afeta diretamente os pilares da promoção e proteção à saúde coletiva, uma vez que viabiliza o reconhecimento, em tempo oportuno, sobre a circulação ambiental desse patógeno, permitindo que medidas de prevenção e controle da doença sejam adequadas e proporcionais.

Apesar do Programa de Monitoramento Ambiental de Cólera (PMAC) ser um avanço na proteção à saúde da população, sabe-se que existem diversos outros patógenos de interesse público que atuam como agentes causadores de outras doenças e que podem circular nos ambientes de esgoto de rodoviárias e aeroportos. Atualmente, como parte do PMAC - MG, nenhum outro potencial patógeno é pesquisado nesse ambiente.

1.7 DOENÇAS TRANSMITIDAS POR ALIMENTOS E ÁGUA

Entre as doenças veiculadas por água, destaca-se a doença diarreica aguda, responsável por mais mortes que malária, gripe e AIDS em conjunto. Atualmente, cerca de 90% das mortes associadas à doença diarreica são atribuídas a ingestão de água ou alimentos impróprios para o consumo humano (CDC, 2015).

Os principais grupos de microrganismos responsáveis por desencadear doença diarreica no homem são os vírus, as bactérias e os protozoários. A contaminação ocorre através da ingestão de água ou alimentos contaminados ou por meio do contato direto pessoa-pessoa (WHO, 2011).

Nos países desenvolvidos, como os Estados Unidos, a taxa e mortalidade associada à doença diarreica é inferior àquela observada em regiões menos desenvolvidas, como África e parte da Ásia. Em 2011, 4.338 americanos foram hospitalizados, dos quais 83 não conseguiram se recuperar (VENKATESAN; VERG, 2015).

No Brasil, entre 2011 e 2013, foram registradas 3.376 internações e 19 óbitos (GOMES; MAGALY; DAMACENA, 2014). Acredita-se, que as bactérias são

responsáveis por 80% dos casos de diarreia do viajante. Tanto em regiões desenvolvidas como naquelas em desenvolvimento, os agentes diarreio gênicos mais comumente detectados são vírus. A hospitalização de crianças americanas em decorrência de doença diarreica é mais frequentemente relatada para quadros associados a vírus (VENKATESAN; VERG, 2015).

Alguns gêneros virais são considerados bons indicadores de qualidade de água. Entre os vírus de DNA, destacam-se os *Adenovirus*, também agentes de doenças respiratórias. Os vírus de RNA que são associados a doenças entéricas são os vírus da hepatite A, *Astrovirus*, *Norovirus* e *Rotavirus* (BOTES; KWAADSTENIET; CLOETE, 2012).

As bactérias também são utilizadas como indicadoras de qualidade da água. Como exemplos, citam-se *Escherichia coli*, *Enterococcus* e integrantes da família Bacteroidales. Tais organismos apresentam contagens elevadas nas fezes humanas, se tornando excelentes marcadores de qualidade microbiológica do ambiente. Vale lembrar que a gama de agentes de doença diarreica é enorme, entre os quais se citam: *Salmonella*, *Shigella*, *Vibrio cholerae*, *Aeromonas*, *Campylobacter*, *Escherichia coli*, *Yersinia enterocolitica*, *Burkholderia pseudomallei*, *Francisella tularensis* e *Leptospira* (WHO, 2011).

1.8 PRINCIPAIS AGENTES DIARREIOGÊNICOS

1.8.1 VÍRUS

1.8.1.1 ADENOVÍRUS (HADV)

Os adenovírus estão incluídos na família Adenoviridae; gênero *Mastadenovirus* e espécie *Human mastadenovirus A-D*. Apresentam dupla fita de DNA linear, não são envelopados e têm simetria icosaédrica com número de triangulação igual a 25. Esses organismos podem levar ao desenvolvimento de doenças respiratórias ou intestinais e são classificados a partir de critérios bioquímicos, imunológicos e morfológicos em mais de 50 sorotipos e em sete espécies (A-G) (WAYE; SING, 2010, SALAMA *et al.*, 2016).

Os adenovírus são considerados um dos mais complexos vírus não envelopados já observados por microscopia eletrônica ou cristalografia de raio X. Seu genoma apresenta tamanho de aproximadamente 36 Kb e codifica cerca de 40 proteínas diferentes, sendo que, aproximadamente 1/3 delas constituem a estrutura da partícula viral. Além disso, no capsídeo viral, há uma série de componentes como cisteínas e proteinases que aumentam o espectro de hospedeiros virais, levando à possibilidade de infecção desde metazoários a arqueas. O genoma viral é condensado e associado a proteínas, garantindo sua estabilidade e conservação no ambiente (SMITH *et al.*, 2010).

Apesar de existirem mais de 50 sorotipos de adenovírus, os grupos 40, 41 e 52 são mais frequentemente associados às enterites. O grupo epidemiológico de maior preocupação para as autoridades públicas são crianças e imunocomprometidos. Calcula-se que cerca de 6% dos casos de doença diarreica em indivíduos menores de 2 anos estejam associados a adenovírus entéricos (MUNNINK; HOEK, 2016). Após a infecção das células intestinais, os sinais se desenvolvem entre 5 e 12 dias. Diarreia aquosa, vômito e febre são as principais manifestações clínicas associadas à infecção por este agente microbiano, podendo, em alguns casos, levar o paciente ao óbito (MULLER *et al.*, 2010).

A infecção envolve a interação com múltiplos receptores celulares do hospedeiro, promovendo uma sequência de eventos que leva à adsorção e à internalização do vírus. Após a internalização, o vírus fica contido em um compartimento endossomal e, então, passa por uma série de etapas, tais como o rompimento do capsídeo, liberação do DNA viral, digestão do vacúolo endossomal e formação de poros na membrana nuclear. Estas etapas complexas são direcionadas por mecanismos genético-bioquímicos virais e visam, em resumo, endereçar o material genético viral ao núcleo da célula do hospedeiro, local onde serão transcritas as proteínas virais, para que o ciclo de multiplicação possa ser completado (SMITH *et al.*, 2010).

1.8.1.2 VÍRUS DA HEPATITE A (HAV)

A hepatite é uma reação inflamatória do fígado que pode ser desencadeada por diversos fatores. Merecem destaque as hepatites virais, associadas a vírus das

famílias Picornaviridae, Hepadnaviridae, Flaviviridae, Deltaviridae e Caliciviridae. Existem, basicamente, cinco espécies de vírus que causam hepatite (A-E). Entre eles, cita-se o vírus da Hepatite A, que está incluído na família Picornaviridae, gênero *Hepatovirus* e espécie *Human hepatitis A virus* (KANYENDA *et al.*, 2015).

No nível global, o HAV é responsável por 200 milhões de casos assintomáticos e pelo adoecimento de 1,4 milhões de pessoas anualmente. A principal forma de contágio é a ingestão de água ou alimentos contaminados, sendo um desafio para os países em desenvolvimento a contenção de novos casos e o tratamento dos doentes. As principais características associadas à transmissão do vírus estão relacionadas a más condições sanitárias da água para consumo e a hábitos de higiene inadequados. Ainda, o vírus apresenta resistência a fatores ambientais, como baixo pH e presença de detergentes (KANYENDA *et al.*, 2015).

O período de incubação da doença varia entre 2 a 7 semanas, com média de 4 semanas, apresentando morbidade elevada e taxa de mortalidade baixa. A forma assintomática da doença é a mais frequente; entretanto, em algumas situações, determinados sinais e sintomas são observados. São eles reação semelhante à da gripe (febre, mialgia, dor de cabeça e artralgia), desconforto intestinal (perda de apetite, náusea, vômitos e diarreia) e doença colestática (urina negra e fezes pálidas) (BURA *et al.*, 2015).

O vírus da hepatite A apresenta simetria icosaédrica, sem envelope; seis genótipos e um único sorotipo são conhecidos. Seu material genético é RNA senso positivo. A proteína Vpg, associada ao RNA, apresenta importante papel na infecção, uma vez que se associa aos ribossomos, promovendo a transcrição das proteínas virais. O genoma do vírus é dividido em três regiões principais, quais sejam, não codificadora (extremidade 5'), intermediária codificadora e não codificadora (extremidade 3') (PEREIRA; GONÇALVES, 2003, VAUGHAN *et al.*, 2013).

A partir de modelos animais, foi possível detectar, no estômago, intestino delgado e intestino grosso, pequena taxa de multiplicação viral. As partículas virais assim formadas alcançam a corrente sanguínea e ao interagir, por exemplo, com o receptor *HAVCR1*, presente nos hepatócitos, infectam essas células. Após a

replicação no fígado, o vírus é lançado na bile e, eventualmente, alcança as fezes (VAUGHAN *et al.*, 2014).

1.8.1.3 VÍRUS DA HEPATITE E (HEV)

O HEV é membro da família Hepeviridae, gênero *Hepevirus* e espécie *Hepatitis E virus*. A infecção pelo vírus é amplamente disseminada no mundo, principalmente nos países em desenvolvimento, sendo responsável por desencadear endemias ou mesmo epidemias nestas localidades. O HEV foi descoberto na Índia, em 1978, e, nos últimos anos, o conhecimento relativo ao agente, seu espectro de hospedeiros, a epidemiologia da doença e o seu modo de disseminação cresceu bastante (KHUROO; KHUROO; KHUROO, 2016).

A hepatite E afeta, principalmente, jovens adultos (15 a 45 anos), causando, em alguns casos, hepatite fulminante e cirrose. Em outras situações, podem ocorrer manifestações não hepáticas e síndromes neurológicas. Uma característica que contribui para a relevância clínica do HEV é a sua capacidade de romper a barreira transplacentária (KHUROO; KHUROO; KHUROO, 2016).

São descritos pelo menos sete genótipos de HEV associados a doenças em seres humanos. Na Ásia, o genótipo 1 é o mais comumente responsável por endemias e epidemias e o genótipo 2 é o mais prevalente na América Central e África. Os genótipos 1 e 2 são obrigatoriamente patógenos humanos e a sua transmissão ocorre pela via fecal-oral. Os variantes genéticos 3 e 4 podem ser detectados em seres humanos e outros animais, especialmente em suínos, na Europa, Estados Unidos e Ásia. Estima-se que o número de casos de infecção sintomática pelo HEV somente na região tropical exceda três milhões e que 70.000 mortes/ano estejam relacionadas à hepatite E (HARTL; WEHMEYER; PISCHKE, 2016).

O genoma do vírus apresenta uma fita simples de RNA senso positivo, 7,2 Kb, com três ORFs. A ORF 1 é responsável pela tradução de proteínas não estruturais, a ORF 2 sintetiza proteínas relacionadas à montagem do vírus e a ORF 3 foi associada à movimentação viral dentro das células, através dos microtúbulos e citoesqueleto. O ciclo de replicação viral ainda não é completamente compreendido. Assume-se que para infectar o hospedeiro, o HEV usa receptores presentes nas células epiteliais do

intestino e, posteriormente, os hepatócitos, através da heparina, e, então, penetre nas células. Uma vez internalizado, o vírus libera seu material genético e proteínas não estruturais são sintetizadas (YIN; LI; FENG, 2016).

1.8.1.4 ENTEROVÍRUS

Os enterovírus (espécies de *Enterovirus A-J* e *Rhinovirus A-C*) pertencem à ordem Picornvirales e família Picornaviridae. São pequenos, envelopados, apresentam simetria icosaédrica e genoma de RNA senso positivo. São amplamente distribuídos na natureza, infectam o homem e outros animais e, taxonomicamente, são agrupados em espécies de A-J. O genoma do vírus apresenta cerca de 7,5 Kb e apenas uma ORF que decodifica uma poliproteína que inclui proteínas estruturais e não estruturais (HE *et al.*, 2016).

O organismo já foi associado a fortes diarreias e doenças respiratórias em bovinos e outros mamíferos. Embora a transmissão ocorra, predominantemente, por via fecal-oral, o grupo ainda é negligenciado como agentes etiológicos de doença diarreica devido à falta de investigações mais detalhadas (RAO *et al.*, 2014).

Uma das espécies mais estudadas é o *Enterovirus C*, popularmente conhecido como Poliovírus, agente causador da poliomielite ou paralisia infantil, doença que, há cerca de 30 anos, recebeu esforços globais para sua erradicação (ARITA, 2016). O segundo enterovírus descrito foi o Coxsackievirus. Há, pelo menos, dois genótipos do vírus e, inicialmente, eles foram diferenciados pelas manifestações clínicas decorrentes da doença associada (CROM *et al.*, 2016).

De modo geral, os *Enterovirus* desenvolveram múltiplas estratégias para evadir as defesas do hospedeiro, eles suprimem a bioquímica celular basal, juntamente com as defesas inatas do hospedeiro e direcionam o funcionamento celular para confecção das proteínas necessárias para sua replicação e brotamento (LLOYD, 2016).

Além disso, os *Enterovirus* são citopáticos e contaminam seus hospedeiros através da via fecal-oral, transplacentária e aerossóis. O primeiro sítio de replicação do vírus são células epiteliais da orofaringe e mucosa intestinal. Em alguns casos,

pode haver uma infecção secundária no sistema nervoso e resultar em meningite ou encefalite. As manifestações clínicas são bem variadas e vão desde infecções respiratórias e gastrointestinais a hepatite, miocardite, pancreatite e outras (CROM *et al.*, 2016).

1.8.1.5 ROTAVÍRUS (RVA)

Os rotavírus, membros da família Reoviridae, gênero *Rotavirus*, espécies *Rotavirus A-H*, apresentam simetria icosaédrica e dupla fita de RNA (dsRNA). Atualmente, são considerados os principais agentes de doença diarreica em crianças menores de cinco anos. Acredita-se que 5% do total de mortes de crianças com gastroenterites sejam decorrentes da infecção por este agente. Além disso, os rotavírus são responsáveis por levar à internação em consequência de doença diarreica entre 25% e 50% dos pacientes com menos de cinco anos. As manifestações clínicas mais comumente observadas são diarreia, vômito e desidratação (TATE *et al.*, 2009).

A dupla fita de RNA produz uma condição peculiar para os membros dessa família, uma vez que, a maquinaria da célula do hospedeiro não apresenta as enzimas necessárias para transcrever a fita dupla de RNA em mRNA. Algumas características auxiliam o entendimento dessa condição específica. Por exemplo, o capsídeo viral contém 11 segmentos de dsRNA e cada segmento é responsável por sintetizar uma proteína, exceto o último segmento, que sintetiza duas. Dessas 12 proteínas, seis são estruturais e seis são não estruturais. O capsídeo viral é composto por três camadas proteicas. Outro fator é a organização estrutural do genoma; há um consenso que enzimas de transcrição ancoradas na superfície interior do capsídeo transcrevem cada segmento do genoma, sendo todo o segmento genômico transcrito simultaneamente (JAYARAM; ESTES; PRASAD, 2004).

A forma de contaminação por esses vírus ocorre por meio da rota fecal-oral, principalmente, através da ingestão de água ou alimentos contaminados. Além disso, pode ocorrer a contaminação pelo contato com pessoas doentes. Ao entrar em contato com enterócitos do intestino delgado, o vírus pode infectá-la, após interagir com receptores de ácido siálico ou mesmo através de canais Ca^{2+} dependentes de endocitose. Experimentos em animais demonstraram que, após a infecção da célula,

o vírus altera a morfologia intestinal, transformando as vilosidades para a forma cuboide. Essa modificação ocorre em até 24h após a infecção. Além disso, ocorre a diminuição do espessamento da parede do intestino delgado. Essas mudanças, em conjunto, levam ao quadro de diarreia (LUNDGREN; SVENSSON, 2001).

1.8.2 BACTÉRIAS

1.8.2.1 *Aeromonas*

O gênero *Aeromonas* (Proteobacteria, Proteobacteria Delta, Aeromonadales, Aeromonadaceae) teve sua descrição entre os séculos XIX e XX. O microrganismo foi, inicialmente, associado a infecções em animais ectotérmicos. Atualmente, é reconhecido não somente por desencadear doenças em peixes ou animais de “sangue frio”, mas, também, como responsável por uma variedade de doenças infecciosas que acometem o ser humano, como doença diarreica e síndrome hemolítico-urêmica. Entre os anos 1981 e 2010, o número de publicações científicas relacionadas a este organismo cresceu 7,4 vezes quando comparado às publicações entre 1944 e 1980, evidenciando o reconhecimento da sua importância (JANDA; ABBOTT, 2010).

São reconhecidas cerca de 90 espécies de *Aeromonas*, sendo, as mais frequentemente associadas a doenças infecciosas, *Aeromonas sobria*, *Aeromonas caviae* e *Aeromonas hydrophila*. A bactéria é um bastonete Gram negativo, quimiorganotrófico, anaeróbio facultativo. As amostras são, predominantemente, móveis e mesofílicas, oxidase, catalase e nitrato redutase positivas. O microrganismo pode ser isolado a partir de água, peixes, invertebrados, solo e alimentos. A transmissão pode ocorrer por meio da ingestão de água ou alimentos contaminados. Os principais sinais e sintomas decorrentes da infecção pelo patógeno são febre baixa, diarreia, vômito e dores abdominais (VON GRAEVENITZ, 2007, YANO *et al.*, 2015).

As amostras de *Aeromonas* são encontradas em superfícies aquáticas, água clorada para consumo humano e água mineral. Além disso, podem ser isoladas a partir do trato intestinal de seres humanos e outros animais, esgoto bruto, efluentes

de esgoto e lodo ativado. Em alimentos, é observada predominantemente em aves domésticas, peixe fresco, peixe defumado, camarões, vegetais crus, carne de cabra, ovos de codorna e leite cru. *A. hydrofila* já foi isolada de fezes de animais sadios tais como cavalos, carneiros, porcos e vacas (IGBINOSA *et al.*, 2012).

Os mecanismos de patogenicidade são complexos e ainda pouco conhecidos. Uma ampla gama de fatores de patogenicidade já foi descrita. Destacam-se flagelo tipo IV, sistema de secreção tipo III (TTSS), enterotoxinas termolábil (Act e Alt) e termoestável (Ast), grande número de hemolisinas (AerA, HlyA, Ahh1 e Asa1), lipases, adesinas, aglutininas, proteases e várias outras enzimas (LI *et al.*, 2015).

1.8.2.2 *Arcobacter*

O gênero *Arcobacter* (Proteobacteria, Epsilonproteobacteria, Campylobacteriales, Campylobacteriaceae) foi isolado, inicialmente, no Reino Unido, a partir de um aborto ocorrido em bovino. Os representantes do gênero são bastonetes Gram negativos, espiralados, podem se multiplicar em condições de microaerofilia ou aerobiose e em temperaturas de 15° C, uma das características que o diferencia do gênero *Campylobacter*. O principal reservatório do microrganismo é o gado e, durante os últimos 10 anos, a sua presença foi associada a carnes de boi, porco e frango, sendo que seu isolamento a partir de carne de frango é significativamente mais comum. A bactéria também foi isolada de leite de vaca com mastite (SNELLING *et al.*, 2006).

Dentre as espécies do gênero, *Arcobacter butzleri* foi considerada, pela Comissão Internacional de Especificações Microbiológicas de Alimentos, como um sério perigo à saúde humana e um importante patógeno zoonótico. Suas habilidades de patogenicidade ainda permanecem pouco compreendidos, embora existam diversos estudos que demonstram capacidade de adesão, invasividade e citotoxicidade, além da produção de hemaglutininas. O mecanismo pelo qual o microrganismo induz diarreia está associado ao rompimento das junções celulares do epitélio intestinal (*tight junctions*), modificando a dinâmica tecidual, promovendo, então, o fluxo de água do órgão para o lúmen intestinal e, conseqüentemente, ocasionando diarreia (COLLADO; FIGUERAS, 2011).

Já foi demonstrado em modelo murino que *A. butzleri* induz a inflamação intestinal e respostas imunitárias sistêmicas. As principais manifestações clínicas da infecção pelo microrganismo são fortes dores abdominais e diarreia (em alguns casos, de maneira persistente) (FIGUERAS *et al.*, 2014, HEIMESAAT *et al.*, 2015).

2 JUSTIFICATIVA

As ações que visam à promoção da saúde coletiva são amplas e devem incluir, entre outras, a vacinação da população contra determinados agentes de doenças infecciosas, o saneamento básico, a proteção ao meio ambiente equilibrado, o monitoramento da qualidade dos alimentos e da água consumida, assim como dos diversos fatores que podem favorecer a transmissão de doenças ao homem. O crescimento exponencial da população humana, ao longo dos últimos séculos, trouxe, como consequência, a mudança no seu modo de organização no espaço, além de diversos desafios à manutenção das relações de harmonia com o meio ambiente. Quase sempre, quando esse equilíbrio é perturbado, há reflexos que se manifestam na saúde individual e coletiva. A peste negra, a febre maculosa, a cólera, o botulismo e a gripe são alguns exemplos de doenças que atingiram o homem como consequência da promoção do desequilíbrio de condições naturais. O fato de algumas dessas enfermidades extrapolarem os limites geográficos locais e se disseminarem pelo mundo está intimamente associado ao avanço das tecnologias que envolvem o rápido transporte de pessoas (e sua microbiota) entre as diferentes regiões do planeta e o contato entre elas, à cultura dos povos e ao modo como eles se dividem no espaço. Atualmente, boa parte dos seres humanos vive em grandes centros urbanos, locais que apresentam intensa circulação de pessoas entre as cidades, principalmente, nos polos industriais, comerciais e turísticos. Os visitantes chegam, em sua maioria, por via terrestre, em veículos particulares, ou transporte público (terrestre ou aéreo). Em Belo Horizonte, terceira região metropolitana mais populosa do Brasil, o Terminal Rodoviário Governador Israel Pinheiro e o Aeroporto Carlos Drummond de Andrade são duas das principais portas de entrada e saída de pessoas. Nestes locais circulam, anualmente, mais de 12 milhões de passageiros. Por já apresentar intensa movimentação de pessoas e frente à realização de grandes eventos de massa, como Copa das Confederações FIFA de 2013, Copa do Mundo FIFA de 2014 e Jogos Olímpicos Rio 2016, a Secretaria do Estado de Saúde de Minas Gerais, por meio da Vigilância Epidemiológica, FUNED e Prefeitura de Belo Horizonte, firmaram parceria para o monitoramento ambiental da cólera, com a finalidade de atender a diretrizes nacionais e proteger a saúde da população. O programa de monitoramento, retomado em 2013, continua até a data atual. Entretanto, ele é voltado, especificamente, para a

detecção do *Vibrio cholerae*; nenhuma outra bactéria é investigada como parte deste programa. A abordagem metagenômica, mais recentemente proposta, vem sendo empregada para diversas finalidades, inclusive para avaliar as comunidades microbianas de um dado ambiente. Esta metodologia tem se mostrado bastante promissora, permitindo a geração de grande quantidade de dados acurados e bastante relevantes. Desta forma, parece-nos pertinente utilizar a estrutura empregada no monitoramento da cólera para investigação do perfil da comunidade microbiana, por meio de abordagem de genética molecular, mais especificamente análise metagenômica e qPCR, visando à identificação de perigos microbianos para a saúde coletiva.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o perfil da comunidade microbiana do ambiente de esgoto do Terminal Rodoviário Governador Israel Pinheiro e do Aeroporto Carlos Drummond de Andrade visando à investigação de perigos microbianos relacionados à saúde pública.

