

Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

ANA CAROLINA GANIME ALVES TEIXEIRA

**VÍRUS GASTROENTÉRICOS COMO MARCADORES BIOLÓGICOS DE
CONTAMINAÇÃO DE FÔMITES HOSPITALARES**

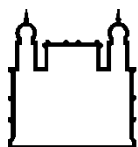
Tese apresentada ao curso de Doutorado do programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular do Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências. Área de Concentração: Virologia

Orientador: Dra. Marize Pereira Miagostovich

Co-orientador: Dr. José Paulo Gagliardi Leite

RIO DE JANEIRO

2014



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

ANA CAROLINA GANIME ALVES TEIXEIRA

**VÍRUS GASTROENTÉRICOS COMO MARCADORES BIOLÓGICOS DE
CONTAMINAÇÃO DE FÔMITES HOSPITALARES**

Orientador: Dra. Marize Pereira Miagostovich

Co-orientador: Dr. José Paulo Gagliardi Leite

EXAMINADORES:

Dra. Flavia Barreto dos Santos – Instituto Oswaldo Cruz - Fiocruz – Revisor -
Presidente da Banca

Dra. Ana Maria Coimbra Gaspar – Instituto Oswaldo Cruz - Fiocruz

Dra. Joana Mascarenhas – Instituto Evandro Chagas – IEC

Dr. Marcelo Pinto – Instituto Oswaldo Cruz- Fiocruz

Dra. Izabel Christina Nunes de Palmer Paixão – Universidade Federal Fluminense -
UFF

Rio de Janeiro, 27 de Novembro de 2014.

“A fé não é algo para se entender, é um estado para se transformar.”

MAHATMA GANDHI

Dedicatória

Gostaria de dedicar esta Tese a uma pessoa que sempre me deu muita força e aplaudiu as minhas escolhas. Mas infelizmente, hoje, não está aqui em corpo físico, mas tenho certeza que continua torcendo por mim e incentivando as minhas escolhas mesmo no plano espiritual. Kadu, você sempre estará no meu coração. EU TE AMO!

AGRADECIMENTOS

- Ao programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular, Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos;
- A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) e a Coordenação Geral de Laboratórios de Saúde Pública – Secretaria de Vigilância em Saúde (CGLAB/SVS) e ao Instituto Oswaldo Cruz pelo apoio financeiro para realização deste projeto.
- As equipes médicas e de enfermagem do Hospital Pró-Cardíaco e do Instituto Fernandes Figueira pelo apoio na obtenção das amostras.
- À plataforma de sequenciamento PDTIS;
- Aos meus orientadores Marize Pereira Miagostovich e José Paulo Gagliardi Leite pelos ensinamentos passados durante estes quatro anos de doutorado no Laboratório de Virologia Comparada e Ambiental (LVCA).
- A Dra. Flávia Barreto pela revisão e a todos os integrantes da banca examinadora pela participação;
- A Mariela Martinez, Eduardo Volotão, Marilda Almeida, Alexandre Fialho, Julia Fioretti, Fabiana Melgaço, Ana Caroline Sá, Juliana Andrade, Marcelle Figueira, Tatiana Rose, e Hugo Resque, pelas conversas inesquecíveis, companhia, amizade e carinho;
- A Dra. Ana Pinto por estar sempre me apoiando e incentivando;
- A Xica pelo carinho imenso, os abraços, apoio e palavras de sabedoria que sempre foram ditas na hora que mais necessitava escutar;
- A Marcos Mendonça pelo carinho, amizade e apoio nos projetos desenvolvidos no LVCA;
- A todos os demais integrantes do LVCA pelo apoio, compreensão e companhia nestes anos;
- As minhas amigas Ludmila Rocha, Nathália Motta e Thaís Ramos por aturarem meus desabafos;
- Aos meus pais, José Antonio Alves Teixeira (*in memorian*) e Marisa Cardoso Ganime pelo incentivo e apoio. Aos meus irmãos Paulo Gustavo, Maria Claudia, Ana Cristina e Carlos Eduardo (*in memorian*) pela compreensão e amizade. E ao

meu marido Vinícius de Moraes pela amizade e companheirismo. Aos meus sobrinhos Letícia, Enzo e Lucas. E a minha princesa Luísa que veio para alegrar meu coração.

SUMÁRIO

| | |
|--------------------------------------------------------------------|----|
| 1. Introdução | 14 |
| 1.1. Infecção hospitalar | 14 |
| 1.2. Transmissão viral e meio ambiente | 15 |
| 1.3. Vírus gastroentéricos | 20 |
| 1.3.1. Rotavírus | 24 |
| 1.3.2. Adenovírus humanos (HAdV) | 28 |
| 1.4. Metodologias de detecção de vírus em superfícies | 30 |
| 1.4.1. Controle interno de processo | 32 |
| 1.4.1.1. Norovírus Murino (MNV-1) | 33 |
| 1.4.1.2. Bacteriófago PP7 | 34 |
| 2. Justificativa | 35 |
| 3. Objetivos | 37 |
| 3.1. Objetivo geral | 37 |
| 3.2. Objetivos específicos | 37 |
| 4. Metodologias e Resultados | 38 |
| 5. Discussão | 82 |
| 6. Conclusões | 89 |
| 7. Perspectivas | 90 |
| 8. Referências Bibliográficas | 91 |

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

A – Adenina

aa – Aminoácido

AdV - adenovírus

AstV - astrovírus

C – Citosina

Ca²⁺ – Íon cálcio

UTI - Unidade de Tratamento Intensivo

DNA – Ácido desoxirribonucléico

ECP - Efeito citopático

EGPA – Eletroforese em gel de poliacrilamida

EMB – Emborrachado

EUA – Estados Unidos da América

FCV – Do inglês: *Feline Calicivirus* – Calicivírus Felino

FIOCRUZ – Fundação Oswaldo Cruz

FL – Fórmica Lisa

FP – Fórmica Porosa

G – Guanina

GA – Gastroenterite Aguda

HAdV – Adenovírus Humano

HuNoV - Norovírus Humanos

ICTV – Do inglês: *International Committee on Taxonomy of Viruses* – Comitê Internacional de Taxonomia dos vírus

ICU – Do inglês: *Intensive Care Unit* - Unidade de Terapia Intensiva

NICU – Do inglês: *Neonatal Intensive Care Unit* - Unidade de Terapia Intensiva Neonatal

ICP – Do inglês: *Internal Control Process*– Controle Interno de Processo

IOC – Instituto Oswaldo Cruz

ITRs – Sequências invertidas repetidas

LVCA – Laboratório de Virologia Comparada e Ambiental

ME – Microscopia eletrônica

MNV-1 – Do inglês: *Murine Norovirus 1* - Norovírus Murino 1

MS – Ministério da Saúde

nm – Nanômetros

NoV- Norovírus

NSPs – Do inglês: *Non Structural Proteins* – Proteínas não-estruturais

nt – Nucleotídeo

NTPase - Do inglês: *Nucleoside triphosphatase* – Nucleosídeo Trifosfatase

NTPs - Do inglês: *Nucleoside triphosphates* – Nucleosídeo trifosfato

OMS – Organização Mundial da Saúde

OPAS – Organização Pan Americana da Saúde

ORF – Do inglês: *Open Reading Frame* - Fase Aberta de Leitura

PAHO – Do inglês: *Pan American Health Organization*

pb – Pares de bases

PCR - Do inglês: *Polimerase Chain Reaction* – Reação em Cadeia pela Polimerase

PNI – Programa Nacional de Imunização

PP7 – bacteriófago de *Pseudomonas aeruginosa*

RAW 264.7 - macrófagos de origem murina

RE – Retículo Endoplasmático

RNA – Do inglês: *ribonucleic acid* - Ácido Ribonucleico

RNA(-) – Ácido Ribonucleico de polaridade negativa

RNA(+) – Ácido Ribonucleico de polaridade positiva

RNA_{df} – Ácido Ribonucleico de fita dupla

RNA_m – Ácido Ribonucleico mensageiro

RNA_s – Ácido Ribonucleico de fita simples

RNA_t - Ácido Ribonucleico de transferência

RV – Rotavírus

RVA – Rotavírus da espécie A

U – Uracila

UR – Umidade Relativa do ar

UV- Ultra Violeta

VLPs – Do inglês: *Virus-Like Particles* - Partículas Semelhantes a Vírus

VPs – Do inglês: *Viral Structural Proteins* - Proteínas Estruturais

WHO – Do inglês: *World Health Organization* – Organização Mundial de Saúde

LISTA DE FIGURAS

| | |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1: Esquema representativo do veículo de disseminação direta e indireta de infecção viral nosocomial (Adaptado de Sattar, 2004). | 16 |
| Figura 2: Fatores biológicos, físicos e químicos que podem influenciar na inativação dos vírus (Adaptado de Vasickova <i>et al.</i> , 2010). | 19 |
| Figura 3: Estrutura do vírion dos rotavírus da espécie A. A) Esquema da estrutura do vírion; B) Camada proteica tripla; C) Esquema da estrutura da proteína VP4 (Adaptado de Patton, 2012). | 25 |
| Figura 4: Esquema estrutural do genoma e partículas virais dos rotavírus. A: Eletroforese em gel de poliacrilamida (EGPA) dos 11 segmentos do genoma do rotavírus A símio (SA-11). B: Gel de poliacrilamida mostrando a separação das proteínas não estruturais (NSP1 – NSP6) e estruturais (VP1 – VP4, VP6 – VP7) sintetizadas pelo rotavírus SA-11. C: Micrografia eletrônica de rotavírus A. D: Reconstrução em 3D do vírion SA-11, mostrando a localização das proteínas estruturais (Adaptada de Conner & Ramig, 1997). | 26 |
| Figura 5: Esquema da organização geral dos segmentos gênicos de rotavírus da espécie A. Abreviações: A, Adenina; C, Citosina; G, Guanina; U, Uracila; <i>ORF</i> , do inglês <i>Open Reading Frame</i> ; pb, pares de bases. | 27 |
| Figura 6: A: Separação e identificação das proteínas do adenovírus humano (HAdV) em eletroforese em gel de poliacrilamida; B: Diagrama esquemático mostrando as proteínas estruturais da partícula viral; as principais proteínas do capsídeo (Hexon, Penton e Fibras), formam as superfícies do capsídeo icosaédrico; as proteínas essenciais, proteína terminal, Mu, V e VII, estão associados com o genoma do DNA fita dupla linear (Adaptada de Russel, 2000)..... | 29 |

LISTA DE QUADROS

| | |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Quadro 1: Estabilidade dos vírus em superfícies secas (Adaptado de Kramer <i>et al.</i> , 2006)..... | 23 |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|

RESUMO

Os fômites desempenham um papel importante na disseminação de diferentes patógenos, em ambientes hospitalares. Atualmente, o Programa Nacional de Controle de Infecção Hospitalar (PCIH) dispõe sobre a obrigatoriedade dos hospitais manterem uma Comissão de Controle de Infecções Hospitalares (CCIH) para execução do controle das infecções adquiridas durante as hospitalizações. Neste contexto, o objetivo deste estudo foi avaliar o papel de vírus gastroentéricos, não incluído nestas normas, como potenciais marcadores biológicos de contaminação hospitalar. Com este propósito foram realizados estudos para demonstrar a disseminação e a infecciosidade de rotavírus da espécie A (RVA) e adenovírus humanos (HAdV) em superfícies e fômites de unidades de tratamentos intensivos (UTI) adulto e neonatal e enfermaria pediátrica da rede privada e pública. O primeiro estudo realizado em uma UTI de adultos detectou HAdV em 44,7% (63/141) dos fômites investigados com carga viral variando entre $2,48 \times 10^1$ e $2,1 \times 10^3$ cópias genômicas por mililitro (gc/mL), incluindo uma contaminação mista com HAdV e RVA. Pode-se observar uma diminuição significativa no percentual de detecção de HAdV ($p < 0,05$) a partir de intervenções realizadas no processo de limpeza e desinfecção da UTI de adultos da rede privada. Embora a detecção de HAdV tenha sido significativamente maior ($p < 0,05$) que RVA nos primeiros dois meses do estudo, os RVA apresentaram uma maior carga viral. Tanto os HAdV quanto os RVA coletados dos fômites hospitalares puderam ser isolados em cultura celular, indicando que os vírus permanecem infecciosos nessas superfícies, apesar dos processos de desinfecção utilizados. Os dados referentes às unidades hospitalares infantis da rede pública revelaram uma maior taxa de detecção de HAdV [26,6% (128/480)] quando comparada com RVA [3,4% (16/480)] ($p < 0,001$). Na unidade de terapia intensiva neonatal, 4,5% (7/156) das amostras foram positivas. Na enfermaria pediátrica, 42,3% foram positivas (137/324), sendo 4,3% (14/324) RVA positivas e 38% (123/324) HAdV positivas. Realizou-se uma avaliação da metodologia utilizada, determinando a recuperação de vírus a partir de superfícies porosas (fórmica porosa e emborrachado) e não porosas (fórmica lisa). A metodologia de amostragem por *swab* utilizada para coleta das amostras a partir dos fômites foi avaliada e a análise por PCR quantitativa (qPCR) revelou uma eficiência de recuperação variável, entre 0,6 e 77% de acordo com os vírus e as superfícies testadas. PP7 e MNV-1 foram recuperados em 100% das superfícies (P e NP) contaminadas artificialmente e indicou o MNV-1 como potencial controle interno para o monitoramento de todas as etapas da metodologia utilizada. Concluindo, os resultados apontam os HAdV como potenciais marcadores de contaminação hospitalar, uma vez que: i) as superfícies analisadas apresentaram uma maior contaminação por estes vírus; ii) foi comprovada a infecciosidade destas amostras; iii) esses vírus podem ser isolados mais facilmente em culturas celulares. O monitoramento de fômites hospitalares mostra-se fundamental para demonstrar a dispersão dos vírus no ambiente hospitalar, podendo contribuir de forma mais eficaz na avaliação da qualidade microbiológica dos ambientes hospitalares, na elucidação de surtos hospitalares e, principalmente, na tomada de medidas eficazes para a prevenção e tratamento de doentes.

Palavras-chaves: rotavírus A, adenovírus humano, fômites hospitalares, metodologias de amostragem por *swab*.

ABSTRACT

Hospital fomites can play an important role in the spread of pathogens such as gastroenteric virus. Currently, the National Program of Hospital Infection Control requires hospitals to maintain a Committee of Nosocomial Infection Control for preventing infections acquired during hospitalization. In this context, the aim of this study was to evaluate the role of gastroenteric viruses as potential biomarkers of hospital contamination. For this purpose studies were performed to demonstrate the spread and infectivity of rotavirus species A (RVA) and human adenoviruses (HAdV) on surfaces and fomites of two hospitals: one private and one public, including adult, neonatal-Intensive care units (ICU) and pediatric ward. The first study conducted in an adult ICU, detected HAdV in 44.7% (63/141) of investigated fomites, with the viral load ranging from 2.48×10^1 to 2.1×10^3 genomic copies per milliliter (gc/mL), including a mixed contamination with HAdV and RVA. Furthermore, it can be observed a significant decrease in the percentage of detection of HAdV ($p < 0.05$) from the cleaning and disinfection interventions of the adult ICU, similar to that previously observed for RVA. Although the detection of HAdV was significantly higher ($p < 0.05$) than the RVA at the first two months of the study, the RVA showed a higher viral load. Both the RVA as HAdV collected from hospital fomites could be isolated in cell culture, indicating that those viruses remain infectious at this surfaces despite the disinfection processes used. Data regarding pediatric's public hospitals revealed a higher detection rate of HAdV [26.6% (128/480)] compared to RVA [3.4% (16/480)] ($p < 0.001$). Only 4.5% (7/156) of the samples were positive in the neonatal intensive care unit. In the pediatric ward, 42.3% were positive (137/324), 4.3% (14/324) RVA positive samples and 38% (123/324) HAdV positive samples. Additionally, it was performed an evaluation of the methodology used in this study, determining the recovery of virus from porous surfaces (porous formica and rubber) and nonporous (nonporous formica) using murine norovirus 1 (MNV-1) and bacteriophage PP7 as internal process controls. The swab sampling methodology used for collecting samples from fomites was evaluated, quantitative PCR (qPCR) showed variable recovery efficiency, between 0.6 and 77% according to viruses and surfaces tested. PP7 and MNV-1 were recovered in 100% of the artificially contaminated surfaces (P and NP), and the MNV-1 was indicated as a potential internal control to monitor all stages of the methodology. In conclusion, the results indicate the HAdV as potential markers of nosocomial infection, since: i) the studied surfaces showed greater HAdV contamination; ii) the infectivity of these samples was proven; iii) these viruses can be more easily isolated in cell cultures. Therefore, the monitoring of hospital fomites proven to be crucial and helps to enhance the dispersion of the virus in the hospital environment, and could contribute more effectively in the evaluation of the microbiological quality of the hospital environment, at the elucidation of hospital outbreaks, and especially in the measured of prevention and treatment of patients.

Keywords: rotavirus A, human adenovirus, hospital fomites, swab sampling methodologies.

1. Introdução

1.1. Infecção hospitalar

A Infecção hospitalar (IH) é aquela adquirida durante a hospitalização, estando ausente ou em período de incubação na ocasião da admissão do paciente. São diagnosticadas, em geral, a partir de 48 horas após a internação, aumentam o tempo de hospitalização do paciente, elevando o custo do tratamento, e são consideradas as principais causas de morbidade e de mortalidade em todo o mundo. No Brasil, segundo o Ministério da Saúde, a taxa média de IH ocorre em torno de 15% dos casos, enquanto nos EUA e na Europa ocorre em aproximadamente 10% (ANVISA, 2004).

Diferentes microrganismos como bactérias, fungos e vírus causam IH. No entanto, o grupo de patógenos mais pesquisados é o das bactérias, que constituem a flora humana e que normalmente não trazem risco a indivíduos saudáveis. Os vírus que sempre foram negligenciados, atualmente são associados às IH, entre eles os citomegalovírus, os herpes simplex e o vírus sincicial respiratório (ANVISA, 2004).

Os patógenos que ocasionam IH são transmitidos ao indivíduo por veículos como mãos, secreção salivar, fluidos corpóreos, ar e materiais contaminados, como por exemplo, equipamentos e instrumentos utilizados em procedimentos médicos, principalmente os invasivos (ANVISA 2004).

Os principais fatores que influenciam na aquisição de uma infecção são: *status* imunológico, idade do paciente (recém-nascidos e idosos são os mais vulneráveis), uso abusivo de antibióticos, procedimentos médicos, imunossupressão e falhas nos procedimentos de controle de infecção (ANVISA, 2004).

Recentemente, foi sugerida a mudança do termo IH por Infecções Relacionadas à Assistência a Saúde (IRAS), que reflete melhor o risco de aquisição dessas infecções (ANVISA, 2004).

Apesar de muitos esforços, o Brasil ainda enfrenta uma realidade adversa daquilo que se pode julgar satisfatório para evitar a IH: carência de recursos humanos e materiais nas instituições de saúde (principalmente nas públicas); ausência de Comissão de Controle de Infecções Hospitalares (CCIH) atuantes em grande parte dos

hospitais ou ainda, profissionais exercendo a função sem conhecimento adequado da atividade. Estes fatores resultam em elevadas taxas de IH, ocorrência de surtos não detectados em berçários e unidades de terapia intensiva, emergência de bactérias resistentes a diversos antibióticos e elevado risco ocupacional (ANVISA, 2004).

As atividades do Programa Nacional de Controle de Infecção Hospitalar (PCIH) foram delineadas pela Lei nº 9431, de 6 de janeiro de 1997, que dispõe sobre a obrigatoriedade dos hospitais manterem um Programa de Infecções Hospitalares e criarem uma CCIH para execução deste controle (ANVISA, 2004).

No Brasil, as primeiras CCIH surgiram na década de 1960 (Fernandes, 2000) e com o movimento contínuo de profissionais envolvidos na área evoluiu-se gradativamente para a concepção das IRAS como um problema de saúde pública. Assim, em 15 de agosto de 2012, a ANVISA publicou a Portaria nº 1.218/2012 que instituiu a Comissão Nacional de Prevenção e Controle de Infecção Relacionada à Assistência à Saúde – CNCIRAS que tem a finalidade de assessorar a Diretoria Colegiada na elaboração de diretrizes, normas e medidas para prevenção de IRAS.

Esta Comissão é formada por representantes da ANVISA, do Ministério da Saúde, das Coordenações Estaduais/Distritais e Municipais de Controle de Infecção Hospitalar, por especialistas em controle de infecção hospitalar, entidades representativas de infectologistas e profissionais que atuam com o controle de infecção hospitalar e Universidades. Uma das principais atividades da CNCIRAS foi a elaboração do Programa Nacional de Prevenção e Controle de Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde - PNPCIRAS. O objetivo geral do Programa é reduzir, em âmbito nacional, a incidência de IRAS e resistência microbiana (ANVISA, 2014).

1.2. Transmissão viral e meio ambiente

Durante séculos, pensava-se que as doenças virais fossem disseminadas pelo contato direto com o paciente ou por via aérea e que o ambiente tivesse pouco ou nenhum papel na transmissão das doenças. Devido ao entendimento de que as infecções hospitalares não estavam relacionadas com a contaminação microbiana das superfícies, até 1987, o *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) e o

American Hospital Association focavam apenas no diagnóstico dos pacientes. Ao longo dos anos os estudos mudaram as perspectivas sobre a transmissão viral e integraram um modelo multifatorial mais complexo de propagação da doença, incluindo o ambiente contaminado (Boone & Gerba, 2007).

Assim, a transmissão viral de uma pessoa infectada para um novo hospedeiro pode ocorrer por vias diretas ou indiretas. As superfícies podem ser contaminadas diretamente pelo contato com secreções e fluidos corporais ou indiretamente pela transferência de vírus por outros veículos (**Figura 1**). A deposição por decantação de aerossóis ou contato com fluidos contaminados por vírus são evidentes; enquanto que as transferências, que podem ocorrer entre os diferentes tipos de superfícies, não são tão notórias (Sattar, 2004).

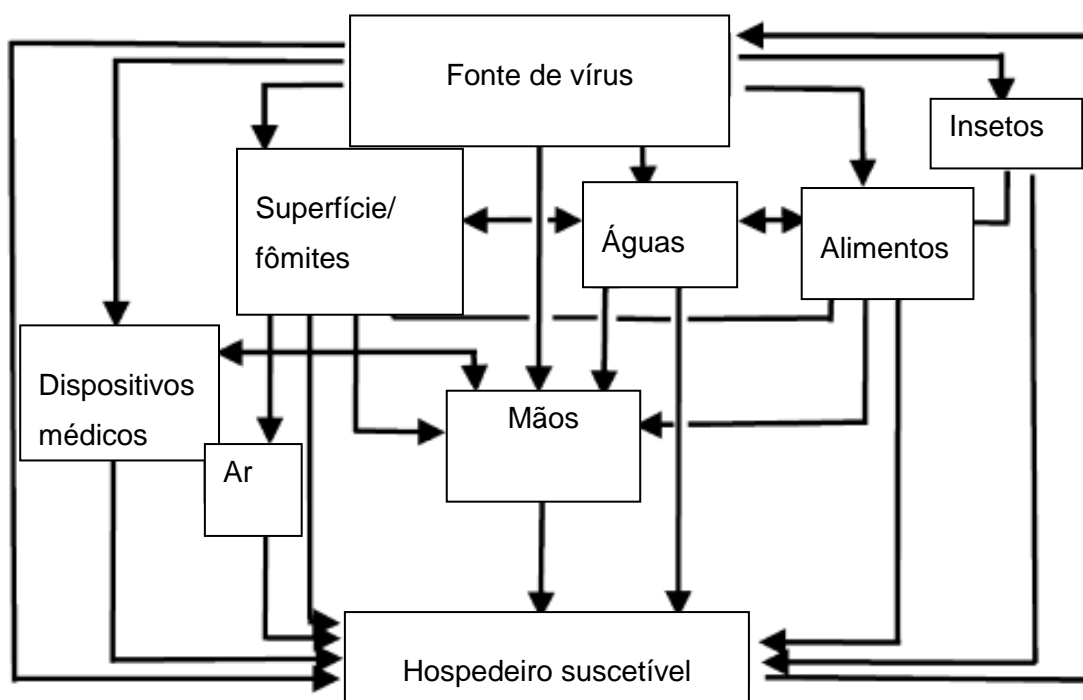


Figura 1: Esquema representativo do veículo de disseminação direta e indireta de infecção viral nosocomial (Adaptado de Sattar, 2004).

Uma vez que uma superfície está contaminada, a transferência de partículas virais infecciosas pode facilmente ocorrer entre objetos inanimados ou animados, como por

exemplo, de mãos e/ou superfícies de trabalho para comida ou diretamente da mão à boca (Goldmann 2000; Marks *et al.*, 2000; Rzezutka *et al.*, 2004). A rápida propagação de infecções virais através de superfícies contaminadas é comum e, especialmente, em estabelecimentos fechados como escolas, creches, asilos, escritórios comerciais, hospitais ou sistemas de transportes públicos, com pessoas aglomeradas/confinadas (Barker *et al.*, 2001).

Durante a transmissão indireta, as superfícies contaminadas podem desempenhar um papel importante, embora este tipo de transmissão seja dependente de vários fatores, que incluem a quantidade de partículas virais presentes nas superfícies, a sua estabilidade no ambiente, o potencial de se dissipar dentro de um ambiente fechado, bem como a interação do vírus e o organismo hospedeiro. Um grande número de partículas virais pode ser eliminado através de vários fluidos corporais, incluindo sangue, fezes, vômito, saliva, urina e secreções respiratórias, oriundas de pessoas infectadas ou portadoras de um vírus. Quanto mais partículas virais forem eliminadas, maiores as chances dos vírus manterem sua infecciosidade e assim infectar um novo organismo hospedeiro (Rzezutka & Cook, 2004).

Atualmente, estudos vêm demonstrando que as partículas virais podem persistir por períodos prolongados em superfícies, tais como dispositivos médicos, fômites ou pele humana (Sattar *et al.* 1986; Abad *et al.* 2001; Todd *et al.* 2009), sugerindo que estes desempenhem um papel importante na disseminação hospitalar de patógenos virais, respiratórios e entéricos (Sattar & Springthorpe, 1996; Gallimore *et al.*, 2004, 2005, 2006; Ramani *et al.*, 2008; Carducci *et al.*, 2011).

A disseminação dos vírus geralmente começa antes do aparecimento dos sintomas clínicos e permanece durante vários dias após o desaparecimento dos mesmos. A quantidade real de disseminação dos vírus varia consideravelmente dependendo do tempo de infecção e do vírus em questão (Sattar, 2004).

O potencial de propagação viral através de superfícies contaminadas depende particularmente da capacidade do vírus em manter sua infecciosidade (Boone e Gerba 2007). Esta é afetada por uma combinação de fatores biológicos e físico-químicos (**Figura 2**) (Vasickova *et al.*, 2010). Mesmo que alguns vírus tenham uma baixa capacidade de permanecer infecciosos no ambiente, a baixa dose infecciosa sugere

que estes vírus são capazes de persistir em número suficiente para atuar como uma fonte de infecção por vários dias, semanas ou, em alguns casos, meses (Barker *et al.* 2001; Boone & Gerba, 2007). Até o momento, não existem informações completas a respeito da influência do ambiente em todos os vírus e sua estabilidade em condições externas. A maioria dos estudos abordou apenas alguns vírus alvos e com condições experimentais e métodos diversos, dificultando a análise de suas conclusões (Carter, 2005).

