

Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

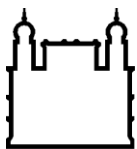
CARMEN BAUR VIEIRA

**DETECÇÃO, QUANTIFICAÇÃO E
CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE VÍRUS
GASTROENTÉRICOS NA LAGOA
RODRIGO DE FREITAS, 2007-2008.**

Dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências. Área de Concentração: Biologia Celular e Molecular.

Orientadora: Dra. Marize Pereira Miagostovich

RIO DE JANEIRO
2010



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

AUTOR (a): Carmen Baur Vieira

**DETECÇÃO, QUANTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE VÍRUS
GASTROENTÉRICOS NA LAGOA RODRIGO DE FREITAS, 2007-2008.**

ORIENTADORA: Dra. Marize Pereira Miagostovich

Aprovada em: 19 / 03 / 2010

EXAMINADORES:

Dr. Christian Maurice Gabriel Niel – Instituto Oswaldo Cruz (IOC)/FIOCRUZ - **Presidente**

Dra. Maria Inês Zanolli Sato – Companhia Ambiental do Estado de São Paulo
(CETESB)/SP

Dra. Cláudia Lamarca Vitral – Universidade Federal Fluminense (UFF)/RJ

Rio de Janeiro, 19 de Março de 2010

Dedico esta dissertação aos meus pais, Antonio e Bel, e ao meu irmão Henrique, pelo amor e apoio que me deram ao longo de toda a minha vida.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Dra. Marize Pereira Miagostovich, pela confiança, carinho, atenção, críticas e ensinamentos que me fizeram aprender tanto; além de palavras de conforto, momentos de risadas e amizade ao longo destes cinco anos de convivência.

Ao Dr. José Paulo Gagliardi Leite, chefe do Laboratório de Virologia Comparada e Ambiental (LVCA), pela atenção, preocupação, dicas, críticas e por suas carinhosas brincadeiras.

Às Dras. Maria Inês Zanolli Sato e Cláudia Vitral e ao Dr. Christian Niel por gentilmente aceitarem o convite para participar da banca examinadora desta dissertação e às Dras. Flávia Barreto e Caroline Soares por aceitarem a participação como suplentes desta dissertação.

À Dra. Caroline Soares pela revisão desta dissertação.

Ao Instituto Oswaldo Cruz pela concessão da bolsa.

À Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular do Instituto Oswaldo Cruz (IOC)/FIOCRUZ.

Ao grupo do Laboratório de Desenvolvimento Tecnológico em Virologia (LDTV), parceiro na realização deste projeto e, em especial, à Dra. Ana Maria Coimbra Gaspar pelo apoio financeiro na realização das coletas.

Ao Professor Takumi Iguchi da Escola Nacional de Saúde Pública (ENSP) pelo grande apoio na análise estatística dos dados obtidos neste estudo.

À toda a família LVCA: Alexandre Fialho, Alexandre Pina, Ana Carolina Ganime, Ana Maria Pinto, Anna Carolina Tinga, Eduardo Volotão, Edson Pereira, Francisca do Santos, Hugo Resque, Joeler Vargas, Júlia Fioretti, Juliana Andrade, Juliana Bragazzi, Ludmila Rocha, Luis Fernando Tort, Maria da Penha Xavier, Marcos César, Mariela Martinez, Marilda Almeida, Maria Eugenia Galeano, Mônica Rocha, Pamella de Souza, Rosane Assis, Silvana Portes, Tatiana Rose, Thaís Ramos e, também, àqueles que já não fazem mais parte do laboratório, pela amizade e por bons momentos compartilhados dentro e fora dele. Em especial, à amiga Marcelle pela amizade, conversas, desabafos e momentos de diversão.

À todos da Virologia Ambiental: Marize, por nos orientar, incentivar e tornar um grupo bem unido; Flávia Guimarães, por me adotar como filha; Matias Victoria e Túlio Fumian, por dividirem a sala comigo e me proporcionarem momentos hilários. Obrigada por me ensinarem a entender esse mundo e a “arte de concentrar e detectar vírus na água”. À minha amiga Fabiana Fioretti (Fabi) por me receber com carinho e me ensinar tanto no laboratório e que, mesmo não fazendo mais parte do grupo, se preocupa muito comigo. Obrigada também ao mais novo integrante do grupo, Nilson Porto, por me auxiliar na bancada. A todos vocês, pela amizade, companheirismo, apoio em todas as horas e oportunidade de desfrutar do conhecimento de cada um.

Ao barqueiro César, por nos ajudar nas coletas e ensinar tantas coisas sobre a Lagoa.