3.1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Caracterizar a estrutura e avaliar a diversidade da comunidade microbiana do esgoto da Rodoviária e do Aeroporto da Pampulha, Belo Horizonte/MG, por abordagem metagenômica.

Investigar a presença de potenciais patógenos bacterianos e virais veiculados por água e alimentos nas amostras de esgoto, por abordagem metagenômica e qPCR.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 ÁREAS DE ESTUDO

A região metropolitana de Belo Horizonte apresenta intensa atividade industrial, comercial, cultural, intelectual, de lazer e de esportes. Sua população foi estimada em 5.783.773 de pessoas no ano de 2014, sendo considerada a terceira região metropolitana mais populosa do Brasil e uma das mais importantes economias brasileiras (IBGE, 2014).

No que se refere ao transporte rodoviário público, a cidade conta com o Terminal Rodoviário Governador Israel Pinheiro (FIG. 2), na capital, que atende cerca de 17 milhões de pessoas por ano, contabilizando rotatividade de 40 mil pessoas por dia, que chegam à cidade de diversos pontos do Brasil ou saem dela para os mais variados locais do território nacional (PREFEITURA DE BELO HORIZONTE, PBH, 2015). Já no Aeroporto Carlos Drummond de Andrade (FIG. 2), situado na Pampulha, circulam cerca de um milhão de passageiros por ano (INFRAERO, 2014).

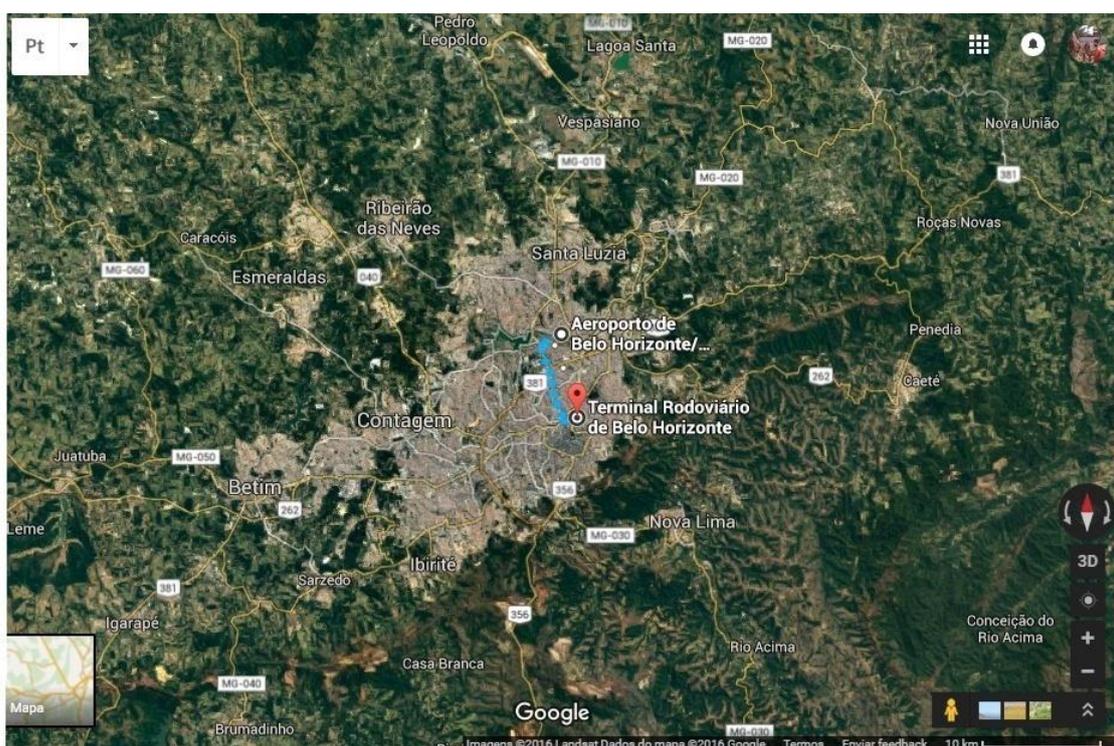
Independente dos motivos que levam à circulação de um lugar a outro, os terminais rodoviários e os aeroportos são locais que reúnem uma grande quantidade de pessoas. Esses ambientes podem apresentar indivíduos de várias regiões do Estado, do País ou mesmo do mundo. Devido a essas características, eles podem ser considerados como locais multiétnicos e culturalmente diversos.

De acordo com Lozupone *et al.* (2012), a diversidade do microbioma humano é influenciada por fatores genéticos, ambientais e da dieta dos indivíduos. Sendo assim, a diversificação dos pontos de coleta de esgoto pode revelar as características de uma população que frequenta um ambiente específico, além de refletir a circulação de patógenos relacionados à saúde pública.

As amostras foram coletadas em dois pontos distintos de Belo Horizonte, capital do Estado de Minas Gerais. A cidade está situada a 853 metros de altitude, latitude de -19.902766829991066 e longitude de -43.96405015000005, com extensão territorial de 331,401 km², população de 2.513.451 e densidade demográfica de 7.167,00 hab/km². Os pontos selecionados foram o Terminal Rodoviário Governador Israel Pinheiro, latitude de -19.913863705752913 e longitude de -

43.941922100000056, e o Aeroporto Carlos Drummond de Andrade, latitude de -19.849847505732868 e longitude de -43.95488990000001.

Figura 2. Região metropolitana de Belo Horizonte, destacando o Aeroporto Carlos Drummond de Andrade e o Terminal Rodoviário Governador Israel Pinheiro, pontos de coleta das amostras de esgoto a serem estudadas.



Fonte: Google Maps.

4.2 OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS

Após visita prévia aos locais, foram definidos, tanto para a rodoviária como para o aeroporto, dois pontos de coleta. Considerando-se as características de cada um deles, o protocolo foi estabelecido.

Foram realizadas duas coletas em cada local, uma em dias nos quais o movimento é considerado “normal” e outra em dias nos quais a circulação de pessoas estava aumentada. Para definição das datas de coleta, profissionais que trabalhavam

na rodoviária e no aeroporto foram consultados. Na rodoviária, há, inclusive, o controle do número de pessoas que utilizam os banheiros (movimento normal: cerca de 500 pessoas/h e movimento aumentado: cerca de 1250 pessoas/h). As quatro coletas foram identificadas como RN e RA (rodoviária, circulação “normal” e aumentada de pessoas, respectivamente) e AN e AA (aeroporto, circulação “normal” e aumentada de pessoas, respectivamente).

4.2.1 RODOVIÁRIA

Na rodoviária, foi feita uma coleta piloto, no dia 29/01/2016, para verificação da funcionalidade do protocolo proposto, conhecimento da dinâmica do campo e suas características. A seguir, as datas das coletas foram estabelecidas. O material foi coletado nos dias 22/02/2016, uma segunda feira, dia de pouco movimento, e 24/04/2016, um domingo pós-feriado prolongado (21/04), dia de grande movimento.

Os dois pontos de coleta selecionados recebem esgoto tanto do banheiro masculino como do banheiro feminino antes de serem enviados ao tratamento. O esgoto é corrente, ou seja, não fica armazenado em nenhum ponto; por isto, optou-se por coletar diversas amostras, em intervalos de tempo regulares.

Para a análise microbiológica, foram coletados 45 mL de amostra, a cada 30 min, pelo período de 4 h, totalizando 405 mL de esgoto bruto total. Ao término da coleta, o material foi transportado para o Laboratório de Microbiologia Oral e Anaeróbios (Departamento de Microbiologia, ICB, UFMG) e centrifugado a 7826 x g, por 20 min, a 4°C. O sobrenadante foi descartado e os sedimentos mantidos em *freezer* a -80°C para posterior extração de DNA.

Para avaliação do perfil da comunidade microbiana (Bacteria e Archaea) das amostras de esgoto obtidas, preparou-se um *pool* a partir dos sedimentos obtidos das nove amostras coletadas em cada dia/local. Então, realizou-se a extração de DNA, empregando-se o *kit EZNA Soil DNA* (Omega Bio-tek, Norcross, GA, EUA), conforme instruções do fabricante. A quantificação foi realizada utilizando-se o *Qubit dsDNA HS Assay Kit* (Life technologies, Ottawa, ON, Canadá).

Paralelamente, para o cálculo do DBO_t, foram coletados 40 mL de esgoto, a cada 30 min, durante 4 h (volume total de 360 mL). Para determinação dos demais

parâmetros físico-químicos, foram coletados 125 mL de esgoto, a cada 30 min, até completar o volume total de 1000 mL. Logo após a coleta, as amostras tiveram suas temperaturas aferidas por imersão de termômetro de mercúrio e, então, foram mantidas refrigeradas em gelo reciclável e encaminhadas para análise.

4.2.2 AEROPORTO

No aeroporto, a coleta piloto ocorreu no dia 02/02/2016 e as coletas subsequentes foram realizadas no dia 23/02/2016 (dia “comum”) e dia 27/03/2016 (feriado de Páscoa).

Os pontos de coleta, como já descrito para a rodoviária, recebem esgoto dos banheiros masculino e feminino. Eles retêm uma parte do esgoto, acumulando o resíduo produzido por dias. Devido a esta característica, optou-se por homogeneizar o esgoto e realizar a coleta pontual. Os volumes de amostras coletados para análises físico-químicas e extração do DNA foram similares aos descritos para a rodoviária.

4.3 ANÁLISE FÍSICO-QUÍMICA

A análise físico-química foi realizada no Laboratório de Saneamento (Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Escola de Veterinária, UFMG). Foram avaliados os seguintes parâmetros: pH, DBO_t, DQO_t, sólidos totais, sólidos voláteis totais, sólidos fixos totais, sólidos suspensos totais, sólidos suspensos voláteis, sólidos suspensos fixos, amônia, nitrito, nitrato e fosfato, conforme metodologia descrita por APHA, AWWA, WEF (1992).

4.4 ANÁLISE DAS COMUNIDADES DE BACTERIA E ARCHAEA

A biblioteca de rDNA 16S foi construída utilizando-se os iniciadores 515(F) 5'-GTGYCAGCMGCCGCGGTAA-3' e 806(R) 5'-GGACTACNVGGGTWTCTAAT-3', que têm como alvo a região hipervariável V4, que possibilita a detecção de microrganismos do domínio Bacteria e Archaea (*amplicon* 292 pb). Os iniciadores foram previamente descritos por Coporaso *et al.* (2012) e modificações quanto à degeneração de bases nitrogenadas foram feitas por Apprill *et al.* (2015).

Os *primers* F e R foram marcados com as sequências adaptadoras: 5'-TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAG-3' e 5'-GTC

TCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAG-3', respectivamente. A amplificação foi conduzida no termociclador *Mastercycler Eppendorf* (Eppendorf, Hamburgo, Alemanha), utilizando o *KAPA HiFi Hot Start Ready Mix PCR Kit* (Kapa Biosystems, Boston, MA, EUA). A mistura de reação (30 μ L) constou de 15 ng de DNA, 1 μ L dos iniciadores (6 μ M) e 15 μ L do *mix*. A reação de amplificação constou dos seguintes ciclos: 95 °C/3 min; 95 °C/30 s, 55 °C/30 s, 72 °C/30 s - 25 x; e 72 °C/5 min. Os *amplicons* foram quantificados pelo *Qubit dsDNA HS Assay Kit* e submetidos à eletroforese em gel de agarose (1,2%), em tampão TBE, pH 8,0. A corrida foi realizada a 100 V por 1 h.

Os *amplicons* foram purificados empregando-se o *Agencourt® AMPure® XP PCR Purification* (Agencourt Bioscience, Beverly, MA, EUA). Posteriormente, foram preparados para o sequenciamento, empregando-se o *Nextera XT Index kit* (Illumina, San Diego, CA, EUA), novamente purificados com o auxílio do *Agencourt® AMPure® XP PCR Purification* e, por último, quantificados por qPCR empregando-se o *KAPA Library Quantification Kit* (Illumina). A biblioteca de V4 rDNA 16S foi então finalizada formando um *pool*, contendo 4 nM de cada amostra e 30% de *PhiX Control Kit v3* (Illumina), desnaturado com hidróxido de sódio e adicionado no cartucho de sequenciamento *MiSeq Reagent Kit v2* para 500 ciclos. O sequenciamento foi realizado empregando-se o *MiSeq Desktop Sequencer* (Illumina), conforme instruções do fabricante.

Os dados gerados foram, primeiramente, tratados pelo *software MiSeq Reporter*. As sequências geradas foram processadas no programa *MOTHUR v.1.23.0* (SCHLOSS *et al.*, 2009), utilizando um limiar de pontuação de qualidade de base nucleotídica (*Phred score*) igual a $Q \geq 20$. Posteriormente, foram alinhadas e classificadas de acordo o banco de dados de referência Silva v.123 (QUAST *et al.*, 2013) para a região V4 do gene rDNA 16S e agrupadas em unidades taxonômicas operacionais (OTUs) considerando 97% de similaridade genética.

As análises de alfa diversidade, beta diversidade e abundância relativa foram realizadas pelo programa R (<https://www.r-project.org-R>, Core Team 2014), utilizando os pacotes *Phyloseq* (MCMURDIE; HOLMES, 2013) e *ggplot2* (WICKHAM, 2009). A alfa diversidade foi mensurada por meio dos índices de diversidade Shannon

(SHANNON; WEAVER, 1963) e Simpson (SIMPSON, 1949) e de riqueza ACE (CHAO, 1987) e Chao1 (CHAO, 1984). Para a avaliação da beta diversidade, foi utilizado UNIFRAC (LOZUPONE; KNIGHT, 2005), no qual as distâncias ponderadas foram definidas e classificadas por análise de coordenadas principais (PCoA).

4.5 PESQUISA DE VÍRUS ENTÉRICOS

A presença de enterovírus totais, adenovírus humanos, vírus das hepatites A e E e rotavírus, todos vírus de RNA, foi investigada por meio de RT-PCR.

4.5.1 CONCENTRAÇÃO E CLARIFICAÇÃO VIRAL

Após centrifugação como descrito anteriormente (item 4.2.1), os sedimentos foram suspensos em PBS, pH 9,0, para eluição viral a partir das partículas sólidas (0,5 g:1 mL PBS), de acordo com Fongaro *et al.* (2014). A seguir, quatro *pools* foram preparados, levando em consideração as datas/locais em que ocorreram as coletas. Posteriormente, as amostras foram clarificadas por meio do uso de clorofórmio: butanol (1:1), de acordo com procedimento recomendado pela EPA (1992).

4.5.2 EXTRAÇÃO DE ÁCIDOS NUCLEICOS

Os ácidos nucleicos foram extraídos utilizando-se o *QIAamp® DNA/RNA Mini Kit* (Qiagen, Hilden, Alemanha), de acordo com as instruções do fabricante. Um volume de 200µL de amostra previamente concentrada e clarificada foi empregado nesta etapa.

4.5.3 QUANTIFICAÇÃO VIRAL

Os vírus em estudo foram quantificados por RT-qPCR. Para a reação de transcrição reversa, foram empregados iniciadores randômicos (Promega, Madison, Wisconsin, EUA). O material genético purificado foi previamente desnaturado a 97 °C por 5 min e resfriado por 2 min em banho de gelo. Posteriormente, o material foi adicionado a uma mistura de 20 pmol de iniciador randômico (Promega), 0,6 mM de dNTPs, 1 U da enzima transcriptase reversa (MMLV-Promega, Madison, Wisconsin, EUA) e 0,5U de inibidor de RNase (RNAsin-Promega, Madison, Wisconsin, EUA). A reação constou de 1 ciclo de 37°C por 60 min e 1 ciclo de 65°C por 10 min.

Então, a quantificação viral foi realizada empregando-se o *kit Quanti Tec SYBR Green-qPCR Master Mix* (Qiagen). Foram empregados *primers* e protocolos previamente descritos (Quadro 3). Os ensaios de qPCR foram realizados em duplicatas, em microplacas de 96 poços (MicroAmp Applied Biosystems, Waltham, Massachusetts, EUA). Um volume de 15 μ L da mistura de reação foi distribuída em cada poço e 5 μ L dos ácidos nucleicos (DNA ou cDNA) previamente diluídos 1:10 foram adicionados. Em seguida, a placa foi selada com filme óptico (Applied Biosystems, Waltham, Massachusetts, EUA). A reação foi realizada no aparelho *StepOnePlus™ Real-Time PCR System* (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA).

Em todos os lotes de reação foram empregados controles positivo e negativo (água). Como controles positivos, foram utilizados fragmentos de DNA/cDNA, previamente clonados em plasmídeos com as sequências-alvo para os respectivos iniciadores para cada vírus investigado.

Quadro 3. Reações de amplificação (qPCR) empregadas para identificação de Vírus Entéricos

Vírus	Alvo	Programa	Fonte	
Adenovírus Humanos	HADV F 5' - C(AT)T - ACATGCACATC(GT)C(CG)GG - 3'	50°C/2 min 95 °C/10 min (1X) 60 °C/1min (40X) 72°C/10 min (1X)	Hernroth <i>et al.</i> (2002)	
	HADV R 5' - C(AG)CGGGC(GA)AA(CT)TGCACCAG - 3'			
Enterovírus totais	Ent F 5' - CCTCCGGCCCCTGAATG - 3'		De Leon <i>et al.</i> (1990)	
	EntR 5' - ACCGGATGGCCAATCCAA - 3'			
Hepatite A	HAVF - 5'GGTAGGCTACGGGTGAAAC - 3'		Jothikumar <i>et al.</i> (2005)	
	HAVR 5' - GCGGATATTGGTGAGTTGTT - 3'			
Hepatite E	HEV F 5' - GGTGGTTTCTGGGGTGAC - 3'			Jothikumar <i>et al.</i> (2006)
	HEV R 5' - AGGGGTTGGTTGGATGAA - 3'			
	RvaF 5' - FACCATCTWCACRTRACCCTCTATGAG - 3'			
Rotavirus	RvaR 5' - GGTCACATAACGCCCCTATAGC - 3'			Zeng <i>et al.</i> (2008)

5 RESULTADOS

5.1 ANÁLISE FÍSICO-QUÍMICA

Os dados relativos à análise físico-química das amostras de esgoto estão apresentados na Tabela 1. Pode-se observar que os resultados obtidos para a maior parte dos parâmetros avaliados foram bastante heterogêneos.

Tabela 1. Resultado das análises físico-químicas dos ambientes de esgoto sanitário do Aeroporto (AN e AA) e Rodoviária (RN e RA).

LC	pH	DBOt	DQOt	ST	STV	STF	SST	SSV	SSF	Amônia	Nitrito	Nitrato	Pt
		(mg.L ⁻¹ O ₂)	(mg.L ⁻¹ O ₂)	(mg.L ⁻¹)									
AN	7,2	420	650	1065	895	170	250	250	0	42	0,01	1,71	1,06
AA	7,8	280,5	500	3095	3055	40	2350	2350	0	60	0,01	3,48	1,34
RN	7,1	330	400	3900	3865	35	1780	1780	0	45	0,01	2,03	0,86
RA	7,3	714	800	780	765	15	660	650	10	55	0,01	3,79	1,14

AN: Aeroporto em dia de circulação normal de pessoas.

AA: Aeroporto em dia de circulação aumentada de pessoas

RN: Rodoviária em dia de circulação normal de pessoas.

RA: Rodoviária em dia de circulação aumentada de pessoas.

LC: Local de coleta.

5.2 ANÁLISE DAS COMUNIDADES DE BACTÉRIA E ARCHAEA

O número total de *reads* brutos obtidos para cada uma das quatro amostras de esgoto foram: AN = 593.477, AA = 510.031, RN = 656.413 e RA = 456.099. No que se refere a OTUs, o número total foi de 394.800, assim divididos: AN = 113.265, AA = 94.108, RN = 112.741 e RA = 74.686.

Os dados demonstram grande predomínio de Bacteria sobre Archaea nas comunidades do esgoto sanitário do aeroporto e da rodoviária. Relativo ao aeroporto, bactérias e arqueas representaram 99% e 1% da amostra, respectivamente, independentemente da quantidade de pessoas circulando no local. Na rodoviária, a amostra RN era constituída quase que exclusivamente por bactérias e a amostra RA incluía 96% de bactérias e 4% de arqueas.

As oito classes que apresentaram maior abundância relativa nas amostras estudadas foram Bacilli, Bacteroidia, Betaproteobacteria, Clostridia, Coriobacteriia, Epsilonproteobacteria, Gammaproteobacteria e Negativicutes (FIG. 3). No que se refere aos táxons mais abundantes, citam-se *Arcobacter*, *Bacteroides*, *Blautia*, Enterobacteriaceae, *Faecalibacterium*, Lachnospiraceae, *Prevotella*, *Streptococcus*, *Subdoligranulum* e *Succinivibrio* (FIG. 4).

No que se refere a Archaea, *Methanosphaera*, *Methanobacterium* e *Methanobrevibacter* foram os únicos gêneros detectados.

Figura 3. Abundância relativa das principais classes microbianas detectadas nas amostras de esgoto sanitário do Aeroporto Carlos Drummond de Andrade e do Terminal Rodoviário Governador Israel Pinheiro.