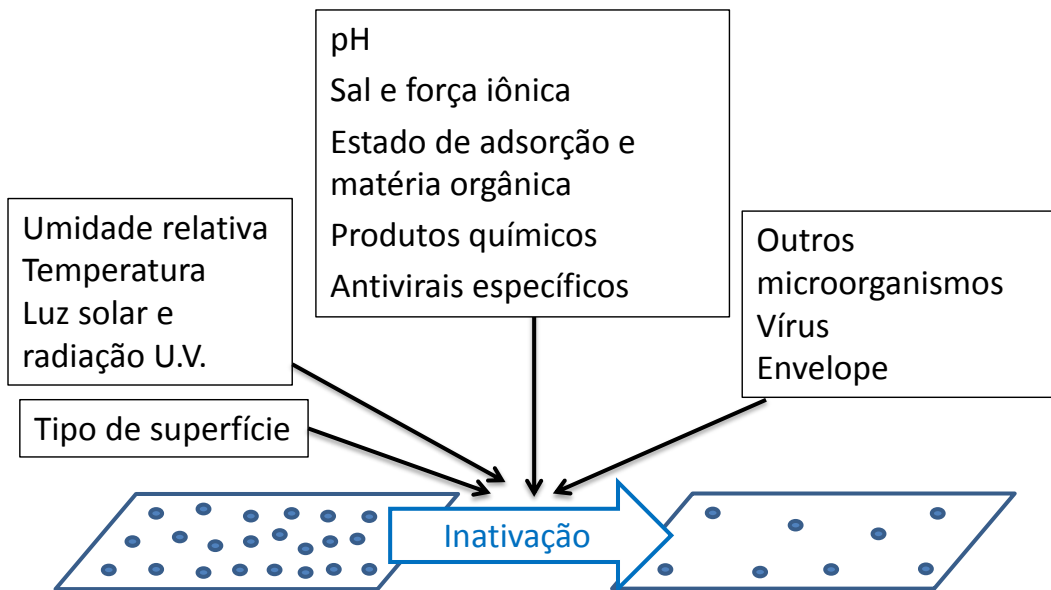


Figura 2: Fatores biológicos, físicos e químicos que podem influenciar na inativação dos vírus (Adaptado de Vasickova *et al.*, 2010).

Um dos aspectos mais importantes, que afeta a estabilidade e a persistência dos vírus no meio ambiente é a presença de um envelope viral que ajuda a manter a infecciosidade destes no meio. Os vírus não envelopados são menos sensíveis aos solventes orgânicos e têm uma maior resistência à secagem ou métodos de dessecação e, por conseguinte, são mais disseminados do que os vírus envelopados, que são menos estáveis no ambiente (Vasickova *et al.*, 2010).

A estabilidade das partículas virais no ambiente, em geral, é inversamente proporcional à temperatura do ar. As partículas virais são capazes de persistir de dias a meses ao longo de um intervalo de temperaturas do meio ambiente, e podem ser preservadas por congelamento ou refrigeração (Cliver, 2009).

A umidade relativa do ar (UR) também tem um efeito relevante sobre a infecciosidade dos vírus e seu efeito é modulado pela temperatura do ar. Em geral, os

vírus envelopados tendem a ser mais persistentes em UR mais baixa, enquanto que os vírus não envelopados são mais estáveis em um ambiente cuja UR é mais elevada (Assar & Block 2000; Moce-Llivina *et al.* 2006). Acredita-se que a estabilidade dos vírus envelopados em superfícies inanimadas é maior quando os níveis de UR encontram-se abaixo de 50%. Por outro lado, os níveis de UR mais elevada que 80% são considerados como sendo mais benéficos para a infecciosidade dos vírus não envelopados. No entanto, há exceções: estudos têm demonstrado que o vírus da hepatite A (HAV) é capaz de manter sua infecciosidade a baixos níveis de UR, em contraste com os outros patógenos virais (Mbithi *et al.*, 1991; Stine *et al.*, 2005). No entanto, Abad *et al.* (1994) constataram que a infecciosidade de HAV foi maior em alta UR.

Uma vez que a superfície foi contaminada, ela pode ser a fonte de contaminação de outras superfícies animadas ou inanimadas, como por exemplo, maçanetas e mãos. As mãos são importantes fontes de contaminação das superfícies e fômites. Partículas virais infecciosas têm sido detectadas em amostras coletadas de mãos naturalmente contaminadas de profissionais de saúde e de fômites (Carducci *et al.*, 2002; Piednoir *et al.*, 2002; Gallimore *et al.*, 2004, 2005, 2006, Ramani *et al.*, 2008), e podem permanecer viáveis por várias horas nas mãos. Por outro lado, podem permanecer muito mais tempo em superfícies ambientais, uma vez que estas são, em geral, higienizadas menos vezes que as mãos (Sattar & Springthorpe, 1996; Kramer *et al.*, 2006). Estudos mostraram que pelo menos 14 pessoas podem ser contaminadas ou infectadas por tocar uma maçaneta de porta contaminada e a transmissão sucessiva do vírus de uma pessoa para outra pode ocorrer pelo contato de até seis pessoas (Von Rheinbaben *et al.*, 2000). Verificou-se também que os dedos contaminados podem subsequentemente transferir partículas virais para até sete superfícies limpas (Barker *et al.* 2004).

1.3. Vírus gastroentéricos

Aproximadamente mil vírus diferentes são conhecidos por infectar os seres humanos, sendo as doenças virais mais prevalentes produzidas por vírus entéricos e

respiratórios (Barker *et al.*, 2001), onde os fômites desempenham um importante papel na disseminação viral (Barker *et al.*, 2004; Winther *et al.*, 2006; Wu *et al.*, 2005). Os vírus são responsáveis por cerca de 30-40% dos casos de gastroenterites infecciosas (Vasickova *et al.*, 2010).

Os vírus que infectam um organismo hospedeiro por via gastrointestinal são excretados nas fezes e podem também estar presentes no vômito (Seymour & Appleton, 2001). Apresentam resistência ao sistema gastrointestinal e, normalmente, são excretados em números elevados e apresentam grande estabilidade no ambiente (Vasickova *et al.*, 2010). Os vírus excretados pela via fecal são, em geral, não envelopados, o que lhes confere elevada resistência às condições ambientais adversas. Embora não se multipliquem quando estão dispersos no ambiente por serem parasitos intracelulares obrigatórios, os vírus não envelopados são geralmente mais resistentes às intempéries do que outros microrganismos, bem como aos métodos físicos e químicos utilizados na desinfecção dos ambientes.

Os vírus entéricos não envelopados como rotavírus da espécie A (RVA) e adenovírus humanos (HAdV) são capazes de permanecer viáveis por longos períodos (**Quadro 1**), resistindo às condições ambientais desfavoráveis ou letais para outros microrganismos, tais como extremos de pH e temperaturas elevadas (Ley *et al.*, 2002; Griffin *et al.*, 2008). Em contraste, vírus respiratórios envelopados geralmente permanecem infecciosos por períodos mais curtos (Duizer *et al.* 2004).

Em todo o mundo, os RVA são os mais importantes patógenos causadores de doenças diarreicas em crianças, gerando surtos em hospitais, creches, escolas e lares de idosos (Hota, 2014). Esses vírus são eliminados em altas concentrações, que variam de 10^5 a 10^{11} partículas virais por grama de amostra fecal (Farthing, 1989) e devido à sua estabilidade no ambiente, sua ubiquidade e sua dose mínima infecciosa (1 a 10 partículas) têm sua transmissão facilitada, podendo permanecer durante vários meses em superfícies (**Quadro 1**), resistindo às intempéries (Payne *et al.*, 2008).

Partículas infecciosas de RVA foram recuperadas de mãos e de várias superfícies e fômites. O contato ocasional pode levar à transferência desses vírus de superfícies contaminadas para superfícies limpas. Assim, superfícies animadas e/ou inanimadas

podem desempenhar um papel complementar na propagação desses vírus (Sattar *et al.*, 1994).

Os HAdV podem manter a infecciosidade no ambiente extra-celular por períodos prolongados (**Quadro 1**). Estes vírus são estáveis na presença de diferentes agentes físicos e químicos, assim como condições adversas de pH e temperatura (Mena; Gerba, 2009). De acordo com Thurston-Enriquez *et al.* (2003), por estes vírus apresentarem um genoma de DNA dupla fita, são capazes de utilizar o sistema de reparo de DNA de células hospedeiras, o que pode prolongar a sua infecciosidade no ambiente e aumentar a sua resistência à inativação pela luz ultravioleta (UV).

Quadro 1: Estabilidade dos vírus em superfícies secas (Adaptado de Kramer et al., 2006).

| Família | Vírus | Período de persistência (intervalo) |
|-------------------------|----------------------------------|--------------------------------------------|
| <i>Adenoviridae</i> | Adenovírus | 7 dias – 90 dias |
| <i>Astroviridae</i> | Astrovírus | 7 dias – 90 dias |
| <i>Caliciviridae</i> | Norovírus e calicivírus felino | 8 horas – 7 dias |
| <i>Coronaviridae</i> | Coronavírus | 3 horas |
| | SARS vírus | 72 – 96 horas |
| <i>Hepadnaviridae</i> | Vírus da Hepatite B | > 7 dias |
| <i>Herpesviridae</i> | Citomegalovírus | 8 horas |
| | Vírus Herpes Simplex 1 e 2 | 4 horas e trinta minutos– 56 dias |
| <i>Orthomyxoviridae</i> | Vírus da Influenza | 1 – 2 dias |
| <i>Papillomaviridae</i> | Papilomavírus 16 | > 7 dias |
| <i>Paramyxoviridae</i> | Vírus Sincicial Respiratório | > 6 horas |
| <i>Parvoviridae</i> | Parvovírus | > 1 ano |
| <i>Picornaviridae</i> | Coxsackievírus | > 14 dias |
| | Echovírus | 7 dias |
| | Vírus da Hepatite A | 2 horas – 60 dias |
| | Poliovírus 1 | 4 horas - < 8 dias |
| | Poliovírus 2 | 1 dia – 56 dias |
| | Rhinovírus | 2 horas – 7 dias |
| <i>Poxviridae</i> | Vacciniavírus | 21 dias - > 20 semanas |
| <i>Reoviridae</i> | Rotavírus | 6 – 60 dias |
| <i>Retroviridae</i> | Vírus da Imunodeficiência Humana | > 7 dias |

1.3.1. Rotavírus

Bishop e colaboradores (1973) realizaram por microscopia eletrônica (ME) a primeira identificação de partículas virais em células da mucosa intestinal. Medindo entre 67 e 87nm de diâmetro e semelhantes à família *Reoviridae* estes vírus receberam o nome de *Orbivirus-like agent*. Partículas virais semelhantes foram também observadas pela ME por Flewett e colaboradores (1973) em fezes de crianças com diarreia aguda. Em 1978, foi proposto que estes vírus constituíssem um novo gênero, *Rotavirus*, dentro da família *Reoviridae* (Flewett & Wood, 1978), por apresentarem à ME a morfologia de uma “roda”.

No Brasil, os RV foram descritos pela primeira vez por Linhares e colaboradores (1977) ao examinarem fezes de crianças com gastroenterite aguda (GA) por ME. De acordo com o 9º Informe do Comitê Internacional de Taxonomia Viral (ICTV 2012), os determinantes antigênicos de grupo conferidos pela proteína VP6 permitem a classificação dos RV em cinco espécies sorológicas: Rotavírus da espécie A (RVA), B (RVB), C (RVC), D (RVD) e E (RVE) (<http://www.ictvonline.org/virusTaxonomy.asp>. Acesso em 16/09/2014 às 14h00min), além de três tentativas adicionais de espécies: Rotavírus da espécie F (RVF), G (RVG) e H (RVH) (Van Regenmortel *et al.*, 2005; Ball, 2005; Johne *et al.*, 2011; Matthijssens *et al.*, 2011; Patton, 2012; Estes & Greenberg, 2013).

Os RVA são vírus não envelopados, de simetria icosaédrica e as partículas virais infecciosas (vírion) são constituídas por três camadas proteicas e apresentam aproximadamente 100 nanômetros (nm) de diâmetro (**Figura 3**). A camada proteica interna, ou cerne viral, é composta por 120 cópias da proteína VP2. A região terminal da proteína VP2 está livre e acredita-se que esta região esteja em contato com o complexo da polimerase viral composto pelas proteínas VP1 (RNA polimerase – RNA dependente) e VP3 (enzima responsável pela adição de um CAP no RNA) (McClain *et al.*, 2010). A camada intermediária é constituída por 260 trímeros da proteína VP6 que permitem estabilidade ao cerne interno; além de funcionar como um adaptador para a camada externa que é essencial para a adsorção e entrada do vírus na célula. Esta última camada é composta por 260 trímeros da glicoproteína VP7, diretamente

posicionados sobre os trimeros da proteína VP6. Os trimeros de VP7 são dependentes de íons cálcio (Ca^{2+}), os quais mantêm a estabilidade destes. Se estendendo da camada formada pela proteína VP7, encontram-se 60 trimeros formados pela proteína VP4, que apresenta diferentes mudanças conformacionais durante a penetração na membrana da célula hospedeira (Patton, 2012).

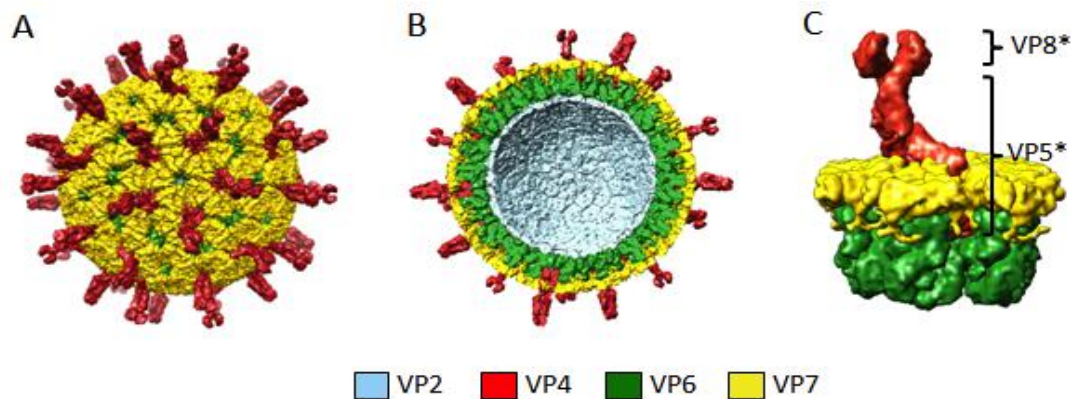


Figura 3: Estrutura do vírion dos rotavírus da espécie A. A) Esquema da estrutura do vírion; B) Camada proteica tripla; C) Esquema da estrutura da proteína VP4 (Adaptado de Patton, 2012).

O genoma completo dos RVA contém aproximadamente 18.552 pares de bases (pb), sendo constituído por 11 segmentos de ácido ribonucleico de dupla fita (RNA_{df}) que variam em tamanho de 667 a 3302 pares de bases (pb), codificando seis proteínas estruturais (VP1-4, VP6-7) e cinco ou seis proteínas não estruturais (NSP1-6), conforme demonstrado na **Figura 4** (Estes & Kapikian, 2007).

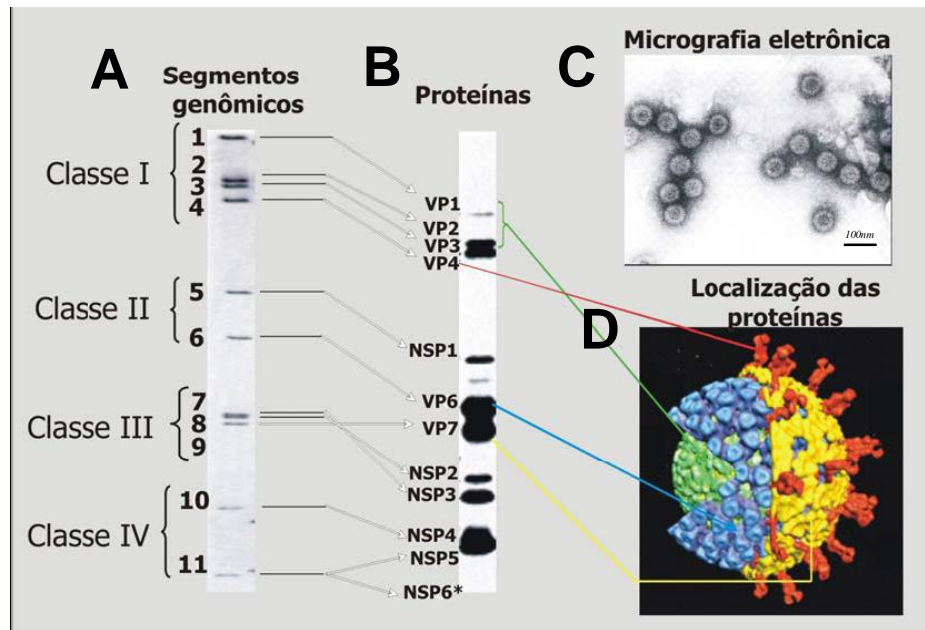


Figura 4: Esquema estrutural do genoma e partículas virais dos rotavírus. A: Eletroforese em gel de poliacrilamida (EGPA) dos 11 segmentos do genoma do rotavírus A símio (SA-11). **B:** Gel de poliacrilamida mostrando a separação das proteínas não estruturais (NSP1 – NSP6) e estruturais (VP1 – VP4, VP6 – VP7) sintetizadas pelo rotavírus SA-11. **C:** Micrografia eletrônica de rotavírus A. **D:** Reconstrução em 3D do vírion SA-11, mostrando a localização das proteínas estruturais (Adaptada de Conner & Ramig, 1997).

A fase de leitura aberta (*ORF*, do inglês *Open Reading Frame*) está flanqueada pelas regiões não codificantes 3' e 5' que podem variar em comprimento, mas que apresentam em comum pequenas sequências nucleotídicas, que são importantes sinais para a transcrição, transporte de RNA, replicação, montagem ou empacotamento dos segmentos genômicos (Patton & Spencer, 2000; Estes & Kapikian, 2007) (**Figura 5**). Os RNAdf estão pareados do começo ao fim e a fita positiva contém na região 5' a sequência CAP. Todos os 11 segmentos devem apresentar os mesmos sinais de ativação em *cis* já que são todos replicados pela mesma polimerase. Além disso, cada

segmento deve conter um sinal único porque estes devem ser distinguidos um dos outros durante o empacotamento (Estes & Greenberg, 2013).

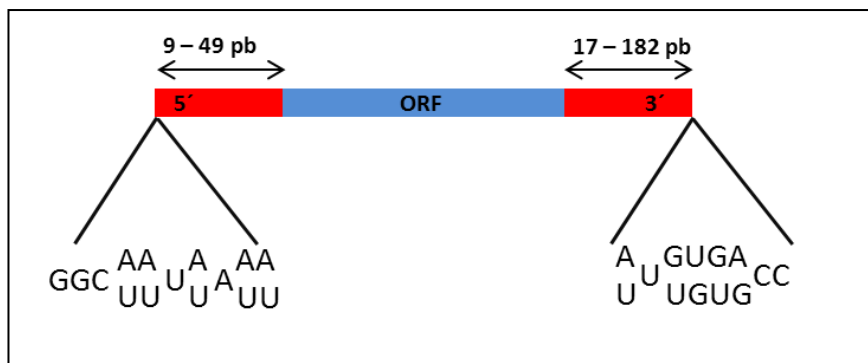


Figura 5: Esquema da organização geral dos segmentos gênicos de rotavírus da espécie A. Abreviações: A, Adenina; C, Citosina; G, Guanina; U, Uracila; ORF, do inglês *Open Reading Frame*; pb, pares de bases.

Os RVA são os principais agentes etiológicos causadores de GA em crianças e jovens, e estima-se que ocorram aproximadamente 196.000 mortes por ano mundialmente (Walker *et al.*, 2013). Em 2006 e 2007 a Organização Pan Americana da Saúde (OPAS) e o Grupo de Assessoria Estratégica de Especialistas em Imunização (SAGE, do inglês: *Strategic Advisory Group of Experts on Immunization*) da Organização Mundial da Saúde (OMS), declararam que a introdução de uma vacina RVA era prioridade nas Américas com a meta de prevenir as mortes e hospitalizações causadas por este vírus (WHO, 2009). Duas vacinas RVA foram recomendadas pela OMS: i) a vacina monovalente Rotarix[®] (RV1) (GlaxoSmithKline (GSK), Rixensart, Bélgica); ii) a vacina pentavalente RotaTeq[®] (RV5) (Merck, North Wales, PE, EUA).

Estudos realizados no Brasil demonstraram uma redução de 17% e 22% nas hospitalizações e taxas de mortalidade, respectivamente, em 2009. Esta redução foi mais acentuada nas regiões Norte e Nordeste do país, onde as condições sócio-

econômicas são mais precárias que em outras regiões, comprovando a importância da vacinação-RVA (do Carmo *et al.*, 2011).

Os RVA são altamente infecciosos e adaptados ao hospedeiro, podendo infectar igualmente o homem e animais (Franco *et al.*, 2006). A transmissão deste vírus é feita pela via fecal-oral. Após um período de incubação que varia entre dois e quatro dias, os sintomas geralmente começam abruptamente com febre e vômitos, seguidos de diarreia aquosa que pode durar de três a oito dias (Staat *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 2008).

A doença provocada pelos RVA é mais frequente em crianças entre três e 36 meses de idade, e acredita-se que múltiplas infecções ocorram ao longo da vida e que por causa da imunidade adquirida nestes episódios, as crianças com idade mais avançada e os adultos sofram com episódios menos graves e/ou assintomáticos (Anderson & Weber, 2004).

1.3.2. Adenovírus humanos (HAdV)

Os adenovírus (AdV) foram primeiramente isolados por Rowe e colaboradores (1953) quando tentavam estabelecer uma linhagem celular de tecido de adenoide, removido cirurgicamente de crianças e de recrutas militares com doenças febris. Estudando uma epidemia de doença respiratória em recrutas, Hillerman e Werner (1954) descreveram um agente similar, que induzia efeito citopático (ECP) em cultura de células humanas. Esses agentes foram denominados AdV por Enders e colaboradores (1956).

De acordo com o Comitê Internacional sobre Taxonomia de Vírus (ICTV, 2012), os AdV pertencem à família *Adenoviridae* que está subdividida nos gêneros *Mastadenovirus* (vírus que infectam humanos, símios, bovinos, equinos, caninos, suínos, ovinos e roedores), *Aviadenovirus* (aves em geral), *Atadenovirus* (cervos, patos e répteis), *Siadenovirus* (anfíbios e perus) e *Ichtadenovirus* (peixes).

Os HAdV são vírus não envelopados com genoma de DNA dupla fita linear, com 26 a 45 Kpb (Russell, 2009, Smith *et al.*, 2010). O capsídeo icosaédrico (vinte faces triangulares e doze vértices) possui diâmetro de 70 a 100 nm. A partícula viral é constituída por 11 proteínas, denominadas polipeptídeos (II, III, IIIa, IV, V, VI, VII, VIII,

IX, X e TP). Estas proteínas são numeradas com relação a sua migração em EGPA (**Figura 6**). Das 11 proteínas, sete compõem o capsídeo viral (II, III, IIIa, IV, VI, VIII, IX), que contém 252 capsômeros, das quais 240 são constituídas pela proteína *hexon* (PII), compondo as faces do icosaedro, e os 12 restantes são compostos pelas proteínas *penton-base* (PIII) e *fibra* (PIV) (**Figura 6**). Cada penton projeta uma fibra proteica que varia para cada sorotipo de HAdV, com exceção dos HAdV entéricos (sorotipos 40 e 41) que projetam duas fibras proteicas (Shenk, 1996; Smith *et al.*, 2010; Robinson *et al.*, 2011).

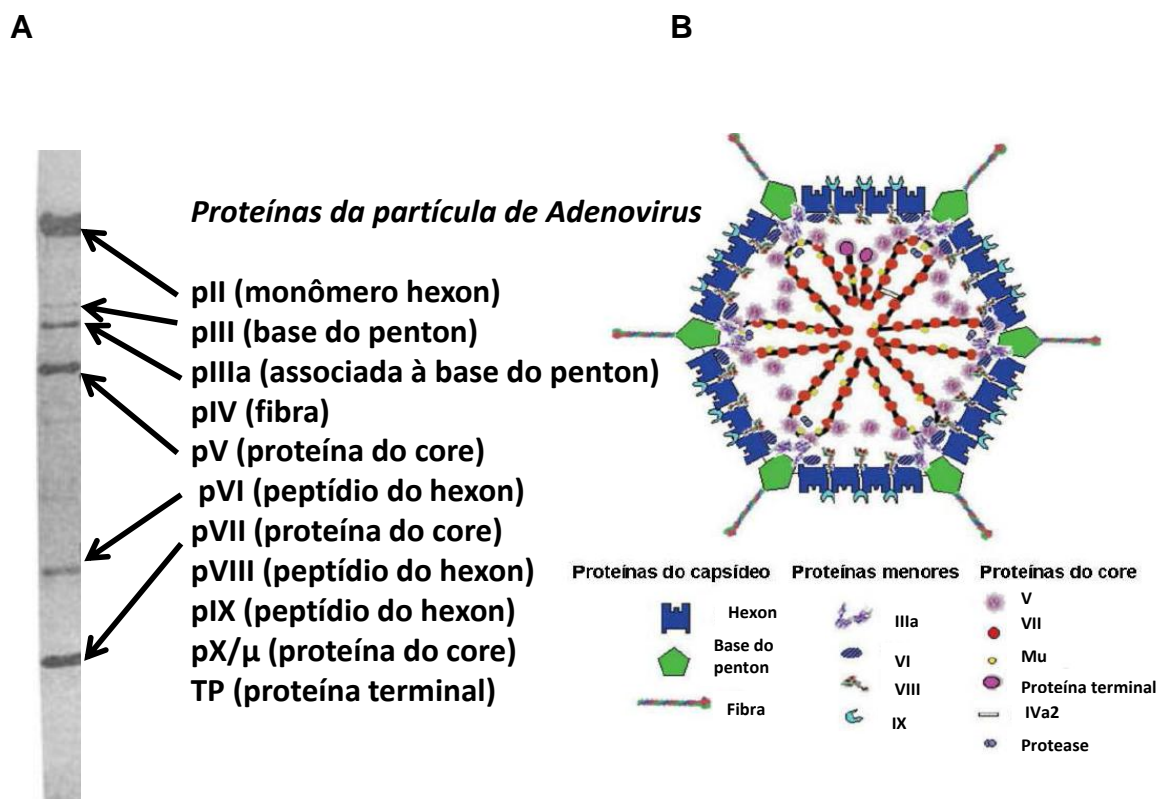


Figura 6: A: Separação e identificação das proteínas do adenovírus humano (HAdV) em eletroforese em gel de poliacrilamida; B: Diagrama esquemático mostrando as proteínas estruturais da partícula viral; as principais proteínas do capsídeo (Hexon, Penton e Fibras), formam as 29 superfícies do capsídeo icosaédrico; as proteínas essenciais, proteína terminal, Mu, V e VII, estão associados com o genoma do DNA fita dupla linear (Adaptada de Russel, 2000).

Atualmente, já foram identificados 57 diferentes sorotipos de HAdV, divididos em sete espécies (A-G), com base na similaridade de 30 superfícies gênicas, padrões de hemaglutinação e perfis sorológicos (Nemerow *et al.*, 2009; Henquell *et al.*, 2009; Robinson *et al.*, 2011).

Os HAdV têm uma notável capacidade de se disseminar e são necessárias apenas cinco partículas virais para infectar um novo hospedeiro (Saha *et al.*, 2014). As doenças associadas aos HAdV têm sido documentadas desde 1926 (Mena & Gerba, 2009). Estes vírus têm a capacidade de infectar uma variedade de tecidos, sendo identificados como agentes etiológicos de diversas patologias, que podem ser mais graves em populações pediátricas e geriátricas, e em indivíduos com sistemas imunológicos debilitados, como receptores de transplante ou pacientes com síndrome da imunodeficiência adquirida (Saha *et al.*, 2014).

As rotas de infecção dos HAdV incluem o trato respiratório, trato gastrointestinal e a conjuntiva ocular, sendo estes vírus responsáveis por inúmeros surtos em escolas, orfanatos e hospitais (Horwitz, 2001). A espécie F (sorotipos 40 e 41) é responsável pela maioria dos casos de GA (Russell, 2009).

Todos os sorotipos de adenovírus são excretados nas fezes, assim, os fômites expostos a esse material fecal podem ser uma fonte de contaminação, mesmo que indireta, pela ingestão, inalação ou contato com os olhos.