À todos aqueles que participaram das divertidas e cansativas coletas para ajudar e/ou admirar a paisagem e/ou pegar sol na Lagoa: Dras. Ana Gaspar e Jaqueline Mendes, sem vocês a primeira coleta teria sido um caos, Leonardo Diniz e Carlos Pinho, pela ajuda com o GPS, Débora, Fabi, Flávia, Marcelle, Matias, Tatiana Prado e Túlio, por estarem sempre dispostos a ajudar.

Um agradecimento mais que especial à Ana Carolina de Oliveira Mendes (Carol), minha companheira em todos os momentos desta dissertação, por ser divertida e dedicada e compartilhar comigo tantos momentos estressantes, engraçados, de “quase-morte” e sustos nas coletas e concentrações. O desenvolvimento deste trabalho e a afinidade que temos me proporcionaram mais esta amizade.

À Débora Regina Lopes dos Santos e Tamara Fogel, amigas do LDTV conquistadas com o convívio nos Pavilhões Rocha Lima e Hélio e Peggy Pereira, além dos momentos compartilhados fora do laboratório.

Aos meus pais, Antonio e Bel, por serem a base sólida que me sustenta, por me proporcionarem uma vida em família, por serem meus modelos de dedicação, meus grandes amigos, por me abraçarem, colocarem no colo e me fazerem sorrir em momentos tristes e estressantes. Sem vocês, suas horas de conversas e sorrisos pela minha felicidade e conquistas não teria chegado até aqui.

Ao meu querido irmão Henrique, que, mesmo mais novo, me ensina grandes lições e a quem admiro tanto. Obrigada pelo apoio, estímulo, torcida e companheirismo incondicionais.

Aos meus familiares, essa verdadeira de legião tios e primos, pela presença e preocupação constantes. Aos tios Heber e Lydia e prima Gláucia, pelo amor de pais e irmã. Às primas Úrsula e Luana, pela grande amizade que se consolida a cada dia de estreita, harmoniosa e feliz convivência.

A todos os meus amigos do “universo não científico” por não entenderem nada do que eu faço e sempre perguntarem pelos “meus vírus”, meus resultados e me proporcionarem momentos de distração.

"Se tens que lidar com água,
consulta primeiro a experiência,
depois a razão".
Leonardo da Vinci

ÍNDICE

| | |
|---|-------|
| LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS | x |
| LISTA DE FIGURAS | xiii |
| LISTA DE TABELAS | xv |
| LISTA DE QUADROS..... | xvi |
| RESUMO..... | xviii |
| ABSTRACT | xix |
| 1. INTRODUÇÃO | 1 |
| 1.1. Vírus gastroentéricos | 2 |
| 1.1.1. Rotavírus | 2 |
| 1.1.2. Norovírus | 9 |
| 1.2. Metodologias de detecção de vírus gastroentéricos..... | 15 |
| 1.2.1. Rotavírus | 15 |
| 1.2.2. Norovírus | 16 |
| 1.2.3. Detecção de vírus gastroentéricos em amostras ambientais..... | 17 |
| 1.3. Prevenção e controle | 19 |
| 2. JUSTIFICATIVA | 20 |
| 3. OBJETIVOS..... | 22 |
| 3.1. Objetivo geral | 22 |
| 3.2. Objetivos específicos | 22 |
| 4. MATERIAL E MÉTODOS | 23 |
| 4.1. Área de estudo..... | 23 |
| 4.2. Coleta | 24 |
| 4.3. Concentração viral | 26 |
| 4.3.1. Determinação da eficiência do método de concentração viral | 28 |
| 4.4. Extração do ácido nucléico e obtenção do DNA complementar (cDNA)..... | 28 |
| 4.5. Detecção e quantificação viral | 29 |
| 4.5.1. Rotavírus | 29 |
| 4.5.2. Norovírus | 35 |
| 4.5.3. Análise dos produtos amplificados em gel de agarose..... | 40 |
| 4.6. Sequenciamento nucleotídico | 40 |
| 4.6.1. Purificação e reação de sequência | 40 |
| 4.7. Caracterização molecular | 41 |
| 4.8. Parâmetros microbiológicos | 41 |
| 4.8.1. <i>E.coli</i> | 41 |
| 4.8.1. Adenovírus humano (HuAdV)..... | 42 |
| 4.9. Parâmetros físico-químicos | 43 |
| 4.10. Análise estatística | 43 |
| 5. RESULTADOS | 45 |
| 5.1. Detecção e quantificação viral | 46 |
| 5.2. Caracterização molecular dos vírus gastroentéricos detectados..... | 49 |
| 5.2.1. Rotavírus | 49 |
| 5.2.2. Norovírus | 51 |
| 5.3. Parâmetros microbiológicos..... | 52 |
| 5.3.1. <i>E.coli</i> | 52 |
| 5.3.2. Adenovírus humano (HuAdV)..... | 54 |
| 5.3.3. Correlação entre detecção de RV-A e NV-GII e parâmetros microbiológicos | 54 |
| 5.3.3.1. Correlação entre detecção de RV-A e NV-GII e parâmetros microbiológicos nas amostras provenientes da Lagoa Rodrigo de Freitas..... | 57 |
| 5.4. Parâmetros físico-químicos | 58 |
| 5.4.1. Correlação entre detecção de RV-A e NV-GII e parâmetros físico-químicos nas amostras provenientes da Lagoa Rodrigo de Freitas..... | 62 |
| 6. DISCUSSÃO..... | 64 |
| 6.1. Eficiência do método de concentração, detecção e caracterização de RV-A e NV-GII | 64 |
| 6.2. Correlação entre detecção de RV-A e NV-GII e parâmetros microbiológicos..... | 69 |