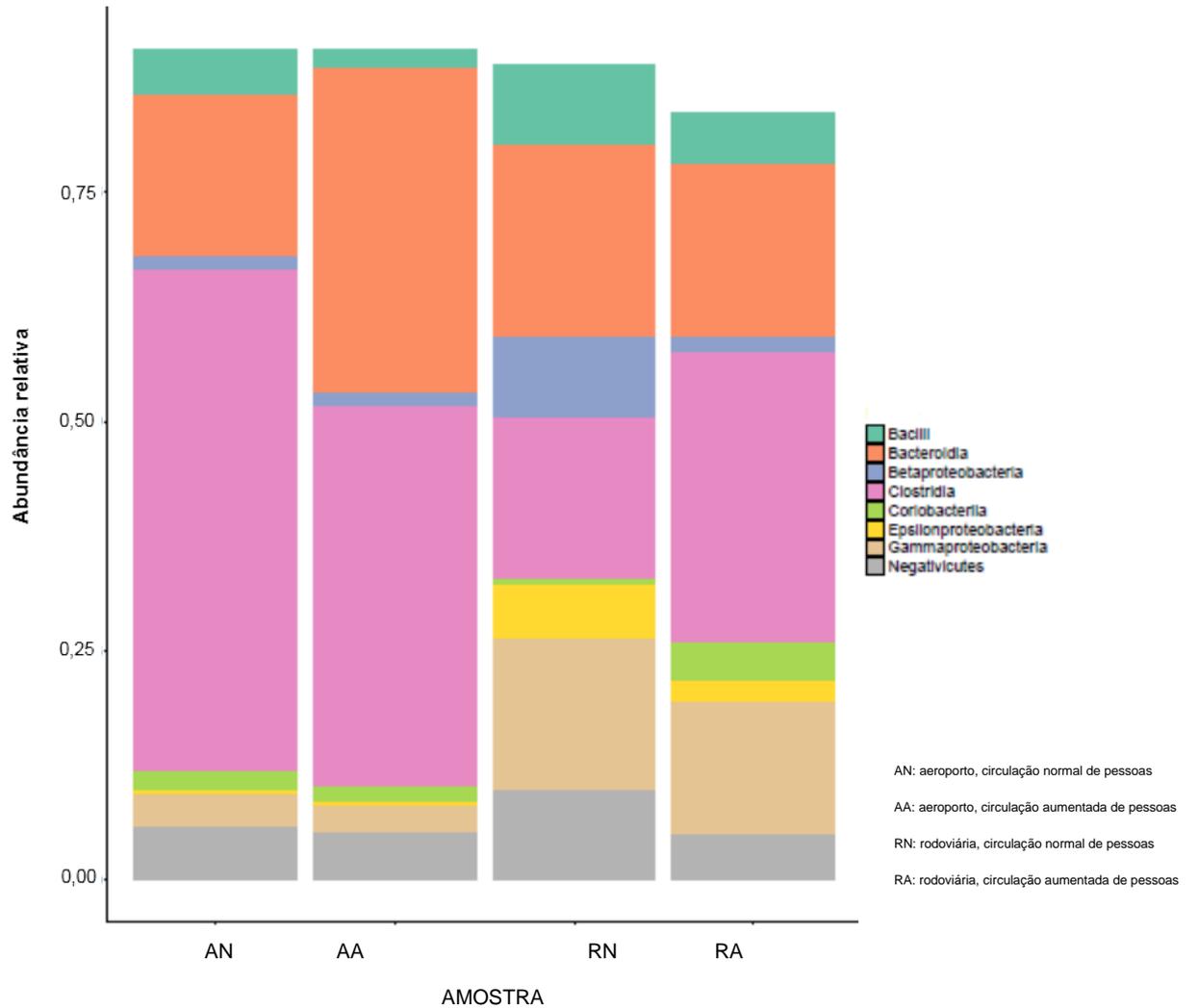
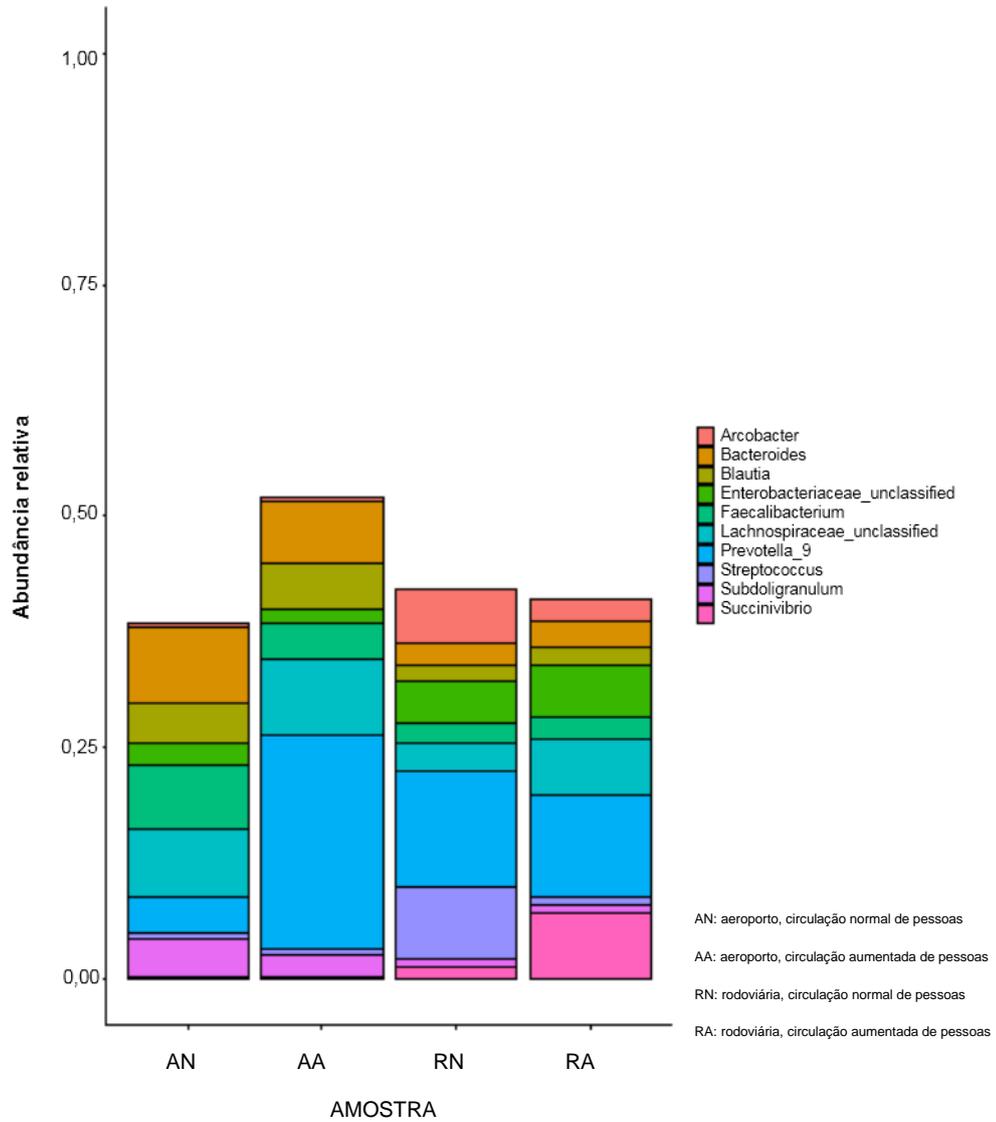


Figura 4. Abundância relativa dos principais táxons detectados nas amostras de esgoto sanitário do Aeroporto Carlos Drummond de Andrade e do Terminal Rodoviário Governador Israel Pinheiro.



A Tabela 2 e a FIG. 5 ilustram os principais filios identificados no estudo. Juntos, Proteobacteria, Firmicutes, Fusobacteria, Bacteroidetes, Euryarchaeota e Actinobacteria compõem, em alguns casos, praticamente 100% das comunidades microbianas avaliadas.

Tabela 2. Abundância relativa dos principais filios microbianos detectados nas amostras de esgoto sanitário do Aeroporto Carlos Drummond de Andrade e do Terminal Rodoviário Governador Israel Pinheiro. Filios com abundância menor que 1% para todas as amostras não foram representados.

Filo	Domínio	AN ¹	AA ²	RN ³	RA ⁴
Firmicutes	Bacteria	64,22%	48,12%	35,24%	40,53%
Bacteroidetes	Bacteria	17,64%	34,77%	22,45%	18,23%
Proteobacteria	Bacteria	5,22%	4,42%	29,90%	18,42%
Actinobacteria	Bacteria	4,56%	2,35%	1,04%	4,50%
Euryarchaeota	Archaea	1,06%	1,06%	0,30%	4,32%
Fusobacteria	Bacteria	0,00%	0,00%	2,90%	0,00%

¹, aeroporto em dia de circulação normal de pessoas; ², aeroporto em dia de circulação aumentada de pessoas; ³, rodoviária em dia de circulação normal de pessoas; ⁴, rodoviária em dia de circulação aumentada de pessoas

O filo Firmicutes representa mais de 50% da amostra de esgoto do aeroporto. Na rodoviária, embora a diferença não seja tão grande, ele também é o filo predominante. Neste filo, os dez táxons mais abundantes foram *Subdoligranulum*, *Streptotoccus*, *Ruminococcaceae*, *Phascolarcobacterium*, *Megasphaera*, *Lactobacillus*, *Lachnospiraceae*, *Faecalibacterium*, *Dialister* e *Blautia* (FIG. 6).

Figura 5. Abundância relativa dos principais filos microbianos detectados nas amostras de esgoto sanitário do Aeroporto Carlos Drummond de Andrade e do Terminal Rodoviário Governador Israel Pinheiro.

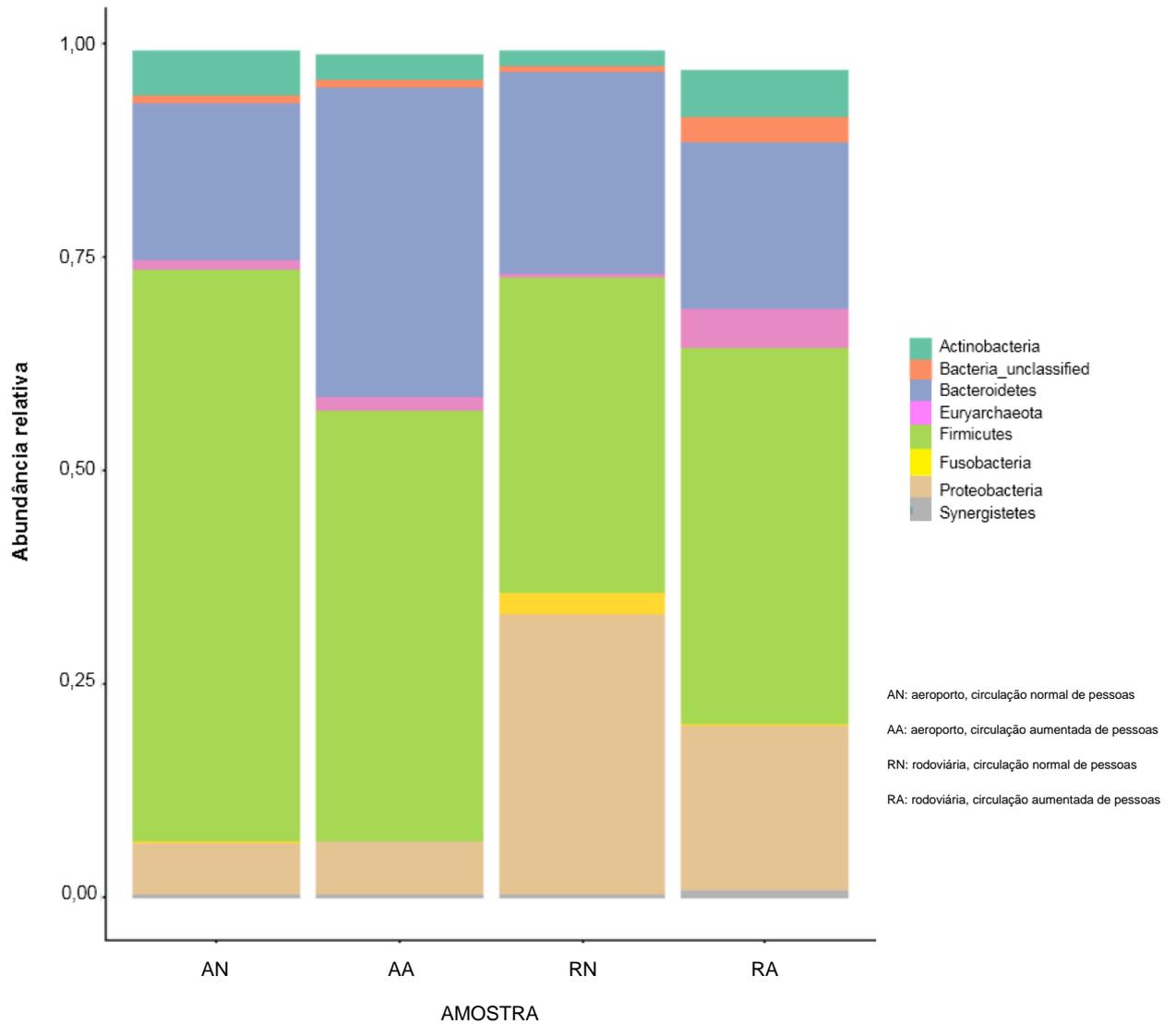
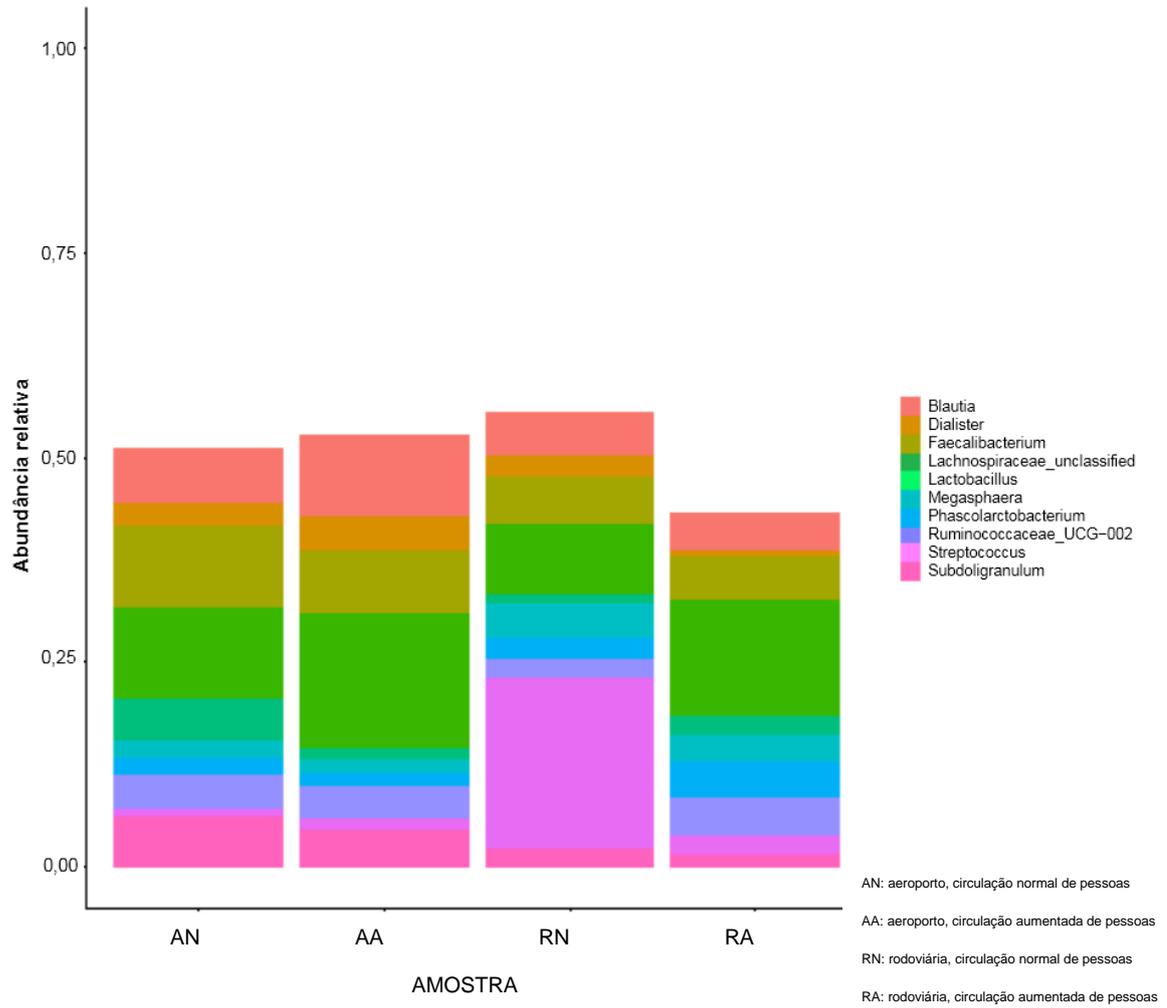


Figura 6. Abundância relativa dos principais táxons microbianos do filo Firmicutes detectados nas amostras de esgoto sanitário do Aeroporto Carlos Drummond de Andrade e do Terminal Rodoviário Governador Israel Pinheiro.



O segundo filo mais abundante foi Bacteroidetes. Os principais gêneros deste filo detectados foram *Prevotella*, *Parabacteroides*, *Macellibacteroides*, *Cloacibacterium*, *Bacteroides*, *Alloprevotella* e *Alistipes* (FIG. 7).

Os 10 táxons mais abundantes do Filo Proteobacteria estão representados na FIG.8. Do filo Actinobacteria, predominaram os táxons *Actinomyces*, *Actinomycetaceae*, *Atopobium*, *Bifidobacterium*, *Collinsella*, *Coriobacteriaceae*, *Enterorhabdus*, *Olsenella* e *Senegalimassilia* (FIG. 9).

A diversidade alfa e beta estão apresentadas na Tabela 3 e na FIG. 10 e 11.

O número de OTUs dos principais patógenos bacterianos está apresentado na FIG 12. Não foram detectadas OTUs associadas a *Vibrio*, *Leptospira*, *Campylobacter*, *Burkholderia* e *Francisella*.

5.3 PESQUISA DE VÍRUS ENTÉRICOS

Os cinco grupos de vírus entéricos pesquisados foram detectados nas amostras de esgoto sanitário tanto do aeroporto como da rodoviária, pelo menos em um dos momentos (Tabela 4). Observa-se predomínio de adenovírus em todas as amostras estudadas.

Figura 7. Abundância relativa dos principais táxons microbianos do filo Bacteroidetes detectados nas amostras de esgoto sanitário do Aeroporto Carlos Drummond de Andrade e do Terminal Rodoviário Governador Israel Pinheiro.

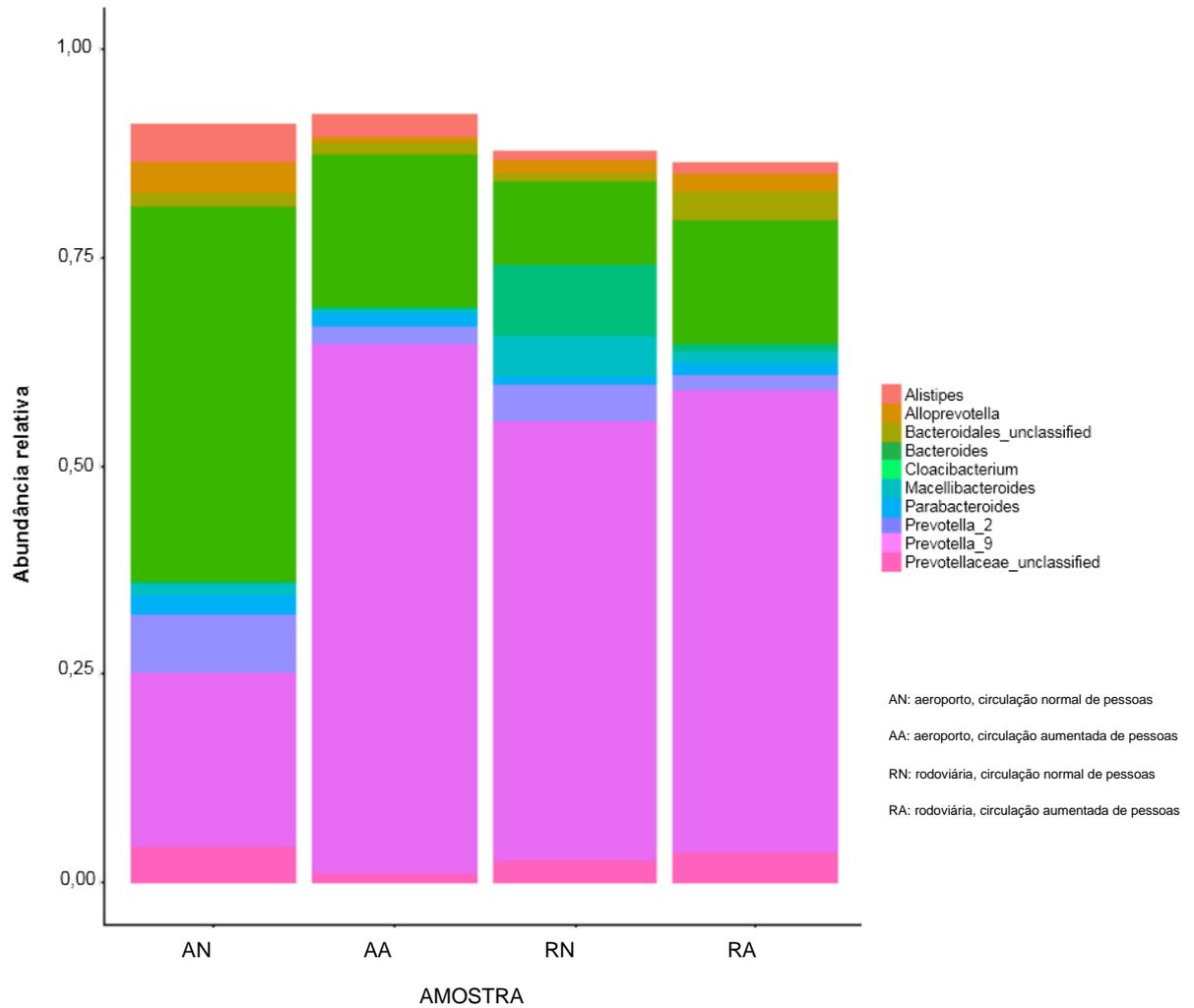


Figura 8. Abundância relativa dos principais táxons microbianos do filo Proteobacteria detectados nas amostras de esgoto sanitário do Aeroporto Carlos Drummond de Andrade e do Terminal Rodoviário Governador Israel Pinheiro.