1.4. Metodologias de detecção de vírus em superfícies

Métodos simples, rápidos e sensíveis para detecção de vírus podem ser utilizados para estabelecer a causa e a fonte de contaminação em surtos hospitalares (Gallimore *et al.*, 2004, 2005, 2006; Ramani *et al.*, 2008, Carducci *et al.*, 2002, 2011, Rodríguez-Lázaro *et al.*, 2012). Entretanto, a detecção de vírus em amostras ambientais pode ser uma tarefa difícil quando comparada a detecção em espécimes clínicos, onde os vírus estão presentes em altas concentrações, as infecções estão associadas a um vírus ou poucos (co-infecção) e a composição da amostra é constante.

Uma eventual distribuição heterogênea de um pequeno número de partículas virais, a variedade na composição das amostras ambientais contendo componentes inibidores que podem interferir na detecção viral e a diversidade de famílias virais são algumas características que devem ser consideradas nas metodologias de recuperação e concentração destes vírus no ambiente, etapa esta realizada anteriormente as metodologias de detecção (Goyal, 2006). Desta forma, a colheita do material e a recuperação dos vírus a partir das diferentes matrizes deve ser adequada à metodologia de detecção viral utilizada e, caso haja a necessidade de utilização de mais de uma metodologia, o material deve ser adequado a todos os métodos selecionados. Assim, o material não deve ser citotóxico para cultura de células usadas em ensaios de infecciosidade e deve estar livre de quaisquer inibidores que possam ser co-extraídos ou co-concentrados a partir de amostras ambientais (Goyal, 2006).

Embora a literatura apresente alguns métodos para recuperação de vírus em superfície (Gallimore et al., 2004; Ramani *et al.*, 2008; Boxman *et al.*, 2009; Scherer *et al.*, 2009; Herzog *et al.*, 2012), a ausência de um sistema de vigilância para detectar vírus em superfícies e a indisponibilidade de métodos laboratoriais padronizados limitam os estudos de investigação de surtos nosocomiais associados a contaminação de superfícies.

A utilização de métodos de detecção sensíveis, bem como a obtenção de um material adequado é crucial para a recuperação dos vírus de objetos contaminados e fômites, uma vez que eles podem estar presentes em baixas concentrações e distribuída heterogeneamente nas matrizes (Rodriguez-Lázaro *et al.*, 2012). O uso de *swabs* associados a técnicas moleculares são geralmente a primeira escolha e estão sendo utilizadas em laboratórios de pesquisa (Gallimore *et al.*, 2004, 2005, 2006; Ramani *et al.*, 2008, Carducci *et al.*, 2002, 2011, Boxman *et al.*, 2009, Herzog *et al.*, 2012). Entretanto, diferentes métodos de amostragem são utilizados e os autores raramente relatam o limite de detecção do método aplicado. Variações como o tempo de fricção sobre a superfície e a composição do material do *swab*, além do eluente em que o *swab* é embebido e armazenado podem interferir na metodologia (Julian *et al.*, 2011).

Entre os métodos moleculares de detecção, a PCR quantitativa (qPCR), tornou-se o principal método de escolha para a detecção de vírus no ambiente. A qPCR é uma técnica molecular que permite a quantificação do vírus específico inicialmente presente em uma amostra (Heid *et al.*, 1996), porém, não distingue entre partículas infecciosas ou não. No entanto, muitas vezes a PCR qualitativa (PCR) é necessária para caracterização molecular dos vírus detectados, uma vez que para o sequenciamento nucleotídico é necessário utilizar o produto da PCR, ou até mesmo pelo fato de muitas vezes a amostra apresentar inibidores que podem interferir na sensibilidade da qPCR (Guimarães *et al.*, 2008).

Outra opção inclui a combinação de técnicas, como a combinação de uma etapa de cultura de células com a detecção por uma técnica molecular, por exemplo, a ICC-PCR (cultura celular integrada a PCR). Essa associação de técnicas reduz os períodos de incubação do vírus em cultura celular, permitindo a detecção de vírus que não causam efeitos citopáticos, além de combinar a velocidade da PCR com um ensaio de viabilidade de cultura para formar um método de detecção molecular capaz de isolar níveis baixos de vírus infecciosos e aumentar a sensibilidade da PCR (Blackmer *et al.*, 2000; Dubois *et al.*, 2002; Duizer *et al.*, 2004).

1.4.1. Controle interno de processo

Com o objetivo de acompanhar todas as etapas durante a análise e evitar resultados falso-negativos, o uso de diversos vírus como controle interno na execução dos ensaios tem sido proposto (Fumian *et al.*, 2010; Mattison *et al.*, 2009; Rajal *et al.*, 2007b; Stals *et al.*, 2009; Prado *et al.*, 2012). A inclusão de um controle interno de processo (CIP) pode ajudar a elucidar o papel de importantes variáveis do método aplicado, permitindo o controle de todos os procedimentos desde a extração de ácidos nucleicos até a parte analítica dos resultados (Rajal *et al.*, 2007b; Stals *et al.*, 2009).

Dentre os vírus estudados como CIP nos ensaios de detecção de vírus encontram-se: os norovírus murino 1 (MNV-1) (Wobus *et al.*, 2006; Stals *et al.*, 2009, 2011), o calicivírus felino (FCV) (Mattison *et al.*, 2009; Schultz *et al.*, 2011), o vírus Mengo (Uhrbrand *et al.*, 2010) e o fago MS2 (Dreier *et al.*, 2005; Scherer *et al.*, 2010),

utilizados para o monitoramento da contaminação de alimentos. O bacteriófago PP7 de *Pseudomonas aeruginosa* (PP7), tem sido utilizado como controle interno na análise de amostras ambientais, de águas e de esgotos (Morales-Morales *et al.*, 2003; Rajal *et al.*, 2007a, 2007b; Fumian *et al.*, 2010; Prado *et al.*, 2013) e o bacteriófago P22 como controle na avaliação da eficiência de recuperação de amostra de fômites entre outros (Herzog *et al.*, 2012).

1.4.1.1. Norovírus Murino (MNV-1)

Os norovírus (NoV), pertencentes à família *Caliciviridae*, são reconhecidos como os principais causadores de surtos de GA em todo o mundo (Cannon *et al.*, 2006). Previamente denominados vírus do grupo *Norwalk*, causam GA autolimitadas em humanos e, apesar de as infecções assintomáticas serem comuns, estudos recentes têm demonstrado que são a causa principal de gastroenterites em pessoas de todas as idades (Koopmans & Duizer, 2004).

O gênero *Norovirus*, pode ser dividido em seis genogrupos (GI, GII, GIII, GIV, GV e GVI), sendo que GI, GII e GIV foram descritos infectando humanos; no entanto, apenas um pequeno número de surtos devido ao genogrupo IV foi relatado (Koopmans *et al.*, 2002). O genogrupo III agrupa os NoVs bovinos e o genogrupo V contém NoVs de origem murina (Wobus *et al.*, 2006). O norovírus canino (CNV) é um patógeno recentemente descoberto em cães, com cepas classificadas nos genogrupos IV e VI (Caddy *et al.*, 2014).

Em 2003, os MNV-1, pertencentes ao genogrupo V (ICTV, 2012) e que infectam camundongos, foram relatados e caracterizados (Karst *et al.*, 2003). Este vírus pode ser isolado tanto em cultura celular como em pequenos animais, e por isso tem sido utilizado como vírus modelo para estudos de NoV humanos (HuNoV) (Wobus *et al.*, 2004). O MNV-1 pode ser produzido rotineiramente por infecção de macrófagos de origem murina, da linhagem celular RAW 264.7, sendo possível a quantificação utilizando ensaios de placa de lise (Wobus *et al.*, 2006).

Do ponto de vista molecular, o MNV-1 compartilha muitas características genéticas com HuNoV. A análise do genoma de MNV (RNA fita-simples com aproximadamente

7,5kb) identificou três ORFs características de *Norovirus* e *Vesivirus*, dois gêneros da família *Caliciviridae* (Karst *et al.*, 2003). Em relação à patogenia, o MNV-1 também compartilha com HuNoVs a capacidade de se dispersar pela via fecal-oral e altas concentrações de partículas virais são encontradas nas fezes do animal infectado (Wobus *et al.*, 2004).

Por ser um vírus descrito recentemente, há poucos estudos relacionados à estabilidade e desinfecção de MNV-1. Este vírus foi utilizado como modelo para estudos de inativação de HuNoV por calor (Hewitt *et al.*, 2009) e desinfecção por cloro e U.V. (Cannon *et al.*, 2006; Lee *et al.*, 2008; Belliot *et al.*, 2008; Baert *et al.*, 2008).

1.4.1.2. Bacteriófago PP7

O uso dos bacteriófagos como controle interno de processo tem sido muito utilizado na virologia (Mesquita *et al.*, 2010; Rajal *et al.*, 2007; Lute *et al.*, 2004; Oshima, 2001) por várias razões: i) são inócuos, ii) podem ser cultivados em títulos elevados, iii) resultados de infecciosidade podem ser obtidos mais rapidamente (em horas em contraste com dias para outros vírus), iv) os ensaios de fagos não requerem instalações especializadas (Aranha-Creado e Brandwein, 1999) e, finalmente v) não espera-se encontrar os bacteriófagos selecionados nas amostras ambientais (Poma *et al.*, 2013).

O bacteriófago PP7 que infecta *Pseudomonas aeruginosa*, pertence à família Leviviridae, ao Gênero Levivirus, tem simetria icosaédrica e não apresenta envelope viral. Seu genoma é de RNA fita simples, polaridade positiva, tem propriedades similares a alguns vírus entéricos e não é detectado em amostras ambientais (Rajal *et al.*, 2007). Esse bacteriófago apresenta grande similaridade com os poliovírus no tamanho (25nm) e em suas propriedades físico-químicas (Rajal *et al.*, 2007), razões pelas quais é utilizado como modelo para o vírus da poliomielite (Aranha-Creado e Brandwein, 1999).

O PP7 tem sido utilizado como controle interno de processo na análise de amostras ambientais, de águas e de esgotos (Morales-Morales *et al.*, 2003; Rajal *et al.*, 2007a, 2007b; Fumian *et al.*, 2010; Prado *et al.*, 2013; Poma *et al.*, 2013).

2. Justificativa

Ao contrário de certos microorganismos como bactérias e fungos, os vírus humanos patogênicos não fazem parte da flora normal do corpo humano. Além de frequentes causadores de infecções na população, os vírus são patógenos comuns em ambientes relacionados à saúde, como os hospitais, podendo ser responsáveis por 5 a 30% de todos os casos de infecção hospitalar (Sattar, 2004). Entretanto, mesmo em países desenvolvidos, a real proporção de infecções hospitalares por vírus permanece desconhecida ou é subestimada, pois muitos hospitais não possuem recursos materiais e humanos para realizar a vigilância adequada e o diagnóstico diferencial destas infecções.

No Brasil, a publicação da Lei nº 9431, que dispõe sobre a obrigatoriedade dos hospitais manterem um PCIH e criarem uma CCIH para execução do controle de infecções hospitalares direciona o controle de contaminação microbiológica dos hospitais apenas ao controle de *Staphylococcus aureus* metacilina-resistente, *enterococci* vancomicina-resistente, *Acinetobacter spp.*, *Clostridium difficile* e *Pseudomonas spp.*, desta forma negligenciando os vírus (Ayliffe *et al.*, 2000; AWMF, 2005; Creamer & Humphreys, 2008).

A contaminação de superfícies hospitalares por vírus gastroentéricos, associados à GA, como RVA, HAdV, HuNoV e astrovírus (AstV) têm sido demonstrada por grupos de pesquisa na Itália, Inglaterra e Índia (Carducci *et al.*, 2002, 2011; Gallimore *et al.*, 2005, 2006, 2008; Ramani *et al.*, 2008). No Brasil, nosso grupo foi pioneiro na investigação de vírus gastroentéricos em superfícies e demonstrou a disseminação de RVA em uma Unidade de Tratamento Intensivo (UTI) não pediátrico em um hospital da rede particular e seu potencial como marcador de contaminação ambiental (Ganime *et al.*, 2012). Entretanto, a utilização de vírus de DNA como marcador de contaminação, como por exemplo, o HAdV, pela sua resistência e facilidade de propagação em cultivo celular quando comparado aos RVA; a infecciosidade dos vírus detectados e níveis de contaminação em unidades hospitalares infantis; assim como outras relacionadas ao percentual de recuperação viral e a inibição da metodologia utilizada necessitam de maior investigação. Neste contexto, este trabalho disponibiliza dados de concentração

e infecciosidade viral, úteis para análise microbiológica de risco em cenários específicos, assim como avalia a metodologia de *swab* utilizada para recuperação de vírus em superfícies. Adicionalmente, alerta para a necessidade de aprimoramento de protocolos de limpeza utilizados em hospitais e para a tomada de medidas de controle eficazes no manejo de pacientes e prevenção de surtos nosocomiais.

3. Objetivos

3.1. Objetivo geral

Avaliar os RVA e HAdV como potenciais marcadores biológicos de contaminação hospitalar em superfícies e fômites de três unidades hospitalares situadas na cidade do Rio de Janeiro.

3.2. Objetivos específicos

1. Determinar a infecciosidade dos RVA e HAdV detectados na UTI de adultos;
2. Avaliar a disseminação de HAdV em amostras de superfície e fômites obtidas em uma UTI de adultos de um hospital da rede particular, previamente analisadas para RVA;
3. Avaliar a disseminação de HAdV e RVA em unidades hospitalares neonatal e pediátrica;
4. Avaliar o MNV-1 e o bacteriófago PP7 como CIP determinando o percentual de recuperação viral nas superfícies de fórmica porosa, fórmica não porosa e emborrachado.

4. Metodologias e Resultados

As metodologias e os resultados obtidos neste estudo serão apresentados sob a forma de artigos publicados, submetidos ou em fase final de elaboração:

- Artigo 1: Detecção de Rotavirus A em superfícies ambientais de uma unidade de terapia intensiva de um hospital (Artigo publicado). Este artigo está relacionado ao objetivo 1.
- Artigo 2: Viabilidade dos Adenovírus Humanos dos fômites hospitalares. (Artigo publicado). Este artigo está relacionado aos objetivos 1 e 2.
- Artigo 3: Monitoramento de contaminação viral em superfícies e fômites hospitalares: comparação entre duas unidades pediátricas (Artigo em fase final de elaboração). Este artigo está relacionado ao objetivo 3.
- Artigo 4: Avaliação do método de amostragem por Swab em fômites (Artigo submetido). Este artigo está associado ao objetivo 4.

Artigo 1

Detecção de Rotavirus A em superfícies ambientais de uma unidade de terapia intensiva hospitalar.



Major article

Group A rotavirus detection on environmental surfaces in a hospital intensive care unit

Ana Carolina Ganime MSc^a, Filipe A. Carvalho-Costa MD, PhD^b, Marcos Cesar L. Mendonça PhD^a,
Carmen B. Vieira MSc^a, Marisa Santos PhD^c, Rubens Costa Filho MD, MBA^d,
Marize P. Miagostovich PhD^a, José Paulo G. Leite PhD^{a,*}

^a Laboratory of Comparative and Environmental Virology, Oswaldo Cruz Institute, Oswaldo Cruz Foundation, Ministry of Health, Rio de Janeiro, Brazil

^b Laboratory of Systematic and Biochemistry Oswaldo Cruz Institute, Oswaldo Cruz Foundation, Ministry of Health, Rio de Janeiro, Brazil

^c National Cardiology of Ipanema, Rio de Janeiro, Brazil

^d Prê-Cárdio Hospital, Rio de Janeiro, Brazil

Key Words:

Foram:

Virus biomarker

Hospital infection

Adult ward

Background: Environmental surfaces can play a role in the spread of pathogens, such as enteric viruses, within a hospital. This study assessed the level of contamination of group A rotavirus (RV-A) on environmental surface samples from an adult intensive care unit in a hospital in Rio de Janeiro, Brazil.

Methods: A total of 504 environmental surface samples were obtained from multiple sites in the intensive care unit, including flushing buttons, telephones, and alcohol gel supports. Nested and quantitative reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) were used to detect and quantify RV-A levels through partial amplification of VP6 and NSP5 genes, respectively, and the viability of the viruses detected was assessed by MA-104 cell integrated cell culture/RT-PCR.

Results: RV-A was detected by nested RT-PCR in 14% of the samples (73 of 504), with viral loads ranging from 3.4 genomic copies/ml to 2.9×10^6 genomic copies/ml. The nucleotide sequence of the amplicons obtained from nested RT-PCR confirmed that the positive samples were RV-A. Moreover, 3 of 10 strains investigated demonstrated viability by integrated cell culture/RT-PCR.

Conclusion: The detection of RV-A on environmental surface samples indicates a need for improvements to hospital cleaning procedures to reduce viral contamination, and suggests, as reported previously, that RV-A can be used as a biomarker to assess contamination in hospitals.

Copyright © 2012 by the Association for Professionals in Infection Control and Epidemiology, Inc. Published by Elsevier Inc. All rights reserved.

Microbiological investigations in hospital settings have focused on controlling contamination by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, vancomycin-resistant enterococci, *Acinetobacter* spp, *Clostridium difficile*, and *Pseudomonas* spp.^{1–3} Although the proportion of nosocomial infections caused by viruses remains unknown, it has been suggested that viruses are responsible for more than 30% of cases.⁴

* Address correspondence to José Paulo G. Leite, PhD, Laboratory of Comparative and Environmental Virology, Oswaldo Cruz Institute, Oswaldo Cruz Foundation, Ministry of Health, Avenida Brasil, 4365, Pavilhão Heleno & Peggy Pereira, Maracanã, CEP 21040-360, Rio de Janeiro, RJ, Brazil.
E-mail address: jg.leite@ioc.fiocruz.br (J.P.G. Leite).

This work was supported by the Brazilian National Council for Scientific and Technological Development, Oswaldo Cruz Institute and Programa Estratégico de Pesquisa em Saúde (PAPE-S) and Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ).

Conflict of interest: None to report.

Experimental evidence and epidemiologic studies indicate that environmental surfaces can play a role in the spread of pathogens, such as respiratory and enteric viruses, within hospitals.⁴ Environmental surfaces have often been described as sources of nosocomial infection outbreaks.⁵ Previous studies have demonstrated the importance of surfaces and objects in the transmission of virus-associated diarrhea and indicated that enteric viruses can retain infectivity on environmental surfaces over prolonged periods.^{6–11} This suggests that these viruses potentially could serve as biomarkers for hospital infections. Therefore, monitoring of hospital surfaces is critical to highlight the spread of these viruses in the environment, which could contribute to more effective evaluation of the microbiological quality of hospital environments, elucidation of nosocomial outbreaks, and especially effective measures for prevention and patient management.

The present study evaluated the dissemination of group A rotavirus (RV-A) on environmental surfaces in an intensive care

unit (ICU) intended for adults with noninfectious diseases in a hospital in Rio de Janeiro, Brazil.

METHODS

Samples were collected from an ICU of a private hospital in Rio de Janeiro with the capacity to treat any medical-surgical condition. The ICU provides privacy and surveillance in 7 individual rooms, each with individual ventilation and air filtration systems on par with those in the surgery center.

Samples were collected from 12 areas in all 7 individual rooms of the ICU representing 42 samples/fomites (Table 1). Each month 84 samples were collected, for a total of 504 samples collected between January and June 2009. Samples were obtained by scraping in at least 50% of the area of the fomite (eg, companion chairs) with swabs dipped in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM; Gibco, Grand Island, NY), pH 7.2, as described previously.¹² For smaller sites (eg, door handles), all of the areas were scraped.

For nucleic acid extraction, the silica method¹³ was adapted as described by Gallimore et al.⁸ The cDNA was prepared using random primers¹⁴ and RV-A VP6 gene-amplified by reverse-transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) with single-round primers VP6-F/VP6-R.¹⁵ Nested RT-PCR (nRT-PCR) was performed using the primers VPGNF/VPGNR.⁸

Samples positive for RV-A by nRT-PCR were then tested by quantitative RT-PCR (qRT-PCR), targeting a segment of the gene encoding NSP3.¹⁶ The number of viral particles was determined by adjusting the values according to the volumes used for each step of the procedure (extraction, cDNA synthesis, and qRT-PCR reaction).

To avoid cross-contamination, all procedures were performed in 4 different rooms, with UV decontamination. Positive and negative controls were included during all steps. The positive control was an RV-A G1P8 sample, isolated from an acute case of gastroenteritis. This sample was characterized by molecular techniques and confirmed by sequencing (Genbank accession number GU831596; National Center for Biotechnology Information, Bethesda, MD). DMEM was used as a negative control.

Individually, the same primers used for the nRT-PCR were used for partial sequencing of the VP6 gene at the Platform for DNA Sequencing (PDTS; Oswaldo Cruz Foundation, Rio de Janeiro, Brazil) and sequence analyses were carried out as described previously.¹⁴

For virus viability assays, integrated cell culture/RT-PCR (ICC/RT-PCR) was applied to 10 of the 73 RV-A-positive samples, randomly collected among all samples positive for the 3 techniques. RV-A strains were propagated in the MA104 cell line as described previously.¹⁷ After adsorption, the virus inoculum was removed and the monolayer was washed twice. nRT-PCR based on amplification of the partial VP6 gene¹⁵ was performed to confirm RV-A isolation.

The frequency of rotavirus detection in hospital surfaces in distinct periods was compared using the χ^2 test with EpiInfo 2000 version 3.5.1 (Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, GA). The threshold for statistical significance was $P < .05$. This project was approved by the hospital's Ethics Committee.

RESULTS

The dissemination of RV-A on environmental surfaces is characterized in Table 1. RV-A was detected in 73 of the 504 samples (14%) by nRT-PCR; 45 of those 73 samples were positive by qRT-PCR, with viral loads ranging from 3.43 genomic copies (gc)/mL to 2.94×10^3 gc/mL of DMEM. The presence of RV-A in fomites was confirmed by analysis of sequences amplified from the VP6 gene.

As shown in Table 1, a statistically significant decrease ($P < .001$) in the percentage of RV-A-positive samples was observed over time, declining from an average of 30% in the first 2 months (January and February) to 7% in subsequent months (March–June). All fomites were found to be positive for RV-A at some point during the study, with the following percentages: alcohol gel supports, 15% (11 of 73); toilet flush buttons, 12% (9 of 73); companion chairs, coffee support tables, and common trash bin covers, 11% (8 of 73) each; interior door handles, 8% (6 of 73); bed controls and exterior bathroom door handles, 7% (5 of 73) each; keyboard infusion pumps, 5% (4 of 73); TV remote controls, chlorhexidine supports, and telephones, 4% (3 of 73) each. The quantification averages of each fomite were analyzed, and it was determined that swab samples from the telephone had the highest viral load (2.94×10^3 gc/mL).

Analysis of fomites from individual rooms showed that RV-A was detected in all 7 rooms of the ICU. Seventeen of 73 RV-A-positive samples (23%) were collected from rooms that had been disinfected with 70% ethanol in January and February and with Viskon (Antec International, Suffolk, England), a broad-spectrum disinfectant which active ingredient is the potassium monopersulfate, in March to June and were not occupied by patients when the samples were obtained.

Three of the 10 samples inoculated into MA-104 cells were positive for RV-A by ICC/nRT-PCR. These positive samples were collected from an inside door handle, a keyboard infusion pump, and an alcohol gel support.

DISCUSSION

Among the hospital surfaces investigated in this study, the most frequently contaminated surface was the device used for disinfecting hands with alcohol gel. This suggests that health professionals prefer to disinfect their hands with alcohol, corroborating previous data.^{3,18} The second most highly contaminated site was toilet flush buttons, in agreement with a previous study that found the highest number of RV-A-positive samples in the area close to toilets.⁸ Although the TV remote control was the surface with the most contact with patients, it had the lowest percentage of RV-A-positive samples. The companion chair was often contaminated with RV-A.

Our results, together with the fact that all hospital surfaces had at least one RV-A-positive sample during the study period, no patients had diarrhea, and only adults circulated within this ICU, suggests that the presence of RV-A is due to contamination of the environment by asymptomatic adults, probably health care workers, relatives, and visitors, as reported in previous studies.^{8,12,19–22} This leads to an increased risk of a patient becoming contaminated through contact with these surfaces, and indicates that handwashing was not being performed properly. These results are in agreement with previous reports demonstrating that norovirus contamination in a hospital was associated with the traffic of relatives in the unit and suggesting that handwashing was not being done appropriately.^{7,8} The adoption of training in proper handwashing techniques for health professionals, relatives, and visitors could minimize both the direct and indirect transmission of these viruses.¹¹

Interestingly, the significant decrease in the percentage of RV-A-positive samples observed between March and June corresponds to the period of highest incidence of RV-A gastroenteritis in Brazil, the autumn and winter seasons. Suggesting that the reduction in the frequency of RV-A-positive samples from hospital surfaces was due to changes in the cleaning agent (ethanol 70% to Viskon) and cleaning crews contracted by the hospital administration after they became aware of the results obtained during the first 2 months of the study. Furthermore, the Hospital Infection

Table 1
Monthly detection of RV-A by nested RT-PCR from environmental surface samples from a hospital ICU in Rio de Janeiro

| Sampling location ^a | Month | | | | | | Total +/- (range) ^b |
|--------------------------------|----------|----------|--------------------|--------|----------|--------|--------------------------------|
| | January | February | March ^c | April | May | June | |
| Keyboard infusion pump | +2 R | +1 R | +1 R | - | - | - | 4 (38) |
| Interior door handle | +3 R | +2 R | +1 R | - | - | - | 6 (148) |
| Telephone | +1 R | +1 R | +1 R | - | - | - | 3 (78) |
| Coffee support table | +2 R | - | - | - | +1 R | - | 3 (78) |
| Exterior bathroom door handle | +2 R | +3 R | - | - | - | - | 5 (128) |
| Alcohol gel support | +6 R | +4 R | - | - | - | +1 R | 11 (208) |
| Chlorhexidine support | +3 R | +5 R | - | - | - | - | 8 (198) |
| Gown on trash bin cover | +2 R | +5 R | - | - | - | +1 R | 8 (198) |
| TV remote control | - | +1 R | - | - | +2 R | - | 3 (78) |
| Bed control | +1 R | - | - | +1 R | +3 R | - | 5 (128) |
| Flushing button | +2 R | +1 R | +1 R | +2 R | +3 R | - | 9 (218) |
| Companion chair | +2 R | +1 R | - | +4 R | +1 R | - | 8 (198) |
| Total +/- month | 26 (318) | 24 (288) | 4 (58) | 7 (88) | 10 (128) | 2 (28) | 73 (904 (148)) |

+, positive samples; -, negative samples; R, positive rooms.

^a Twelve samples were collected from each of 7 rooms.

^b The cleaning protocol was changed during this month.

^c Forty-two samples were collected from each fornice.

Committee Control started offering new training for cleaning staff and health care workers.

These data emphasize the significant potential impact of strictly applied cleaning measures and education and demonstrate that routine monitoring for environmental contamination by gastroenteric virus in hospitals may be an effective way to manage the cleaning of the hospital environment and prevent outbreaks.

Detection of RV-A on surfaces in hospital rooms that did not have any patients implies noncompliance with effective cleaning protocols and strengthens the results of a previous study demonstrating that RV-A might persist on surfaces for more than 60 days.²¹ It is important to emphasize that all protocols for hospital cleaning be performed daily and that after patients leave the hospital, individual rooms undergo a more rigorous disinfection process.

The isolation of viruses from hospital environmental samples was not performed in previous studies.^{6-9,11} Although molecular methodologies are currently the most widely used techniques for detecting viruses from hospital surfaces, they are unable to distinguish between infectious and noninfectious viral particles.²³ The detection of genomic RNA by molecular techniques suggests the presence of intact viral particles.²⁴ Thus, molecular biology techniques are more sensitive to detection of gastroenteric viruses on hospital surfaces.²⁵

The isolation of RV-A in MA-104 cells showed that these viruses can remain infectious even on sanitized hospital surfaces and when exposed to adverse environmental conditions. The presence and infectivity demonstrated in the present study indicates that a surface contaminated with RV-A may play a role in the spread of these viruses and could be a potential source of nosocomial infection.

The environmental monitoring of gastroenteric viruses on surfaces and equipment in hospitals can reduce the risk of patients acquiring these viruses, as well as other pathogens. Monitoring is recommended in situations where a viral infection will cause great risk to a patient, for example, after bone marrow transplantation or while in an immunocompromised state. This type of monitoring would be relevant to the pediatric ICU given the significant epidemiologic importance of RV-A in children under age 5 years, especially those who are immunocompromised.^{26,27}

The results of the present study, coupled with the physical and chemical properties of RV-A, imply that this virus could be a good biomarker for contamination of hospital surfaces. In light of these findings, further studies are merited to examine the efficacy of the cleaning protocols and products used to disinfect hospital surfaces.

Acknowledgment

We thank Mariela Martinez and Marcelle Riquelme for their critical reading of the manuscript.

References

- Cramer E, Humphreys H. The contribution of beds to healthcare-associated infection: the importance of adequate decontamination. *J Hosp Infect* 2008; 69:3-23.
- Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften (AWMF) Working Group for Hygiene in Hospital and Practice. Hygienic processing of hospital beds. *Krankenhaushygiene, Hygiene in hospital and practice*. 3rd ed. Wiesbaden [Germany]: MBP-Verlag; 2005. p. 157-61.
- Ayllón CAJ, Peake AP, Geddes AM, Mitchell K. Control of hospital infection: A practical handbook. 4th ed. London: Arnold; 2000.
- Sattar SA. Microbicides and the environmental control of nonbacterial viral infections. *J Hosp Infect* 2004;56(Suppl 2):564-9.
- Kramer A, Schwelke I, Kampf G. How long do nosocomial pathogens persist on inanimate surfaces? A systematic review. *BMC Infect Dis* 2006;6:130.
- Gallimore CI, Cubitt D, du Plessis N, Gray J. Asymptomatic and asymptomatic excretion of norovirus during a hospital outbreak of gastroenteritis. *J Clin Microbiol* 2004;42:2271-4.
- Gallimore CI, Taylor C, Gemmery AR, Cant AJ, Galloway A, Lewis D, et al. Use of a hermetic reverse-transcriptase PCR assay for detection of astrovirus in environmental swabs from an outbreak of gastroenteritis in a pediatric primary immunodeficiency unit. *J Clin Microbiol* 2005;43:3890-4.
- Gallimore CI, Taylor C, Gemmery AR, Cant AJ, Galloway A, Ibarra-Gonzalez M, et al. Environmental monitoring for gastroenteric viruses in a pediatric primary immunodeficiency unit. *J Clin Microbiol* 2006;44:395-9.
- Gallimore CI, Taylor C, Gemmery AR, Cant AJ, Galloway A, Xerry J, et al. Contamination of the hospital environment with gastroenteric viruses: comparison of two pediatric wards over a winter season. *J Clin Microbiol* 2008; 46:3112-5.
- Razutka A, Cook N. Survival of human enteric viruses in the environment and food. *FEMS Microbiol Rev* 2004;28:441-53.
- Souk H, Genssler O, Gratacap-Cavallier B, Mallaret MR, Mosand P, François P, et al. Monitoring rotavirus environmental contamination in a pediatric unit using polymerase chain reaction. *Infect Control Hosp Epidemiol* 1999;24: 432-4.
- Ramoni S, Arunagan R, Gopalakrishnan N, Mohanty I, Mathew S, Gladstone BP, et al. Investigation of the environment and of mothers in transmission of rotavirus infections in the neonatal nursery. *J Med Virol* 2008; 80:1089-105.
- Bloom R, Sol CJ, Salzman MM, Jensen CL, Werthman-van Dillen PM, van der Noordse J. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *J Clin Microbiol* 1980;23:495-503.
- Ferreira MS, Kayser FH, Pariani TM, Victoria M, Oliveira SA, Pena LH, et al. Acute gastroenteritis cases associated with norovirus infection in the state of Rio de Janeiro. *J Med Virol* 2008;80:338-44.
- Ibarra-Gonzalez M, Wong C, Bieme S, Denzelberger U, Gray J. Molecular characterization of VP6 genes of human rotavirus isolates: correlation of genogroups with subgroups and evidence of independent segregation. *J Virol* 2002;76:6596-601.

16. Zeng XJ, Halkosalo A, Salminen M, Saikaj ED, Paustinen L, Vartiainen T. One-step quantitative RT-PCR for the detection of rotavirus in acute gastroenteritis. *J Virol Methods* 2008;153:238–40.
17. Arnold M, Patton JT, McDonald SM. Counting, storage, and quantification of rotaviruses. *Curr Protoc Microbiol* 2009;15:Unit 15C.3.
18. Bisset JR. Correct use of insecticides: management of resistance. *Rev Cubana Med Trop* 2002;54:202–19.
19. Sattar SA, Lloyd-Evans N, Springthorpe VS, Nair RC. Institutional outbreaks of rotavirus diarrhoea: potential role of fomites and environmental surfaces as vehicles for virus transmission. *J Hyg (Lond)* 1986;96:277–89.
20. Horn H, Kohlihaas B. Asymptomatic excretion of rotavirus. *Infection* 1989;14:163–6.
21. Barnes GL, Callaghan SL, Kirkwood CD, Bogdanovic-Salazar N, Johnston LJ, Bishop RF. Excretion of serotype G1 rotavirus strains by asymptomatic staff: a possible source of nosocomial infection. *J Pediatr* 2003;142:722–5.
22. Phillips G, Lopman B, Rodrigues IC, Tam CC. Asymptomatic rotavirus infections in England: prevalence, characteristics, and risk factors. *Am J Epidemiol* 2010;171:3023–30.
23. Fong TT, Lipp EK. Enteric viruses of humans and animals in aquatic environments: health risks, detection, and potential water quality assessment tools. *Microbiol Mol Biol Rev* 2005;69:357–71.
24. Haramoto E, Katayama H, Oguma K, Ohgaki S. Recovery of naked viral genomes in water by virus concentration methods. *J Virol Methods* 2007;142:169–73.
25. Tsai YS, Tran B, Senggermano LR, Palmer CJ. Detection of poliovirus, hepatitis A virus, and rotavirus from sewage and ocean water by triplex reverse-transcriptase PCR. *Appl Environ Microbiol* 1994;60:2400–7.
26. PancharUD, Bessae J, Gentsch JR, Glass RI. Rotavirus. *Emerg Infect Dis* 1998;4:561–70.
27. PancharUD, Hamelmann EC, Bessae J, Miller AM, Glass RI. Global illness and deaths caused by rotavirus disease in children. *Emerg Infect Dis* 2003;9:565–71.

Artigo 2

Viabilidade dos Adenovirus Humanos dos fômites hospitalares.

Viability of Human Adenovirus from Hospital Fomites

Ana Carolina Ganime,^{1*} Filipe A. Carvalho-Costa,¹ Marisa Santos,² Rubens Costa Filho,² José Paulo G. Leite,¹ and Marize P. Miagostovich¹

¹Laboratory of Comparative and Environmental Virology, Oswaldo Cruz Institute, Oswaldo Cruz Foundation, Rio de Janeiro, Brazil

²National Institute of Cardiology, Rio de Janeiro, Brazil

³Pró-Cardíaco Hospital, Rio de Janeiro, Brazil

The monitoring of environmental microbial contamination in healthcare facilities may be a valuable tool to determine pathogens transmission in those settings; however, such procedure is limited to bacterial indicators. Viruses are found commonly in those environments and are rarely used for these procedures. The aim of this study was to assess distribution and viability of a human DNA virus on fomites in an Adult Intensive Care Unit of a private hospital in Rio de Janeiro, Brazil. Human adenoviruses (HAdV) were investigated in 141 fomites by scraping the surface area and screening by quantitative PCR (qPCR) using TaqMan[®] System (Carlsbad, CA). Ten positive samples were selected for virus isolation in A549 and/or HEp2c cell lines. A total of 63 samples (44.7%) were positive and presented viral load ranging from 2.48×10^1 to 2.1×10^3 genomic copies per millilitre (gc/ml). The viability was demonstrated by integrated cell culture/nested-PCR in 5 out of 10 samples. Nucleotide sequencing confirmed all samples as HAdV and characterized one of them as specie B, serotype 3 (HAdV-3). The results indicate the risk of nosocomial transmission via contaminated fomites and point out the use of HAdV as biomarkers of environmental contamination. **J. Med. Virol.**

© 2014 Wiley Periodicals, Inc.

KEY WORDS: adenovirus; viability; fomites; hospital; biomarker

INTRODUCTION

Studies performed in hospitals have described the transmission of pathogens through contact with contaminated fomites in these environments [Gallimore et al., 2004, 2005, 2006, 2008; Goodman et al., 2008;

Carducci et al., 2011; Ganime et al., 2012]. Particularly, in the case of viruses, experimental and epidemiological studies indicate that hospital surfaces could play an important role in the spreading of human adenoviruses (HAdV), group A rotaviruses (RVA), and noroviruses (NoV) suggesting that they might be responsible for 15–30% of nosocomial infections [Soule et al., 1999; Gallimore et al., 2004, 2005, 2006, 2008; Lopman et al., 2004; Rzesutka and Cook, 2004; Sattar, 2004; Goodman et al., 2008; Carducci et al., 2011; Ganime et al., 2012].

Procedures carried out in healthcare facilities could be one of the main sources of viral dissemination, causing considered impact on human health [Tuladar et al., 2012]. In those settings, blood-borne, air borne and viruses transmitted via the fecal-oral route could be easily transmitted by accidents with infected needles or sharp objects or spread by contamination of air, hands, and fomites [Aitken and Jeffries, 2001; Lopman et al., 2004; Davanzo et al., 2008].

Grant sponsor: Brazilian National Council for Scientific and Technological Development (CNPq); Grant sponsor: Oswaldo Cruz Institute (IOC-Fiocruz); Grant sponsor: Program of Research Excellence (PROEP); Grant sponsor: Carlos Chagas Filho Foundation for Research Support of the state of Rio de Janeiro (FAPERJ); Grant sponsor: Instituto Oswaldo Cruz—IOC, Cellular and Molecular Biology Program

This research study is under the scope of the activities of Fiocruz as a collaborating centre of PAHO/WHO of Public and Environmental Health.

Conflict of Interest: The authors inform that they do not have any conflict of interest.

Ethical Approval: This project was approved by the Hospital's Ethics Committee under number 275/2008.

*Correspondence to: Ana Carolina Ganime, Avenida Brasil, 4365, Pav. Hélio & Peggy Pereira, Marquinhos, Rio de Janeiro 21040-360, Brazil. E-mail: acganime@ioc.fiocruz.br

Accepted 27 January 2014

DOI 10.1002/jmv.23907

Published online in Wiley Online Library
(wileyonlinelibrary.com).

© 2014 WILEY PERIODICALS, INC.

The monitoring of environmental microbial contamination in healthcare services could be a valuable tool to determine the means of transmission. However, this monitoring is usually limited to bacterial indicators and viruses are rarely used, even being common pathogens in hospitals and healthcare settings [Sattar, 2004; Creamer and Humphreys, 2008; Carducci et al., 2011; Ganime et al., 2012].

When compared with RNA viruses, DNA viruses are known to be more stable as they are considered good indicators of viral contamination in environmental samples [Puig et al., 1994; Horwitz, 1996; Pina et al., 1998; Bofill-Mas et al., 2000; Thurston-Enriquez et al., 2003; Carducci et al., 2011]. Particularly, human adenoviruses (HAdV) present several characteristics that qualify them as good viral indicators considering their resistance to environmental stressors, transmission by different routes, and also for not exhibiting seasonality [Myrmet et al., 2006; Haramoto et al., 2007a,b; Katayama et al., 2008]. Additionally, they could be replicated in several cell lines such as A549, HeLa, HEK 293, and HEp-2, among others enabling studies of infectivity and risk assessment [Leite et al., 1985; Rigotto et al., 2005; Filho et al., 2007; Cromeans et al., 2008]. Therefore, the aim of the present report was to investigate HAdV dissemination and viability in fomites obtained in a private hospital in Rio de Janeiro, Brazil. Results of previous investigations on rotavirus A (RVA) using the same samples were published elsewhere and were used to design this study [Ganime et al., 2012].

METHODS

Sampling Procedures

Samples were obtained from fomites available on seven rooms of an Adult Intensive Care Unit of a private hospital in Rio de Janeiro with the capacity to treat any medical-surgical condition. Sampling was carried out between January and June 2009. The Adult Intensive Care Unit provides privacy and surveillance in seven individual rooms, each one with individual ventilation and air filtration systems.

All hospital cleaning protocols are performed twice a day routinely, emphasizing that after discharge of the patient's, the room undergoes a more rigorous process of disinfection. Weekly, the hospital performs track of colonization of mechanically ventilated patients, by surveying methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), *Acinetobacter baumannii* (MDR), and gram-negative *bacillus* (BGN) using tracheal and rectal swabs.

The sites were chosen to represent areas commonly in contact with hands. At least 50% of fomite areas (e.g., companion chairs) were scraped with swabs and dipped in Dubecco's modified eagle's medium (DMEM—Gibco[®], Grand Island, NY), pH 7.2, as described previously [Ganime et al., 2012]. HAdV were investigated in 141 samples, 73 previously

positive for RVA, and 68 negative for RVA that were selected randomly [Ganime et al., 2012].

Controls

HAdV type 2 and DMEM were used as positive and negative controls, respectively, for all methodologies used [Leite et al., 1985]. To avoid cross-contamination, all molecular and cell cultures procedures were performed in different rooms, with UV decontamination.

Nucleic Acids Extraction of Swab

For nucleic acid extraction, guanidinium thiocyanate-silica method was adapted as described previously [Boom et al., 1990; Gallimore et al., 2004].

Human Adenovirus Detection and Quantification

Nucleic acids extracted from swabs were quantified using TaqMan[®] qPCR, targeting the conserved region segment of the first HAdV hexon gene part [Hennroth et al., 2002].

Virus Viability Assay

Samples presenting a high genomic quantification by TaqMan[®] qPCR cycle threshold (Ct) <38 were selected for investigation of viral viability using the integrated cell culture/nested-PCR (ICC/nPCR) assay. HAdV strains were propagated into 80–90% confluent A549 and HEp2c cell lines supplemented with 2% FBS as described previously [Cromeans et al., 2008]. Nested-PCR was performed targeting a segment from the conserved region of the HAdV hexon gene to confirm HAdV isolation [Allard et al., 2001].

Nucleotide Sequencing

Purified DNA obtained from nested-PCR products were sequenced in both directions using Nehex3deg and Nehex4deg primers [Allard et al., 2001]. Generation of contiguous sequences and pairwise alignments of the HAdV hexon gene 171 bp inter-primer region were performed at the Platform for DNA Sequencing (PDTIS; Oswaldo Cruz Foundation, Rio de Janeiro, Brazil).

Statistical Analysis

Statistical analysis was performed using the chi-square test as implemented by Epi info[®] software, version 3.5.1, and the two-tailed Fisher's exact test. The threshold for statistical significance was $P < 0.05$.

RESULTS

Sixty-three out of 141 (44.7%) fomites were positive for HAdV using TaqMan[®] qPCR. The viral load ranged from 2.48×10^1 to 2.1×10^3 genomic copies per millilitre (gc/ml). The Chlorhexidine[®] dispensers presented the highest viral load (2.1×10^3 gc/ml),

although the most frequently contaminated surface was the common trash bin covers followed by the TV remote control.

The analysis of fomites from rooms showed that HAdV was detected in all seven rooms of the Adult Intensive Care Unit, with a detection percentage ranging from 12.7 to 19%. The room that presented the highest percentage of detection (19%) was located farther from the room occupied by the medical staff.

Table I summarizes the results obtained in the present study compared with RVA previous detection showing a mixed contamination in 31.2% (44/141) of analyzed samples. The statistical analysis demonstrated that the probability of a sample to be HAdV positive is 2.16 times ($P < 0.05$) higher when it is also RVA positive.

The rate of HAdV detection in the first months of the study (January [25/45, 55.6%] and February [32/34, 94.1%]) was significantly higher than in the following months: March (1/16, 6.3%), April (2/12, 16.7%), May (1/20, 5%), and June (2/14, 14.3%) ($P < 0.05$).

HAdV were isolated from 5 out of 10 investigated samples using A549 and/or HEp2c cell lines. Two samples, collected from telephone handles and common trash bin covers, demonstrated viability by ICC/nPCR using A549 cell line. The samples collected from the common trash bin covers could be isolated in both cell lines (A549 and HEp2c). Samples collected from alcohol gel dispensers ($n = 2$) and Chlorhexidine[®] dispensers ($n = 1$) were isolated in HEp2c cell line.

All isolates were confirmed as HAdV by nt sequencing presenting blast homology ranging from 96% to 98%, one of which characterized as specie B, serotype 3 (HAdV-3).

DISCUSSION

The percentage and concentration of HAdV detected on fomites are consistent with previous data concerning their stability in environmental samples [Rutala et al., 2006; Carducci et al., 2011]. HAdV have been described as resistant to environmental stressors as disinfectants when deposited on fomites, recovered from dry inanimate surfaces from 7 days to 3 months [Kramer et al., 2006; Rutala et al., 2006].

In this study, environmental mixed contamination with HAdV and RVA was demonstrated corroborating data that shows mixed infection on hospital surfaces with gastroenteric viruses [Gallimore et al., 2006]. Virus survival on surfaces depends on several conditions although the most important contribution so far is the type of material/fluid in which it is discharged [Sattar, 2004]. Additionally, the type of surface can also influence the detection of these viruses. Abad et al. [1994] show that RVA persists longer than enteric HAdV when dried on porous and non-porous fomites. That information was not evaluated in this study, but may explain the presence of RVA in HAdV negative samples.

A significant decrease in the percentage of HAdV detection ($P < 0.05$) from March onwards was similar to the one previously observed for RVA [Ganime et al., 2012], although the detection of HAdV was significantly higher ($P < 0.05$) than the RVA in the first 2 months of the investigation (January and February). That reduction resulted from changing of both cleaning and disinfection procedures after finding RVA spread in hospital settings [Ganime et al., 2012]. The change of strategy in cleaning procedures resulted not only in the decrease of viral contamination, but also in the control of hospital infections by *Acinetobacter* spp. (data not shown). Those data emphasize the importance of preventive and corrective measures to reduce both direct and indirect transmission of microorganisms. Wilhelmi et al. [2003] support that hand hygiene before and after contact with patients or with objects that may be contaminated, as essential to disinfect contaminated surfaces. Training techniques of hand washing, for healthcare professionals, relatives, and visitors should be frequently provided especially those who attend any Intensive Care Unit [Soule et al., 1999]. This finding is supported by Ansari et al. [1988] who stated that the hands can donate or receive virus during occasional contact with animate and inanimate surfaces.

The negligence in cleaning procedures and the lack of compliance in hand hygiene was noted in this study. HAdV was detected in all rooms investigated; however, the fact that the most frequently contaminated room were the ones located away from the medical staff revealing non-compliance with effective cleaning protocols caught our attention. This kind of human behavior could explain why the common trash bin covers were the most frequently contaminated surfaces with HAdV. Such observation led us to confirm the incorrect use of the trash bin by relatives, visitors, and health professionals, when making the use of the hands to open the trash bin covers instead of the pedal. The qPCR results also revealed that Chlorhexidine[®] dispensers presented the highest viral load, corroborating data that suggest that health professionals are not compliant with proper hand washing using soap and water [Soule et al., 1999; Gallimore et al., 2005, 2008; Kramer et al., 2006; Ganime et al., 2012].

The isolation of HAdV and RVA from fomites indicate that these viruses remain infectious and should be useful to monitor environmental contamination. The higher percentage of HAdV detection together with the availability of cells for their isolation, suggests the use of HAdV as an indicator of viral contamination of fomites. Despite the isolation of enteric HAdV (specie F [40 and 41]) is considered a difficult procedure to be carried out when compared to other HAdV species [Bigotto et al., 2011], G293 and A549 cell lines have been described for isolating and propagating these viruses [Cromeans et al., 2008]. RVA is known as a fastidious virus and its isolation

TABLE 1. Human Adenovirus Detection in Fomites Obtained in an Adult Intensive Care Unit

| RVA | Fomites | | | | | | | | | | | Total | |
|----------|--------------------------|--------------|-------------|------------|------------|------------|-------------|--------------|-------------|------------|-------------|-------------|---------------|
| | TFB | OCH | BC | TBC | CST | BDH | IDR | AGS | CD | KIP | TE | | TBC |
| HAdV (+) | 3/13 (7.7%) | 2/19 (10.5) | 2/11 (18.2) | 3/7 (42.8) | 0/9 | 0/8 | 1/13 (7.3) | 3/17 (17.6) | 0/14 | 3/8 (37.5) | 2/10 (20.0) | 2/12 (16.7) | 19/141 (13.5) |
| (-) | 3/13 (23.3) | 3/19 (15.8) | 0/11 | 2/7 (28.6) | 2/9 (22.2) | 4/8 (50.0) | 4/13 (30.8) | 7/17 (41.2) | 8/14 (57.1) | 2/8 (25.0) | 2/10 (20.0) | 7/12 (58.3) | 44/141 (31.2) |
| Total | 4/13 (30.8) | 5/19 (26.3) | 2/11 (18.2) | 5/7 (71.4) | 2/9 (22.2) | 4/8 (50.0) | 5/13 (38.5) | 10/17 (58.8) | 8/14 (57.1) | 5/8 (62.5) | 4/10 (40.0) | 9/12 (75.0) | 63/141 (44.7) |
| HAdV (-) | 3/13 (23.3) ^b | 9/19 (47.4) | 4/11 (36.4) | 1/7 (14.3) | 6/9 (66.7) | 3/8 (37.5) | 6/13 (46.1) | 3/17 (17.7) | 6/14 (42.9) | 1/8 (12.5) | 5/10 (50.0) | 2/12 (16.7) | 49/141 (34.7) |
| (+) | 6/13 (46.3) | 5/19 (26.3) | 5/11 (45.4) | 1/7 (14.3) | 1/9 (11.1) | 1/8 (12.5) | 2/13 (15.4) | 4/17 (23.5) | 0/14 | 2/8 (25.0) | 1/10 (10.0) | 1/12 (8.3) | 29/141 (20.6) |
| Total | 9/13 (69.2) | 14/19 (73.7) | 9/11 (81.8) | 2/7 (28.6) | 7/9 (77.8) | 4/8 (50.0) | 8/13 (61.5) | 7/17 (41.2) | 6/14 (42.9) | 3/8 (37.5) | 6/10 (60.0) | 3/12 (25.0) | 78/141 (55.3) |

RVA, group A adenovirus; HAdV, human adenovirus; TFB, table flush buttons; BC, bed controls; TBC, TV remote controls; CST, coffee support tables; BDH, entrance bathroom door handles; IDR, intensive door handles; AGS, alcohol gel supports; CD, Chlorhexidine® dispensers; KIP, keyboard infusions pumps; TE, telephones; TBC, common touch bin covers; (+) positive sample; (-), negative sample.
^a No gastrofomites samples (0%).
^b No gastrofomites samples (0%).

requires long-time procedures [Kapikian et al., 2001; Ganime et al., 2012].

Nucleotide sequencing confirms HAdV isolation and sorting serotype 3 by molecular analysis. HAdV-3 is often associated with eye infections and severe cases of bronchiolitis and pneumonia [Tian et al., 2011]. Molecular technologies have been described as useful tools for viruses' detection mainly due to their rapidity and easiness when compared to classic detection of virus isolation in cell culture, although unable to distinguish between infectious and non-infectious viral particles [Parahar et al., 1998; Haramoto et al., 2007a,b]. RVA and HAdV isolation from fomites trialed previously by molecular techniques highlights the use of those methods for monitoring viruses' contamination of hospital fomites allowing inferring infectivity for risk assessment studies.

HAdV is associated with various diseases in adults and children, such as pneumonia, acute gastroenteritis, and epidemic keratoconjunctivitis, and despite different transmission paths, all serotypes are eliminated in the feces fostering fomites contamination by several species [Greening, 2006; Kramer et al., 2006; Rutala et al., 2006; Matsushima et al., 2012; Rodriguez-Lázaro et al., 2012]. Its investigation is particularly important in hospitals that admit immunocompromised patients and neonatal Intensive Care Unit as described by Pham et al. [2003] showing that severe and fatal HAdV infections are not infrequent, particularly among the immunocompromised population. Kéley [2010] and Henquell et al. [2009] reported fatal cases of pre-term infants with disseminated HAdV infection.

CONCLUSION

Considering the detection and isolation of HAdV and the totality of information, HAdV could be inferred as biomarkers for hospital fomites, as they can also be valuable to test the effectiveness of preventive measures and hygiene levels from hospital fomites, in order to alert healthcare professionals to the need of prevention measures and to ensure their compliance.

REFERENCES

- Ahad FX, Pinta RM, Booth A. 1994. Survival of enteric viruses on environmental fomites. *Appl Environ Microbiol* 60:3704-3710.
- Aitken C, Jeffries DJ. 2001. Nosocomial spread of viral diseases. *Clin Microbiol Rev* 14:528-546.
- Allard A, Althausen R, Wadell G. 2001. Rapid typing of human adenoviruses by a general PCR combined with restriction endonuclease analysis. *J Clin Microbiol* 39:496-505.
- Anzari SA, Sattar SA, Springthorpe VS, Wells GA, Todorowicz W. 1988. Rotavirus survival on human hands and transfer of infectious virus to animate and inanimate surfaces. *J Clin Microbiol* 26:1513-1518.
- Bofill-Mas S, Pina S, Girones R. 2000. Documenting the epidemiologic patterns of polyomaviruses in human populations by studying their presence in urban sewage. *Appl Environ Microbiol* 66:238-245.
- Room R, Sol GJ, Salimans MM, Jansen CL, Wertheim-van Dillen PM, van der Noorden J. 1990. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *J Clin Microbiol* 28:495-503.