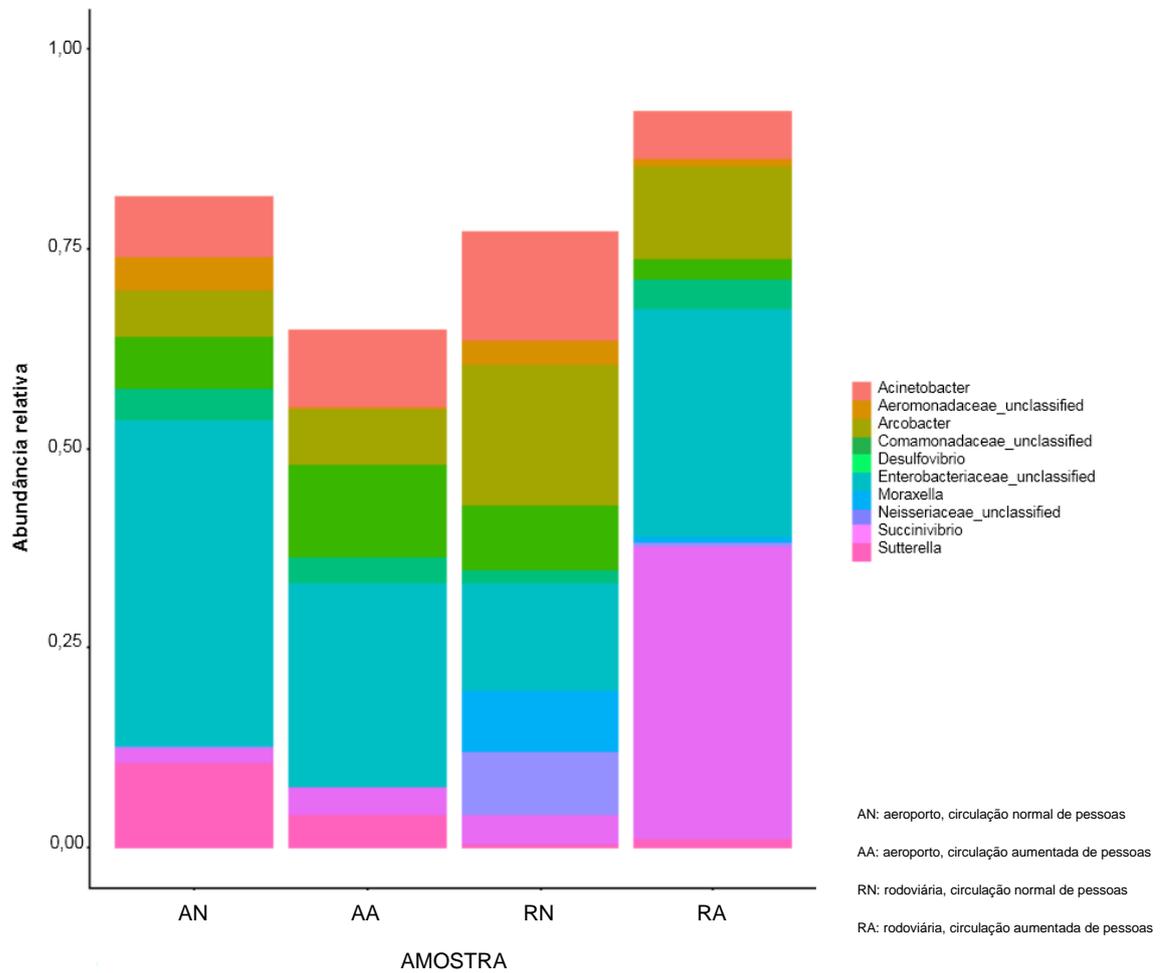


Figura 9. Abundância relativa dos principais táxons microbianos do filo Actinobacteria detectados nas amostras de esgoto sanitário do Aeroporto Carlos Drummond de Andrade e do Terminal Rodoviário Governador Israel Pinheiro.

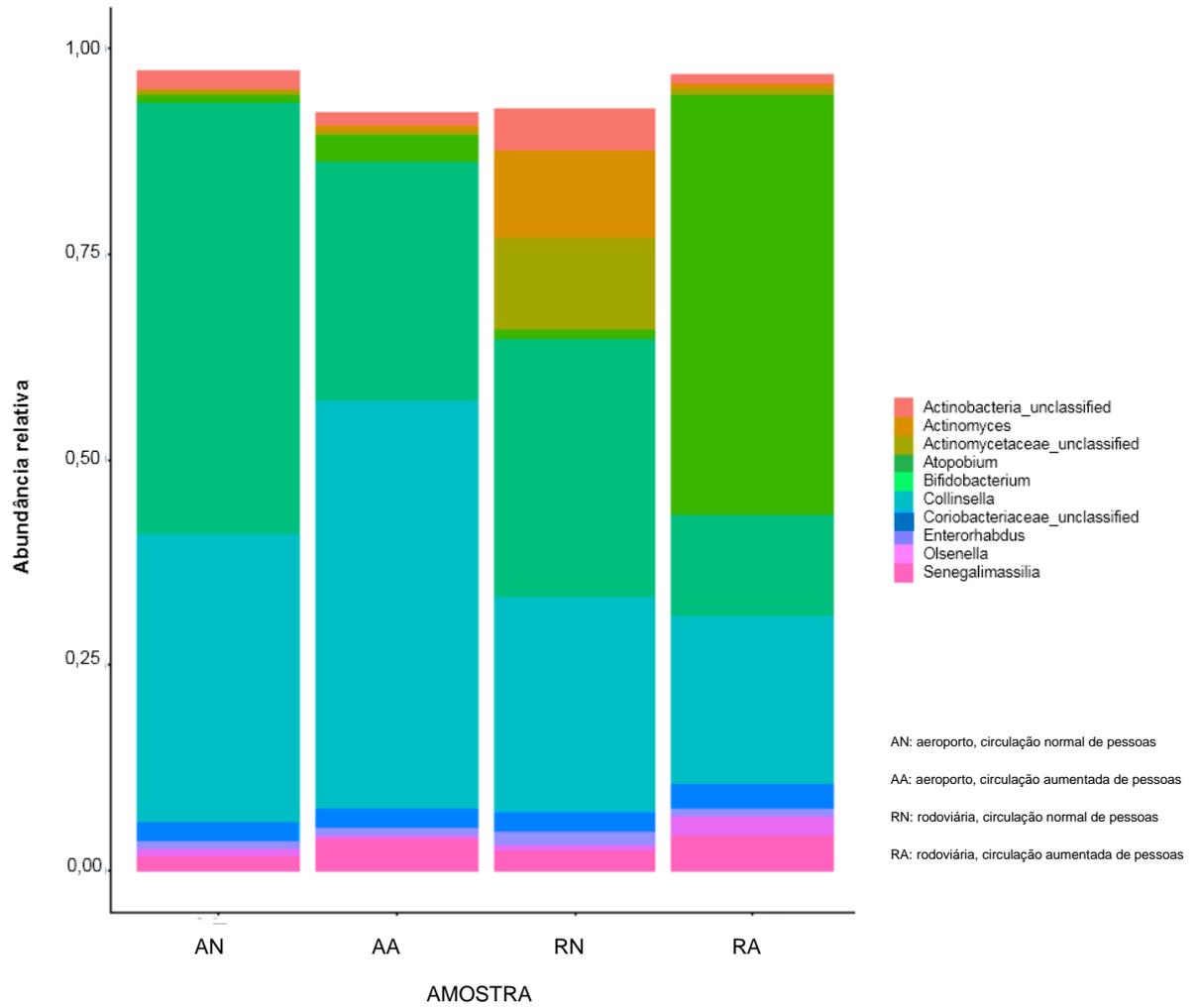


Tabela 3. Alfa diversidade biológica do esgoto sanitário do Aeroporto Carlos Drummond de Andrade e do Terminal Rodoviário Governador Israel Pinheiro avaliada pelos índices de Chao1, ACE, Shannon, Simpson.

Amostra	Chao1	ACE	Shannon	Simpson
AN ¹	1157,9166	1172,0943	4,9465	0,9836
AA ²	1323,0740	1329,6852	4,5325	0,9379
RN ³	1308,7821	1333,1519	4,6157	0,9688
RA ⁴	1280,5796	1287,3423	4,8396	0,9730

AN¹, aeroporto em dia de circulação normal de pessoas; AA², aeroporto em dia de circulação aumentada de pessoas; RN³, rodoviária em dia de circulação normal de pessoas; RA⁴, rodoviária em dia de circulação aumentada de pessoas

Figura 10. Alfa diversidade biológica do esgoto sanitário do Aeroporto Carlos Drummond de Andrade e do Terminal Rodoviário Governador Israel Pinheiro avaliada pelos índices de Chao1, ACE, Shannon, Simpson.

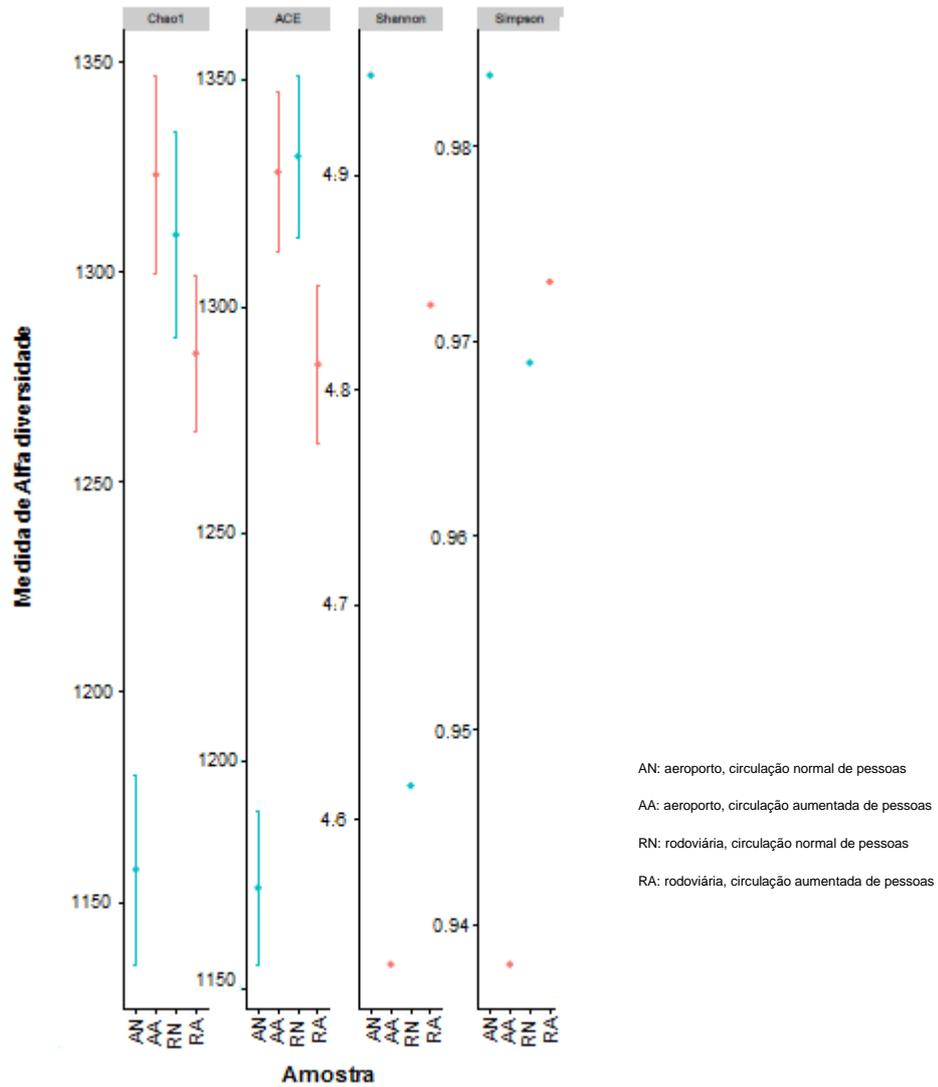


Figura 11. Beta diversidade entre as amostras esgoto sanitário do Aeroporto Carlos Drummond de Andrade e do Terminal Rodoviário Governador Israel Pinheiro.

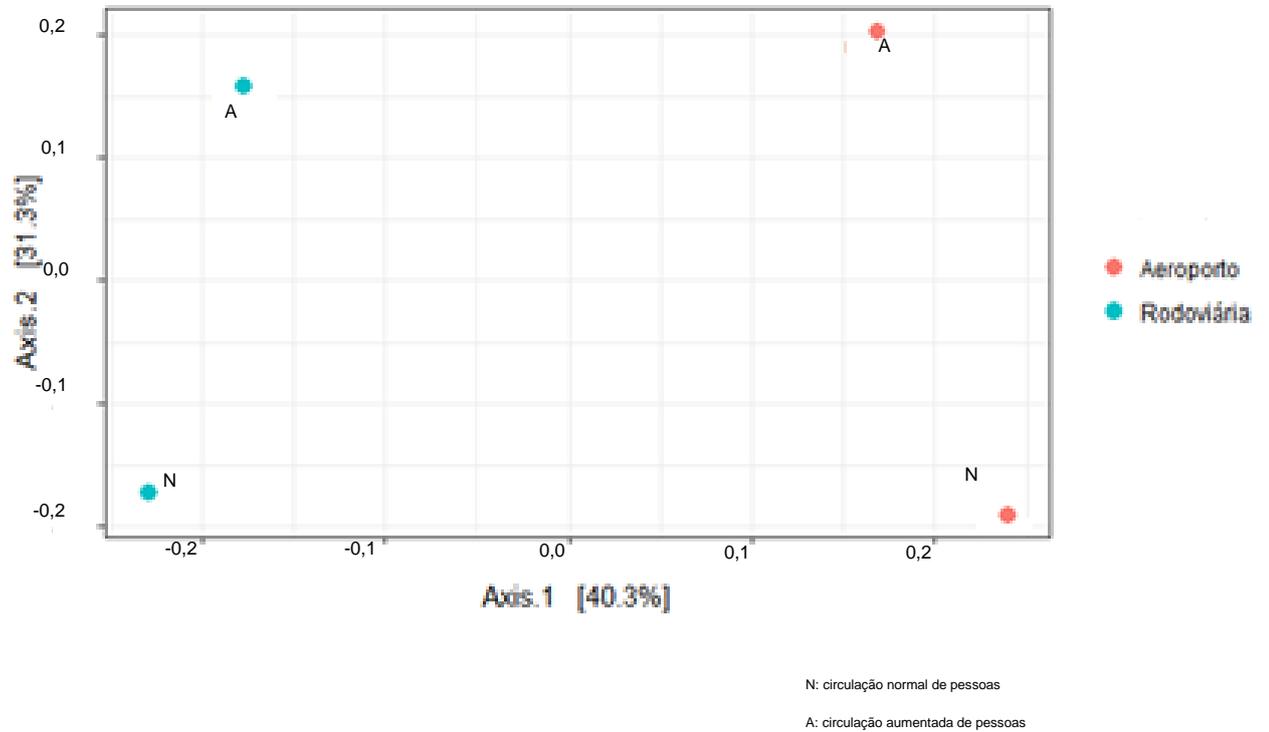


Figura 12. A figura ilustra o número de OTUs dos principais patógenos nas amostras de esgoto sanitário do Aeroporto Carlos Drummond de Andrade e do Terminal Rodoviário Governador Israel Pinheiro.

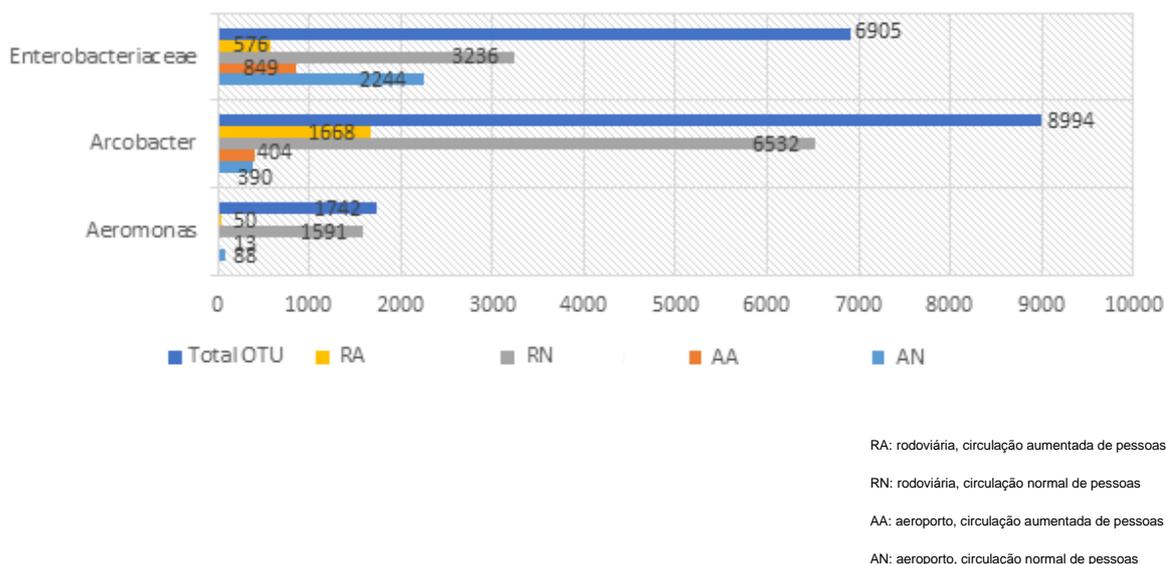


Tabela 4. Quantificação de vírus entéricos nas amostras de esgoto sanitário do Aeroporto Carlos Drummond de Andrade e do Terminal Rodoviário Governador Israel Pinheiro.

Amostra	RVA ⁵	HAV ⁶	HEV ⁷	EV ⁸	HADV ⁹
RN ¹	2,12E+04	ND ¹⁰	ND	ND	3,00E+06
RA ²	2,10E+04	3,00E+04	2,30E+05	2,30E+04	2,10E+06
AN ³	8,00E+04	9,00E+05	9,00E+05	3,40E+05	2,00E+06
AA ⁴	2,30E+05	2,90E+04	ND	ND	8,00E+06

¹, aeroporto em dia de circulação normal de pessoas; ², aeroporto em dia de circulação aumentada de pessoas; ³, rodoviária em dia de circulação normal de pessoas; ⁴, rodoviária em dia de circulação aumentada de pessoas; ⁵, rotavírus; ⁶, vírus da hepatite A; ⁷, vírus da hepatite E; ⁸, enterovírus totais; ⁹, adenovírus; ¹⁰, não detectado.

6 DISCUSSÃO

Uma das grandes questões que rodeiam o universo científico perpassa pela compreensão do impacto causado pelas comunidades microbianas no ecossistema. Basicamente, deseja-se saber quais os microrganismos estão relacionados a um evento, onde podem ser encontrados e qual é a sua ação nessas situações. Na maioria dos ambientes, há comunidades extremamente complexas que, em parte, são definidas pelos fatores abióticos, como também pelas interações que ocorrem entre os organismos. Essas interações recíprocas criam determinadas condições nos *habitats*, que variam de insustentáveis a favoráveis, dependendo do *fitness* de cada organismo (FINLAY; MABERLY; COOPER, 1997). Nesse contexto, a caracterização dos fatores físico-químicos dos ambientes microbianos é relevante para a compreensão de parte dos elementos responsáveis por determinar o predomínio de determinados microrganismos em relação a outros.

6.1 FATORES FÍSICO-QUÍMICOS

Nesta oportunidade, foram avaliadas amostras de esgoto sanitário do Aeroporto Carlos Drummond de Andrade e do Terminal Rodoviário Governador Israel Pinheiro obtidas em dois momentos diferentes, uma em dia de circulação normal de pessoas e outra em dia de movimento aumentado. Os valores de pH das amostras AN e RN foram bem semelhantes e muito próximos do neutro. Nos dias de circulação de pessoas aumentada, observou-se elevação do pH, em especial, no aeroporto, que atingiu 7,8. Lusk *et al.* (2016) demonstraram que o pH ideal para alguns microrganismos se estabelecerem e formarem biofilmes é em torno de 8. Entretanto, o pH ideal para a multiplicação dos principais patógenos transmitidos por alimentos e água é em torno de 6,5 a 7,5 (FDA, 2016). A faixa de pH observada, 7,1 a 7,8, é adequada para grande parte das bactérias.

A concentração de nitrito de todas as amostras foi a mesma, mas, os níveis de nitrato em dias de movimento aumentado no aeroporto e na rodoviária foram quase o dobro daqueles detectados em dias de circulação normal de pessoas. Waiser, Tumber e Holm (2010) demonstraram que a liberação de concentrações elevadas de nitrato na natureza está vinculada à crescente urbanização, à produção de esgoto sanitário em grandes quantidades e ao insucesso na total eliminação do composto.

Os parâmetros pH, nitrito e nitrato das amostras tanto do aeroporto como da rodoviária estavam dentro dos valores de referência relatados na COPAM/CERH-MG nº 01/08 para liberação de efluentes em corpos d'água, mesmo sendo coletadas de esgoto sanitário. Já os valores de DBOt e DQOt correspondem àqueles considerados característicos de fontes poluidoras. Como o esgoto sanitário desses ambientes é destinado às ETEs municipais, não há problema, nesse momento, em relação aos parâmetros mencionados.

Resultados inversos foram obtidos para ST, quando dias de circulação normal e aumentada de pessoas nos dois locais de coleta foram comparados. Com o aumento do movimento, a concentração de ST praticamente triplicou no aeroporto e, na rodoviária, foi cerca de 1/5 daquela observada na amostra RN. Também as concentrações de SST elevaram-se com o movimento maior no aeroporto, chegando a um valor de cerca de oito vezes maior que aquela da amostra AN e, na rodoviária, a amostra RN apresentou concentração equivalente a perto de três vezes àquela detectada em RA.

Seria plausível esperar concentrações mais elevadas desses parâmetros em amostras nas quais houvesse maiores quantidades de microrganismos, visto que eles podem interagir com a matéria orgânica de diferentes maneiras. Entretanto, esta não foi a regra. Apenas na rodoviária, o número de OTUs foi maior na amostra com valores superiores de ST e SST.

No que se refere a fosfato, concentrações mais elevadas foram observadas com o aumento da circulação de pessoa no aeroporto e na rodoviária.

As espécies biológicas que compõe um determinado ambiente, bem como as relações que estabelecem entre si e com os fatores abióticos auxiliam no estabelecimento e manutenção dos organismos em um determinado espaço. Nesse sentido, a biodiversidade pode ser compreendida como a variabilidade entre os organismos que habitam um determinado local no tempo e no espaço, formando os complexos ecológicos dos quais farão parte (CHANDRA; IDRISOVA, 2011).

Os microrganismos que compõem o microbioma humano são considerados a chave para a compreensão de diversas situações de saúde e doença. Alterações na composição das comunidades microbianas estão associadas à gênese de diversos quadros clínicos, de natureza infecciosa ou não. É importante lembrar que alguns estudos já comprovaram que a dieta praticada pelo indivíduo influencia na composição das comunidades microbianas do trato intestinal. Esta situação é um claro exemplo de como os fatores culturais podem afetar a composição do microbioma humano (HEIMAN; GREENWAY, 2016).

O ambiente de esgoto de dois locais distintos, mas que recebem pessoas de diversas regiões reúne as condições para explorar a diversidade microbiológica e os possíveis perigos microbianos associados. Eventualmente, os patógenos que residem nos sistemas de esgoto podem atingir o solo, os lençóis freáticos, a bacia hidrográfica e contaminar todos esses recursos. Por isso, é extremamente importante que a rede coletora de resíduos esteja operando em condições adequadas.

Como esperado, uma grande variedade de microrganismo foi observada nas amostras de esgoto estudadas. Detectou-se grande predomínio de Bacteria em relação a Archaea. Zhang *et al.* (2015), em 200 dias de monitoramento de reatores biológicos, não encontraram Archaea. Entretanto, Liu *et al.* (2016) encontraram mais de 15 gêneros pertencentes a este domínio em situação similar. Cardoso *et al.* (2012) relataram Archaea como um dos principais táxons presentes na Baía de Guanabara.

Na presente investigação, as classes Clostridia e Bacteroidia apresentaram maior abundância relativa em todas as amostras analisadas. Diferentemente, Kaevska, Videnska e Vasickova (2015) demonstraram, em afluente de ETE, predomínio de Epsilonproteobacteria e Gammaproteobacteria, as classes Alphaproteobacteria e Betaproteobacteria estiveram presentes em baixa abundância.