- Carducci A, Verani M, Lombardi R, Casini R, Privitera G. 2011. Environmental survey to assess viral contamination of air and surfaces in hospital settings. *J Hosp Infect* 77:343-347.
- Comar E, Humphreys H. 2008. The contribution of beds to healthcare-associated infection: The importance of adequate decontamination. *J Hosp Infect* 69:8-23.
- Commins TL, Lu X, Erdman DD, Humphrey CD, Hill VR. 2008. Development of plaque assays for adenoviruses 40 and 41. *J Virol Methods* 151:140-145.
- Davanzo E, Frasson C, Mondini M, Trevisan A. 2008. Occupational blood and body fluid exposure of university health care workers. *Am J Infect Control* 36:753-756.
- Filho EP, da Costa Paiva NR, Fialho AM, de Assis RS, Almeida MM, Rocha M, Galvão M, dos Santos FR, Barreto ML, Leite JP. 2007. Adenoviruses associated with acute gastroenteritis in hospitalized and community children up to 5 years old in Rio de Janeiro and Salvador, Brazil. *J Med Microbiol* 56:313-319.
- Gallimore CI, Oxbitt D, du Plessis N, Gray JJ. 2004. Asymptomatic and symptomatic excretion of noroviruses during a hospital outbreak of gastroenteritis. *J Clin Microbiol* 42:2271-2274.
- Gallimore CI, Taylor C, Gennary AR, Cant AJ, Galloway A, Lewis D, Gray JJ. 2005. Use of a heminested reverse transcriptase PCR assay for detection of adenovirus in environmental swabs from an outbreak of gastroenteritis in a pediatric primary immunodeficiency unit. *J Clin Microbiol* 43:3890-3894.
- Gallimore CI, Taylor C, Gennary AR, Cant AJ, Galloway A, Ibarra-Gonzalez M, Gray JJ. 2006. Environmental monitoring for gastroenteric viruses in a pediatric primary immunodeficiency unit. *J Clin Microbiol* 44:396-399.
- Gallimore CI, Taylor C, Gennary AR, Cant AJ, Galloway A, Xerry J, Adigwe J, Gray JJ. 2006. Contamination of the hospital environment with gastroenteric viruses: Comparison of two pediatric wards over a winter season. *J Clin Microbiol* 46:3112-3115.
- Gonins AC, Carvalho-Costa FA, Mendonça MC, Vieira CR, Santos M, Costa Filho R, Miagostovich MP, Leite JP. 2012. Group A rotavirus detection on environmental surfaces in a hospital intensive care unit. *Am J Infect Control* 40:544-547.
- Goodman ER, Platt R, Baw R, Oosterdonk AB, Yokoe DS, Huang SS. 2008. Impact of an environmental cleaning intervention on the presence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and vancomycin-resistant enterococci on surfaces in intensive care unit rooms. *Infect Control Hosp Epidemiol* 29:893-899.
- Greening GH. 2006. Human and animal viruses in food (including taxonomy of enteric virus). In: Goyal SM, editor. *Virus in foods*, 1st edition. St. Paul, USA: University of Minnesota, pp 28-29.
- Hamamoto E, Katayama H, Oguma K, Ohgaki S. 2007a. Quantitative analysis of human enteric adenoviruses in aquatic environments. *J Appl Microbiol* 103:2153-2159.
- Hamamoto E, Katayama H, Oguma K, Ohgaki S. 2007b. Recovery of naked viral genomes in water by virus concentration methods. *J Virol Methods* 142:169-173.
- Henquell C, Bouif B, Mirand A, Bucher C, Traou O, Dichakite P, Labbi A, Bailli JI, Peugeot-Lafeuille H. 2009. Fetal adenovirus infection in a neonate and transmission to health-care workers. *J Clin Virol* 45:345-348.
- Herzoth BE, Conden-Hansen AC, Rehnsten-Holm AS, Girones R, Allard AR. 2002. Environmental factors influencing human viral pathogens and their potential indicator organisms in the blue mussel, *Mytilus edulis*: The first Scandinavian report. *Appl Environ Microbiol* 68:4523-4533.
- Horwitz MS. 1996. Adenoviruses. In: Fields BN, Knipe DM, Howley PM, editors. *Fields virology*, 3rd edition. Philadelphia, PA: Lippincott-Raven Publishers, pp 2149-2171.
- Kapikian AZ, Hoshino Y, Chanock RM. 2001. Rotaviruses. In: Fields BN, Knipe DM, Howley PM, editors. *Fields virology*, 4th edition. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins Publishers, pp 1787-1893.
- Katayama H, Hamamoto E, Oguma K, Yamashita H, Tajima A, Nakajima H, Ohgaki S. 2008. One-year monthly quantitative survey of noroviruses, enteroviruses, and adenoviruses in wastewater collected from six plants in Japan. *Water Res* 42:1441-1448.
- Kelley CJ. 2010. A fetal case of neonatal adenovirus infection. *Neonatal Netw* 29:297-305.
- Kramer A, Schwelke I, Kampf G. 2006. How long do nosocomial pathogens persist on inanimate surfaces? A systematic review. *BMC Infect Dis* 6:130.
- Leite JP, Pereira HG, Azeredo RS, Schatzmayr HG. 1985. Adenoviruses in faeces of children with acute gastroenteritis in Rio de Janeiro, Brazil. *J Med Virol* 15:203-209.
- Lopman BA, Becher MH, Vipond IB, Hill D, Perry C, Halliday T, Brown DW, Edmunds WJ, Sarangi J. 2004. Epidemiology and cost of nosocomial gastroenteritis, Avon, England, 2002-2003. *Emerg Infect Dis* 10:1827-1834.
- Matsumura Y, Shimizu H, Kano A, Nakajima E, Ishimaru Y, Dey SK, Watanabe Y, Adachi F, Suzuki K, Mitsu K, Fujimoto T, Phan TG, Ushijima H. 2012. Novel human adenovirus strain. *Bangladesh Emerg Infect Dis* 18:848-848.
- Myrland M, Berg EMM, Grinde B, Rimstad E. 2006. Enteric viruses in inlet and outlet samples from sewage treatment plants. *J Water Health* 4:197-209.
- Parashar UD, Brunsen JS, Gentsch JR, Glass RI. 1996. Rotavirus. *Emerg Infect Dis* 4:561-670.
- Pham TT, Barchette JL, Jr, Hale LP. 2003. Fetal disseminated adenovirus infections in immunocompromised patients. *Am J Clin Pathol* 120:575-583.
- Pina S, Puig M, Lucena F, Jofre J, Girones R. 1998. Viral pollution in the environment and in shellfish: Human adenovirus detection by PCR as an index of human viruses. *Appl Environ Microbiol* 64:3376-3382.
- Puig M, Jofre J, Lucena F. 1994. Detection of adenovirus and enteroviruses in polluted waters by nested PCR amplification. *Appl Environ Microbiol* 60:2963-2970.
- Rigotto C, Simões TC, Simões CM, Barardi CR. 2005. Detection of adenoviruses in shellfish by means of conventional PCR, nested-PCR, and integrated cell culture PCR (ICC/PCR). *Water Res* 39:297-304.
- Rigotto C, Hanley K, Rochelle PA, De Leon R, Barardi CRM, Yates MV. 2011. Survival of adenovirus types 2 and 41 on surface and ground waters measured by plaque assay. *Environ Sci Technol* 45:4145-4150.
- Rodríguez-Lázaro D, Cook N, Ruggeri FM, Sellwood J, Nasser A, Nascimento MS, D'Agostino M, Santos R, Ruiz JC, Rosztuka A, Bosch A, Girones R, Carducci A, Muscillo M, Kováč K, Diaz-Vallurias M, Vantarakis A, van Renswouff CH, de Roda Husman AM, Heemster M, van der Poel WH. 2012. Virus hazards from food, water and other contaminated environments. *FEMS Microbiol Rev* 36:788-814.
- Rutala WA, Peacock JR, Geryn MF, Schweg MD, Weber DJ. 2006. Efficacy of hospital germicides against adenovirus 8, a common cause of epidemic keratoconjunctivitis in health care facilities. *Antimicrob Agents Chemother* 50:1419-1424.
- Ruzmitka A, Cook N. 2004. Survival of human enteric viruses in the environment and food. *FEMS Microbiol Rev* 28:441-453.
- Safer SA. Microbicides and the environmental control of nosocomial viral infections. *J Hosp Infect* 2004. 56:564-569.
- Soule H, Genoular O, Gratacap-Cuvellier B, Mallaret MR, Morand P, Fmangis P, Lou Duc Bin D, Charrier A, Bost-Bru C, Seignourin JM. 1999. Monitoring rotavirus environmental contamination in a pediatric unit using polymerase chain reaction. *Infect Control Hosp Epidemiol* 20:432-434.
- Thurston-Enriquez JA, Haase CN, Jacekzoh J, Gerba CP. 2003. Inactivation of feline calicivirus and adenovirus type 40 by UV radiation. *Appl Environ Microbiol* 69:577-582.
- Tian X, Su X, Li H, Li X, Zhou Z, Liu W, Zhou R. 2011. Construction and characterization of human adenovirus serotype 3 packaged by serotype 7 genome. *Virus Res* 160:214-220.
- Tuladar F, Hazebeger WC, Koopmans M, Zwietering MH, Beumer RR, Duizer E. 2012. Residual viral and bacterial contamination of surfaces after cleaning and disinfection. *Appl Environ Microbiol* 78:7760-7775.
- Wiltzini I, Roman E, Sanchez-Fuquier A. 2003. Viruses causing gastroenteritis. *Clin Microbiol Infect* 9:247-262.

Artigo 3

Dispersão de vírus gastroentéricos em fômites de diferentes unidades pediátricas

Gastroenteric virus spreading in fomites from different pediatric units

Ana Carolina Ganime^{1*}; José Paulo G Leite¹; Carlos Eduardo da Silva Figueiredo²; Filipe A Carvalho-Costa¹; Fabio Correia Malta¹; Tatiana L Rose¹, Marize P Miagostovich¹

¹ Laboratory of Comparative and Environmental Virology, Oswaldo Cruz Institute, Oswaldo Cruz Foundation, Ministry of Health, Rio de Janeiro, Brazil; ² Fernandes Figueira Institute, Oswaldo Cruz Institute, Oswaldo Cruz Foundation, Ministry of Health, Rio de Janeiro, Brazil.

*Corresponding author: Phone: 55 21 25621923. Fax: 55 21 25621851. e-mail: acganime@ioc.fiocruz.br

Key words: Rotavirus A; Adenovirus; Fomites; Hospital infection; Neonatal intensive care unit; Pediatric ward.

Summary

In the hospital environment, it is very common viral illness outbreaks, especially in pediatric units, where children have respiratory and gastrointestinal infections. In recent years, studies were conducted to monitor the presence of viruses on hospital fomites showing that only the bacteriological control is not sufficient to ensure the decontamination of those environments. The aim of this study was to assess the rotavirus specie A (RVA) and human adenovirus (HAdV) dissemination in hospital fomites, comparing their spreading between two pediatric units of a public hospital, located in the city of Rio de Janeiro, Brazil. For this purpose, an one year monitoring was carried out from August 2011 to August 2012, collecting 480 samples from surfaces and fomites 156 from a neonatal intensive care unit (NICU) and 324 from a pediatric Ward (PW). From this total 16 (3.3%) were positive for RVA while 128 (26.7%) were positive for HAdV, showing a higher rate of detection of HAdV ($p < 0.001$). Only 4.5% (7/156) samples were positive in the NICU being two (1.3%) RVA and 5 (3.2%) HAdV in the PW, a higher dissemination was observed with 42.3% (137/324) of virus detection being 4.3% (4) RVA positive and 38% (123/324) were HAdV positive. These data emphasize the great importance to monitoring the presence of viruses on hospital fomites, showing that the disinfection should be reassessed.

Introduction

In the hospital environment is very common viral illness outbreaks, especially in pediatric units, where children have infections such as respiratory and gastrointestinal, usually related to the local community (D'Arcy *et al.*, 2014). Viral disease might not even be the reason for admission, but patients may carry the virus asymptotically and expel infectious particles for long periods of time (Najjioullah *et al.*, 2004; Murata *et al.*, 2007; Martin *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2010; Frange *et al.*, 2012).

In recent years, many studies have been conducted to monitor the presence of viruses on hospital fomites (Carducci *et al.*, 2002, 2011; Gallimore *et al.*, 2004, 2005, 2006, Ramani *et al.*, 2008, Ganime *et al.*, 2012, 2014), once it has been demonstrated that some virus with major impact on hospital environment remain in the fomites and / or air for extended periods of time (Soule *et al.*, 1999; Loopman *et al.*, 2004; Rzezutka and Cook, 2004; Sattar, 2004; Gallimore *et al.*, 2004, 2005, 2006, 2008; Kramer *et al.*, 2006; Carducci *et al.*, 2002, 2011; Weber *et al.*, 2010; Ganime *et al.*, 2012, 2014). This has been happening due to the fact the hygiene protocols for microbiological control of the hospitals, in many countries, continues to be performed only by bacteriological control and the viral control was not yet included.

In Brazil, our group conduct a study to monitor the presence of viruses in hospital fomites (Ganime *et al.*, 2012), showing that virus used as a biological marker were able to increase the effectiveness of a hygiene intervention reducing their spread. Based on those results that revealed a dissemination of infective RVA in an adult intensive care unit associated HAdV viability observed in the same samples (Ganime *et al.* 2014) this study aims to assess the spreading of RVA and HAdV in fomites of two pediatric units of a public hospital, located in the city of Rio de Janeiro, Brazil in order to contribute to data base for risk assessment.

Methods

An one-year monitoring (August 2011 to July 2012) was conducted in a public hospital, located in the city of Rio de Janeiro, Brazil, where fomites and surface samples were taken monthly from two units of pediatric hospitalization as neonatal intensive care unit (NICU) and the pediatric ward (PW). The NICU is a single room with a capacity of 15 patients who are separated from each other only by the neonatal incubators. The neonatal incubator's cleaning protocols are performed once a week. The PW is divided into 10 boxes and each box has two beds. The PW bed's cleaning protocols are performed whenever there is release of patient, death and prolonged hospitalization.

Sampling procedures

Samples were obtained by scraping at least 50% of fomite areas, with swabs dipped in *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM – Gibco[®], Grand Island, NY, USA), pH 7.2, as previously described (Ramani *et al.*, 2008). The fomites were chosen to represent areas commonly in contact with hands (Ganime *et al.*, 2012).

Controls

A pool of RVA and HAdV type 2 was used as positive control and DMEM was used as a negative control, for all methodologies used (Leite *et al.*, 1985). To avoid cross-contamination, all molecular procedures were performed in different rooms, with UV decontamination.

Nucleic acids extraction and virus quantification

Guanidinium thiocyanate-silica method adapted for nucleic acid extraction from fomites sampling was performed as described previously (Boom *et al.*, 1990; Gallimore *et al.*, 2004).

For RVA nucleic acids extracted from swabs were submitted to the cDNA, using random primers (Ferreira *et al.*, 2008). RVA NSP3 gene and HAdV hexon gene were amplified using TaqMan[®] quantitative polymerase chain reaction (qPCR) protocols previously described (Zeng *et al.*, 2008, Hernorth *et al.*, 2002).

Statistical analysis

Statistical analysis was performed using the chi-square test as implemented by Epi info[®] software, version 3.5.1 and the two-tailed Fisher's exact test. The threshold for statistical significance was $p < 0.05$.

Results

A total of 480 samples were collected from August 2011 to July 2012 being 156 and 324 obtained from a NICU and a PW, respectively. Table 1 shows the distribution of virus detection according the hospital units and revealed a higher rate of HAdV detection ($p < 0.001$) in the hospital. Comparing the rate of detection of any of the viruses among units: NICU (7/156, 4.5 %) and PW (137/324, 42.2 %), it can be observed a significant difference ($p < 0.001$) in the percentage positive samples in the PW. When this analysis is disassembled, we didn't observe significant difference ($p = 0.104$) in detection rate of RVA between units, while the rate of detection of HAdV in PW (123/324, 38.0 %) is significantly higher ($p < 0.001$) than in the NICU (5/156, 3.2%).

When each unit was individually analyzed, it can be observed that among the 156 samples collected in the NICU, only 7 (4.5%) were positive: two (1.3 %) tested positive for RVA and 5 (3.2%) for HAdV, with no significant difference between viruses ($p = 0.447$). All RVA positive samples were collected in cardiac monitors, while HAdV positive samples were collected in the incubator door latches ($N = 3$, 1.9 %) and in the cardiac monitors ($N = 2$, 1.3 %). There weren't mixed contamination in these fomites.

Among the 324 samples collected in the PW, 137 were positive (42.3 %), of these, 14 (4.3%) were RVA positive and 123 (38%) were HAdV positive, thus presenting a significant difference ($p < 0.001$) in positivity of HAdV in this unit. RVA positive samples were distributed in the arm of companion chair ($N = 4$, 1.2%), Bed grid ($N = 2$, 0.6%), external handle door of the box ($N = 1$, 0.3%) and desk ($N = 7$, 2.2 %). HAdV positive samples were distributed in the arm of companion chair ($N = 45$, 13.9%), Bed grid ($N=20$, 6.2%), external door handle of the box ($N=9$, 2.8%), internal door handle of general ward ($N=4$, 1.2%) and desk ($N=45$, 13.9%). In this unit, there were mixed contamination in the following fomites: the arm of companion chair ($N=2$), bed grid ($N=2$) and desk ($N=4$).

The RVA' viral load ranged from 6.3×10^2 gc/mL (genomic copies per milliliter) to 6.9×10^3 gc/mL in NICU and 2.5×10^3 gc/mL to 3.3×10^5 gc/mL in PW. While the HAdV' Viral load ranged from 2.7×10^1 gc/mL to 3.2×10^3 gc/mL in NICU and 8.8×10^1 gc/mL to 4.2×10^5 gc/mL in PW.

The results obtained from August 2011 to July 2012 shows that in the NICU, RVA was detected only in September 2011, while in PW, RVA was detected in the first two months: August [6/27 (22.2%)] and September [6/27 (22.2%)], then disappear and reappear in December 2011 [1/27 (3.7%)] and May 2012 [3/27 (2.7%)]. Whereas, the HAdV was detected in December 2011 [2/13 (15.4%)] and July 2012 [3/13 (23.1%)] in the NICU and in the PW it was detected in all months of the study (Graphic I).

Discussion

In this study, it could be observed that both units were contaminated with RVA and HAdV, however, HAdV was significantly higher than RVA. It could be happened because of its stability in the environmental, corroborating data that indicates that RVA remains viable in inanimate surfaces between 6 and 60 days whereas HAdV remain viable between 7 and 90 days (Kramer *et al.*, 2006). Another factor that can influence the greater presence of HAdV compared with RVA is the different routes of transmission of the HAdV, once the routes of infection of HAdV include respiratory tract, gastrointestinal and ocular conjunctiva; these viruses being responsible for numerous outbreaks in schools, hospitals and orphanages (Horwitz, 1996).

This study revealed that RVA and HAdV were present in several places; it may be associated with the transmission of these viruses that are often touched by hands. Some authors already demonstrated that a variety of fomites could become contaminated by different viruses such as RVA and HAdV (Carducci *et al.*, 2002; Gallimore *et al.*, 2004, 2005, 2006; Ramani *et al.*, 2008; Ganime *et al.*, 2012, 2014).

The NICU had a significantly lower percentage compared to PW ($p < 0,001$), which may indicate a greater concern for both health professionals and relatives in relation to hand hygiene; or even the layout of the sink, which is in an anteroom, having to compulsorily all the people go by it. Moreover, the process of cleaning of fomites is stricter in NICU, using water, detergent and 70% alcohol and a product-based glucoprotamina called Incidin® Extra N (Borer Chemie AG, Zuchwil, Switzerland). This greater caution is likely due to the fact infections in neonates and immunocompromised patients are of paramount importance, since viral infection will cause great risk to the

patient and may be fatal (Pham *et al.*, 2003; Kelley, 2010; Henquell *et al.*, 2009; Ganime *et al.*, 2012, 2014).

Despite showing very few positive samples NICU had the cardiac monitor as the most contaminated item. This item is only handled by health professionals, and never by relatives, showing contamination by hands by the professionals who works there. This evidence is in agreement with data indicating that hand washing has little acceptance, even when it comes to health care professionals (Ayliffe *et al.*, 2000). However the incubator's door latches can be manipulated both by health professionals such as relatives, showing that regular training of hand washing techniques for health professionals and relatives could minimize both the direct and indirect transmission of these viruses (Soule *et al.*, 1999, Ganime *et al.*, 2012, 2014).

Although the RVA being the main etiological agents of acute gastroenteritis in children and youth, it is estimated that there are approximately 196,000 deaths per year worldwide (Walker *et al.*, 2013); there was a low percentage of positive samples for RVA in the PW, which mainly circulate children 10 years of age. However, the RVA were present in areas where adults come into contact, such as the companion chair, showing that although primarily affect children, adults can display mostly asymptomatic infection and spread of the virus to the hospital fomites, increasing the chances of contamination of patients and, again, showing that hand washing was not held properly. These results are in agreement with previous reports (Gallimore *et al.*, 2005, 2008, Ramani *et al.*, 2008, Ganime *et al.*, 2012, 2014), which demonstrated that contamination by gastroenteric virus in a hospital was associated with the traffic of relatives in the unit and also suggested that hand washing was not being done appropriately.

In this study, it can be seen that the RVA were detected in different months throughout the year, with no seasonality. Corroborating data indicate that it is only possible to observe a pattern with respect to the seasonality in temperate regions, with outbreaks and epidemics during the colder and dry months of the year. In general, in tropical regions RVA infections occur throughout the year (Estes & Kapikian, 2007). The same happens with the HAdV that were detected in all months of the year in PW, showing no seasonal pattern. It is worth noting that no evidence of seasonality for this virus was observed in several investigations (Levidiotou *et al.*, 2009; Raboni *et al.*,

2014; Ozdemir *et al.*, 2010) reported the presence of HAdV in the fall and winter months in Turkey (Raboni *et al.*, 2014).

These data emphasize the great importance to monitoring the presence of viruses on hospital fomites, showing that how the disinfection was being conducted and the products, which were used to disinfecting the fomites, should be reassessed. Furthermore, inactivation tests of viruses by disinfectants routinely used in hospitals should be performed, since the virus still present in the hospital environment and remain viable, as already demonstrated by Ganime and colleagues (2012, 2014).

Funding Supported by the Brazilian National Council for Scientific and Technological Development (CNPq), Oswaldo Cruz Institute and Papes V (Fiocruz-CNPq).

Conflicts of Interest Statements The authors inform that they do not have any conflict of interest.

References

- Akhter J., S. al-Hajjar, S. Myint and S. M. Qadri. Viral contamination of environmental surfaces on a general pediatric ward and playroom in a major referral centre in Riyadh. *Eur J Epidemiol.* 1995.11(5):587-90.
- Ansari S. A., S. A. Sattar, V. S. Springthorpe, G. A. Wells and W. Tostowaryk. Rotavirus survival on human hands and transfer of infectious virus to animate and nonporous inanimate surfaces. *J Clin Microbiol.* 1988. 26:1513-18.
- Ayliffe G. A. J., A. P. Fraiese, A. M. Geddes and K. Mitchell. *Control of hospital infection. A practical handbook.* 2000.4th edn: Arnold.
- Barnes G. L., S. L. Callaghan, C. D. Kirkwood, N. Bogdanovic-Sakran, L. J. Johnston and R. F. Bishop. Excretion of serotype G1 rotavirus strains by asymptomatic staff: a possible source of nosocomial infection. *J Pediatr.* 2003.142(6):722-25.
- Bisset J. A. Correct use of insecticides: management of resistance. *Rev Cubana Med Trop.* 2002.54(3):202-19.
- Boom R., C. J. Sol, M. M. Salimans, C. L. Jansen, P. M. Wertheim-van Dillen and J. van der Noordaa. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *J Clin Microbiol.* 1990. 28(3):495-503.
- Carducci A, Verani M, Casini B, Giuntini A, Mazzoni F, Rovini E, *et al.* Detection and potential indicators of the presence of hepatitis C virus on surfaces in hospital settings. *Lett Appl Microbiol.* 2002. 34(3):189-93.
- Carducci A, Verani M, Lombardi R, Casini B, Privitera G. 2011. Environmental survey to assess viral contamination of air and surfaces in hospital settings. *J Hosp Infect.;* 77:242-7.
- D'Arcy N, Cloutman-Green E, Klein N, Spratt DA. 2014. Environmental viral contamination in a pediatric hospital outpatient waiting area: Implications for infection control. *Am J Infect Control.;* 42(8):856-60.
- Estes MK, Kapikian AZ. Rotaviruses. *Fields Virology.* 5th edição. Lippincott Williams & Wilkins. Philadelphia; 2007.
- Ferreira M. S., M. P. Xavier, T. M. Fumian, M. Victoria, S. A. Oliveira, L. H. Pena, J. P. Leite, M. P. Miagostovich. Acute gastroenteritis cases associated with noroviruses infection in the state of Rio de Janeiro. *J Med Virol.* 2008. 80(2):338-44.

Frange P, Touzot F, Debré M, Héri-tier S, Leruez-Ville M, Cros G, *et al.* Prevalence and clinical impact of norovirus fecal shedding in children with inherited immune deficiencies. *J Infect Dis* 2012;206:1269-74.

Gallimore CI, C. Taylor, A. R. Gennery, A. J. Cant, A. Galloway, D. Lewis and J. J. Gray. Use of a Heminested Reverse Transcriptase PCR Assay for Detection of Astrovirus in Environmental Swabs from an Outbreak of Gastroenteritis in a Pediatric Primary Immunodeficiency Unit. *J Clin Microbiol.* 2005. 43(8): 3890–94

Gallimore CI, C. Taylor, A. R. Gennery, A. J. Cant, A. Galloway, M. Iturriza-Gomara and J. J. Gray.. Environmental monitoring for gastroenteric viruses in a pediatric primary immunodeficiency unit. *J Clin Microbiol.* 2006. 44(2): 395-9.

Gallimore CI, C. Taylor, A. R. Gennery, A. J. Cant, A. Galloway, J. Xerry, J. Adigwe and J. J. Gray. Contamination of the hospital environment with gastroenteric viruses: comparison of two pediatric wards over a winter season. *J Clin Microbiol.* 2008. 46(9):3112-15.

Gallimore CI, D. Cubbit, N. du Plessis and J. J. Gray. Asymptomatic and symptomatic excretion of noroviruses during a hospital outbreak of gastroenteritis. *J Clin Microbiol.* 2004.42(5): 2271-4.

Ganime AC, Carvalho-Costa FA, Santos M, Costa Filho R, Leite JP, Miagostovich MP. 2014. Viability of human adenovirus from hospital fomites. *J Med Virol.* Jul 11. doi: 10.1002/jmv.23907. [Epub ahead of print].

Ganime AC, Carvalho-Costa FA, Mendonça MC, Vieira CB, Santos M, Costa Filho R, Miagostovich MP, Leite JP. 2012. Group A rotavirus detection on environmental surfaces in a hospital intensive care unit. *Am J Infect Control*; 40:544-7.

Haramoto, E., H. Katayama, K. Oguma, S.Ohgaki. Recovery of naked viral genomes in water by virus concentration methods. *J. Virol. Methods.* 2007. 142:169-73.

Henquell C, Boeuf B, Mirand A, Bacher C, Traore O, Déchelotte P, Labbé A, Bailly JL, Peigue-Lafeuille H. 2009. Fatal adenovirus infection in a neonate and transmission to health-care workers. *J Clin Virol* ; 45:345-8.

Hernroth BE, Conden-Hansson AC, Rehnstam-Holm AS, Girones R, Allard AK. 2002. Environmental factors influencing human viral pathogens and their potential indicator

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

Horst H. and B. Kohlhase. Asymptomatic excretors of rotavirus. *Infection*. 1986. 14(4):163-66.

Horwitz, MS. 1996. Adenoviruses. In: Fields BN, Knipe DM, Howley PM, Eds. . *Fields virology*, 3rd edn. Philadelphia, PA: Lippincott-Raven Publishers; 2149-2171.

Kelley CJ. 2010. A fatal case of neonatal adenovirus infection. *Neonatal Netw*; 29:297-305.

Kramer A, Schwebke I, Kampf G. How long do nosocomial pathogens persist on inanimate surfaces? A systematic review. *BMC Infect Dis* 2006;6:130.

Leite JP, Pereira HG, Azeredo RS, Schatzmayr HG. 1985. Adenoviruses in faeces of children with acute gastroenteritis in Rio de Janeiro, Brazil. *J Med Virol*; 15:203-9.

Levidiotou S, Gartzonika C, Papaventsis D, Christaki C, Priavali E, Zotos N, Kapsali E, Vrioni G. 2009 Viral agents of acute gastroenteritis in hospitalized children in Greece. *Clin Microbiol Infect.*; 15(6):596-8.

Li C, Wang L, Eng H, You H, Chang L, Tang K, *et al*. Correlation of pandemic (H1N1) 2009 viral load with disease severity and prolonged viral shedding in children. *Emerg Infect Dis* 2010;16:1265-72.

Loopman BA, Reacher MH, Vipond IB, Hill D, Perry C, Halladay T, Brown DW, Edmunds WJ, Sarangi J. 2004. Epidemiology and cost of nosocomial gastroenteritis, Avon, England, 2002 e 2003. *Emerg Infect Dis*; 10:1827e1834.

Martin ET, Fairchok MP, Kuypers J, Magaret A, Zerr DM, Wald A, *et al*. Frequent and prolonged shedding of bocavirus in young children attending daycare. *J Infect Dis* 2010;201:1625-32.

Murata T, Katsushima N, Mizuta K, Muraki Y, Hongo S, Matsuzaki Y. Prolonged norovirus shedding in infants \leq 6 months of age with gastroenteritis. *Pediatr Infect Dis J* 2007;26:46-9.

Najioullah F, Tissot Guerraz F, Thouvenot D, Milon MP, Lachaux A, Floret D. Nosocomial infections due to adenovirus in a paediatric unit. *Pathol Biol* 2004; 52:16-20.

Parashar U. D., E. G. Hummelman, J. S. Bresee, A. M. Miller and R. I. Glass. Global illness and deaths caused by rotavirus disease in children. *Emerging Infectious Diseases*. 2003. 9(5):565-571.

Parashar U. D., J. S. Bresee, J. R. Gentsch, R. I. Glass. Rotavirus. *Emerging Infectious Diseases*. 1998.4(4):561-70.

Payne D. C., L. Stockman, J. R. Gentsch, and U. D. Parashar. Rotavirus. In: Roush SW, ed. *Manual for the Surveillance of Vaccine Preventable Diseases*. 4th Edition. Atlanta: US Centers for Disease Control and Prevention. 2008.Chapter 13.

Pham TT, Burchette JL Jr, Hale LP. 2003. Fatal disseminated adenovirus infections in immunocompromised patients. *Am J Clin Pathol* ; 120:575-83.

Phillips G., B. Lopman , L. C. Rodrigues and C. C. Tam. Asymptomatic rotavirus infections in England: prevalence, characteristics, and risk factors. *Am J Epidemiol*. 2010.171(9):1023-30.

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

Ramani S., R. Arumugam, N. Gopalarathinam, I. Mohanty, S. Mathew, B. P. Gladstone, A. K. Jana, K. A. Kuruvilla and G. Kang. Investigation of the environment and of mothers in transmission of rotavirus infections in the neonatal nursery. *J Med Virol*. 2008. 80(6):1099-105.

Rzezutka A. and N. Cook. Survival of human enteric viruses in the environment and food. *FEMS Microbiol Rev*. 2004. 28(4):441-53.

Sattar S. A. Microbicides and the environmental control of nosocomial viral infections. *J Hosp Infect*. 2004.56 Suppl 2:S64-9.

Sattar S. A., N. Lloyd-Evans, V. S. Springthorpe and R. C. Nair. Institutional outbreaks of rotavirus diarrhoea: potential role of fomites and environmental surfaces as vehicles for virus transmission. *J Hyg (Lond)*. 1986. 96(2):277-89.

Soule H., O. Genoulaz, B. Gratacap-Cavallier, M. R. Mallaret, P. Morand, P. François, D. Luu Duc Bin, A. Charvier, C. Bost-Bru, J. M Seigneurin. Monitoring rotavirus

environmental contamination in a pediatric unit using polymerase chain reaction. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 1999. 20(6):432-34.

Tate JE, Haynes A, Payne DC, Cortese MM, Lopman BA, Patel MM et al. Trends in national rotavirus activity before and after introduction of rotavirus vaccine into the national immunization program in the United States, 2000 to 2012. *Pediatr Infect Dis J.* 2013 Jul;32(7):741-4.

Tsai Y. L., B. Tran, L. R. Sangermano, C. J. Palmer. Detection of poliovirus, hepatitis A virus, and rotavirus from sewage and ocean water by triplex reverse transcriptase PCR. *Appl Environ Microbiol.* 1994. 60(7):2400-7.

Weber DJ, Rutala WA, Miller MB, Huslage K, Sickbert-Bennett E. Role of hospital surfaces in the transmission of emerging health care-associated pathogens: norovirus, *Clostridium difficile*, and *Acinetobacter* species. *Am J Infect Control* 2010;38(5 Suppl 1):S25-33.

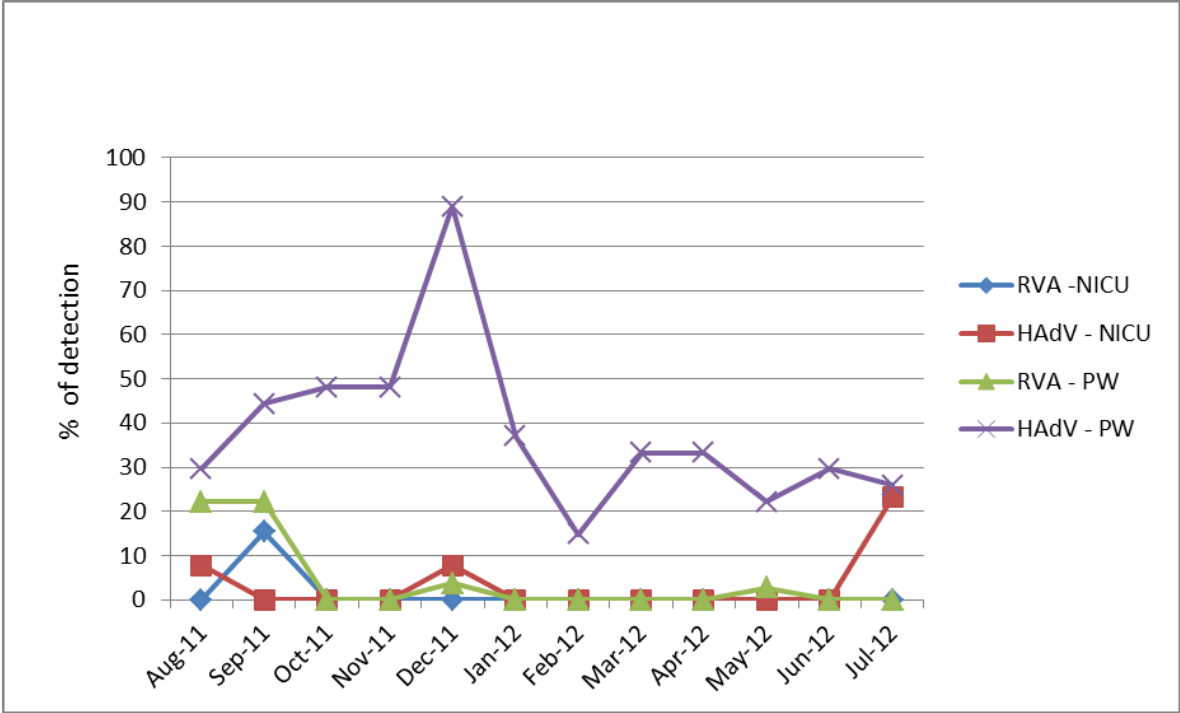
Zeng S. Q., A. Halkosalo, M. Salminen, E. D. Szakal, L. Puustinen and T. Vesikari. One-step quantitative RT-PCR for the detection of rotavirus in acute Gastroenteritis. *J Virol Met.* 2008. 153: 238-40.

Table 1: Distribution of virus detection according fomites, virus and units

| Units | FOMITES | Viruses | | total/fomite |
|------------------|--------------------------------|---------------|----------------|----------------|
| | | RVA | HAdV | |
| PW | accompanying arm chair | 04/324 (1.2)* | 45/324 (13.9) | 49/324 (15.1) |
| | bed rail | 02/324 (0.6) | 20/324 (6.2) | 22/324 (6.8) |
| | box's external knob | 01/324 (0.3) | 09/324 (2.8) | 10/324 (3.1) |
| | Inner knob of the general ward | 0 | 04/324 (1.2) | 04/324 (1.2) |
| | Bedside | 07/324 (2.2) | 45/324 (13.9) | 52/324 (16.1) |
| sub-total | | 14/324 (4.3) | 123/324 (38.0) | 137/324 (42.3) |
| NICU | cardiac monitor keyboard | 02/156 (1.3) | 02/156 (1.3) | 04/156 (2.6) |
| | incubator door locks | 0 | 03/156 (1.9) | 3/156 (1.9) |
| | chlorhexidine vial | 0 | 0 | 0 |
| | Mayo table | 0 | 0 | 0 |
| | balance panel | 0 | 0 | 0 |
| | handle of drawers | 0 | 0 | 0 |
| | computer keyboard | 0 | 0 | 0 |
| sub-total | | 02/156 (1.3) | 05/156 (3.2) | 07/156 (4.5) |
| Total | | 16/480 (3.3) | 128/480 (26.7) | 144/480 (30.0) |

* positive sample/total sample (%)

Graphic I: Detection of Human Adenovirus (HAdV) and Rotavirus A (RVA) in two paediatric units, neonatal intensive care unit (NICU) and pediatric ward (PW) of a public hospital.



Artigo 4

Avaliação do método de amostragem por Swab em fômites

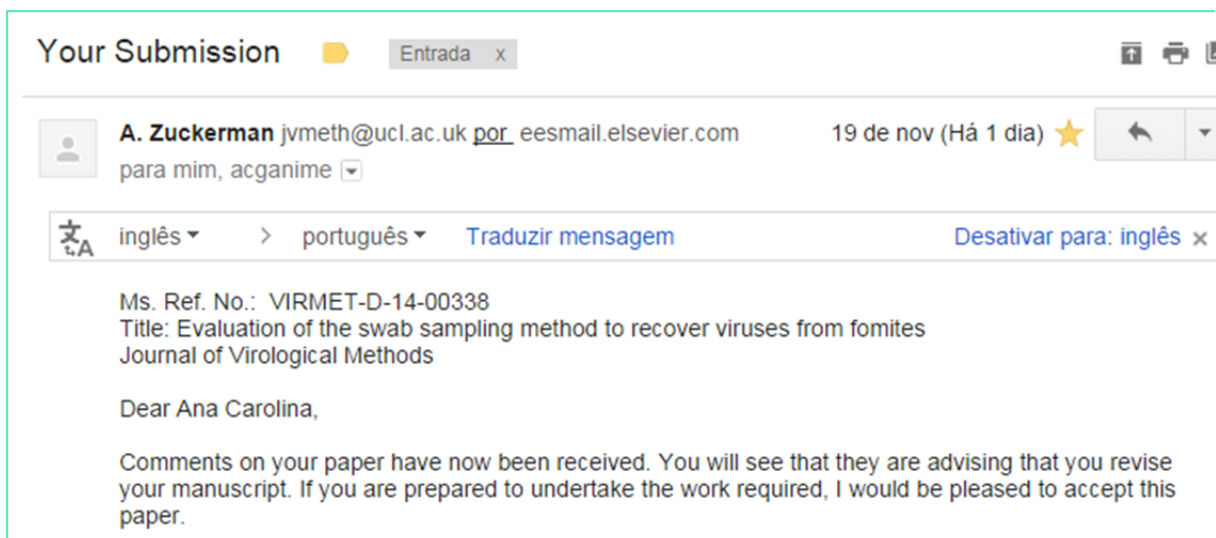
Evaluation of the swab sampling method to recover viruses from fomites

Ganime AC^{1*}, Leite JPG¹, de Abreu Corrêa AA², Melgaço FG¹, Carvalho-Costa FA¹, Miagostovich MP¹.

¹Oswaldo Cruz Institute, Oswaldo Cruz Foundation - FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brasil.

²Microbiology and Parasitology Department, Biomedical Institute, Laboratory of Virology, Fluminense Federal University, Niterói-RJ, Brazil.

* Corresponding author to Ana Carolina Ganime. Avenida Brasil, 4365 - Pav. Hélio & Peggy Pereira. Zip code: 21040-360. Manguinhos - Rio de Janeiro – Brasil. Phone: 55- 21-25621923; Fax: 55-21-25621851. E-mail: acganime@ioc.fiocruz.br.



Abstract

The monitoring of virus contamination on fomites, especially at hospitals, has been used for a more effective evaluation of the microbiological quality of surfaces. Swab sampling is the methodology currently used, although the use of an internal control process (ICP) has not yet been assessed. The aim of this study is to determine the recovery rate of murine norovirus 1 (MNV-1) and bacteriophage PP7 on different surfaces in order to assess their potential use as an ICP. For this purpose both viruses were experimentally spiked both on porous and non-porous formic as well as on rubberized surfaces. Quantitative PCR (qPCR) revealed a variable efficiency with percentage recovery ranging from 0.6 to 77% according to viruses and surfaces. A global analysis suggested that MNV-1 could be used as a potential ICP for the swab sampling methodology.

Keywords: Fomites, swab, MNV-1, bacteriophage PP7, Internal control process

INTRODUCTION

The role and importance in the transmission of gastrointestinal and respiratory diseases through fomites especially for indoor environments, such as schools, daycare centers, nursing homes and hospitals have been well reported in previous studies (Bean *et al.*, 1982; Abad *et al.*, 1994, 2001; Carducci *et al.*, 2011; Ganime *et al.*, 2012). Especially at hospitals, the monitoring of surfaces is critical to highlight the spreading of viruses thus contributing to elucidate nosocomial outbreaks by assessment of the microbiological quality of fomites, therefore helping to draw effective prevention measures and also patient management (Ganime *et al.*, 2012).

The use of sensitive methods of viral detection, as well as obtaining a suitable material is crucial to recovery from fomites, once they may be present in low concentration and distributed heterogeneously on the matrices (Rodríguez-Lázaro *et al.*, 2012). The swab sampling assay associated to molecular methodologies are usually the first choice in this type of procedure, although the presence of inhibitors for molecular amplification procedures remains as a major challenge (Rodríguez-Lázaro *et al.*, 2012). To monitor and overcome problems of inhibition, which normally occur in environmental and food samples, studies to describe the use of bacteriophages and viruses as internal control processes were carried out (ICP): MS2 (Dreier *et al.*, 2005), P22 (Herzog *et al.*, 2012) or PP7 (Rajal *et al.*, 2007), Mengo virus (Uhrbrand *et al.*, 2010) and murine norovirus 1 (MNV-1) (Wobus *et al.*, 2006).

The aim of this study is to determine the recovery efficiency of bacteriophage PP7 and MNV-1 in samples obtained from porous (P) and non-porous (NP) surfaces using a swab sampling method associated to a quantitative amplification methodology (qPCR) in order to assess their potential use as an ICP.

MATERIAL AND METHODS

Viruses' stock suspension

A bacteriophage PP7 (ATCC 15692-B2) kindly provided by Dr Verónica Rajal (Salta University, Argentina) was replicated in *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 15692) using a previously described protocol (Rajal *et al.*, 2007). The MNV-1 was propagated in RAW 264.7 cells as previously described (de Abreu Correa *et al.*, 2012) and both, virus and cells, were kindly donated by Herbert W. Virgin,

Department of Pathology and Immunology, Washington University School of Medicine (St. Louis, MO).

Surfaces and swabs

Rubberized (RB), porous formic (PF) and non-porous formic (NPF), with 63,6 cm² surfaces were used for spiking experiments. Prior, the selected surface areas were washed and embedded overnight in Extran[®] 0.5% (Merck[®], KGaA, Darmstadt, Germany), rinsed with sterile distilled water, dried at room temperature (22 ± 2 °C) and then left for 1 hour under UV light.

Swabs used for recovering PP7 and MNV-1 were sterile, with the tip of rayon, plastic rod and packed individually (Alamar Técnico Científica LTDA., Diadema, São Paulo, Brazil).

Nucleic acid extraction, cDNA synthesis and quantitative PCR (qPCR)

For nucleic acid extraction, the guanidinium thiocyanate-silica method (Boom *et al.*, 1990) was adapted as described previously (Gallimore *et al.*, 2004). The cDNA synthesis was conducted by RT using random primers (Prado *et al.*, 2013) and quantitative PCR (qPCR) was performed to determine the PP7 and MNV-1 concentrations (Rajal *et al.*, 2007; Baert *et al.*, 2008b). The sequence of primers and probes and the region of amplification on the genome for both PP7 and MNV-1 quantification are described in Table I.

Quantitative amplification methodology (qPCR) detection limit

Viral stocks and their 10-fold dilutions (10² – 10⁵) were quantified in triplicate to evaluate the detection limit of each virus. To avoid cross-contamination, negative controls were included during all steps. PP7 samples were tested using the protocols for MNV-1 and vice-versa, to make sure that a specific test was carried out without cross contamination.

Spiking Experiments

Fifty µl of each 10-fold dilution of viral stocks (10³-10⁶) were spiked in triplicate at RB, PF and NPF using a biological safety cabinet class II (Bio IIA, Industrial TELSTAR, Terrassa, Spain). Three hours after incubation at room temperature (22 ± 2 °C) and ambient relative humidity of 50-80%, the swab dipped in the culture medium Dulbecco's *Modified Eagle's Medium* (DMEM – Gibco[®], Grand Island, NY, USA) was

rubbed over the surface for 10 seconds, stored in sterile tubes containing 1ml of the DMEM and stored at -80°C until molecular biology analysis was performed.

Data Analysis

The recovery of MNV-1 and bacteriophage PP7 was assessed both qualitatively and quantitatively as described by Stals and colleagues (2011c). To evaluate the “recovery efficiency”(RE) and “recovery success rate” (RSR) of both viruses using a sampling swab methodology, identical sized of RB, NPF and PF surfaces were artificially spiked with different dilutions of the viral stocks.

Qualitative analysis was performed by comparing the number of samples with signal amplification (positive) using real-time PCR and the total number of PCR reactions performed in real time. Quantitative analysis was performed by comparing the average number of genome copies in samples recovered with the number of genome copies inoculated therein. The quantitative and qualitative analyses were expressed, respectively, as the RE and RSR.

Statistical analysis was performed using the chi-square test as implemented by Epi info[®] software, version 3.5.1. Significance levels were set at 0.05.

RESULTS

To evaluate the recovery of MNV-1 and PP7 bacteriophage using the swab sampling methodology the qPCR detection limits for both viruses were determined and P and NP surfaces were spiked artificially with both viruses. The qPCR detection limits for the PP7 were of 6.4E-01 to 4.2E+02 gc/mL with an average cycle threshold value (Ct) of 37; for the MNV-1, qPCR detection limits were of 4.3E+02 to 1.8E+03gc/mL with an average value of 36.08 Ct (Table II).

PP7 and MNV-1 were recovered in 100% of the contaminated surface samples (P and NP), although the efficiency ranged from 0.6 to 11.5% and from 12.2 to 77.0%, respectively, according to the surface tested (Table III). No significant difference was observed between the surfaces ($p > 0.05$) for both viruses.

DISCUSSION

Fomites and surfaces can be important means of transmission of viral diseases. The exposure occurs through touch and transfer of pathogens present on the fomite to the hands and then to the mouth, nasopharynx, and eyes (Abad *et al.*, 1994, 2001;

Carducci *et al.*, 2011; Herzog *et al.*, 2012). The detection of viruses on a large variety of surfaces and fomites, such as tables, door knobs, walls, toilets seats, thermometers, gloves, among others (Boone & Gerba, 2007; Ganime *et al.*, 2012) has helped to demonstrate this route of transmission in sporadic cases and also in outbreaks (Ansari *et al.*, 1988; Ansari *et al.*, 1991; Gallimore *et al.*, 2004, 2005, 2006, 2008; Wu *et al.*, 2005; Boxman *et al.*, 2009). However, the methodology for viruses recovery from surfaces is not an easy task, mainly due to its heterogeneous distribution, as well as the low viral load and the eventual presence of inhibitors in these surfaces (Rodríguez-Lázaro, 2012). In this study P and NP matrices were chosen to evaluate ICP in the swab sampling methodology once they represent almost all hospital surfaces which the hands come in contact with. The variability in the virus recovery efficiency from these surfaces was also demonstrated previously in different materials such as stainless steel, ceramic plates, polyethylene and wood surfaces (Carducci *et al.*, 2002, Scherer *et al.*, 2009). However, data from these experimental studies that used different surfaces and viruses do not allow any comparison among recovery rates.

Our results showed that despite the 100% success rate observed for both viruses used, the recovery efficiency for MNV-1, independent of the surface, was significantly higher compared to PP7, suggesting the use of MNV-1 as a ICP.

The use of MNV-1 as ICP in NoV detection protocols has been proposed due to its genetic similarities to the NoV genome (Wobus *et al.*, 2006; Baert *et al.*, 2008a). Its use as ICP for detecting viruses in foods such as shellfish, soft red fruits and ready-to-eat foods has also been described (Kingsley *et al.*, 2007; Stals *et al.*, 2009, 2011a, 2011b). However, some studies focusing on PP7 as ICP for food and environmental samples have been described (Rajal *et al.*, 2007; Fumian *et al.*, 2010; Brandão *et al.*, 2014), mainly because PP7 propagation is easier than MNV-1, not requiring the set-up of cell cultures to produce stocks of those viruses (Rajal *et al.*, 2007b). PP7 bacteriophage has been chosen due to its similarity both by its size (25 nm) and its physicochemical properties to poliovirus. Other viruses as feline calicivirus (FCV) (Mattison *et al.*, 2009), MS2 phage (Scherer *et al.*, 2010) or Mengo virus (Uhrbrand *et al.*, 2010) has also been evaluated as ICP for virus recovery from environmental samples. Furthermore, according to Stevenson and colleagues (2008a) RNA virus used as ICP is better than a DNA virus because the reverse transcriptase-PCR (RT-PCR) inhibition can be monitored.

Nowadays, ICP is becoming more routinely used in clinical molecular virology testing, providing an increased confidence inpatient results (Busting and Nolan, 2004; Bustin and Mueller, 2005). However, its use is sometimes controversial, mainly in samples where low viral loads are expected. The competition between ICP, added in the samples in higher concentrations, and the target virus investigated should be considered.

Considering the epidemiological importance of NoV in water and food gastroenteritis outbreaks worldwide (Kingsley *et al.*, 2007; Mattison *et al.*, 2009, Stals *et al.*, 2009, 2011a, 2011b) this study pointed out the use of MNV-1 as a potential ICP for this methodology, mainly due to its high rate of recovery and also because they may surrogate NoV in infectivity studies.

FUNDING

This work was supported by Brazilian National Council for Scientific and Technological Development (CNPq), Oswaldo Cruz Institute (IOC-Fiocruz), Program of Research Excellence (PROEP) and Carlos Chagas Filho Foundation for Research Support of the State of Rio de Janeiro (FAPERJ). The author is a PhD student in the graduate program of Cell and Molecular Biology, Oswaldo Cruz Institute.

This research study is under the scope of the activities of Fiocruz as a collaborating center of PAHO/WHO of Public and Environmental Health.

CONFLICTS OF INTEREST STATEMENTS

The authors inform that they do not have any conflict of interest.

REFERENCES

- Abad FX, Pinto RM, Bosch A. Survival of enteric viruses on environmental fomites. *Appl. Environ. Microbiol.* 1994. 60:3704–3710. 2.
- Abad FX, Villena C, Guix S, Caballero S, Pinto RM, Bosch A. Potential role of fomites in vehicular transmission of human astroviruses. *Appl. Environ. Microbiol.* 2001. 67:3904–3907.
- Ansari SA, Sattar SA, Springthorpe VS, Wells GA, Tostowaryk W. Rotavirus survival on human hands and transfer of infectious virus to animate and nonporous inanimate surfaces. *J Clin Microbiol.* 1988. 26: 1513–1518.

Ansari SA, Springthorpe VS, Sattar SA, Rivard S, Rahman M Potential role of hands in the spread of respiratory viral infections: studies with human parainfluenza virus 3 and rhinovirus 14. *J Clin Microbiol.* 1991. 29: 2115–2119.

Baert L, Uyttendaele M, Vermeersch M, Van Coillie E, Debrevere J. Survival and transfer of murine norovirus 1, a surrogate for human noroviruses, during the production process of deep-frozen onions and spinach. *J Food Prot.* 2008a. 71(8):1590-7.

Baert L, Wobus CE, Van Coillie E, Thackray LB, Debevere J, Uyttendaele M. Detection of murine norovirus 1 by using plaque assay, transfection assay, and real-time reverse transcription-PCR before and after heat exposure. *Appl Environ Microbiol.* 2008b. 74(2):543-6.

Bean B, Moore BM, Sterner B, Peterson LR, Gerding DN, Balfour HH. Survival of influenza viruses on environmental surfaces. *J. Infect. Dis.* 1982.146:47–51.

Boom R, Sol CJ, Salimans MM, Jansen CL, Wertheim-van Dillen PM, van der Noordaa J. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *J Clin Microbiol.* 1990. 28:495-503.

Boone SA and Gerba CP. Significance of Fomites in the Spread of Respiratory and Enteric Viral Disease. *Appl Environ Microbiol.* 2007. 73(6):1687-96.

Boxman IL, Dijkman R, te Loeke NA, Ha"gele G, Tilburg JJ, Vennema H, *et al.* Environmental swabs as a tool in norovirus outbreak investigation, including outbreaks on cruise ships. *J Food Prot.* 2009. 72: 111–119.

Brandão MLL, Almeida DO, Bispo FCP, Bricio SML, Marin VA, Miagostovich MP. Assessment of Microbiological Contamination of Fresh, Minimally Processed, and Ready-to-Eat Lettuces (*Lactuca sativa*), Rio de Janeiro State, Brazil. *Journal of Food Science.* 2014 May;79(5):M961-6. doi: 10.1111/1750-3841.12459

Bustin SA, Nolan T. Pitfalls of quantitative real-time reverse-transcription polymerase chain reaction. *J. Biomol. Tech.* 2004. 15, 155–166.

Bustin SA, Mueller R. Real-time reverse transcription PCR (qRT-PCR) and its potential use in clinical diagnosis. *Clin. Sci.* 2005. 109, 365–379.

Carducci A, Verani M, Casini B, Giuntini A, Mazzoni F, Rovini E, *et al.* Detection and potential indicators of the presence of hepatitis C virus on surfaces in hospital settings. *Lett Appl Microbiol.* 2002. 34(3):189-93.

Carducci A, Verani M, Lombardi R, Casini B, Privitera G. Environmental survey to assess viral contamination of air and surfaces in hospital settings. *Journal of Hospital Infection*. 2011. 77: 242-7

de Abreu Corrêa A, Carratala A, Barardi CR, Calvo M, Girones R, Bofill-Mas S. Comparative inactivation of murine norovirus, human adenovirus, and JC polyomavirus by chlorine in seawater. *Appl Environ Microbiol*. 2012. 78(18):6450-7. doi: 10.1128/AEM.01059-12.

Dreier J, Störmer M, Kleesiek K. Use of bacteriophage MS2 as an internal control in viral reverse transcription-PCR assays. *J Clin Microbiol*. 2005. 43(9):4551-7.

Fumian TM¹, Leite JP, Castello AA, Gaggero A, Caillou MS, Miagostovich MP. Detection of rotavirus A in sewage samples using multiplex qPCR and an evaluation of the ultracentrifugation and adsorption-elution methods for virus concentration. *J Virol Methods*. 2010 Dec;170(1-2):42-6. doi: 10.1016/j.jviromet.2010.08.017.

Gallimore CI, Cubbit D, du Plessis N, Gray J J. Asymptomatic and symptomatic excretion of noroviruses during a hospital outbreak of gastroenteritis. *J Clin Microbiol*. 2004.42(5): 2271-4

Gallimore CI, Taylor C, Gennery AR, Cant AJ, Galloway A, Iturriza-Gomara M, *et al*. Environmental monitoring for gastroenteric viruses in a pediatric primary immunodeficiency unit. *J Clin Microbiol*. 2006. 44(2): 395-9.

Gallimore CI, Taylor C, Gennery AR, Cant AJ, Galloway A, Lewis , *et al*. Use of a Heminested Reverse Transcriptase PCR Assay for Detection of Astrovirus in Environmental Swabs from an Outbreak of Gastroenteritis in a Pediatric Primary Immunodeficiency Unit. *J Clin Microbiol*. 2005. 43(8): 3890 - 94

Gallimore CI, Taylor C, Gennery AR, Cant AJ, Galloway A, Xerry J, *et al*. Contamination of the hospital environment with gastroenteric viruses: comparison of two pediatric wards over a winter season. *J Clin Microbiol*. 2008. 46(9):3112-15.

Ganime AC, Carvalho-Costa FA, Mendonça MCL, Vieira CB, Santos M, Costa-Filho R, *et al*. Group A rotavirus detection on environmental surfaces in a hospital intensive care unit. *Am j Infect Control*. 2012. 40(6):544-7

Herzog AB, Pandey AK, Reyes-Gastelum D, Gerba CP, Rose JB, Hashsham SA. Evaluation of Sample Recovery Efficiency for Bacteriophage P22 on Fomites *Appl Environ Microbiol*. 2012. 78(22):7915-22. doi: 10.1128/AEM.01370-12.

Kingsley DH, Holliman DR, Calci KR, Chen H, Flick GJ. Inactivation of a norovirus by high-pressure processing. *Appl Environ Microbiol*. 2007. 73(2):581-5.

Mattison K, Brassard J, Gagné M, Ward P, Houde A, Lessard L, Simard C, Shukla A, Pagotto F, Jones TH, Trottier Y. The feline calicivirus as a sample process control for the detection of food and waterborn RNA viruses. *Int J Food Microbiol* 2009. 132(1):73-77. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2009.04.002

Prado T, Guilayn Wde C, Gaspar AM, Miagostovich MP. The efficiency of concentration methods used to detect enteric viruses in anaerobically digested sludge. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2013. 108(1):77-83.

Rajal VB, McSwain BS, Thompson DE, Leutenegger CM, Kildare BJ, Wuertz S. Validation of hollow fiber ultrafiltration and real-time PCR using bacteriophage PP7 as surrogate for the quantification of viruses from watwr samples. *Water Res*. 2007. 41(7):1411-22.