No que se refere a gêneros microbianos, neste estudo, 10 gêneros constituíram cerca de 50% da comunidade de Bacteria e Archaea dos esgotos sanitários do aeroporto e da rodoviária. Embora os dados não tenham sido analisados do ponto de vista estatístico, observou-se predomínio de *Prevotella* (entre 10,9 e 22,9%) em todas as amostras, exceto AN. De acordo com Sherrard *et al.* (2013), a

bactéria é membro da microbiota indígena do ser humano, colonizando diversos sítios anatômicos, como trato respiratório, vagina e intestino.

Já em estudo conduzido por Cai, Ju e Zhang (2013), *Streptococcus* foi o gênero com maior abundância relativa (13,1%) em afluentes de esgoto. Esse microrganismo é encontrado em concentrações elevadas na cavidade oral e pequena abundância no intestino. Nesse mesmo estudo, os autores identificaram outros gêneros dominantes, como *Blautia* (8,9%), que pertence a microbiota intestinal, e *Paracoccus* (7,3%) que usualmente não é encontrado no esgoto sanitário. Na presente investigação, *Blautia* e *Streptococcus* também foram detectados entre os 10 gêneros mais abundantes.

Bacteroides e Enterobacteriaceae, membros da microbiota intestinal indígena do ser humano (LLOYD-PRICE; ABU-ALI; HUTTENHOWER, 2016), também foram identificados entre os 10 táxons mais abundantes, como esperado.

O filo Firmicutes apresentou a maior abundância relativa, sempre superior a 35%, em todas as amostras de esgoto. Em estudo conduzido por Cai e colaboradores (2013), que estudou afluentes de ETE, Firmicutes também foi o filo mais abundante (54%).

Bacteroidetes representou o segundo filo mais abundante nas amostras AN e AA. Ambos, Firmicutes e Bacteroidetes, são os filios predominantes no ambiente intestinal humano, o que explica os achados desta investigação. Cai e colaboradores (2013) relataram abundância relativa do filo de apenas 2% em afluentes de ETE.

Nas amostras de esgoto sanitário da rodoviária, o segundo filo com maior abundância relativa foi Proteobacteria, tanto na amostra RN (cerca de 30%) como na amostra RA (cerca de 20%). Os dados corroboram aqueles relatados por Cai *et al.* (2013), que observaram, em amostras de afluente de ETE, abundância relativa do filo de 34%. Em estudo realizado na Baía de Guanabara, Cardoso *et al.* (2012) relataram Proteobacteria um dos principais táxons presentes.

Os índices empregados para avaliação de alfa diversidade demonstraram que as amostras são relativamente semelhantes quanto à alta riqueza e diversidade, tanto no que se refere ao ambiente, aeroporto e rodoviária, como em momento da

coleta (movimento normal e aumentado). Entretanto, a análise de beta diversidade mostra que as estruturas das comunidades não se assemelham entre si.

Bactérias do gênero *Aeromonas* são agentes de doença diarreica aguda. Em países desenvolvidos, os índices de diarreia associada ao microrganismo variam de 0,0 a 4,0% e de 0,8 a 7,4%, em países desenvolvidos e em desenvolvimento, respectivamente. Em estudo conduzido em Taiwan, amostras de fezes de 514 adultos com diarreia foram avaliadas e *Aeromonas* foi identificada como agente da doença em cerca de 3% dos casos. Já na China, em estudo que incluiu 4.529 amostras de fezes de pacientes com diarreia e 540 amostras de água, o microrganismo foi identificado em cerca de 4% dos espécimes fecais e 12% das amostras de água. No Japão, calcula-se que cerca de 2% dos casos de diarreia dos viajantes que acometem turistas nipônicos em viagem à África, América Latina e Ásia sejam causadas por essa bactéria. No sul do Brasil, a presença de *Aeromonas*, em especial, *Aeromonas caviae*, foi confirmada em 2,7% dos casos de diarreia (PREDIGER *et al.*, 2012, IGBINOSA *et al.*, 2012, CHEN *et al.*, 2015, LI *et al.*, 2015, LI *et al.*, 2015).

No presente estudo, a abundância relativa de *Aeromonas* foi inferior a 0,1% no aeroporto e na amostra RA. Apenas na amostra RN o valor foi cerca de 1,5%. Em estudo conduzido por Shannon *et al.* (2007), que avaliou amostras de esgoto bruto e após tratamento, *Aeromonas hydrophila* foi identificada somente no esgoto bruto. Em estudo conduzido por Ma *et al.* (2016), o gênero *Aeromonas* teve abundância relativa entre 0,9 e 3,6% em sistema de tratamento de efluentes.

O gênero *Arcobacter* vem sendo associado à etiopatogenia da doença diarreica. O microrganismo já foi isolado da microbiota de animais saudáveis, como gado, cavalos e porcos. Na Índia, 12% de 600 amostras bacterianas relacionadas à doença diarreica foram identificadas como *Arcobacter* (PATYAL *et al.*, 2011). Relatos sugerem que a doença associada a *Arcobacter butzleri* não é tão agressiva quanto à relacionada a *C. jejuni* (GÖLZ *et al.*, 2016).

Nas amostras de esgoto sanitário do aeroporto, a abundância relativa tanto no dia de movimento normal como naquele de circulação aumentada de pessoas foi de cerca de 0,4%. Na rodoviária, os valores foram de, aproximadamente, 6 e 2%, nas

amostras RN e RA. Os dados demonstram que o aumento do número de pessoas não resulta em aumento da abundância relativa do microrganismo.

A circulação de *Arcobacter* em ETEs foi descrita por MA *et al.* (2016). Os autores verificaram que a abundância da bactéria nesses sistemas variou de 4,1 a 21,8% e a eficiência de remoção do microrganismo foi de 87%. Entretanto, ainda não foi demonstrada a sua circulação a partir do início de uma rede de esgoto bruto.

Os resultados indicam, ainda, uma diferença considerável entre os ambientes coletados. Talvez ela ocorra devido a características sociais e culturais das pessoas que frequentam esses locais. A rodoviária recebe, predominantemente, pessoas do Brasil, inclusive, do interior de Minas Gerais, uma área que apresenta intensa atividade pecuária. Sabe-se que *Arcobacter* é observado com frequência em animais como gado, frangos e porcos. Em estudo conduzido por Patyal *et al.* (2011), cerca de 25% dos porcos e 12% dos frangos estavam colonizados pelo organismo.

Não é possível descartar completamente a possibilidade da presença de amostras de *Arcobacter* no esgoto ser decorrente dos processos de higienização de produtos cárneos que serão servidos nos restaurantes da rodoviária ou do aeroporto. Em estudo conduzido por Teague *et al.* (2010), os autores demonstraram a presença de *Arcobacter* em refeições prontas para consumo em 13% das amostras pesquisadas. Para o preparo das refeições, é comum sanitizar vegetais, lavar a carne de frango, cortar a carne de porco na pia e a água utilizada na maioria desses processos para enxaguar os diferentes alimentos. Sendo assim, caso haja contaminação do alimento, ela poderia carrear esses microrganismos para o esgoto sanitário.

Em resumo, a identificação de *Arcobarcter* no ambiente de esgoto sanitário pode ser explicada por, pelo menos, três hipóteses, quais sejam, a circulação de indivíduos com doença diarreica, a presença de portadores assintomáticos e a higienização de alimentos contaminados pelo organismo. Todas as situações requerem atenção, quer seja indivíduos doentes ou com potencial para desenvolver o quadro diarreico, cuja importância é óbvia, quer seja a possibilidade de que estes indivíduos atuem como fontes de contaminação potenciais. Ainda, caso seja um problema de contaminação alimentar, este é, também, um problema sanitário de

grandes proporções, uma vez que, atualmente, não há políticas de vigilância sanitária ou de identificação de agentes responsáveis por causar DTAs, em Minas Gerais, que objetivem saber os impactos desse patógeno emergente nos alimentos consumidos pela população do Estado.

Os microrganismos que pertencem à família Enterobacteriaceae colonizam o intestino de animais endotérmicos. Atualmente, são reconhecidos mais de 50 gêneros descritos com centenas de espécies. Essas bactérias apresentam importância para a economia, para a indústria de alimentos e para a saúde pública. Embora boa parte desses organismos seja relacionada a hospedeiros saudáveis, há alguns gêneros/espécies associados a uma ampla diversidade de doenças bastante prevalentes que afetam o ser humano. Entre elas, destaca-se a doença diarreica (KILONZO-NTHENGE; ROTICH; NAHASHON, 2013; LLOYD-PRICE; ABU-ALI; HUTTENHOWER, 2016).

No grupo enteropatogênico de enterobactérias, merecem ser citadas *E. coli*, *Shigella*, *S. enterica* e *Yersinia*. Em trabalho realizado por Kumar (2016), os autores isolaram de afluente de esgoto 16 táxons da família Enterobacteriaceae. Entre eles, destacaram-se *Salmonella*, *Shigella* e *Yersinia*.

No que se refere a *Yersinia enterocolitica*, no Brasil, apesar de alguns trabalhos demonstram o isolamento do microrganismo, ainda não há dados epidemiológicos consistentes a este respeito. Muito provavelmente pelo difícil isolamento do patógeno associado às subnotificações (LA *et al.*, 2014). Estima-se que a bactéria seja responsável por mais de 110.000 casos nos EUA, em especial, em crianças menores que cinco anos (47%) e 1 ano (32%) e nos últimos anos houve amplo declínio na incidência desse microrganismo como causador de DTAs nos EUA (ONG *et al.*, 2012)

No presente estudo, como esperado, foi possível a detecção de OTUs referentes à família Enterobacteriaceae em ambos os ambientes. No aeroporto, a abundância relativa do grupo foi próxima de 2,5 e 1,5%, nas amostras AN e AA, respectivamente e, na rodoviária, a taxa foi próxima de 4,4 na amostra RN e 5,5% em RA. Entretanto, não foi possível a identificação de OTUs correspondentes a grupos específicos de enterobactérias. Considerando o fato de que diversas enterobactérias

são parte da microbiota indígena do ser humano e que a metodologia empregada só permitiu a identificação no nível de família, a discussão do tema fica comprometida.

Embora reconhecidos como agentes diarreiogênicos relevantes, *Campylobacter*, *Vibrio* e *Leptospira* não foram detectados nas amostras estudadas. De acordo com KAAKOUSH *et al.* (2015), na América do Sul, o organismo é detectado em taxas que podem atingir as taxas superiores a 30% em pacientes com doença diarreica aguda. As frequências reportadas pelos autores são de 0,0 a 30,1% para a Argentina, 4,4 a 10,0% para a Bolívia, 0,0 a 14% para o Chile, 0,0 a 13% para o Uruguai e de 0,0 a 23% para o Peru e o Equador. No Brasil, foram encontrados níveis de 5,8 a 9,6%. Segundo Bonetta *et al.* (2016), 83% das amostras de esgotos sanitários são positivas para *C. jejuni*. Ainda assim, no presente estudo, o organismo não pode ser observado.

No que se refere a *V. cholerae*, as estimativas são de 1,4 a 4,3 milhões de caso a anualmente, resultando em 28.000 a 142.000 mortes. No Brasil, a sétima pandemia de cólera iniciou-se em 1991, com os primeiros casos ocorrendo na Amazônia. Entre os anos de 1991 e 2001, ocorreram 168.598 confirmações da doença no País, com 2.037 mortes. Já entre 2001 e 2003, ocorreram 4.756 casos notificados e sete óbitos (BHATTACHARYA *et al.*, 2013).

Considerando a associação entre o microrganismo e água salgada, a detecção em Minas Gerais seria menos provável. Entretanto, levando em conta a diversidade de origem das pessoas que circulam pelos ambientes estudados, sua identificação seria esperada. No Estado do Rio de Janeiro, entre os meses de outubro de 2011 e fevereiro de 2012, ocorreu o monitoramento de 251 navios e 14 amostras do organismo foram isoladas (SILVA *et al.*, 2016).

Referente a *Leptospira*, anualmente, há cerca de um milhão de casos de leptospirose, associados a quase 60.000 óbitos mundialmente. No Brasil, entre os anos 1999 e 2005, 81.897 casos suspeitos de leptospirose foram notificados, 22.774 foram confirmados e, entre eles, 2.574 evoluíram para óbito (SOUZA *et al.*, 2011, ALLAN *et al.*, 2015, COSTA *et al.*, 2015).

6.3 PESQUISA DE VÍRUS ENTÉRICOS

Diversos vírus estão associados a doenças transmitidas por água. Entre eles, destacamos, neste estudo, adenovírus, vírus das hepatites A e E, enterovírus e rotavírus. Todos eles puderam ser detectados nas amostras de esgoto sanitário do aeroporto e da rodoviária, em, pelo menos, um dos momentos.

Os adenovírus representam um importante patógeno, cujo grupo epidemiológico de interesse são crianças menores de 2 anos. Recentemente, em estudo conduzido no Irã, das 827 amostras de fezes de crianças com doenças diarreicas, 76 (9%) apresentaram esse organismo como agente etiológico da enfermidade (MOTAMEDIFAR *et al.*, 2013). Nos EUA, em estudo conduzido na cidade de Utah, foi identificado algum patógeno em 52% das amostras, sendo adenovírus, o agente em 7% dos eventos (STOCKMANN *et al.*, 2016). No Brasil, os estudos já realizados demonstram que a participação de adenovírus nas doenças diarreicas é em torno de 12% (REIS *et al.*, 2016).

A contaminação de ambientes aquáticos por microrganismos potencialmente patogênicos é um problema enfrentado por países em desenvolvimento e países desenvolvidos. Em trabalho de monitoramento de águas recreacionais, Wyn-jones *et al.* (2011) demonstraram que os adenovírus estavam presentes em 36,4% das amostras estudadas. Os autores hipotetizaram que a alta frequência de detecção desses vírus devia-se ao fato da liberação intermitente do organismo em fezes humanas. Os resultados da presente investigação corroboram, esta hipótese, uma vez adenovírus foram identificados em todas as amostras estudadas.

Por serem excretados intermitentemente nas fezes de seres humanos doentes ou saudáveis, apresentarem resistência elevada a diferentes condições ambientais, resistirem aos processos de tratamento de esgoto e apresentarem alta incidência em águas recreacionais, os adenovírus podem ser considerados um problema de saúde ambiental e, conseqüentemente, de saúde pública, uma vez que a sua remoção total nos sistemas de tratamento de esgoto ainda não foi demonstrada experimentalmente (MAGRI *et al.*, 2015)

As hepatites virais são um problema global e atingem, principalmente, os países que apresentam baixa qualidade sanitária e más condições de higiene, devido

à rota de transmissão de alguns tipos da doença. As taxas de detecção de indivíduos que apresentam reação positiva para anticorpos contra o vírus da hepatite A podem chegar a cerca de 90%, como em Córdoba, Argentina (YANEZ *et al.*, 2014). No Brasil, as taxas mais elevadas de infecção pelo vírus estão associadas a áreas que apresentam deficiência na captação e tratamento dos esgotos sanitários. Entre os anos 2007 e 2013, cerca de 50.000 casos da doença foram relatados (PRADO; MIAGOSTOVICH, 2014).

Na presente investigação, o HAV foi detectado em todas as amostras, exceto na amostra RN. Contudo, não é possível afirmar que elas não continham os referidos vírus, pois o limite de detecção da técnica empregada foi estabelecido em 10^3 CG/L.

Na amostra RA, foi observada a presença de $3,0 \times 10^4$ CG/L de HAV. As amostras do esgoto sanitário do aeroporto indicaram presença de 10^4 a 10^5 CG de HAV/L, sem relação aparente com a circulação de pessoas. De acordo com Bosch (1998), um indivíduo doente elimina entre 10^7 e 10^{13} partículas virais por dia. Assim, espera-se que o aumento da circulação de pessoas aumente as chances de detecção do vírus. Para Hellmer *et al.* (2014), a análise do esgoto pode ser um importante parâmetro para estimar o número de pessoas infectadas pelo HAV.

Em estudo conduzido por Fernández *et al.* (2012), HAV foi detectado no rio La Plata, que recebe esgoto não tratado de Buenos Aires e seu entorno, e Riachuelo-Arenales, Lujan, que recebe efluente do sistema de tratamento de esgoto. Já em outro estudo, Yanez *et al.* (2014) demonstraram que o vírus da hepatite A estava presente em cerca de 20% das amostras de esgoto bruto e de 16% das amostras de rios.

Vale ressaltar que, desde o início dos anos 1990, há, no Brasil, uma vacina disponível contra a Hepatite A, considerada efetiva e segura. Ela é disponibilizada pelo SUS somente para grupos epidemiológicos de risco (SARTORI *et al.*, 2012). Em Lujan, Fernández *et al.* (2012) demonstraram que, após a introdução da vacina, em 2005, a circulação ambiental dos vírus diminuiu de 93% para 0% em 2012.

Considerando as características biológicas do adenovírus e do vírus da hepatite A, quais sejam, eliminação pelas fezes, resistência às pressões ambientais e ao sistema de tratamento de esgotos, longa persistência em suprimentos de água e resistência moderada ao cloro (EMILIANO; ANDRÉ, 2012), é tentador sugerir o

emprego dos organismos como indicadores de qualidade de água para consumo humano ou para recreação.

A hepatite E apresenta taxas elevadas de morbidade e mortalidade ao redor do mundo. São relatados mais de 3,4 milhões de casos sintomáticos, 70.000 mortes e 3.000 natimortos anualmente. Em países desenvolvidos, estima-se que a taxa de prevalência de indivíduos positivos para anti-HEV IgG situa-se entre 7 e 21%. A hepatite E pode representar 50% das hepatites virais em locais endêmicos. Apesar de serem globalmente distribuídos, há variação nas frequências de diferentes genótipos e subtipos por região (PÉREZ-GRACIA; SUAY; MATEOS-LINDEMANN, 2014).

Na rodoviária, nossos resultados sugerem que a circulação de pessoas teve impacto na presença do HEV no esgoto sanitário. Resultado inverso foi obtido para as amostras do esgoto sanitário do aeroporto. Em estudo conduzido por MIURA *et al.* (2016), 22% das amostras de águas residuárias que chegavam para o tratamento estavam contaminadas com o vírus. Além disso, o estudo demonstrou que é possível verificar a permanência do organismo no esgoto por até 3 meses.

Os dados relativos ao Brasil, nesse aspecto, são escassos e, muitas vezes, inexistentes. A partir dos dados demonstrados nesse estudo, mostra-se necessário evidenciar os perfis dos genótipos virais a fim de responder se os vírus circulantes são provenientes de suínos ou outros animais, se BH está situada em área endêmica para Hepatite E ou se há surtos sazonais proporcionados por esses vírus.

Os enterovírus representam um grupo de vírus que apresentam predisposição pelo sistema nervoso. Entre eles, os poliovírus, agentes da poliomielite, recebem atenção especial dos órgãos internacionais de saúde. Desde os anos 2000 foram estabelecidas as três principais estratégias para erradicação da doença provocada por esse agente, quais sejam manutenção da cobertura da vacinação infantil, vacinação suplementar através dos dias nacionais de imunização e desenvolvimento de programas de vigilância epidemiológica e ambiental (ALAM *et al.*, 2014).

Como discutido para HEV, enterovírus foram detectados no esgoto sanitário da rodoviária apenas na amostra obtida em dia de circulação aumentada de pessoas.

Mais uma vez, resultado inverso foi observado para o aeroporto, onde enterovírus foram detectados apenas no dia de movimento normal de pessoas.

Os resultados relativos à detecção de enterovírus totais são preliminares em relação à presença de poliovírus, mas, devem ser tratados com especial atenção. É necessário que se avalie se as CGs observadas são relacionadas a poliovírus e, caso sejam, se correspondem a amostras selvagens ou vacinais.

Em estudo conduzido na China, Wang *et al.* (2014), em cinco anos de coletas, detectaram, em 129 amostras de esgoto, poliovírus em 38,8% delas. Entretanto, todas as amostras correspondiam à cepa vacinal. Os demais enterovírus foram identificados em 75% das amostras. A vigilância ambiental demonstra que a pesquisa contínua dos poliovírus em esgoto sanitário é uma importante ferramenta para proteção da saúde ambiental e avaliação das políticas públicas relacionadas à erradicação da poliomielite. Exemplo dessa importância é verificada por Derrough e Salekeen (2016) que demonstraram desde novos casos da doença a identificação de *Enterovirus C* selvagens em esgoto sanitário.

Os rotavírus são responsáveis, no mundo, por cerca de 25 milhões de consultas ambulatoriais, dois milhões de internações e 500 mil mortes por ano. Em decorrência deste quadro, há, hoje, a vacinação em massa de grupos populacionais específicos em diversas localidades do planeta (CHANG *et al.*, 2013).

No Brasil, há cerca de 10 anos, o governo inclui, no Calendário Básico de Vacinação, a vacina contra a rotavirose, para crianças com idade inferior a cinco anos. Os casos de hospitalização diminuíram de 495 mil (2002-2005) para 389 mil (2006-2009) e o número de mortes por doenças diarreicas diminuiu 50,3% (GURGEL *et al.*, 2011).

No presente estudo, rotavírus foi detectado em todas as amostras estudadas, em quantidades semelhantes. Em investigação conduzida por Ruggeri *et al.* (2014), na Itália, entre 58,3% e 82,1% das amostras de esgoto sanitário foram positivas para algum genótipo de rotavírus. O vírus foi identificado durante todo o ano, independentemente do relato de doença associada a ele. Todas as cepas detectadas eram vacinais. Já em estudo de Motayo, Adeniji e Faneye (2016), na Nigéria, 14,2% das amostras de esgoto sanitário foram positivas para rotavírus (cepa não vacinal),

com aumento da circulação no período de seca. Nas amostras de Ruggeri *et al.* (2014) só foram identificadas cepas vacinais enquanto que nas de Motayo, Adeniji e Faneye (2016) as cepas detectadas não correspondiam à cepa vacinal.

Nos últimos anos, o desenvolvimento de tecnologias de sequenciamento em larga escala (*high-throughput sequencing*) e da qPCR permitiu avaliar, inclusive do ponto de vista quantitativo, a composição de comunidades microbianas. Nesse contexto, vêm sendo empregadas para a identificação de patógenos circulantes em diversos ambientes, inclusive, em estações de tratamento de água para o consumo humano (MA *et al.*, 2016).

A água, como recurso natural, é fundamental para o bem estar, o progresso e a manutenção das diversas atividades humanas. Contudo, o seu mau gerenciamento pode provocar sérios danos à saúde. Um dos principais problemas relacionados à água é a sua poluição por dejetos humanos ou de outros animais (GIRONES *et al.*, 2010).

O esgoto doméstico é composto pela somatória dos diversos microrganismos que habitam a pele, o trato respiratório, a cavidade oral, o trato urogenital e, em especial, o intestino humano. Eles são depositados no ambiente, principalmente, por meio dos atos de defecar, tomar banho ou urinar. Esse ambiente apresenta grande quantidade de matéria orgânica e carga microbiana elevada. Por isso, caso não seja tratado adequadamente, pode causar a contaminação de mananciais aquáticos ou provocar efeitos ambientais catastróficos, como a eutrofização de lagos ou rios (TANG *et al.*, 2016).