Rodríguez-Lázaro D, Cook N, Ruggeri FM, Sellwood J, Nasser A, Nascimento MS, *et al*. Virus hazards from food, water and other contaminated environments *FEMS Microbiol Rev*. 2012. 36(4):786-814. doi: 10.1111/j.1574-6976.2011.00306.x.

Scherer K, Ma"de D, Ellerbroek L, Schulenburg J, Johne R, Klein G. Application of a Swab Sampling Method for the Detection of Norovirus and Rotavirus on Artificially Contaminated Food and Environmental Surfaces. *Food Environ Virol*. 2009 1:42–49. DOI 10.1007/s12560-008-9007-0.

Scherer K, Johne R, Schrader C, Ellerbroek L, Schulenburg J, Klein G. Comparison of two extraction methods for viruses in food and application in a norovirus gastroenteritis outbreak. *J Virol Methods*. 2010. 169(1):22-27. doi: 10.1016/j.jviromet.2010.06.008

Stals A, Baert L, Botteldoorn N, Werbrouck H, Herman L, Uyttendaele M, *et al*. Multiplex real-time RT-PCR for simultaneous detection of GI/GII noroviruses and murine norovirus 1. *J. Virol. Methods*. 2009. 161(2):247-53

Stals A, Baert L, De Keuckelaere A, Van Coillie E, Uyttendaele M. Evaluation of a norovirus detection methodology for ready-to-eat foods. *Int J Food Microbiol*. 2011a. 145(2-3):420-5.

Stals A, Baert L, Jasson V, Van Coillie E, Uyttendaele M. Screening of fruit products for norovirus and the difficulty of interpreting positive PCR results. 2011b. 74(3):425-31.

Stals A, Baert L, Van Coillie E, Uyttendaele M. Evaluation of a norovirus detection methodology for soft red fruits. *Food Microbiol*. 2011c. 28(1):52-8

Stevenson J, Hymas W, Hillyard D. The use of Armored RNA as a multi-purpose internal control for RT-PCR. *J Virol Methods*. 2008. 150(1-2):73-6. doi: 10.1016/j.jviromet.2008.02.007.

Uhrbrand K, Myrmel M, Maunula L, Vainio K, Trebbien R, Nørrung B, Schultz AC. Evaluation of a rapid method for recovery of norovirus and hepatitis A virus from oysters and blue mussels. *J Virol Methods*. 2010. 169(1):70-78. doi: 10.1016/j.jviromet.2010.06.019

Wobus CE, Thackray LB, Virgin HW. Murine norovirus: a model system to study norovirus biology and pathogenesis. *J. Virol*. 2006. 80(11):5104-12.

Wu HM, Fornek M, Schwab KJ, Chapin AR, Gibson K, Schwab E, *et al*. A norovirus outbreak at a long-term-care facility: the role of environmental surface contamination. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2005. 26: 802–810.

Table I. Primer and probe sets used to detect murine Norovirus 1 (MNV-1) and bacteriophage PP7 (PP7) by Quantitative amplification methodology (PCR).

| Virus (Reference) | Primer or Probe | Sequence (5'- 3') | Genome region |
|-------------------------------|-----------------|---------------------------------------|-----------------|
| PP7 (Rajal et al. 2007) | 247 F | GTTATGAACCAATGTGGCCGTTAT ^a | Replicase |
| | 320 R | CGGGATGCCTCTGAAAAAAG | |
| | 274 probe | FAM-TCGGTGGTCAACGAGGAACTGGAAC-TAMRA | |
| MNV-1 (Baert et al., 2008) | F – ORF1/ORF2 | CAC GCC ACC GAT CTG TTC TG | ORF1-ORF2 |
| | R – ORF1/ORF2 | GCG CTG CGC CAT CAC TC | junction region |
| | MGB– ORF1/ORF2 | 6FAM-CGC TTT GGA ACA ATG - MGBNFQ | |

^a: International Union of Biochemistry code (W: A/T; R: A/G; B: C/G/T; Y: C/T; N: A/C/G/T); ORF: open reading frame; qPCR: quantitative PCR; RT: reverse transcription; F: forward. R: reverse

Table II. Detection limits of the murine Norovirus 1 (MNV-1) and bacteriophage PP7 by using Quantitative amplification methodology (qPCR).

| Virus | No. of experiment | Virus stock dilutions | | | | | | | |
|----------------------------------|-------------------|-----------------------|--------------------|---------|-----------------|---------|-----------------|---------|-------|
| | | 10 ² | 10 ³ | | 10 ⁴ | | 10 ⁵ | | |
| MNV-1 (4.3 E+06) ^a | 1 | ND | 1.8E+03 | (2/3) | 5.4E+04 | (3/3) | 6.4E+04 | (3/3) | |
| | 2 | ND | 5.8E+02 | (2/3) | 3.9E+03 | (3/3) | 6.4E+04 | (3/3) | |
| | 3 | ND | 4.3E+02 | (1/3) | 1.5E+03 | (3/3) | 6.5E+04 | (3/3) | |
| PP7 (1.2 E+06) ^a | 1 | 4.2E+02 ^a | (3/3) ^b | 1.5E+03 | (3/3) | 4.9E+04 | (3/3) | 1.6E+05 | (3/3) |
| | 2 | 6.4E-01 | (2/3) | 4.3E+02 | (3/3) | 1.2E+04 | (3/3) | 6.1E+05 | (3/3) |
| | 3 | ND | | 8.7E+03 | (3/3) | 7.9E+04 | (3/3) | 3.9E+05 | (3/3) |

ND = not detected^a genomic copies/mL^b success rate = positive tests / total number of tests

Table III – Recovery rate estimated by Quantitative amplification methodology (qPCR) of serial dilution of the murine Norovirus 1 (MNV-1) and bacteriophage PP7 (PP7) from different matrices*.

| Surface | Virus | Virus Concentration | | | | P value |
|-------------------|-------|---------------------------------|-------------------|--------------------|---------------------|---------|
| | | 10 ³ | 10 ⁴ | 10 ⁵ | 10 ⁶ | |
| Rubberized | MNV | 77.0 (61.2 – 77.7) ^a | 12.9 (9.1 – 15.6) | 27.1 (9.1 – 114.2) | 15.7 (12.9 – 174.0) | 0.218 |
| | PP7 | 0.6 (0.5 – 3.0) | 0.6 (0.2 – 5.2) | 0.6 (0.3 – 1.8) | 2.4 (1.3 – 3.9) | 0.563 |
| Non porous formic | MNV | 24.4 (0.4 – 147.7) | 28.6 (0.1 – 39.4) | 20.4 (0.4 – 27.5) | 42.0(0.2 – 49.9) | 0.789 |
| | PP7 | 5.1 (1.4 – 8.1) | 3.4 (2.3 – 10.2) | 11.5 (8.7 – 18.8) | 7.6 (6.3 – 14.8) | 0.157 |
| Porous formic | MNV | 45.2 (35.3 – 156.7) | 7.6 (4 – 12.3) | 29.3 (28.1– 34.8) | 12.2 (3.5 – 26.9) | 0.025 |
| | PP7 | 1.1 (0.3 – 4.7) | 10.0 (1.3 – 15.6) | 5.9 (1.8 – 49.4) | 1.6 (1.0 – 78.1) | 0.4 |

Recovery rate*: quantitative amplification methodology (qPCR) ^a % of recuperation (range).

5. Discussão

O contato das mãos com uma superfície contaminada tem sido apontado como uma importante via de transmissão de doenças que resulta em um grau variável de transferência de patógenos, de modo que o cuidado na higiene das mãos não deve ser negligenciado, uma vez que as superfícies que entram em contato com estas podem servir como vetores para a transmissão cruzada de patógenos hospitalares (Kramer *et al.*, 2006).

No Brasil, estudo pioneiro sobre investigação de RVA em superfícies foi realizado na UTI de adultos de um hospital da rede particular situado na cidade do Rio de Janeiro, Brasil, demonstrando uma prevalência de 14,5% nas superfícies investigadas durante um monitoramento realizado no período de janeiro a junho de 2009 (Ganime *et al.*, 2012). A alta prevalência do RVA, o qual acomete principalmente crianças, foi inesperada, principalmente por se tratar de uma UTI de adultos com problemas cardíacos e deu o primeiro alerta para a necessidade de investigar a presença destes vírus em superfícies.

Imediatamente após este estudo, decidiu-se por avaliar a infecciosidade dos RVA detectados pelo isolamento em cultura de células MA-104. O isolamento de RVA, proveniente de três amostras, demonstrando a infecciosidade destes vírus em fômites foram publicados juntamente com os dados referentes ao monitoramento (Artigo 1).

Devido às dificuldades no isolamento de um vírus fastidioso como o RVA, aliado ao fato de que os HAdV têm sido apontados como excelentes marcadores de contaminação ambiental por sua resistência no ambiente, ausência de sazonalidade e facilidade para isolamento (Cromeans *et al.*, 2008; Myrmel *et al.*, 2006; Haramoto *et al.*, 2007) ampliou-se o estudo inicial realizando-se a investigação de HAdV nas mesmas amostras coletadas na UTI. Para esta investigação foram selecionadas aleatoriamente 141 amostras, sendo 73 previamente positivas para RVA e 68 negativas. Essa pesquisa elevou o percentual de contaminação das superfícies para 44,7%, com percentual de positividade de 13,5% (19/141) nas amostras previamente negativas para RVA e evidenciando uma contaminação de superfícies com outro agente viral 31,2% (44/141) (Artigo 2). O isolamento dos HAdV detectados em cultura

de células A459 e/ou HEp2c confirmou a existência de patógenos virais infecciosos nos fômites analisados, sendo estes dados inéditos.

A investigação desses vírus em superfícies e fômites hospitalares mostrou-se eficaz e necessário, alertando para a presença de vírus gastroentéricos infecciosos que podem ser particularmente importante em hospitais que tratam pacientes imunocomprometidos (Parashar *et al.*, 1998, 2003; Pham *et al.*, 2003, Raboni *et al.*, 2014), assim como em pediatrias e UTI neonatal como descrito anteriormente, uma vez que já foi demonstrado que infecção tanto por HAdV como por RVA pode ser grave e fatal (Parashar *et al.*, 1998, 2003; Pham *et al.*, 2003; Henquell *et al.*, 2009; Kelley 2010).

O isolamento de HAdV e RVA de amostras coletadas de fômites indica que os vírus permanecem infecciosos, entretanto, o isolamento desses vírus, não é uma tarefa fácil, além de desprender muito tempo e ter alto custo (Kapikian *et al.*, 2001, Rigotto *et al.*, 2011). As tecnologias moleculares têm sido descritas como ferramentas úteis para a detecção, devido principalmente à sua rapidez e facilidade quando em comparação com a detecção do clássico isolamento dos vírus em cultura celular, embora incapaz de distinguir entre partículas virais infecciosas e não infecciosas (Parashar *et al.*, 1998; Haramoto *et al.*, 2007a, b). Entretanto, uma vez que já foi comprovado que as partículas permanecem infecciosas, as metodologias moleculares podem ser suficientes para este monitoramento.

A evidência de contaminação mista em alguns fômites corrobora dados publicados anteriormente que demonstram infecção mista em superfícies hospitalares com vírus gastroentéricos (Gallimore *et al.*, 2006). Entretanto, quando avaliada a distribuição dos vírus analisados, foi possível demonstrar que os HAdV foram prevalentes em relação aos RVA. Esses dados são consistentes com relatos que demonstram a estabilidade dos HAdV em amostras ambientais (Rutala *et al.*, 2006; Carducci *et al.*, 2011). Os HAdV em fômites têm sido descritos como resistentes aos processos de desinfecção hospitalares como desinfetantes e recuperados de superfícies inanimadas entre 7 e 90 dias, enquanto que os RVA permanecem viáveis em superfícies inanimadas entre 6 e 60 dias (Kramer *et al.*, 2006; Rutala *et al.*, 2006). Entretanto, Abad *et al.* (1994) mostraram que os RVA podem persistir por mais tempo

que os HAdV entéricos, quando secos em fômites porosos e não porosos. Essa informação não foi avaliada neste estudo, mas pode explicar a presença de RVA em amostras negativas para HAdV.

A grande disseminação de HAdV pode também estar associada as várias rotas de disseminação do vírus, uma vez que pode causar diferentes doenças, tanto em adultos como em crianças, tais como pneumonia, gastroenterite aguda, e ceratoconjuntivite; e apesar das diferentes vias de transmissão, todos os sorotipos são eliminados nas fezes o que leva a contaminação dos fômites por várias espécies (Greening, 2006; Kramer *et al.*, 2006; Rutala *et al.*, 2006; Matsushima *et al.*, 2012; Rodríguez-Lázaro *et al.*, 2012).

Estes estudos de contaminação de superfícies hospitalares são originais no Brasil e na América Latina. Com o monitoramento no hospital da rede particular foi possível observar a aplicabilidade do trabalho. Tanto os RVA quanto os HAdV tiveram uma diminuição significativa no percentual de detecção ($p < 0,05$) a partir de março de 2009. Essa redução resultou a partir da mudança dos procedimentos de limpeza e desinfecção após uma reunião com os responsáveis pela UTI de adultos do hospital particular. A mudança de estratégia nos procedimentos de limpeza não apenas resultou na diminuição da contaminação viral, mas também no controle hospitalar de infecções por *Acinetobacter spp.*, que vinha acontecendo desde dezembro de 2008. Além disso, a CCIH passou a oferecer um novo treinamento para os funcionários da limpeza e do hospital. Vale ressaltar que, na UTI de adultos, um dos procedimentos de limpeza modificado e capaz de reduzir o percentual de detecção dos vírus, foi a substituição do álcool 70% por Virkon®, a base de monopersulfato de potássio (Artigo 1).

Com base nos resultados obtidos no monitoramento das superfícies e fômites da UTI de adultos do hospital particular, achou-se necessário aplicar esta metodologia em uma unidade pediátrica, uma vez que os RVA acometem principalmente crianças e jovens (Tate *et al.*, 2013) e os HAdV acometem tanto crianças como adultos. Desta forma, foi realizado um monitoramento por um período de um ano em superfícies e fômites de duas unidades de um hospital da rede pública: uma unidade de terapia intensiva neonatal (UTIN) e uma enfermaria pediátrica (EP) (Artigo 3).

Assim como na UTI de adultos do hospital da rede particular, foram detectados tanto RVA como HAdV nas unidades pediátricas. A UTIN apresentou um percentual

significativamente menor em comparação com a EP ($p < 0,001$), o que pode indicar uma maior preocupação dos profissionais de saúde e familiares em relação à higienização das mãos, demonstrada pela disposição de uma pia na antessala da UTIN, com passagem obrigatória.

Outro fator importante que provavelmente contribuiu para esta diferença entre as unidades pediátricas foi o fato de na UTIN o produto utilizado para desinfecção da unidade, não ser apenas o álcool 70% e sim um produto a base de glucoprotamina (Incidin® Extra N). Esta unidade apresentou percentuais baixos de detecção dos vírus. O mesmo não aconteceu na enfermaria pediátrica, em que o principal produto de desinfecção é o álcool 70%, e os percentuais de detecção, ao menos de HAdV, se mantiveram altos durante todo o estudo. Esses dados indicam que a utilização do álcool 70% não é suficiente para a desinfecção dos fômites, pelo menos no que diz respeito aos vírus não envelopados, corroborando dados que indicam que o etanol possui atividade relativamente fraca contra certos vírus não envelopados (Macinga *et al.*, 2008), tendo assim que ser substituído por outros produtos nos hospitais.

Embora os RVA sejam os principais agentes etiológicos de GA em crianças e jovens, houve um baixo percentual de amostras positivas para RVA na EP, em que circulam principalmente crianças de até 10 anos de idade. No entanto, o RVA estava presente em áreas onde os adultos entram em contato, tais como a cadeira do acompanhante, mostrando que, apesar de afetar principalmente as crianças, os adultos podem apresentar a infecção geralmente assintomática e propagar o vírus para as superfícies hospitalares, aumentando as chances de contaminação de pacientes e, mais uma vez, mostrando que a lavagem das mãos não foi realizada corretamente. Estes resultados estão de acordo com os estudos anteriores (Gallimore *et al.*, 2005, 2008, Ramani *et al.*, 2008), em que a contaminação de um hospital por vírus gastroentéricos foi demonstrada, e esta foi associada ao tráfego de parentes na unidade. Também foi sugerido que a lavagem das mãos não estava sendo feita de forma adequada.

No estudo realizado nas unidades pediátricas, tanto os RVA como os HAdV foram detectados ao longo de todo o ano, não mostrando qualquer sazonalidade. Esses dados corroboram estudos que indicam que somente é possível observar um padrão

na sazonalidade dos RVA em regiões temperadas, com surtos e epidemias durante os meses mais frios e secos do ano. Em geral, nas regiões tropicais, infecções por RVA ocorrem ao longo do ano (Estes & Kapikian, 2007). O mesmo acontece com os HAdV em que nenhuma evidência de sazonalidade para este vírus foi observada em várias investigações (Levidiotou *et al.*, 2009; Raboni *et al.*, 2014; Ozdemir *et al.*, 2010). Estes dados enfatizam o significativo impacto gerado pelas mudanças ocasionadas após a reunião, demonstrando que o monitoramento de contaminação das superfícies hospitalares pelo vírus gastroentéricos pode ser uma forma eficaz de gerenciar a limpeza do ambiente hospitalar e assim, ajudar a prevenir surtos.

Embora nos hospitais estudados não tenha havido qualquer caso de GA por HAdV e RVA no período dos estudos, a falta do cumprimento na higienização das mãos foi observada, uma vez que os HAdV e RVA foram detectados em todos os leitos investigados da UTI de adultos e que as superfícies estudadas, tanto no hospital particular como no público, representam áreas que estão sempre em contato com as mãos. Esses dados ressaltam mais uma vez a disseminação desses vírus por indivíduos assintomáticos, além de demonstrar a importância de medidas preventivas e corretivas para reduzir tanto a transmissão direta como indireta de microorganismos, mostrando que a precariedade da lavagem das mãos e informações de antisepsia dada aos parentes pode contribuir para a disseminação de infecções gastroentéricas. Tal situação pode comprometer também a higienização adequada de leitos e áreas de uso comum, contribuindo para a disseminação viral no ambiente hospitalar, como referido em estudos anteriores (Linhares, 2000; Gallimore *et al.*, 2004, 2006; Carducci *et al.*, 2011). Wilhelmi *et al.* (2003), indicaram que a higienização das mãos, antes e após o contato com pacientes ou com objetos que possam estar contaminados, é essencial para a não contaminação de superfícies. Técnicas de treinamento de lavagem das mãos, por profissionais de saúde, familiares e visitantes devem ser frequentemente fornecidas, especialmente àqueles que frequentam qualquer UTI (Soule *et al.*, 1999).

Em paralelo ao monitoramento anual das superfícies das duas unidades pediátricas do hospital da rede pública, achou-se necessária a realização de testes para avaliação da metodologia utilizada, uma vez que esta metodologia só havia sido

testada *in situ*, não tendo ainda sido testada em laboratório (Artigo 4). Sendo assim, um estudo com a finalidade de avaliar o uso de um controle interno de processo (CIP) e a metodologia de recuperação de vírus em fômites foi realizado pela inoculação experimental de MNV-1 e bacteriófago PP7 em diferentes superfícies: fôrmica porosa (FP), fôrmica não porosa (FNP) e emborrachado (EMB).

Estas superfícies foram selecionadas por representarem quase todas as superfícies do hospital que entram em contato com as mãos. A variabilidade na eficiência da recuperação de vírus a partir de superfícies foi demonstrada anteriormente em diferentes materiais, tais como aço inoxidável, placas de cerâmica, de polietileno e de superfícies de madeira (Carducci *et al.*, 2002, Scherer *et al.*, 2009). A metodologia para a recuperação de vírus de superfícies é dificultada principalmente pela possível distribuição heterogênea, baixa carga viral e a eventual presença de inibidores nestas superfícies (Rodríguez-Lázaro, 2012).

Nossos resultados demonstraram que, apesar da taxa de sucesso de 100% para ambos os vírus utilizados, a eficiência de recuperação de MNV-1, independente da superfície, foi significativamente maior em comparação com PP7, sugerindo o uso de MNV-1 como CIP.

O uso de MNV-1 como CIP em protocolos de detecção de NoV foi proposta devido às suas semelhanças genéticas com os NoV (Wobus *et al.*, 2006; Baert *et al.*, 2008a). Seu uso como CIP para a detecção de vírus em alimentos como mariscos, frutas vermelhas e alimentos prontos para o consumo também tem sido descrito (Kingsley *et al.*, 2007; Stals *et al.*, 2009, 2011a, 2011b). No entanto, alguns estudos enfocam a utilização do PP7 para amostras alimentares e ambientais (Rajal *et al.*, 2007; Fumian *et al.*, 2010; Brandão *et al.*, 2014), principalmente pela propagação do PP7 ser mais fácil que MNV-1, não necessitando estabelecer culturas celulares para produzir estoques desses vírus (Rajal *et al.*, 2007b). Ambos são vírus RNA, que de acordo com Stevenson e colaboradores (2008a) devem ser utilizados como o CIP por monitorarem a inibição da transcriptase reversa-PCR (RT-PCR).

Este estudo apontou o uso de MNV-1 como um potencial CIP para essa metodologia, principalmente devido a sua alta taxa de recuperação e também porque eles podem substituir os NoV em estudos de infecciosidade. Atualmente, o CIP é

utilizado rotineiramente em testes de virologia molecular clínica, proporcionando um aumento da confiança dos resultados (Bustin & Nolan, 2004; Bustin & Mueller, 2005). No entanto, o seu uso é por vezes controverso, principalmente em amostras onde se espera uma carga viral baixa. A competição entre o CIP, adicionado às amostras em concentrações mais elevadas, e o vírus alvo investigado deve ser considerado.

6. Conclusões

1. Os RVA e os HAdV demonstraram ser importantes marcadores de contaminação hospitalar, tanto em unidade pediátrica quanto adulta, na rede pública e privada;
2. A presença de vírus em superfícies hospitalares ressalta a necessidade de reavaliação dos processos e produtos utilizados para a desinfecção.;
3. O maior percentual de detecção de HAdV juntamente com a maior possibilidade de isolamento viral em cultura celular, sugere o uso destes vírus como um indicador de contaminação viral de superfícies hospitalares;
4. A metodologia avaliada mostrou-se eficaz, no entanto, é sugerido *swab* seja apenas embebido em meio de cultura para um aumento no percentual de detecção.
5. A utilização do MNV-1 como controle interno mostrou-se efetiva para monitorar a eficiência das etapas de detecção viral em diferentes superfícies, contudo o uso do bacteriófago PP7 parece adequado quando altas concentrações iniciais são inoculadas.

7. Perspectivas

Considerando os resultados aqui apresentados e visando contribuir para os avanços nos estudos da contaminação de superfícies, tanto hospitalares como de ambientes em que o risco a contaminação e infecção por indivíduos suscetíveis mostra-se crítico; como desdobramentos deste estudo visamos: i) desenvolver cartilha educativa, informando a importância da lavagem das mãos para interrupção da transmissão de doenças infecciosas; ii) realizar avaliação dos desinfetantes frente aos vírus gastroentéricos; iii) investigar a contaminação de diferentes superfícies que estão constantemente em contato com as mãos e passíveis de veicular uma infecção por vírus gastroentéricos; iv) avaliar diferentes drogas que possam vir a interromper uma infecção por RVA; v) realizar testes complementares para a inclusão de ICP nas amostras de superfícies, vi) contribuir de forma mais eficaz na avaliação da qualidade microbiológica dos ambientes hospitalares, na elucidação de surtos hospitalares e, principalmente, na tomada de medidas eficazes para a prevenção e tratamento de doentes, além de contribuir para uma revisão da legislação, no que diz respeito aos vírus.

8. Referências Bibliográficas

Abad FX, Pinto RM, Bosch A. Survival of enteric viruses on environmental fomites. *Appl. Environ. Microbiol.* 1994. 60:3704-3710. 2.

Abad FX, Villena C, Guix S, Caballero S, Pinto RM, Bosch A. Potential role of fomites in vehicular transmission of human astroviruses. *Appl. Environ. Microbiol.* 2001. 67:3904-3907.

Anderson EJ, Weber SG. Rotavirus infections in adults. *Lancet Infect Dis.* 2004;4(2):91e9.

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2004. Curso Infecção relacionada à Assistência à Saúde - IrAS - versão 1.0 – 2004. [on line] Brasil [capurado 31 Outubro 2014]. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/controle/iras.htm>.

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2014- NOTA TÉCNICA Nº 01/2014[on line] Brasil [capurado 31 Outubro 2014]. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/3885258043128c5986bdae4e9319b768/NOTA+TECNICA+IRAS+E+RM+-+FEV+2014+II+%282%29.pdf?MOD=AJPERES>

Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften (AWMF) Working Group for Hygiene in Hospital and Practice. Hygienic processing of hospital beds. *Krankenhaushygiene, Hygiene in hospital and practice.* 3rd ed. Wiesbaden [Germany]: MHPVerlag. 2005. 157-161.

Assar SK, & Block SS. Survival of microorganisms in the environment. In S. S. Block (Ed.), *Disinfection, sterilization, and preservation.* Philadelphia: Lippinkott-Williams. 2000

Atmar RL, Estes MK. Diagnosis of noncultivable gastroenteritis viruses, the human caliciviruses. *Clin Microbiol Rev.* 2001. 14(1):15-37.

Ayliffe GAJ, Fraise AP, Geddes AM and Mitchell K. *Control of hospital infection. A practical handbook.* 2000. 4th edn: Arnold.

Baert L, Uyttendaele M, Vermeersch M, Van Coillie E, Debrevere J. Survival and transfer of murine norovirus 1, a surrogate for human noroviruses, during the production process of deep-frozen onions and spinach. *J Food Prot.* 2008. 71(8):1590-7.

Ball LA. The universal taxonomy of viruses in theory and practice. In: Fauquet CM, Mayo MA, Maniloff J, Desselberger U, Ball LA, editors. *Virus Taxonomy: Eight Report of the International Committee on taxonomy of Viruses*. Elsevier, Academic Press; Amsterdam, Holland: 2005. 3-8.

Barker J, Stevens D, & Bloomfield SF. Spread and prevention of some common viral infections in community facilities and domestic homes. *Journal of Applied Microbiology*, 2001. 91: 7–21.

Barker J, Vipond IB & Bloomfield SF. Effects of cleaning and disinfection in reducing the spread of norovirus contamination via environmental surfaces. *Journal of Hospital Infection*. 2004. 58, 42–49.

Belliot G, Lavaux A, Souihel D, Agnello D, Pothier P. Use of murine norovirus as a surrogate to evaluate resistance of human norovirus to disinfectants. *Appl Environ Microbiol*. 2008. 74(10):3315-8. doi: 10.1128/AEM.02148-07.

Bishop RF, Davidson GP, Holmes IH, Ruck BJ. Virus particles in epithelial cells of duodenal mucosa from children with acute non-bacterial gastroenteritis. *Lancet*. 1973. 2(7841):1281-3.

Blackmer F, Reynolds KA, Gerba CP, Pepper IL. Use of integrated cell culture-PCR to evaluate the effectiveness of poliovirus inactivation by chlorine. *Appl Environ Microbiol*. 2000. 66(5):2267-8.

Boone SA and Gerba CP. Significance of Fomites in the Spread of Respiratory and Enteric Viral Disease. *Appl Environ Microbiol*. 2007. 73(6):1687-96.

Boxman, I. L. A., R. Dijkman, N. A. J. M. te Loeke, G. Haëgele, J. J. H. C. Tilburg, H. Vennema, and M. Koopmans. Environmental swabs as a tool in norovirus outbreak investigation, including outbreaks on cruise ships. *J. Food Prot*. 2009.72:111–119.

Brandão MLL, Almeida DO, Bispo FCP, Bricio SML, Marin VA, Miagostovich MP. Assessment of Microbiological Contamination of Fresh, Minimally Processed, and Ready-to-Eat Lettuces (*Lactuca sativa*), Rio de Janeiro State, Brazil. *Journal of Food Science*. 2014. 79(5):M961-6. doi: 10.1111/1750-3841.12459

Bustin SA, Mueller R. Real-time reverse transcription PCR (qRT-PCR) and its potential use in clinical diagnosis. *Clin. Sci*. 2005. 109:365–379.

Bustin SA, Nolan T. Pitfalls of quantitative real-time reverse-transcription polymerase chain reaction. *J. Biomol. Tech*. 2004. 15:155–166.

Caddy S, Breiman A, le Pendu J, Goodfellow I. Genogroup IV and VI canine noroviruses interact with histo-blood group antigens. *J Virol*. 2014. 88(18):10377-91. doi: 10.1128/JVI.01008-14.

Cannon JL, Papafragkou E, Park GW, Osborne J, Jaykus LA, Vinjé J. Surrogates for the study of norovirus stability and inactivation in the environment: a comparison of murine norovirus and feline calicivirus. *J Food Prot*. 2006. 69(11):2761-5.

Cardoso Dd, Soares CM, Dias e Souza MB, de Azevedo Mda S, Martins RM, Queiróz DA, de Brito WM, Munford V, Rácz ML. Epidemiological features of rotavirus infection in Goiânia, Goiás, Brazil, from 1986 to 2000. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2003. 98(1):25-9.

Carducci A, Verani M, Lombardi R, Casini B, Privitera G. Environmental survey to assess viral contamination of air and surfaces in hospital settings. *Journal of Hospital Infection*. 2011. 77: 242- 7

Carducci A, Verani M, Casini B, Giuntini A, Mazzoni F, Rovini E, *et al*. Detection and potential indicators of the presence of hepatitis C virus on surfaces in hospital settings. *Lett Appl Microbiol*. 2002. 34(3):189-93.

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

Cliver, DO. Control of Viral Contamination of Food and Environment. *Food and Environmental Virology*. 2009. 1(1): 3-9. doi: 10.1007/s12560-008-9005-2.

Conner ME, Ramig RF. Viral enteric diseases. Viral pathogenesis. *Lippincott-Raven Publishers*, Philadelphia, Pa. 1997.

Creamer E, Humphreys H. The contribution of beds to healthcare-associated infection: the importance of adequate decontamination. *J Hosp Infect*. 2008. 69:8-23.

Cromeans TL, Lu X, Erdman DD, Humphrey CD, Hill VR. 2008. Development of plaque assays for adenoviruses 40 and 41. *Journal of Virological Methods*. 2008. 151:140-145.

do Carmo GM, Yen C, Cortes J, Siqueira AA, de Oliveira WK, Cortez-Escalante JJ *et al*. Decline in diarrhea mortality and admissions after routine childhood rotavirus immunization in Brazil: a time-series analysis. *PLoS Med*. 2011. 8(4):e1001024.

Dreier J, Störmer M, Kleesiek K. Use of bacteriophage MS2 as an internal control in viral reverse transcription-PCR assays. *J Clin Microbiol.* 2005. 43(9):4551-7.

Dubois E, Agier C, Traoré O, Hennechart C, Merle G, Crucière C, Laveran H. Modified concentration method for the detection of enteric viruses on fruits and vegetables by reverse transcriptase-polymerase chain reaction or cell culture. *J Food Prot.* 2002. 65(12):1962-9.

Duizer E, Bijkerkl P, Rockx B, De Groot A, Twisk F, Koopmans M. Inactivation of calicivirus. *Appl. Environ. Microbiol.* 2004. v. 70: 4538–4543.

Enders JF, Bell JA, Dingle JH, Francis T Jr, Hilleman MR, Huebner RJ, Payne AM. Adenoviruses: group name proposed for new respiratory-tract viruses. *Science.* 1956. 124(3212):119-20.

Estes MK, Greenberg HB. Rotaviruses. *Fields Virology.* 6th ed. Lippincott Williams & Wilkins. Philadelphia. 2013.

Estes MK, Greenberg HB. Rotaviruses. *Fields Virology.* 6th edição. Lippincott Williams & Wilkins. Philadelphia; 2013.

Estes MK, Kapikian AZ. Rotaviruses. *Fields Virology.* 5th ed. Lippincott Williams & Wilkins. Philadelphia. 2007.

Farthing MJG. *Viruses and the Gut.* Welwyn Garden City, Hertfordshire: Smith Kline & French. 1989.

Fields BN, Knipe DM, Howley PM, Chanock RM, Melnick JL, Monath TP, Roizman B, Straus SE (eds). *Fields Virology.* Vol.2. Lippincott-Raven, 3rd ed., Philadelphia, USA, 1996.

Flewett TH, Woode GN. The rotaviruses. *Arch Virol.* 1978. 57(1):1-23.

Flewett TH, Bryden AS, Davies H. Letter. Virus particles in gastroenteritis. *Lancet.* 1973. 2(7844):1497.

Franco MA, Angel J, Greenberg HB. Immunity and correlates of protection for rotavirus vaccines. *Vaccine.* 2006; 24:2718–2731.

Fumian TM, Leite JP, Castello AA, Gaggero A, Caillou MS, Miagostovich MP. Detection of rotavirus A in sewage samples using multiplex qPCR and an evaluation of the ultracentrifugation and adsorption-elution methods for virus concentration. *J Virol Methods.* 2010. 170(1-2):42-6. doi: 10.1016/j.jviromet.2010.

Gallimore CI, Cubbit D, du Plessis N, Gray J J. Asymptomatic and symptomatic excretion of noroviruses during a hospital outbreak of gastroenteritis. *J Clin Microbiol.* 2004. 42(5): 2271-4

Gallimore CI, Taylor C, Gennery AR, Cant AJ, Galloway A, Iturriza-Gomara M, *et al.* Environmental monitoring for gastroenteric viruses in a pediatric primary immunodeficiency unit. *J Clin Microbiol.* 2006. 44(2): 395-9.

Gallimore CI, Taylor C, Gennery AR, Cant AJ, Galloway A, Lewis , *et al.* Use of a Heminested Reverse Transcriptase PCR Assay for Detection of Astrovirus in Environmental Swabs from an Outbreak of Gastroenteritis in a Pediatric Primary Immunodeficiency Unit. *J Clin Microbiol.* 2005. 43(8): 3890 - 94

Gallimore CI, Taylor C, Gennery AR, Cant AJ, Galloway A, Xerry J, *et al.* Contamination of the hospital environment with gastroenteric viruses: comparison of two pediatric wards over a winter season. *J Clin Microbiol.* 2008. 46(9):3112-15.

Goldmann DA. Transmission of viral respiratory infections in the home. *Pediatr Infect Dis J.* 2000. 19(10 Suppl):S97-102.

Goyal SM. Methods of virus detection in foods. *Viruses in Foods* (Goyal SM, ed.). *Food Microbiology and Food Safety Series.* Springer, New York. 2006. 101–119.

Greening GH. Human and Animal Viruses in food (including taxonomy of enteric virus). Goyal SM, Ed. *Virus in foods*, 1st edn. St. Paul, USA: University of Minnesota. 2006. 28-29.

Griffin JS, Plummer JD, Long SC. Torque teno virus: an improved indicator for viral pathogens in drinking waters. *J Virol.* 2008. v.5:p. 112.

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

Haramoto E, Katayama H, Oguma K, Ohgaki S. Quantitative analysis of human enteric adenoviruses in aquatic environments. *J Appl Microbiol.* 2007. 103:2153–2159.

Haramoto E, Katayama H, Oguma K, Ohgaki S. Recovery of naked viral genomes in water by virus concentration methods. *J Virol. Methods.* 2007 142:169-73.

Heid CA, Stevens J, Livak KJ & Williams PM. Real time quantitative PCR. *Genome Res.* 1996. 6: 986–994.

Henquell C, Boeuf B, Mirand A, Bacher C, Traore O, Déchelotte P, Labbé A, Bailly JL, Peigue-Lafeuille H. Fatal adenovirus infection in a neonate and transmission to health-care workers. *J Clin Virol.* 2009. 45:345-8.

Herzog AB, Pandey AK, Reyes-Gastelum D, Gerba CP, Rose JB, Hashsham SA. Evaluation of Sample Recovery Efficiency for Bacteriophage P22 on Fomites. *Appl Environ Microbiol.* 2012. 78(22):7915-22. doi: 10.1128/AEM.01370-12.

Hewitt J, Rivera-Aban M, Greninge G.E. Evaluation of murine norovirus as a surrogate for human norovirus and hepatitis A virus in heat inactivation studies. *J. Appl. Microbiol.* 2009. v. 107 (1): 65-71.

Hilleman MR, Werner JH. Recovery of new agent from patients with acute respiratory illness. *Proc. Soc. Exp. Biol Med.* 1954. 85 (1) 183-8.

Horwitz MS. Adenovirus immunoregulatory genes and their cellular targets. *Virology.* 2001. 279: 1-8.

Hota B. Contamination, disinfection, and cross-colonization: are hospital surfaces reservoirs for nosocomial infection? *Clin Infect Dis.* 2004. 39(8):1182-9.

ICTVdB. <http://www.ictvonline.org/virusTaxonomy.asp>. Acesso em 16/09/2014 às 14:00hs).

Johne R, Otto P, Roth B, Löhren U, Belnap D, Reetz J, Trojnar E. Sequence analysis of the VP6-encoding genome segment of avian group F and G rotaviruses. *Virology.* 2011;412(2):384-91.

Kapikian AZ, Hoshino Y, Chanock RM. Rotaviruses. Fields BN, Knipe DM, Howley PM, Eds. *Fields virology*, 4th ed. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins Publishers. 2001. 1787-1833.

Karts SM, Wobus CE, Lay M, Davidson J, Virgin HW. STAT1-Dependent Innate Immunity to a Norwalk-Like Virus. *Science.* 2003. v.299:1575-1578.

Kelley CJ. A fatal case of neonatal adenovirus infection. *Neonatal Netw.* 2010. 29:297-305.

Kingsley DH, Holliman DR, Calci KR, Chen H, Flick GJ. Inactivation of a norovirus by high-pressure processing. *Appl Environ Microbiol.* 2007. 73(2):581-5.

Koopmans M, Von Bonsdorff CH, Vinjé, J, De Medici DY, Monroe S. Foodborne Viruses. *FEMS Microbiol Ver.* 2002. 26: 187-205.

Kramer A, Schwebke I, Kampf G. How long do nosocomial pathogens persist on inanimate surfaces? A systematic review. *BMC Infect Dis.* 2006. 6:130.

Lee J, Zoh K, KO G. Inactivation and U.V. disinfection of murine norovirus with TiO₂ under various environmental conditions. *Appl Environ Microbiol.* 2008. 74(7): 2111-2117.

Levidiotou S, Gartzonika C, Papaventsis D, Christaki C, Priavali E, Zotos N, Kapsali E, Vrioni G. Viral agents of acute gastroenteritis in hospitalized children in Greece. *Clin Microbiol Infect.* 2009. 15(6):596-8.

Ley V, Higgins J, Fayer R. Bovine Enteroviruses as Indicators of Fecal Contamination. *Appl Environ Microbiol.* 2002. 68:3455-3461.

Linhares AC, Pinheiro FP, Schmetz C, Müller G, Peters D. Duovirus (Rotavirus) in Belem, State of Para, Brazil (preliminary report). *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 1977. 19(4):278-9.

Linhares AC. Rotavirus infection in Brazil: epidemiology and challenges for its control. *Cad Saude Publica.* 2000. 16(3):629-46.

Macinga DR, Sattar SA, Jaykus LA, Arbogast JW. Improved inactivation of nonenveloped enteric viruses and their surrogates by a novel alcohol-based hand sanitizer. *Appl Environ Microbiol.* 2008. 74(16):5047-52. doi: 10.1128/AEM.00487-08.

Marks PJ, Vipond I B, Carlisle D, Deakin D, Fey RE, & Caul E O. Evidence for airborne transmission of Norwalk-like virus (NLV) in a hotel restaurant. *Epidemiology and Infection.* 2000. 124: 481- 487.

Mascarenhas JD, Gusmão RH, Barardi CR, Paiva FL, Simões CO, Gabbay YB, Monteiro TA, Linhares AC. Characterization of rotavirus P genotypes circulating among paediatric inpatients in Northern Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo.* 1999. 41(3): 165-170.

Matsushima Y, Shimizu H, Kano A, Nakajima E, Ishimaru Y, Dey SK, Watanabe Y, Adachi F, Suzuki K, Mitani K, Fujimoto T, Phan TG, Ushijima H. Novel human adenovirus strain, Bangladesh. *Emerg Infect Dis.* 2012. 18:846-8.

Matthijnssens J, Ciarlet M, McDonald SM, Attoui H, Bányai K, Brister JR, Buesa J, Esona MD, Estes MK, Gentsch JR, Iturriza-Gómara M, Johne R, Kirkwood CD, Martella V, Mertens PP, Nakagomi O, Parreño V, Rahman M, Ruggeri FM, Saif LJ, Santos N, Steyer A, Taniguchi K, Patton JT, Desselberger U, Van Ranst M. Uniformity 133 of rotavirus strain nomenclature proposed by the Rotavirus Classification Working Group (RCWG). *Arch Virol*. 2011;156(8):1397-413.

Mattison K, Brassard J, Gagné M, Ward P, Houde A, Lessard L, Simard C, Shukla A, Pagotto F, Jones TH, Trottier Y. The feline calicivirus as a sample process control for the detection of food and waterborn RNA viruses. *Int J Food Microbiol*. 2009. 132(1):73-77. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2009.04.002

Mbithi JN, Springthorpe VS, Boulet JR, & Sattar SA. (1992). Survival of hepatitis-A virus on human hands and its transfer on contact with animate and inanimate surfaces. *Journal of Clinical Microbiology*. 1992. 30:757–763.

McClain B, Settembre E, Temple BR, Bellamy AR, Harrison SC. X-ray crystal structure of the rotavirus inner capsid particle at 3.8 Å resolution. *J Mol Biol*. 2010. 397(2):587-99.

Mena KD, Gerba CP, Waterborne Adenovirus. *Rev Environ Contam Toxicol*. 2009. 198: 133-167.

Mocé-Llivina L, Papageorgiou GT, Jofre J. A membrane-based quantitative carrier test to assess the virucidal activity of disinfectants and persistence of viruses on porous fomites. *J Virol Methods*. 2006. 135(1):49-55.

Morales-Morales HA, Vidal G, Olszewski J, Rock CM, Dasgupta D, Oshima KH, Smith GB. Optimization of a reusable hollow-fiber ultrafilter for simultaneous concentration of enteric bacteria, protozoa, and viruses from water. *Appl Environ Microbiol*. 2003. 69(7):4098-102.

Myrmel M, Berg EMM, Grinde B, Rimstad E. Enteric viroses in inlet and outlet samples from sewage treatment plants. *J Water Health*. 2006. 4:197–209.

Nemerow GR, Pache L, Redd YV, Stewart PL. Insights into adenovirus host cell interactions from structural studies. *Virology*. 2009. 384(2):380-8. doi: 10.1016/j.virol.2008.10.016.

Parashar UD, Bresee JS, Gentsch JR, Glass RI. Rotavirus. *Emerging Infectious Diseases*. 1998. 4(4):561-70.

Parashar UD, Hummelman EG, Bresee JS, Miller AM and Glass RI. Global illness and deaths caused by rotavirus disease in children. *Emerging Infectious Diseases*. 2003. 9(5):565-571.

Patton JT, Spencer E. Genome replication and packaging of segmented double-stranded RNA viruses. *Virology*. 2000. 277(2):217-25.

Patton JT. Rotavirus diversity and evolution in the post-vaccine world. *Discov Med*. 2012. 13(68):85-97. Review.

Patton JT. Rotavirus diversity and evolution in the post-vaccine world. *Discov Med*. 2012;13(68):85-97.

Payne DC, Stockman L, Gentsch JR and Parashar UD. Rotavirus. Roush SW, ed. *Manual for the Surveillance of Vaccine Preventable Diseases*. 4th Edition. Atlanta: US Centers for Disease Control and Prevention. 2008. Chapter 13.

Pereira HG, Linhares AC, Candeias JA, Glass RI. National laboratory surveillance of viral agents of gastroenteritis in Brazil. *Bulletin of the Pan American Health Organization*. 1993. 27:224-233.

Pham TT, Burchette JL, Jr., Hale LP. Fatal disseminated adenovirus infections in immunocompromised patients. *Am J Clin Pathol*. 2003. 120:575–583.

Piednoir E, Bureau-Chalot F, Merle C, et al. Direct costs associated with a nosocomial outbreak of adenoviral conjunctivitis infection in a long-term care institution. *Am J Infect Control*. 2002. 30:407- 410.

Pinto RM & Bosch A. Rethinking virus detection in food. *Foodborne Viruses: Progress and Challenges* (Koopmans M, Cliver DO & Bosch A, eds). 2008. 171–188. ASM Press, Washington, DC.

Prado T, Fumian TM, Miagostovich MP, Gaspar AM. Monitoring the hepatitis A virus in urban wastewater from Rio de Janeiro, Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2012. 106(2):104-9. doi: 10.1016/j.trstmh.2011.10.005.

Poma H.R., Rajal V.B., Blanco Fernández M.D., Barril P.A., Giordano M.O., Masachessi G., et al. Evaluation of concentration efficiency of the Pseudomonas

aeruginosa phage PP7 in various water matrixes by different methods. 2013 185: 2565-76. doi: 10.1007/s10661-012-2731-9.

Prado T, Guilayn Wde C, Gaspar AM, Miagostovich MP. The efficiency of concentration methods used to detect enteric viruses in anaerobically digested sludge. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2013. 108(1):77-83.

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

Rácz ML, Candeias JA, Trabulsi JR, Murahowski J. Diarrheal diseases in Brazil: clinical features of rotavirus-associated gastroenteritis in children. *Eur J Epidemiol*. 1988. 4(3):382-5.

Rajal VB, McSwain BS, Thompson DE, Leutenegger CM, Kildare BJ, Wuertz S. Validation of hollow fiber ultrafiltration and real-time PCR using bacteriophage PP7 as surrogate for the quantification of viruses from watwr samples. *Water Res*. 2007. 41(7):1411-22.

Ramani S, Arumugam R, Gopalarathinam N, Mohanty I, Mathew S, Gladstone BP, Jana AK, Kuruvilla KA and Kang G. Investigation of the environment and of mothers in transmission of rotavirus infections in the neonatal nursery. *J Med Virol*. 2008. 80(6):1099-105.

Rigotto C, Hanley K, Rochelle PA, De Leon R, Barardi CRM, Yates MV. Survival of Adenovirus types 2 and 41 in surface and ground waters measured by plaque assay. *Environ. Sci. Technol*. 2011. 45: 4145-4150.

Robinson CM, Seto D, Jones MS, Dyer DW, Chodosh J. Molecular evolution of human species D adenoviruses. *Infect Genet Evol* 2011. 11(16): 1208-1217.

Rodríguez-Lázaro D, Cook N, Ruggeri FM, Sellwood J, Nasser A, Nascimento MS, *et al*. Virus hazards from food, water and other contaminated environments. *FEMS Microbiol Rev*. 2012. 36(4):786-814. doi: 10.1111/j.1574-6976.2011.00306.x.

Rodríguez-Lázaro D, Cook N, Ruggeri FM, Sellwood J, Nasser A, Nascimento MS, *et al*. Virus hazards from food, water and other contaminated environments *FEMS Microbiol Rev*. 2012. 36(4):786-814. doi: 10.1111/j.1574-6976.2011.00306.x.

Rowe WP, Huebner RJ, Gailmore LK, Parrot RH, Ward TG. Isolation of a cytopathogenic agent from human adenoids undergoing spontaneous degeneration in tissue culture. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1953. 84(3):570-3.

Russell WC. Update on adenovirus and its vectors. *J Gen Virol*. 2000. 81(11):2573-604.

Rutala WA, Peacock JE, Gergen MF, Sobsey MD, Weber DJ. Efficacy of Hospital Germicides against Adenovirus 8, a Common Cause of Epidemic Keratoconjunctivitis in Health Care Facilities. *Antimicrob Agents Chemother*. 2006. 50: 1419–1424.

Rzezutka A. and Cook N. Survival of human enteric viruses in the environment and food. *FEMS Microbiol Rev*. 2004. 28:441-53.

Sattar SA, Jacobsen H, Rahman H, Cusack TM, Rubino JR. Interruption of rotavirus spread through chemical disinfection. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 1994. 15(12):751-6.

Sattar SA, Lloyd-Evans N, Springthorpe VS and Nair RC. Institutional outbreaks of rotavirus diarrhoea: potential role of fomites and environmental surfaces as vehicles for virus transmission. *J Hyg (Lond)*. 1986. 96(2):277-89.

Sattar SA, Springthorpe VS. Transmission of viral infections through animate and inanimate surfaces and infection control through chemical disinfection. In: Hurst CJ, editor. *Modeling disease transmission and its prevention by disinfection*. Cambridge, UK: Cambridge University Press. 1996. p. 224-257.

Sattar SA. Microbicides and the environmental control of nosocomial viral infections. *J Hosp Infect*. 2004. 56:S64-9.

Scherer K, Made D, Ellerbroek L, Schulenburg J, Johne R, Klein G. Application of a Swab Sampling Method for the Detection of Norovirus and Rotavirus on Artificially Contaminated Food and Environmental Surfaces. *Food Environ Virol*. 2009. 1:42–49. DOI 10.1007/s12560-008-9007-0

Scherer K, Johne R, Schrader C, Ellerbroek L, Schulenburg J, Klein G. Comparison of two extraction methods for viruses in food and application in a norovirus gastroenteritis outbreak. *J Virol Methods*. 2010. 169(1):22-27. doi: 10.1016/j.jviromet.2010.06.008

Scherer K, Mañde D, Ellerbroek L, Schulenburg J, Johne R, Klein G. Application of a Swab Sampling Method for the Detection of Norovirus and Rotavirus on Artificially Contaminated Food and Environmental Surfaces. *Food Environ Virol.* 2009 1:42–49. DOI 10.1007/s12560-008-9007-0.

Schultz AC, Perelle S, Di Pasquale S, Kovac K, De Medici D, Fach P, Sommer HM, Hoofar J. Collaborative validation of a rapid method for efficient virus concentration in bottled water. *Int J Food Microbiol.* 2011. 145 Suppl 1:S158-66. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2010.07.030.

Seymour IJ, & Appleton H. Foodborne viruses and fresh produce. *Journal of Applied Microbiology.* 2001. 91, 759–773.

Shenk TE. Adenoviridae: The viruses and their replication. In: Fields B, Knip D, Howley PM (eds). *Fields Virology.* Vol.2. Lippincott-Raven, 3rd ed. Philadelphia. 1996. chapter 67: 2111-2148.

Smith JG, Wiethoff CM, Stewart PL, Nemerow GR. Adenovirus. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2010. 343: 195-224.

Soule H, Genoulaz O, Gratacap-Cavallier B, Mallaret MR, Morand P, François P, Luu Duc Bin D, Charvier A, Bost-Bru C, Seigneurin JM. Monitoring rotavirus environmental contamination in a pediatric unit using polymerase chain reaction. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 1999. 20:432-34.

Staat MA, Azimi PH, Berke T, Roberts N, Bernstein DI, Ward RL, Pickering LK, Matson DO. Clinical presentations of rotavirus infection among hospitalized children. *Pediatr Infect Dis J.* 2002. 21(3):221-7.

Stals A, Baert L, Botteldoorn N, Werbrouck H, Herman L, Uyttendaele M, *et al.* Multiplex real-time RT-PCR for simultaneous detection of GI/GII noroviruses and murine norovirus 1. *J. Virol. Methods.* 2009. 161(2):247-53

Stals A, Baert L, De Keuckelaere A, Van Coillie E, Uyttendaele M. Evaluation of a norovirus detection methodology for ready-to-eat foods. *Int J Food Microbiol.* 2011a. 145(2-3):420-5.

Stals A, Baert L, Jasson V, Van Coillie E, Uyttendaele M. Screening of fruit products for norovirus and the difficulty of interpreting positive PCR results. *J Food Prot.* 2011b. 74(3):425-31. doi: 10.4315/0362-028X.JFP-10-209.

Stals A, Baert L, Van Coillie E, Uyttendaele M. Evaluation of a norovirus detection methodology for soft red fruits. *Food Microbiol.* 2011c. 28(1):52-8

Stevenson J, Hymas W, Hillyard D. The use of Armored RNA as a multi-purpose internal control for RT-PCR. *J Virol Methods.* 2008. 150(1-2):73-6. doi: 10.1016/j.jviromet.2008.02.007.

Stine SW, Song I, Choi CY, & Gerba CP. Effect of relative humidity on preharvest survival of bacterial and viral pathogens on the surface of cantaloupe, lettuce, and bell peppers. *Journal of Food Protection.* 2005. 68:1352–1358.

Tate JE, Haynes A, Payne DC, Cortese MM, Lopman BA, Patel MM et al. Trends in national rotavirus activity before and after introduction of rotavirus vaccine into the national immunization program in the United States, 2000 to 2012. *Pediatr Infect Dis J.* 2013. 32(7):741-4.

Thurston-Enriquez JA, Haas CN, Jacangelo J, Gerba CP. Inactivation of feline calicivirus and adenovirus type 40 by UV radiation. *Appl Environ Microbiol.* 2003. 69: 577–582.

Todd EC, Greig JD, Bartleson CA, & Michaels BS. Outbreaks where food workers have been implicated in the spread of foodborne disease. Part 6. Transmission and survival of pathogens in the food processing and preparation environment. *Journal of Food Protection.* 2009. 72:202–219.

Uhrbrand K, Myrmel M, Maunula L, Vainio K, Trebbien R, Nørrung B, Schultz AC. Evaluation of a rapid method for recovery of norovirus and hepatitis A virus from oysters and blue mussels. *J Virol Methods.* 2010. 169(1):70-78. doi: 10.1016/j.jviromet.2010.06.019

Uhrbrand K, Myrmel M, Maunula L, Vainio K, Trebbien R, Nørrung B, Schultz AC. Evaluation of a rapid method for recovery of norovirus and hepatitis A virus from oysters and blue mussels. *J Virol Methods.* 2010. 169(1):70-78. doi: 10.1016/j.jviromet.2010.06.019

Walker C.L., Rudan I., Liu L., Nair H., Theodoratou E., Bhutta Z., O'Brien K.L, Campbell H. Global burden of childhood pneumonia and diarrhea. *Lancet.* 2013. 381: 1405–16.

Van Regenmortel MHV, Fauquet CM, Bishop DHL, Cartens EB, Estes MK, Lemon SM, Maniloff J, Mayo MA, McGeoch DJ, Pringle CR, Wickner RB, Ball, LA. The universal taxonomy of viruses in theory and practice. In: Fauquet CM, Mayo MA, Maniloff J, Desselberger U, Ball LA, editors. *Virus Taxonomy: Eight Report of the International Committee on taxonomy of Viruses*. Elsevier, Academic Press; Amsterdam, Holland: 2005. 3-8.

Vasickova P, Pavlik I, Verani M, Carducci A. Issues Concerning Survival of Viruses on Surfaces. *Food and Environmental Virology*. 2010. Volume 2: Issue 1, 24-34

von Rheinbaben F, Schunemann S, Gross T, & Wolff MH. Transmission of viruses via contact in a household setting: experiments using bacteriophage phi X174 as a model virus. *Journal of Hospital Infection*. 2000. 46: 61–66.

Wilhelmi I, Roman E, Sanchez-Fauquier A. Viruses causing gastroenteritis. *Clin Microbiol Infect*. 2003. 9:247-62.

Winther B, Hayden FG, & Hendley JO. Picornavirus infections in children diagnosed by RT-PCR during longitudinal surveillance with weekly sampling: Association with symptomatic illness and effect of season. *Journal of Medical Virology*. 2006. 78, 644–650.

Wobus CE, Karst SM, Thackray LB, Chang KO, Sosnovtsev SV, Belliot G. Replication of norovirus in cell culture reveals a tropism for dendritic cells and macrophages. *PLoS Biology*. 2004. v. 2, n. 12, p.432.

Wobus CE, Thackray LB, Virgin HW. Murine norovirus: a model system to study norovirus biology and pathogenesis. *J. Virol*. 2006. 80(11):5104-12.

Wu HM, Fornek M, Schwab KJ, Chapin AR, Gibson K, Schwab E, *et al*. A norovirus outbreak at a long-term-care facility: the role of environmental surface contamination. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2005. 26: 802–810.