Apesar dos processos de tratamento de resíduos descartados por seres humanos serem capazes de remover, de forma eficiente, uma ampla gama de microrganismos indesejáveis, o processo não é 100% eficaz. Dessa forma, muitos deles são lançados nos rios. Para identificação de possíveis contaminantes nos cursos d'água, são utilizados bioindicadores, entre eles coliformes fecais (*Escherichia coli*) e *Enterococci*. Entretanto, há críticas em relação à utilização destes parâmetros, uma vez que não há relação demonstrada entre a ocorrência deles e de vírus, cistos de protozoários ou outros patógenos bacterianos. Nesse contexto, os mais variados

métodos de genética molecular podem ser utilizados para o monitoramento de vírus e bactérias de interesse para a saúde pública (GIRONES *et al.*, 2010).

Os vírus apresentam sorotipos diferentes e, muitas vezes, uma espécie tem vários subtipos ou genotipos distintos, distribuindo-se de maneira heterogênea no ambiente. Vale ressaltar que, em determinadas regiões geográficas, existem quadros endêmicos para determinadas viroses, ou seja, os subtipos virais detectados não são, necessariamente, os mesmos responsáveis pelo desenvolvimento de quadros similares em outras regiões. Assim, pode não ser possível o estabelecimento de relação epidemiológica (KAWAI *et al.*, 2012). Além disso, há a possibilidade de recombinação genética, gerando novas estirpes, o que complica ainda mais a sua prevenção (SALAMA *et al.*, 2016).

As bactérias responsáveis por doenças em seres humanos também apresentam ampla distribuição geográfica, e, muitas vezes, algum sorogrupo ou genotipo é endêmico em uma região. Ainda, a resistência bacteriana a drogas antimicrobianas é uma realidade. Assim, além da disseminação de grupos específicos, é importante lembrar da possibilidade de transferência de marcadores de resistência entre amostras locais e daquelas introduzidas no ambiente por pessoas de diferentes origens.

Considerando o contexto apresentado e associando-o com os resultados originados deste estudo, parece adequado sugerir que seria desejável que locais públicos que recebem grande número de pessoas de diferentes regiões geográficas, como aeroportos e rodoviária, deveriam ter o seu próprio sistema de tratamento de efluentes, uma vez que, devido a essa diversidade populacional, podem carregar subtipos microbianos exógenos, virais ou bacterianos, além de genes associados à patogenicidade e resistência a drogas antimicrobianas.

As bactérias exógenas, ao serem introduzidas nas ETEs locais, podem sofrer recombinação genética com os microrganismos regionais e, considerando que os sistemas de tratamento de efluentes não são 100% eficazes, os organismos recombinantes podem ser dispersados na natureza. Já os diferentes subtipos virais podem passar ilesos pelos processos de tratamento de esgoto e serem disseminados no ambiente. Assim, um subtipo exógeno pode infectar, ao mesmo tempo que um

subtipo local, um hospedeiro e nele sofrer rearranjo genético originando uma nova estirpe viral. Ambas as situações contribuem para a manutenção de uma determinada doença emergente ou reemergente em uma região, bem como para o surgimento de novos quadros.

O tratamento *in situ* do esgoto sanitário em aeroportos e rodoviárias minimizaria os problemas relatados, pois, ao diminuir a carga de microrganismos exógenos que chegam às ETEs locais, haveria, conseqüentemente, uma maior efetividade na sua eliminação. Assim, os impactos e desdobramentos decorrentes da presença de microrganismos exógenos atingiria os menores níveis possíveis.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

As doenças infecciosas precisam ser encaradas como uma agressão a toda a sociedade. Quando um indivíduo adoece, os impactos desse acontecimento podem ter reflexos em todo o coletivo, inclusive, dependendo da situação, colocando em risco a própria existência humana ou o modelo político-econômico vivenciado.

Considerando a relevância das doenças diarreicas em todo o mundo, é necessário não apenas a ampliação de políticas voltadas para a vigilância ambiental, epidemiológica e sanitária, mas, também, a adoção de programas públicos que objetivem orientar a população, em especial, adotando hábitos que minimizem as chances de transmissão fecal-oral, via de infecção da enterite aguda. Por parte da população, é necessário aplicar tais conhecimentos e ter uma postura ativa frente a esses problemas.

Nesse contexto, o conceito de Saúde Única, associado às novas tecnologias de identificação microbiana, têm se mostrado fundamental na determinação de perigos microbiológicos de interesse público. O monitoramento ambiental da circulação de microrganismos é necessário para o controle de doenças e avaliação da terapêutica empregada na sua erradicação, pois, permite aos gestores de saúde pública, planejar as ações de prevenção da disseminação de doenças e buscar melhores formas de enfrentar os impactos decorrentes das doenças associadas a tais patógenos.

Aos laboratórios de microbiologia, direta ou indiretamente vinculados aos serviços de saúde e pesquisa, cabe continuar o monitoramento de tais microrganismos e investigar novas situações de risco. Por isso, a capacidade técnica, analítica, científica e tecnológica dos mesmos deve ser continuamente aprimorada, uma vez que a velocidade com que as mudanças ocorrem é enorme e a ciência evolui rapidamente. Para um resultado eficiente no combate a tais doenças, os desafios modernos precisam ser encarados e conceitos estáticos não podem reger o comportamento pessoal e profissional do ser humano.

7 CONCLUSÕES

Os dados gerados por esta investigação demonstram a grande diversidade microbiana presente no esgoto sanitário, inclusive no que se refere a microrganismos de relevância para a saúde pública. Nesse contexto, é fundamental o monitoramento constante desse ambiente. As ações de monitoramento associadas ao contexto de Saúde Única podem auxiliar na prevenção de doenças infecciosas, constituindo-se em importante ferramenta para subsidiar ações de políticas públicas que visem à proteção, à promoção e à recuperação da saúde coletiva.

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ALAM, M. M.; SHAUKAT, S.; SHARIF, S.; ANGEZ, M.; KHURSHID, A.; MALIK, F.; REHMAN, L.; ZAIDI, S. S. Z. Detection of Multiple Cocirculating Wild Poliovirus Type 1 Lineages Through Environmental Surveillance: Impact and Progress During 2011-2013 in Pakistan. **Journal of Infectious Diseases**, v.210, n.1, p.324-332, out. 2014.
2. ALLAN, K. J.; BIGGS, H. M.; HALLIDAY, J. E. B.; KAZWALA, R. R.; MARO, V. P. CLEAVELAND, S.; CRUMP, J. A. Epidemiology of Leptospirosis in Africa: A Systematic Review of a Neglected Zoonosis and a Paradigm for 'One Health' in Africa. **Plos Neglected Tropical Disease**, v.9, n.9, p.1-26, set. 2015.
3. AMANN, R. I.; BINDER, B. J.; OLSON, R. J.; CHISHOLM, S. W.; DEVEREUX, R.; STAHL, D.A. Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations. **Applied and Environmental Microbiology**, v.56, n.06, p.1919-1925, jun. 1990.
4. AMOS, G. C. A.; ZHANG, L.; HAWKEY, P. M.; GAZE, W. H.; WELLINGTON, E. M. Functional metagenomic analysis reveals rivers are a reservoir for diverse antibiotic resistance genes. **Veterinary Microbiology**, v.171, n.3-4, p.441-447, jul. 2014.
5. AMOROSO, L.; BARALDI-ARTONI, S. M.; SOARES, N. M.; PINTO, F. R.; PACHECO, M. R.; SAGULA, A. L.; ALVA, J. C. R.; AMOROSO, P. Influência da qualidade microbiológica da água de dessedentação na morfologia intestinal de frangos de corte. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.35, n.1, p.80-88, jan. 2015.
6. APHA, AWWA, WPCF. **Standard methods for the examination of water and wastewater. 18th**. Washington, DC: APHA, 1992.
7. APPRILL, A.; MCNALLY, S.; PARSONS, R.; WEBER, L. Minor revision to V4 region SSU rRNA 806R gene primer greatly increases detection of SAR11 bacterioplankton. **Aquatic Microbiological Ecology**, v.75, n.2, p.129-137, jun. 2015.
8. BACKES, M. T. S.; ROSA, L. M.; FERNANDES, G. C. M.; BECKER, S. G.; MEIRELLES, B. H. S.; SANTOS, S. M. A. Concepts of Health/Disease Along History Under the Light of Epidemiology and Anthropology. **Revista de Enfermagem da Uerj**, v.17, n.1, p.111-117, jan. 2009.

9. BARCELLOS, C.; QUITÉRIO, L. A. D. Vigilância ambiental em saúde e sua implantação no Sistema Único de Saúde. **Revista de Saúde Pública**, v.40, n.1, p.170-177, fev. 2006.
10. BH-AIRPORT (Org.). **Aeroporto Internacional de Belo Horizonte**. Disponível em: <<http://www.bh-airport.com.br/br/p/48/projeto-de-expansao.aspx>>. Acesso em: 07 set. 2015.
11. BHATTACHARYA, S. K *et al.* 5 year efficacy of a bivalent killed whole-cell oral cholera vaccine in Kolkata, India: a cluster-randomised, double-blind, placebo-controlled trial. **The Lancet Infectious Diseases**, v.13, n.12, p.1050-1056, dez. 2013.
12. BINNEWIES, T. T.; MOTRO, Y.; HALLIN, P. F.; LUND, O.; DUNN, D.; TOM L. A.; HAMPSON, D. J.; BELLGARD, M.; WASSENAAR, T. M.; USSERY, D. W. Ten years of bacterial genome sequencing: comparative-genomics-based discoveries. **Functional & Integrative Genomics**, v.6, n.3, p.165-185, maio 2006.
13. BONETTA, S.; PIGNATA, C.; LORENZI, E.; DE CEGLIA, M.; MEUCCI, L.; BONETTA, S.; GILLI, G.; CARRARO, E. Detection of pathogenic *Campylobacter*, *E. coli* O157: H7 and *Salmonella* spp. in wastewater by PCR assay. **Environmental Science and Pollution Research**, v.23, n.15, p.15302-15309, abr. 2016.
14. BOSCH, A. Human enteric viruses in the water environment: a minireview. **International Microbiology**, v.1, n.3, p.191-198, set. 1998.
15. BOTES, M; KWAADSTENIET, M; CLOETE, T. E. Application of quantitative PCR for the detection of microorganisms in water. **Anal Bioanal Chem**, v.405, n.1, p.91-108, set. 2012.
16. BRASIL. PREFEITURA MUNICIPAL DE BELO HORIZONTE. (Org.). **Rodoviária de Belo Horizonte**. 2015. Disponível em: <<http://rodoviariaonline.com.br/rodoviaria/belo-horizonte/>>. Acesso em: 02 ago. 2015.
17. BRASIL. INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. (Org.). **POPULAÇÃO DAS REGIÕES METROPOLITANAS**. 2014. Disponível em:

<<http://saladeimprensa.ibge.gov.br/noticias?view=noticia&id=1&busca=1&idnoticia=2704>>. Acesso em: 02 ago. 2015.

18. BRASIL. Portaria nº 2914, de 12 de dezembro de 2011. **Dispõe Sobre Os Procedimentos de Controle e de Vigilância da Qualidade da Água Para Consumo Humano e Seu Padrão de Potabilidade.** Brasília, DF.
19. BRASIL. Lei nº 8080, de 19 de setembro de 1990. **Dispõe Sobre As Condições Para A Promoção, Proteção e Recuperação da Saúde, A Organização e O Funcionamento dos Serviços Correspondentes e Dá Outras Providências.** Brasília, DF.
20. BRASIL. Instrução Normativa nº 1, de 7 de março de 2005. **Regulamenta a Portaria GM/MS nº 1.172/04, no que se refere às competências da União, estados, municípios e Distrito Federal na área de vigilância em saúde ambiental.** Brasília, DF.
21. BRASIL. Decreto Legislativo nº 395, de 2009. **Regulamento Sanitário Internacional.**
22. BROOK, I. **Anaerobic Infections Diagnosis and Management.** London: Informa Health Care, 2008. 430 p.
23. BRUIJN, F. (Org.). **Handbook of Molecular Microbial Ecology I: Metagenomics and Complementary Approaches.** Wiley & Sons Blackwell, 2011. 800 p.
24. BUCK, R. (Ed.). **PCR Collection: The American Association for The Advancement Of Science,** 2007. 31 p.
25. BULLEID, A. The microbe hunters: section of odontology. **Proceedings of the Royal Society of Medicine,** v.47, n.01, p.37-40, jan. 1954.
26. BURA, M.; MICHALAK, M.; CHOJNICKI, M. K.; KOWALA-PIASKOWSKA, A.; MOZER-LISEWSKA, I. Viral Hepatitis A in 108 Adult Patients During an Eight-Year Observation in a Single Center in Poland. **Advances in Clinical and Experimental Medicine,** v.24, n.05, p.829-836, 2015.

27. CAI, L.; JU, F.; ZHANG, T. Tracking human sewage microbiome in a municipal wastewater treatment plant. **Applied Microbiology Biotechnology**, v.98, n.7, p.3317-3326, dez. 2013.
28. CARDOSO, A. M.; COUTINHO, F. H. S.; IGNACIO, C. B.; VIEIRA, B. L.; SALLÔTO, R. P.; CLEMENTINO, G. R. B.; ALBANO, M. B. M.; PARANHOS, R. M.; MARTINS, R.; BONIFÁCIO, O. Metagenomics in polluted aquatic environments. In: BALKIS, N. (Org). Water Pollution. Rijeka: InTech, 2012. p. 89-104.
29. CHANDRA, A.; IDRISOVA, A. Convention on Biological Diversity: a review of national challenges and opportunities for implementation. **Biodiversity and Conservation**, v.20, n.14, p.3295-3316, set. 2011.
30. CDC. **Viral Hepatitis Surveillance United States, 2014**. Atlanta: CDC, 2014. 66 p. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/hepatitis/statistics/2014surveillance/pdfs/2014hepsurveillan cerpt.pdf>>. Acesso em: 06 dez. 2016.
31. CENTER DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **Diarrhea: Common Illness, Global Killer**. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/healthywater/global/diarrhea-burden.html>>. Acesso em: 25 abr. 2016.
32. CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **About One Health**. 2016. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/onehealth/about.html>>. Acesso em: 10 out. 2016.
33. CENTER DISEASE CONTROL AND PREVENTION (Org.). **Campylobacter - Technical Information**. 2014. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/foodsafety/diseases/campylobacter/technical.html>>. Acesso em: 22 jun. 2016.
34. CENTER DISEASE CONTROL AND PREVENTION (Org.). **Diarrheagenic E. coli**. 2016. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/ecoli/diarrheagenic-ecoli.html>>. Acesso em: 23 jun. 2016.
35. CENTER DISEASE CONTROL AND PREVENTION (Org.). **Leptospirosis: Signs and Symptoms**. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/leptospirosis/symptoms/index.html>>. Acesso em: 24 jun. 2016.

36. CENTRO DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA (Org.). Cólera: Normas e Instruções. São Paulo: CVE, 2002. 47 p. Disponível em: <ftp://ftp.cve.saude.sp.gov.br/doc_tec/hidrica/dta_manual_colera.pdf>. Acesso em: 27 jun. 2016.
37. CHANG, W.; YEN, C.; CHI, C.; WU, F.; HUANG, Y.; LIN, J.; HUANG, F.; TATE, J. E.; WU, H.; HSIUNG, C. A. Cost-effectiveness of rotavirus vaccination programs in Taiwan. **Vaccine**, v.31, n.46, p.5458-5465, nov. 2013.
38. CHAO, Y.; MA, L.; YANG, Y.; JU, F.; ZHANG, X.; WU, W.; ZHANG, T. Metagenomic analysis reveals significant changes of microbial compositions and protective functions during drinking water treatment. **Scientific Reports**, v.3, p.1-9, 19 dez. 2013.
39. CHEN, P.; TSAI, P.; CHEN, C.; CHUAN LU, Y.; CHEN, H.; LEE, N.; LEE, C.; LI, C.; LI M.; WU, C.; KO, W. Aeromonas stool isolates from individuals with or without diarrhea in southern Taiwan: Predominance of Aeromonas veronii. **Journal of Microbiology, Immunology and Infection**, v.48, n.6, p.618-624, dez. 2015.
40. CHO, I.; BLASER, M. J. The human microbiome: at the interface of health and disease. **Nature Reviews Genetic**, v.13, n.04, p.260-270, mar. 2012
41. COLLADO, L.; FIGUERAS, M. J. Taxonomy, Epidemiology, and Clinical Relevance of the Genus Arcobacter. **Clinical Microbiology Reviews**, v.24, n.1, p.174-192, jan. 2011.
42. CAPORASO, J. G.; LAUBER, C. L.; WALTERS, A. W.; BERG-LYONS D.; HUNTLEY, J.; FIERER, N.; OWENS, S. M.; BETLEY, J.; FRASER, L.; BAUER, M.; GORMLEY, N.; GILBERT, J. A.; SMITH, G.; KNIGHT, R. Ultra-high-throughput microbial community analysis on the Illumina HiSeq and MiSeq platforms. **The Isme Journal**, v.6, n.8, p.1621-1624, mar. 2012.
43. COORDENADORIA DE CONTROLE DE DOENÇAS. **CADERNO DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA EM SAÚDE AMBIENTAL: CADERNO DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA E M S A Ú D E A M B I E N T A L**. 1ª ed. São Paulo: Doenças Ocasionadas Pelo Meio Ambiente, 2013. 154 p. Disponível em:

<ftp://ftp.cve.saude.sp.gov.br/doc_tec/DOMA/doma13_caderno_ambiental.pdf>.

Acesso em: 10 abr. 2016.

44. CORDEY, S.; DIEM-LAN VU.; SCHIBLER, V.; KAISER, L. Astrovirus MLB2, a New Gastroenteric Virus Associated with Meningitis and Disseminated Infection. **Emerging Infection Disease**, v.22, n.5, p.846-853, maio 2016.
45. COSTA, F.; HAGAN, J. E.; CALCAGNO, J.; KANE, M.; TORGERSON, P.; MARTINEZ-SILVEIRA, M. S.; STEIN, C.; ABELA-RIDDER, B.; KO, A. I. Global Morbidity and Mortality of Leptospirosis: A Systematic Review. **Plos Neglected Tropical Disease**, v.9, n.9, p.1-20, set. 2015.
46. CROM, S. C. M.; ROSSEN, J. W. A.; VAN FURTH, A. M.; OBIHARA, C. C. Enterovirus and parechovirus infection in children: a brief overview. **European Journal of Pediatrics**, v.175, n.8, p.1023-1029, maio 2016.
47. DE LEON, R.; SHIEH C.; BARIC, R. S.; SOBSEY, M. D. Detection of enteroviruses and hepatitis A virus in environmental samples by gene probes and polymerase chain reaction. In *Advances in water analysis and treatment. Proceedings of the Water Quality Technology Conference*, p. 833-853, 1990.
48. DERROUGH, T.; SALEKEEN, A. Lessons learnt to keep Europe polio-free: a review of outbreaks in the European Union, European Economic Area, and candidate countries, 1973 to 2013. **Eurosurveillance**, v.21, n.16, p.1-9, abr. 2016.
49. EMILIANO, J. P.; ANDRÉ, M. C. D. B. Review: Markers of Potability, Sanitation Basic and Costs of Treatment and Microbiological Monitoring of Water for Human Consumption in Brazil. **Water Quality, Exposure and Health**, v.4, n.4, p.217-228, nov. 2012.
50. FERNÁNDEZ, M. B.; TORRES, C.; RIVIELLO-LÓPEZ, G.; POMA, H. R.; RAJA, V. B.; NATES, S.; CISTERNA, D. M.; CAMPOS, R. H.; MBAYED, V. A. Analysis of the circulation of hepatitis A virus in Argentina since vaccine introduction. **Clinical Microbiology and Infection**, v.18, n.12, p.548-551, dez. 2012.
51. FIGUERAS, M.J.; LEVICAN, A.; PUJOL, I.; Ballester, F.; Quilez, M. J. R.; Gomez-Bertomeu, F. A severe case of persistent diarrhoea associated with *Arcobacter*

- cryaerophilus but attributed to *Campylobacter* sp. and a review of the clinical incidence of *Arcobacter* spp. **New Microbes and New Infections**, v.2, n.2, p.31-37, mar. 2014.
52. FINLAY, B. J.; MABERLY, S. C.; COOPER, J. I. Microbial Diversity and Ecosystem Function. **Oikos**, v.80, n.2, p.209-213, nov. 1997.
53. FONGARO, G.; VIANCELLI, A.; MAGRI, M.E.; ELMAHDY, E.M.; BIESUS, L.L.; KICH, J.D.; KUNZ, A.; BARARDI, C.R.M. Utility of specific biomarkers to assess safety of swine manure for biofertilizing purposes. **Science of the Total environment**, v.479-480, p.277-283, maio 2014.
54. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **Bacteriological Analytical Manual (BAM)**. 2015. Disponível em: <<http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm2006949.htm>>. Acesso em: 15 dez. 2016.
55. FREDRICKS, D. Microbial ecology of human skin in health and disease. **Society for Investigative Dermatology**, v.06, n.03, p.167-169, dez. 2001.
56. FUNED, 2011. **Manual de Coleta de Amostras**. Disponível em: <www.funed.mg.gov.br>. Acesso em: 20 nov. 2015.
57. FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE. **Vigilância Ambiental em Saúde**. Brasília: Assessoria de Comunicação e Educação em Saúde - Ascom/pre/ Funasa, 2002. 46 p.
58. GARIBYAN, L.; AVASHIA, N. Polymerase Chain Reaction. **Journal of Investigative Dermatology**, v.133, n.3, p.1-4, mar. 2013.
59. GIBBS, E. P. The evolution of One Health: a decade of progress and challenges for the future. **Veterinary Record**, v.174, n.4, p.85-91, jan. 2014.
60. GIRONES, R.; FERRÈS, M. A.; ALONSO, J. L.; RODRIGUEZ-MANZANO, J.; CALGUA, B.; CORRÊA, A. A.; HUNDESA, A.; CARRATALA, A.; BOFILL-MAS, S. Molecular detection of pathogens in water – The pros and cons of molecular techniques. **Water Research**, v.44, n.15, p.4325-4339, ago. 2010.
61. GLEICK, H. P. WATER IN CRISIS: PATHS TO SUSTAINABLE WATER USE. **Ecological Society of America**, v.8, n.3, p.571-579, aug.1998.

62. GÖLZ, G.; ALTER, T.; BERESWILL, S.; HEIMESAAT, M. M. The Immunopathogenic Potential of *Arcobacter butzleri* – Lessons from a Meta-Analysis of Murine Infection Studies. **Plos One**, v.11, n.7, p.1-19, jul. 2016.
63. GOMES, I. C.; MAGALY, M. L.; DAMACENA, M. C. S. EPIDEMIOLOGIA DAS DOENÇAS DIARREICAS AGUDAS NO CARIRI – CE. **Revista Interfaces: Saúde, Humanas e Tecnologia**, v.2, n.2, p.1-5, jun. 2014.
64. GRIFFITH, F. The Significance of Pneumococcal Types. **The Journal Of Hygiene**, v.27, n.2, p.113-159, jan. 1928.
65. GUPTA, V.; GULATI, P.; BHAGAT, N.; DHAR, M. S.; VIRDI, J. S. Detection of *Yersinia enterocolitica* in food: an overview. **Europe Journal of Clinical Microbiology Infectious Disease**, v.34, n.4, p.641-650, nov. 2014.
66. GURGEL, R. Q.; ILOZUE, C.; CORREIA, J. B. CENTENARI, C.; OLIVEIRA, S. M.T.; CUEVAS, L. E. Impact of rotavirus vaccination on diarrhoea mortality and hospital admissions in Brazil. **Tropical Medicine & International Health**, v.16, n.9, p.1180-1184, jul. 2011.
67. GUO, F.; ZHANG, T. Biases during DNA extraction of activated sludge samples revealed by high throughput sequencing. **Applied Microbiology Biotechnology**, v.97, n.10, p.4607-4616, jul. 2012.
68. HAKIM, M. S.; WANG, W.; BRAMER, W.; GENG, J.; HUANG, F.; MAN, R.; Peppelenbosch, M. P.; PAN, Q. The global burden of hepatitis E outbreaks: a systematic review. **Liver International**, p.1-13, set. 2016.
69. HANDELSMAN, J. Metagenomics: application of genomics to uncultured microorganisms. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v.68, n.4, p.669-685, dez. 2004.
70. HARRIS, J. C. Fecal Leukocytes in Diarrheal Illness. **Annals of Internal Medicine**, v.76, n.5, p.697-703, maio 1972.
71. HARTL, J.; WEHMEYER, M.; PISCHKE, S. Acute Hepatitis E: Two Sides of the Same Coin. **Viruses**, v.8, n.11, p.1-15, nov. 2016.

72. HE, H.; TANG, C.; CHEN, X.; YUE, H.; REN, Y.; LIU, Y.; ZHANG, B. Isolation and characterization of a new enterovirus F in yak feces in the Qinghai-Tibetan Plateau. **Archives of Virology**, p.1-5, 25 out. 2016.
73. HEIMAN, Mark L.; GREENWAY, Frank L. A healthy gastrointestinal microbiome is dependent on dietary diversity. **Molecular Metabolism**, v.5, n.5, p.317-320, maio 2016.
74. HEIMESAAT, M. M.; KARADAS, G.; ALUTIS, M.; FISCHER, A.; . KÜHL, A. A.; BREITHAUPT, A.; GÖBEL, U. B.; ALTER, T.; BERESWILL, S.; GÖLZ, G. Survey of small intestinal and systemic immune responses following murine *Arcobacter butzleri* infection. **Gut Pathogens**, v.7, n.1, p.1-11, out. 2015.
75. HELLMER, M.; PAXEUS, N.; MAGNIUS, L.; ENACHE, L.; ARNHOLM, B.; JOHANSSON, A.; BERGSTRÖM, T.; NORDER, H. Detection of Pathogenic Viruses in Sewage Provided Early Warnings of Hepatitis A Virus and Norovirus Outbreaks. **Applied and Environmental Microbiology**, v.80, n.21, p.6771-6781, ago. 2014.
76. HERNROTH, B.E.; CONDEN-HANSSON, A.C.; REHNSTAM-HOLM, A.S.; GIRONES, R.; ALLARD, A. K. Environmental factors influencing human viral pathogens and their potential indicator organisms in the blue mussel, *Mytilus edulis*: the first Scandinavian report. **Applied and Environmental Microbiology**, v.68, p.4523-4533, 2002
77. HUTTENHOWER, C.; *et al.* Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. **Nature**, v.486, n.7402, p.207-214, jun. 2012.
78. IGBINOSA, I. H.; IGUMBOR, E. U.; AGHDASI, F. TOM, M.; OKOH, A. I. Emerging *Aeromonas* Species Infections and Their Significance in Public Health. **The Scientific World Journal**, v.2012, p.1-13, 2012.
79. INFRAERO (org.). **Aeroporto de Belo Horizonte/Pampulha-MG: Carlos Drummond de Andrade, anuário 2014.** Disponível em: <http://www.infraero.gov.br/images/stories/Estatistica/anuario/anuario_2014.pdf> . Acesso em: 25 fev. 2016.
80. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (Comp.). **ESTIMATIVAS DA POPULAÇÃO DOS MUNICÍPIOS BRASILEIROS COM DATA DE REFERÊNCIA**

- EM 1º DE JULHO DE 2014.** Brasília: IBGE, 2014. 18 p. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/pdf/analise_estimativas_2014.pdf>. Acesso em: 07 set. 2015.
81. IVANOVA, E.p. et al. Characterization of Aeromonas and Vibrio species isolated from a drinking water reservoir. **Journal Applied Microbiology**, v.90, n.6, p.919-927, jun. 2001.
82. JANDA, J. M.; ABBOTT, S. L. The Genus Aeromonas: Taxonomy, Pathogenicity, and Infection. **Clinical Microbiology Reviews**, v.23, n.1, p.35-73, jan. 2010.
83. JAYARAM, H.; ESTES, M. K.; PRASAD, B.; VENKATARAM, V. Emerging themes in rotavirus cell entry, genome organization, transcription and replication. **Virus Research**, v.101, n.1, p.67-81, abr. 2004.
84. JEONG, H. S.; JEONG, A.; CHEON, D. Epidemiology of astrovirus infection in children. **Korean Journal Pediatrics**, v.55, n.3, p.77-84, jan. 2012.
85. JOTHIKUMAR, N.; CROMEANS, T. L.; SOBSEY, M. D. ROBERTINSON, B.H. Development and Evaluation of a Broadly Reactive TaqMan Assay for Rapid Detection of Hepatitis A Virus. **Applied and Environmental Microbiology**, v.71, n.6, p.3359-3363, jun. 2005.
86. JOTHIKUMAR, N.; CROMEANS, T. L.; ROBERTSON, B. H. MENG, X. J.; HILL, V. R. A broadly reactive one-step real-time RT-PCR assay for rapid and sensitive detection of hepatitis E virus. **Journal of Virological Methods**, v.131, n.1, p.65-71, jan. 2006.
87. JU, F.; GUO, F.; YE, L.; XIA, Y.; ZHANG, T. Metagenomic analysis on seasonal microbial variations of activated sludge from a full-scale wastewater treatment plant over 4 years. **Environmental Microbiology Reports**, v.6, n.1, p.80-89, fev. 2014.
88. KAAKOUSH, N. O.; CASTAÑO-RODRÍGUEZ, N.; MITCHELL, H. M.; MITCHELL, H. M.; MAN S. M. Global Epidemiology of Campylobacter Infection. **Clinical Microbiology Reviews**, v.28, n.3, p.687-720, jun. 2015.

89. KAEVSKA, Marija; VIDENSKA, Petra; VASICKOVA, Petra. Changes in Microbial Composition of Wastewater During Treatment in a Full-Scale Plant. **Current Microbiology**, v.72, n.2, p.128-132, out. 2015.
90. KANYENDA, T. J.; ABDULLAHI, L. H.; HUSSEY, G. D.; KAGINA, B. Epidemiology of hepatitis A virus in Africa among persons aged 1–10 years: a systematic review protocol. **Systematic Reviews**, v.4, n.1, p.1-8, set. 2015.
91. KAWAI, K. O'BRIEN, M. A.; GOVEIA, M. G.; MAST, T. C.; EL KHOURY, A. C. Burden of rotavirus gastroenteritis and distribution of rotavirus strains in Asia: A systematic review. **Vaccine**, v.30, n.7, p.1244-1254, fev. 2012.
92. KHUROO, M. S; KHUROO, M. S; KHUROO, N. S. Hepatitis E: Discovery, global impact, control and cure. **World Journal of Gastroenterology**, v.22, n.31, p.7030-7045, ago. 2016.
93. KILONZO-NTHENGE, A.; ROTICH, E.; NAHASHON, S. N. Evaluation of drug-resistant Enterobacteriaceae in retail poultry and beef. **Poultry Science**, v.92, n.4, p.1098-1107, abr. 2013.
94. KOPROWSKI, H.; OLDSTONE, M. Microbe Hunters- Ten and Now: Book Review. **Nature Publishing Group**, v.03, n.02, p.241-241, fev. 1997.
95. KORNBERG, A. Biologic Synthesis of Deoxyribonucleic Acid. **Science**, v.131, n.3412, p.1503-1508, maio 1960.
96. KUMAR, H. Multiple Antibiotic Resistance Patterns of the Enterobacteriaceae in the Untreated Municipal Sewage. **Journal of Clinical and Diagnostic Research**, p.1-2, set. 2016.
97. LA, RUSAK.; REIS, C. M.; BARBOSA, A. V.; SANTOS, A. F.; PAIXÃO, R.; HOFER, E.; VALLIM, D. C.; ASENSI, M. D. Phenotypic and genotypic analysis of bio-serotypes of *Yersinia enterocolitica* from various sources in Brazil. **The Journal of Infection in Developing Countries**, v.08, n.12, p.1533-1540, ago. 2014.
98. LANE, D. J.; PACE, B.; OLSEN, G. J.; STAHL, D. A.; SOGIN, M. L.; PACE, N. R. Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analyses.

Proceedings of the National Academy of Sciences, v.82, n.20, p.6955-6959, out. 1985.

99. LAINSON, Z. C. L.; ABDON, N. P.; PARDAUIL, C. R. B.; PAES A. L. V.; QUEIROZ, B. H. S. CÓLERA. IN: LEÃO, R. N. Q.; BICHARA, C. N. C.; MIRANDA; E. C. B. M.; CARNEIRO, I. C. R. S, OLIVEIRA, M. R. F.; ABDON, N. P.; VASCONCELOS, P. F. C.; SILVA, B. M.; PAES, A. L. V.; MARSOLA, L. R. (ORG.). *Doenças infecciosas e parasitárias enfoque amazônico*. Belém: Cejup, UEPA, **Instituto Evandro Chagas**, 1997. p.449-468.
100. LAZAREVIC, V.; WHITESON, K.; HUSE, S.; HERNANDEZ, D.; FARINELLI, L.; OSTERAS, M.; SCHERENZEL, J.; FRANÇOIS, P. Metagenomic study of the oral microbiota by Illumina high-throughput sequencing. **Journal of Microbiological Methods**, v.79, n.3, p.266-271, dez. 2009.
101. LEAL BERNARDES, A. F.; DIAS, R. S. Doença Transmitida por Alimentos Causada por Múltiplos Agentes. Relato de Caso. **Periódico Científico do Núcleo de Biociências**, v.4, n.7, p.7-10, jun. 2014.
102. LIU, J.; LI, J.; TAO, Y.; SELLAMUTHU, B.; WALSH R. Analysis of bacterial, fungal and archaeal populations from a municipal wastewater treatment plant developing an innovative aerobic granular sludge process. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.33, n.1, p.1-16, nov. 2016.
103. LLOYD, R. Enterovirus Control of Translation and RNA Granule Stress Responses. **Viruses**, v.8, n.4, p.93-106, mar. 2016.
104. LLOYD-PRICE, J.; ABU-ALI, G.; HUTTENHOWER, C. The healthy human microbiome. **Genome Medicine**, v.8, n.1, p.1-11, abr. 2016.
105. LI, F.; WANG, W.; ZHU, Z.; CHEN, A.; DU, P.; WANG, R.; CHEN, H.; HU, Y.; LI, J.; KAN, B.; WANG, D. Distribution, virulence-associated genes and antimicrobial resistance of *Aeromonas* isolates from diarrheal patients and water, China. **Journal of Infection**, v.70, n.6, p.600-608, jun. 2015.
106. LOZUPONE, C. A.; STOMBAUGH, J. I.; GORDON, J. I.; JANSSON, J. K.; KNIGHT, R. Diversity, stability and resilience of the human gut microbiota. **Nature**, v.489, n.13, p.220-230, set. 2012.

107. LUNDGREN, O.; SVENSSON, L. Pathogenesis of Rotavirus diarrhea. **Microbes and Infection**, Si, v. 3, n. 13, p.1145-1156, nov. 2001.
108. LUSK, B. G.; PARAMESWARAN, P; POPAT, S. C.; RITTMANN, B. E.; TORRES, C. The effect of pH and buffer concentration on anode biofilms of *Thermincola ferriacetica*. **Bioelectrochemistry**, v.112, p.47-52, dez. 2016.
109. MA, J.; WANG, Z.; LI, H.; PARK, HD.; WU, Z. Metagenomes reveal microbial structures, functional potentials, and biofouling-related genes in a membrane bioreactor. *Applied Microbiology Biotechnology*, v.100, n.11, p.5109-5121, jan. 2016.
110. MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; BENDER, K. S; BUCKLEY, D. H.; STAHL, D. A. **Brock Biology of Microorganisms**. 14. ed. London: Pearson, 2014. 1041 p.
111. MAGRI, M. E.; FIDJELAND, J.; JÖNSSON, H.; ALBIHN, A.; VINNERÅS, B. Inactivation of adenovirus, reovirus and bacteriophages in fecal sludge by pH and ammonia. **Science of the Total Environment**, v.520, p.213-221, jul. 2015.
112. MARDIS, E. R. Next-Generation DNA Sequencing Methods. **Annual Review of Genomics and Human Genetics**, v.9, n.1, p.387-402, set. 2008.
113. MCMURDIE, Paul J.; HOLMES, Susan. Phyloseq: An R Package for Reproducible Interactive Analysis and Graphics of Microbiome Census Data. **Plos One**, v.8, n.4, p.e61217, abr. 2013.
114. MILLER, R.; MONTOYA, V.; GARDY, J. L.; PATRICK, D. M.; TANG, P. Metagenomics for pathogen detection in public health. **Genome Medicine**, v.5, n.9, p.1-14, 2013.
115. MINAS GERAIS. Assembleia Legislativa. Lei nº 15.474, de 28 de janeiro de 2005. **Altera a Lei Nº 13.317, de 24 de setembro de 1999, que Contém o Código de Saúde do Estado de Minas Gerais, Cria Gratificação de Função, Institui Prêmio de Produtividade e Dá Outras Providências**. Belo Horizonte, MG.
116. MINAS GERAIS. Deliberação Normativa Conjunta nº 01, de 05 de maio de 2008. **Deliberação Normativa Conjunta Copam/cerh-mg Nº 01, de 05 de maio**

de 2008.: Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências. Disponível em: <<http://www.siam.mg.gov.br/sla/download.pdf?idNorma=8151>>. Acesso em: 03 jan. 2017.

117. MIURA, T.; LHOMME, S.; SAUX, J.; LE MEHAUTE, P.; GUILLOIS, Y.; COUTURIER, ELIZABETH.; IZOPET, J.; ABRANAVAL, F.; GUYADER, F. S. Detection of Hepatitis E Virus in Sewage After an Outbreak on a French Island. **Food and Environmental Virology**, v.8, n.3, p.194-199, maio 2016.
118. MONTE, M. H.; ALBUQUERQUE, A. **Reutilização de Águas Residuais**. Lisboa: Entidade Reguladora dos Serviços de Águas e Resíduos, 2010. 317 p.
119. MOTAMEDIFAR, M.; AMINI, E.; SHIRAZI, TALEZADEH. Frequency of Rotavirus and Adenovirus Gastroenteritis among Children in Shiraz, Iran. **Iranian Red Crescent Medical Journal**, v.15, n.8, p.729-733, ago. 2013.
120. MOTAYO, B. O.; ADENIJI, A. J.; FANEYE, A. O. FIRST MOLECULAR DETECTION AND VP7 (G) GENOTYPING OF GROUP A ROTAVIRUS BY SEMI-NESTED RT-PCR FROM SEWAGE IN NIGERIA. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.58, p.1-6, 2016.
121. MUNNINK, B.; HOEK, L. Viruses Causing Gastroenteritis: The Known, The New and Those Beyond. **Viruses**, v.8, n.2, p.42-62, 8 fev. 2016.
122. MULLER, E. C. A.; MORAIS, M. A. A.; GABBAY, Y. B.; LINHARES A. C. Ocorrência de adenovirus em crianças com gastroenterite aguda grave na Cidade de Belém, Pará, Brasil. **Revista Pan-amazônica de Saúde**, v.1, n.3, p.49-55, set. 2010.
123. MULLIS, K. B. The unusual origin of the polymerase chain reaction. **Scientific American**, v.262, n.4, p.56-65, abr. 1990.
124. ONG, K. L.; GOULD, L. H.; CHEN, D. L.; JONES, F. T.; SCHEFTEL, J.; WEBB, T. H.; MODY, R. K.; MAHON, B. E. Changing Epidemiology of Yersinia enterocolitica Infections: Markedly Decreased Rates in Young Black Children,

- Foodborne Diseases Active Surveillance Network (FoodNet), 1996-2009. **Clinical Infectious Diseases**, v. 54, n. 5, p.385-390, maio 2012.
125. OPLUSTIL, C. A.; ZOCCOLI, C. M.; TOBOUTI, N. R. SINTO, N. R. Procedimentos básicos em microbiologia clínica. 2. ed. São Paulo: Sarvier, 2004.
126. PEREIRA, E. L. F.; GONÇALVES, S. C. Hepatite A. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.3, n.36, p.387-400, maio 2003.
127. PATYAL, A.; RATHORE, R. S.; MOHAN, H. V. Dhama, K.; Kumar, A. Prevalence of Arcobacter spp. in Humans, Animals and Foods of Animal Origin Including Sea Food from India. **Transboundary and Emerging Diseases**, v.58, n.5, p.402-410, abr. 2011.
128. PÉREZ-GRACIA, M. T.; SUAY, B.; MATEOS-LINDEMANN, M. L. Hepatitis E: An emerging disease. **Infection, Genetics and Evolution**, v.22, p.40-59, mar. 2014.
129. PIERCE, B. A. **Genética: Um Enfoque Conceitual**. New York: Guanabara Koogan S.A., 2003. 758 p.
130. PRADO, T.; MIAGOSTOVICH, M. P. Virologia ambiental e saneamento no Brasil: uma revisão narrativa. **Cadernos de Saúde Pública**, v.30, n.7, p.1367-1378, jul. 2014.
131. PREDIGER, K. C.; PEREIRA, R. S.; WINCKLER N. C. H. P.; SANTOS, R. C. V.; FADEL-PICHETH, C. M. T.; VIZZOTTO, B. S. A prospective study on Aeromonas in outpatients with diarrhea in the central region of Rio Grande do Sul State. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.43, n.3, p.966-968, set. 2012.
132. Prefeitura de Belo Horizonte (Org.). **RODOVIÁRIA APRESENTAÇÃO**. Disponível em: <http://portalpbh.pbh.gov.br/pbh/ecp/comunidade.do?evento=portlet&pIdPlc=ecpTaxonomiaMenuPortal&app=rodoviaria&lang=pt_BR&pg=5720&tax=8206>. Acesso em: 07 set. 2015.
133. R Core Team (2014). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL: <http://www.R-project.org/>.

134. RAO, D. C.; REDDY, H.; SUDHEENDRA, K.; RAGHAVENDRA, A.; VARADHARAJ, V.; EDULA, S.; GOPARAJU, R.; RATNAKAR, BHARATH.; RAO, A. S. R. S.; MAIYA, P.; BABU, M. A. Non-polio enterovirus association with persistent diarrhea in children as revealed by a follow-up study of an Indian cohort during the first two years of life. **Journal of Clinical Virology**, v.61, n.1, p.125-131, set. 2014.
135. REIS, T. A.; ASSIS, A. S. F.; VALLE, D. A.; BARLETTA, V. H.; CARVALHO, I. P.; ROSE, T. L.; PORTES, S. A. R.; LEITE, J. P. G.; SILVA, M. L. R. The role of human adenoviruses type 41 in acute diarrheal disease in Minas Gerais after rotavirus vaccination. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.47, n.1, p.243-250, jan. 2016.
136. RIESENFELD, C. S.; SCHLOSS, P. D.; HANDELSMAN, J. Metagenomics: genomic analysis of microbial communities. **Annual Review of Genetics**, v.38, n.1, p.525-552, dez. 2004.
137. RONAGHI, M. DNA sequencing: a sequencing method based on real-time pyrophosphate. **Science**, v.281, n.5375, p.363-365, jul. 1998.
138. RUGGERI, F. M.; BONOMO, P.; IANIRO, G.; BATTISTONE A.; DELOGU, R.; GERMINARIO, C.; CHIRONNA, M.; TRIASS, M.; CAMPAGNUOLO, R.; CICALA, A.; GIAMMANCO, G. M.; CASTIGLIA, P.; SERRA, C.; GAGGIOLI, A.; FIORE, L. ROTAVIRUS. Genotypes in Sewage Treatment Plants and in Children Hospitalized with Acute Diarrhea in Italy in 2010 and 2011. **Applied and Environmental Microbiology**, v.81, n.1, p.241-249, out. 2014.
139. SALAMA, M.; AMITAI, Z.; AMIR, N.; GOTTESMAN-YEKUTIELI, T.; SHERBANY, H.; DRORI, Y.; MENDELSOND, E.; CARMELI, Y.; ATANELLE, M. M. Outbreak of adenovirus type 55 infection in Israel. **Journal of Clinical Virology**, v.78, p.31-35, maio 2016.
140. SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.74, n.12, p.5463-5467, 1977.

141. SARTORI, A. C.; SOÁREZ, P. C.; NOVAES, H. M. D.; AMAKUC, M.; AZEVEDO, R. S.; MOREIRAE, R. C.; PEREIRA, L. M. M. B.; XIMENES, R. A. A.; MARTELLI, C. M. T. Cost-effectiveness analysis of universal childhood hepatitis A vaccination in Brazil: Regional analyses according to the endemic context. **Vaccine**, v.30, n.52, p.7489-7497, dez. 2012.
142. SATINSKY, B.; FORTUNATO, C. S.; DOHERTY, M.; SMITH, C. B.; SHARMA, S.; WARD, N. D.; KRUSCHE, A. V.; YAGER, P.; RICHEY, J. E.; MORAN, M. A.; CRUMP, B. C. Metagenomic and metatranscriptomic inventories of the lower Amazon River, May 2011. **Microbiome**, v.3, n.1, p.1-8, set. 2015.
143. SCHUENEMANN, V. J.; SINGH, P.; MENDUM, T. A.; KRAUSE-KYORA, B.; JAGER, G.; BOS, K. I.; HERBIG, A.; ECONOMOU, C.; BENJAK, A.; BUSO, P.; NEBEL, A.; BOLDSSEN, J. L.; KJELLSTROM, A.; WU, H.; STEWART, G. R.; TAYLOR, G. M.; BAUER, P.; LEE, O. Y. C.; MINNIKIN, D.; BESRA, G.; TUCKER, K.; ROFFEY, S.; SOW, S. O.; COLE, S. T.; NIESLT, K.; KRAUSE, J. Genome-wide comparison of medieval and modern *Mycobacterium leprae*. **Science**, v.341, n.6142, p.179-183, jun. 2013.
144. SCHLOSS, P.; WESTCOTT, S.; RYABIN, T.; HALL, J.; HARTMANN, M.; HOLLISTER, E.; LESNIEWSKI, R.; OAKLEY, B.; PARKS, D.; ROBINSON, C.; SAHL, J.; STRES, B.; THALLINGER, G.; VAN HORN, D.; WEBER, C. Introducing MOTHUR: open -source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. **Applied and Environmental Microbiology**, v.75, n.23, p.7537-7541, 2009.
145. Secretaria de Estado de Agricultura. **Relatório da Pecuária**.2016. Disponível em: < <http://www.agricultura.mg.gov.br/2014-09-23-01-07-23/relatorios/pecuaria>>. Acesso em: 13 dez. 2016.
146. SHANNON, K.E.; LEE, D.-Y.; TREVORS, J.T.; BEAUDETTE, L.A. Application of real-time quantitative PCR for the detection of selected bacterial pathogens during municipal wastewater treatment. **Science of the Total Environment**, v.382, n.1, p.121-129, ago. 2007.
147. SHERRARD, L.; GRAHAM, K. A.; MCGRATH, S. J.; MCILREAVEY, L.; HATCH, J.; MUHLEBACH, M.; WOLFGANG, M. C.; GILPIN, D. F.; ELBORN, J. S.;

- SCHNEIDERS, T.; TUNNEY, M. M. Antibiotic resistance in *Prevotella* species isolated from patients with cystic fibrosis. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.47, n.2, p.2369-2374, maio 2013.
148. SILVA, E. S.; VIANA, C. M.; MEMORIA, I. N. G. R. Wedekind, E. S. Verificação de *V. cholerae* em águas portuárias da cidade do Rio de Janeiro, Brasil: um ensaio metodológico. **Visa em Debate**, v.4, n.1, p.13-19, fev. 2016.
149. SILVA, A J.; BENITEZ, J A. *Vibrio cholerae* Biofilms and Cholera Pathogenesis. **Plos Neglected Tropical Disease**, v.10, n.2, p.1-25, fev. 2016.
150. SIMON, C.; DANIEL, R. Achievements and new knowledge unraveled by metagenomic approaches. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.85, n.2, p.265-276, set. 2009.
151. SLEATOR, R. D.; SHORTALL, C.; HILL, C. Metagenomics. **Letters In Applied Microbiology**, v.47, n.5, p.361-366, nov. 2008.
152. SMITH, J. G.; WIETHOFF, M. C.; STEWART, L. P.; NEMEROW, G. R. Adenovirus. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, v.343, p.195-224, abril 2010.
153. SNELLING, W.J.; MATSUDA, M.; MOORE, J.; DOOLEY, J.S.G. Under the Microscope: *Arcobacter*. **Letters in Applied Microbiology**, v.42, n.1, p.7-14, jan. 2006.
154. SOFI, M. H.; GUDI, R.; KARUMUTHIL-MELETHIL, S.; PEREZ, N.; JOHNSON, B. M.; VASU, C. PH of Drinking Water Influences the Composition of Gut Microbiome and Type 1 Diabetes Incidence. **Diabetes**, v.63, n.2, p.632-644, nov. 2013.
155. SOUZA, V. M. M.; ARSKY, M. L. N. S.; CASTRO, A. P. B.; ARAÚJO, W. N. Anos potenciais de vida perdidos e custos hospitalares da leptospirose no Brasil. **Revista de Saúde Pública**, v.45, n.6, p.1001-1008, dez. 2011.
156. STAHL, D. A.; LANE, D. J.; OLSEN, G. J.; PACE, N. R. Characterization of a Yellowstone hot spring microbial community by 5S rRNA sequences. **Applied and Environmental Microbiology**, v.49, n.06, p.1379-1384, jun. 1985.

157. STOCKMANN, C.; PAVIA, A. T.; GRAHAM, B.; VAUGHN, M.; CRISP, R.; PORITZ, M. A.; THATCHER, S.; KORGENSKI, E. K.; BARNEY, T.; DALY, J.; ROGATCHEVA, M. Detection of 23 Gastrointestinal Pathogens among Children Who Present with Diarrhea. **Journal Pediatrics Infection Diseases**, v.5, n.2, maio 2016.
158. SULTANA, H.; NEELAKANTA, G. The use of metagenomic approaches to analyze changes in microbial communities. **Microbiology Insights**, v.6, p.37-48, abr. 2013.
159. TANNOCK, G. W. et al. Analysis of the Fecal Microflora of Human Subjects Consuming a Probiotic Product Containing *Lactobacillus rhamnosus* DR20. **Applied And Environmental Microbiology**, v.66, n.6, p.2578-2588, 1 jun. 2000.
160. TANG, J.; BU, Y.; ZHANG, X.; HUANG, K.; HE, X.; YE, L.; SHAN, Z.; REN, H. Metagenomic analysis of bacterial community composition and antibiotic resistance genes in a wastewater treatment plant and its receiving surface water. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.132, p.260-269, out. 2016.
161. TATE, J. E.; CHITAMBAR, S.; ESPOSITO, D. H.; SARKAR, R.; GLADSTONE, BERYL.; RAMANI, S.; RAGHAVA, M. V.; SOWMYANARAYANAN, T. V.; GANDHE, SWATI, ARORA, R.; PARASHAR, U.; KANG, G. Disease and economic burden of rotavirus diarrhoea in India. **Vaccine**, v.27, n. n. 0, p.18-24, nov. 2009.
162. TEAGUE, N. S.; SRIJAN, A.; WONGSTITWILAIROONG, B.; PORAMATHIKUL, KAMONPORN.; CHAMPATHAI, T.; RUKSASIRI, S.; PAVLIN, J.; MASON, C. J. Enteric Pathogen Sampling of Tourist Restaurants in Bangkok, Thailand. **Journal of Travel Medicine**, v.17, n.2, p.118-123, mar. 2010.
163. TUNDISI, J. G. Água no século XXI: enfrentando a escassez. São Carlos: Rima Editora/Instituto Internacional de Ecologia. 247 p. 2003.
164. UNITED STATES ENIRONMENTAL PROTECTION AGENCY - **USEPA**. Land Application of Biosolids: Process Design Manual Disposal. Cincinnatti: EPA, s.d, 1992.

165. VAUGHAN, G.; Xia, G.; Forbi, J. C.; Purdy, M. A.; Rossi, L. M. G.; Spradling, P. R.; Khudyakov, Y. E. Genetic Relatedness among Hepatitis A Virus Strains Associated with Food-Borne Outbreaks. **Plos One**, v.8, n.11, p.74546-74546, nov. 2013.
166. VAUGHAN, G. Rossi, L. M. G.; Forbi, J. C.; De Paula, V.; Purdy, M. A.; Xia, G.; Khudyakov, Y. E. Hepatitis A virus: Host interactions, molecular epidemiology and evolution. **Infection, Genetics and Evolution**, v.21, p.227-243, jan. 2014.
167. VENKATESAN, M. M.; VERG, L. L. Combination vaccines against diarrheal diseases. **Human Vaccines & Immunotherapeutics**, v.11, n.06, p.434-1448, abr. 2015.
168. VIEIRA, C. B.; VIEIRA, C. B.; CORRÊA, A. A.; JESUS, M. S.; LUZ, S. L. B.; WYN-JONES, P.; KAY, D.; VARGHA, M.; MIAGOSTOVICH, M. P. Viruses Surveillance Under Different Season Scenarios of the Negro River Basin, Amazonia, Brazil. **Food Environ Virology**, v.8, n.1, p.57-69, jan. 2016.
169. VICENTE, A. C. P.; COELHO, A. M. 1990s Vibrio cholerae Epidemic, Brazil. **Emerging Infectious Disease**, v.11, n.1, p.127-128, jan. 2005.
170. VON GRAEVENITZ, A. The Role of Aeromonas in Diarrhea: a Review. **Infection**, v.35, n.2, p.59-64, abr. 2007.
171. VON SPERLING, Marcos. **Introdução à qualidade das águas e ao tratamento de esgotos**. Belo Horizonte: Ufmg, 2005. 452 p.
172. WAISER, M. J.; TUMBER, V.; HOLM, J. Effluent-dominated streams. Part 1: Presence and effects of excess nitrogen and phosphorus in Wascana Creek, Saskatchewan, Canada. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v.30, n.2, p.496-507, dez. 2010.
173. WANG, H.; TAO, Z.; LI, Y.; LIN, X.; YOSHIDA, H.; SONG, L.; ZHANG, Y.; WANG, S.; CUI, N.; XU, W.; SONG, Y.; XU, A. Environmental Surveillance of Human Enteroviruses in Shandong Province, China, 2008 to 2012: Serotypes, Temporal Fluctuation, and Molecular Epidemiology. **Applied and Environmental Microbiology**, v.80, n.15, p.4683-4691, maio 2014.

174. WALKER, A. W.; DUNCAN, S. H.; LOUIS, P.; FLINT, H. J. Phylogeny, culturing, and metagenomics of the human gut microbiota. **Trends in Microbiology**, v.22, n.5, p.267-274, maio. 2014.
175. WAYE, M. M. Y.; SING, C. W. Anti-Viral Drugs for Human Adenoviruses. **Pharmaceuticals**, v.3, n.10, p.3343-3354, out. 2010.
176. WASHINGTON, University of. **The Global Burden of Disease: Generating Evidence, Guiding Policy**. Seattle: Institute for Health Metrics and Evaluation, 2010. 30 p. Disponível em: <http://www.healthdata.org/sites/default/files/files/policy_report/2013/GBD_GeneratingEvidence/IHME_GBD_GeneratingEvidence_FullReport.pdf>. Acesso em: 10 abr. 2016.
177. WATSON, J.; CRICK, F. A structure for deoxyribose nucleic acid. **Nature Publishing Group**, v.171, n.4353, p.737-738, abr. 1953.
178. WICKHAM, H. ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis. **Springer-Verlag** New York, 2009.
179. WOESE, R. C. Bacterial Evolution. **Microbiological Reviews**, v.51, n.02, p.221-271, jun. 1987.
180. World Health Organization. **Guidelines for drinking-water quality**, fourth edition; 2011.
181. World Health Organization. **Global health risks global health risks who mortality and burden of disease attributable to selected major risks**. Switzerland: Who Press, 2009. 70 p. Disponível em: <http://www.who.int/healthinfo/global_burden_disease/GlobalHealthRisks_report_full.pdf>. Acesso em: 10 abr. 2016.
182. World Health Organization. **Preventing disease through healthy environments**. Switzerland: Who Press, 2003. 4 p. Disponível em: <http://www.who.int/quantifying_ehimpacts/publications/preventingdisease6.pdf>. Acesso em: 11 abr. 2016.

183. WYN-JONES, A. P.; CARDUCCI, A.; COOK, N.; D'AGOSTINO, M.; DIVIZIA, M.; FLEISCHER, J.; GANTZER, C.; GAWLER, A.; GIRONES, R.; HO"LLER, C.; HUSMAN, A. M. R.; KAY, D.; KOZYRA, I.; LO'PEZ-PILA, J.; MUSCILLO, M.; NASCIMENTO, M. S. J.; PAPAGEORGIU, G.; RUTJES, S.; SELLWOOD, J.; SZEWZYK, R.; WYER, M. Surveillance of adenoviruses and noroviruses in European recreational waters. **Water Research**, v.45, n.3, p.1025-1038, jan. 2011.
184. YANEZ, L. A.; LUCERO, N. S.; BARRIL, P. A.; DÍAZ, M. P.; MARÍA M. TENAGLIAC, SPINSANTI, L. I.; NATES, S. V.; ISA, M. B.; RÉ, V. E. Evidence of Hepatitis A virus circulation in central Argentina: Seroprevalence and environmental surveillance. **Journal of Clinical Virology**, [s.l.], v. 59, n. 1, p.38-43, jan. 2014.
185. YANG, Bo; WANG, Yong; QIAN, Pei-yuan. Sensitivity and correlation of hypervariable regions in 16S rRNA genes in phylogenetic analysis. **Bmc Bioinformatics**, v.17, n.1, p.1-8, mar. 2016.
186. YANO, Y.; HAMANO, K.; TSUTSUI, I.; Aue-umneoy, D.; Ban, M.; Satomi, M. Occurrence, molecular characterization, and antimicrobial susceptibility of *Aeromonas* spp. in marine species of shrimps cultured at inland low salinity ponds. **Food Microbiology**, v. 47, p.21-27, maio 2015.
187. YIN, X.; LI, X.; FENG, Z. Role of Envelopment in the HEV Life Cycle. **Viruses**, v.8, n.8, p.1-8, ago. 2016.
188. ZENG, S.Q., HALKOSALO, A., SALMINEN, M., SZAKAL, E.D., PUUSTINEN, L., VESIKARI, T. One-step quantitative RT-PCR for the detection of rotavirus in acute gastroenteritis. **Journal of Virological Methods**, v.153, n.2, p.238-240, nov. 2008.
189. ZHANG, Q.; SHUWEN, G.; ZHANG, J.; FANE, A.G.; KJELLEBERG, S.; RICE, S.A.; MCDOUGALD, D. Analysis of microbial community composition in a lab-scale membrane distillation bioreactor. **Journal of Applied Microbiology**, v.118, n.4, p.940-953, 15 fev. 2015.

10 ANEXOS

Ofício n.º 920/SBBH/2015

Belo Horizonte, 01 de dezembro de

Senhora Paula Prazeres Magalhães

Professora do Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG

Av. Antonio Carlos, 6627 – Pampulha – Bloco C4, Sala 204

CEP: 31270-901 – Belo Horizonte/MG

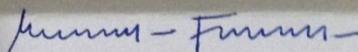
Assunto: Trabalho Acadêmico

Senhora Doutora,

Informo que está autorizada a realização de coletas de amostras de esgoto do Aeroporto de Belo Horizonte/Pampulha – Carlos Drummond de Andrade para a realização da pesquisa acadêmica.

2. Solicito designar representante dessa Instituição para entrar em contato com a Coordenadora de Meio Ambiente, Sra. Tatiana Gontijo de Loreto Advincula, no telefone (31) 3615-9440 para o apoio e informações necessárias.

Atenciosamente,



MARIO JORGE FERNANDES DE OLIVEIRA

Superintendente

 <p>PREFEITURA MUNICIPAL DE BELO HORIZONTE</p>	<p><i>Secretaria de Administração Regional Municipal Centro Sul</i> Gerência Regional do Terminal Rodoviário – GERTE-CS Praça Rio Branco 100, 3º Piso - Centro CEP 30.111-050 BH/MG Telefone: (31)3277-4509 - Fax: 3277-4522 - rodovi@pbh.gov.br</p>
---	---

Belo Horizonte, 09 de janeiro de 2016

SENHOR ANDRÉ FELIPE LEAL BERNARDES,

Informo que está autorizada a realização de coletas de amostras de esgoto do Terminal Rodoviário Governador Israel Pinheiro para realização de estudo acadêmico.

Conforme combinado as datas serão:

Conhecimento do local para logística – 19/01/2016

Coletas – 25/01/2016 às 7h30 e 10/02/2016 às 10h.

Atenciosamente,



LEONARDO RODRIGUES

Assessor de Imprensa do Terminal Rodoviário



PREFEITURA MUNICIPAL
DE BELO HORIZONTE

Declaro para os devidos fins que Andre Felipe Leal Bernardes foi convidado a apresentar o projeto de mestrado Meta Genômica aplicado a estudo da adversidade do esgoto do Terminal Rodoviário Governador Israel Pinheiro.

Belo horizonte 19 de janeiro de 2015

Leonardo R. B. frutuoso

Leonardo Rodrigues

Assessor de Comunicação

SECRETARIA DE ADMINISTRAÇÃO REGIONAL
MUNICIPAL CENTRO-SUL
GERÊNCIA REGIONAL DO TERMINAL
RODOVIÁRIO - GERTE
Praça Rio Branco Nº 100 - Centro
Belo Horizonte - MG - CEP 30.111-050



SECRETARIA DE ESTADO DE SAÚDE DE MINAS GERAIS
 SUB SECRETARIA DE VIGILÂNCIA E PROTEÇÃO À SAÚDE
 SUPERINTENDENCIA DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA, AMBIENTAL E SAÚDE DO TRABALHADOR
 DIRETORIA DE VIGILÂNCIA AMBIENTAL – SUB.VPS/SES-MG

Memo.Circ. DVA/SVEAST/Sub.VPS - Nº 028/2014.

Belo Horizonte, 14 de abril de 2014.

À Superintendência / Gerência Regional de Saúde - (Barbacena, Belo Horizonte, Coronel Fabriciano, Diamantina, Juiz de Fora, Montes Claros, Pouso Alegre, São João Del Rei, Sete Lagoas, Uberaba, Uberlândia, e Varginha)

Assunto: Envia Nota Técnica Nº 006/2014 – CVFRNB/DVA/SVEAST/SUB.VPS/SES-MG juntamente com a DIVISA/IOM/FUNED

A/C coordenação de epidemiologia.

Prezado(a) coordenador(a).

No intuito de alinhar as ações do Monitoramento Ambiental da Cólera em Minas Gerais para o ano de 2014, segue anexa NOTA TÉCNICA Nº 006/2014 CVFRNB/DVA/SVEAST/Sub.VPS/SES-MG elaborada juntamente com a Divisão de Vigilância Sanitária e Ambiental da FUNED que trata sobre os procedimentos, bem como o cronograma anual para imersão, coleta e envio de amostras à FUNED para a pesquisa de *Vibrio cholerae*.

Considerando o evento de massa internacional do presente ano (Copa do Mundo - FIFA), informamos que o 'Monitoramento Ambiental da Cólera, MG, 2014' ocorrerá, excepcionalmente, em 30 (trinta) municípios mineiros ditos prioritários para este evento, considerando o fluxo de migração, hospedagem de turistas e delegações e Centros de Treinamento do Catálogo FIFA vigente; sendo identificadas amostras indicativas, a ampliação do monitoramento (frequência e/ou número de amostras) será avaliada junto à FUNED.

Colocamo-nos à disposição para quaisquer esclarecimentos

Atenciosamente,


Marcela Lencine Ferraz
 Diretora de Vigilância Ambiental
 SVEAST/SUB/VPS/SES-MG
 Masp: 1 205 600 8


Kléber Eduardo da Silva Baptista
 Chefe da Divisão de Vigilância Sanitária e Ambiental
 Instituto Octávio Magalhães/FUNED
 MASP: 1.036.909-8

Anexos:

- Nota Técnica Nº 006/2014 – CVFRNB/DVA/SVEAST/SUB.VPS/SES-MG juntamente com a DIVISA/IOM/FUNED.

Recebido
 EM 20/04/14
 Daniel
 Assinatura



SECRETARIA DE ESTADO DE SAÚDE DE MINAS GERAIS
SUB SECRETARIA DE VIGILÂNCIA E PROTEÇÃO À SAÚDE
SUPERINTENDENCIA DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA, AMBIENTAL E SAÚDE DO TRABALHADOR
DIRETORIA DE VIGILÂNCIA AMBIENTAL – SUB.VPS/SES-MG

- Cronograma para o Monitoramento Ambiental da Cólera, MG, 2014.

**NOTA TÉCNICA Nº 006/2014 - CVFRÑB/DVA/SVEAST/SUB.VPS/SES-MG
juntamente com a DIVISA/IOM/FUNED
“MONITORAMENTO AMBIENTAL DA CÓLERA EM ÁGUAS RESIDUAIS, MG, 2014”**

Belo Horizonte, 14 de abril de 2014.

1. A Secretaria de Estado de Saúde de Minas Gerais (SES-MG), por meio da Diretoria de Vigilância Ambiental (DVA/SES-MG) planeja o cronograma de Monitoramento Ambiental da Cólera junto ao Laboratório de Águas (LA/FUNED) e Serviço de Gerenciamento de Amostras (SGA/FUNED), que libera os insumos necessários para coleta da amostra e realiza a análise para pesquisa de *Vibrio cholerae* em águas residuais (esgoto).
2. Torna-se necessária a articulação prévia entre a equipe técnica de Vigilância em Saúde Ambiental regional e a Secretaria Municipal de Saúde para execução do cronograma anexo de forma a assegurar o monitoramento nos municípios prioritários de Minas Gerais.
3. A equipe técnica de Vigilância em Saúde Ambiental regional deve programar previamente e acompanhar, juntos aos municípios jurisdicionados, a execução dos procedimentos de imersão, coleta e envio das amostras à FUNED conforme cronograma. Lembramos que o descumprimento dos prazos determinados causam transtornos para a execução das análises pelo Laboratório de Águas da FUNED. Assim sendo, salienta-se que o descumprimento do cronograma acarretará prejuízo (não realização) da análise de modo a evitar o comprometimento do monitoramento dos demais municípios integrantes.
4. Orientações relacionadas à coleta de amostras em águas residuais (esgoto): Retirar o plástico de proteção e submergir a mecha de gaze (fornecida pela FUNED) em ponto(s) estratégico(s) do(s) município(s) - conforme definição no cronograma - por três a cinco dias. Recolher as amostras e acondicioná-las em sacos plásticos (região metropolitana de Belo Horizonte) ou em frascos de boca larga contendo água peptonada alcalina simples (ambos fornecidos pela FUNED).

5. Antes de serem enviadas à FUNED as amostras devem, impreterivelmente, ser identificadas com o ponto (local) de coleta, município e data da coleta (recolhimento da mecha). A identificação deve ser realizada no recipiente externo que acompanha a mecha (amostra). A ausência de identificação acarretará prejuízo (não realização) da análise. O acondicionamento e transporte devem ser realizados sob refrigeração e não devem ultrapassar 12 horas, preferencialmente. As amostras provenientes de municípios sob jurisdição da SRS BH deverão ser previamente cadastradas no módulo ambiental do Sistema Gerenciador do Ambiente Laboratorial (GAL).

6. Para encaminhamento à FUNED, as amostras devem ser acompanhadas da Ficha de Encaminhamento de Amostras devidamente preenchida (anexo).

7. Qualquer dúvida ou esclarecimento alusivo deverá ser direcionado aos endereços eletrônicos: aline.thomaz@saude.mg.gov.br; se.gva@saude.mg.gov.br (Ponto focal na DVA: Aline Thomaz) e microagua@funed.mg.gov.br; sga@funed.mg.gov.br (Pontos Focais na FUNED: Valéria Martins e Marcela Campos).

Atenciosamente,


Marcela Lencine Ferraz
Diretora de Vigilância Ambiental
SVEAST/SUB/VPS/SES-MG
Masp: 1 205 600 8


Kléber Eduardo da Silva Baptista
Chefe da Divisão de Vigilância Sanitária e Ambiental
Instituto Octávio Magalhães/FUNED
MASP: 1.036.909-8