| | |
|--|----|
| 6.2.1. <i>E.coli</i> | 69 |
| 6.2.2. Adenovirus humano (HuAdV)..... | 70 |
| 6.3. Correlação entre detecção de RV-A e NV-GII e parâmetros físico-químicos | 71 |
| 7. CONCLUSÕES | 74 |
| 8. PERSPECTIVAS | 76 |
| 9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 77 |

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

μM – micromolar

μL – microlitro

A – adenina

aa – aminoácido

AstV – astrovírus

BLAST – *Basic Local Alignment Search Tool*

CA – Califórnia

Ca^{++} – íons cálcio

cDNA – *complementary DNA* - DNA complementar

cg – cópias de genoma

CME – criomicroscopia eletrônica

CO – Colorado

CONAMA – Conselho Nacional de Meio Ambiente

cPCR – PCR convencional

CV – calicivirus

dATP – desoxiadenosina trifosfato

dCTP – desoxicitidina trifosfato

dGTP – desoxiguanosina trifosfato

DMSO – dimetilsulfóxido

DNA – ácido desoxirribonucleico

dTTP – desoxitimidina trifosfato

dXTP – desoxiribonucleotídeo trifosfato

E. coli – *Escherichia coli*

EDTA – ácido etilenodiamino tetracético

EGPA – eletroforese em gel de poliacrilamida

EIE – ensaio imunoenzimático

EUA – Estados Unidos da América

FIOCRUZ – Fundação Oswaldo Cruz

G – genogrupo

GA – gastroenterite aguda

GG – genótipo

H_2O – água

H_2SO_4 – ácido sulfúrico

HAV – vírus da hepatite A
HCl – ácido clorídrico
HPyJC – poliomavírus humano JC
HuAdV – adenovírus humano
HuCaV – calicivírus humano
ICC-PCR – *integrated cell culture* - PCR integrada a cultura celular
ICTV – *International Committee on Taxonomy of Viruses* - Comitê Internacional de Taxonomia Viral
IME – imunomicroscopia eletrônica
INEA – Instituto Estadual do Ambiente
IOC – Instituto Oswaldo Cruz
IUB – International Union of Biochemistry - União Internacional de Bioquímica
kb – quilo base
kDa – quilodalton
L – litro
ME – microscopia eletrônica
mg/L – miligrama por litro
MgCl₂ – cloreto de magnésio
mL – mililitro
mm – milímetro
mM – milimolar
N – normal
NaOH – hidróxido de sódio
NCBI – *National Center for Biotechnology Information*
NLV – *Norwalk-like Virus*
nm – nanômetro
NMP – número mais provável
nt – nucleotídeo
NT – não tipado
NTPase – nucleosídeo trifosfatase
NV – norovírus
NV-GI – norovírus genogrupo I
NV-GII – norovírus genogrupo II
°C – graus Celsius
OMS – Organização Mundial de Saúde – WHO – *World Health Organization*

ORF – *open reading frame* – fase aberta de leitura
pb – par de bases
PCR – reação em cadeia pela polimerase
PDTIS – Programa de Desenvolvimento Tecnológico em Insumos para Saúde
pmol – picomol
pro – protease
qPCR – PCR quantitativo
RNA – ácido ribonucléico
RNAfd – RNA de fita dupla
RNAs – RNA de fita simples
RpRd – RNA polimerase-RNA dependente
RT – transcrição reversa
RT-PCR – reação em cadeia da polimerase precedida pela transcrição reversa
RV – rotavírus
RV-A – rotavírus grupo A
SG – subgrupos
TE – tris-EDTA
Tris – hidroximetil-tris-aminometano
TTV – torque teno vírus
U – unidade
UNT – unidades de turbidez
UTR – *untranslated region* - região não traduzida
UV – ultravioleta
VPg – *virus protein genome* - proteína viral associada ao genoma
X – vezes

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1.1. Estrutura e proteínas dos rotavírus (RV) | 3 |
| Figura 1.2. Genótipos de rotavírus grupo A (RV-A) no Brasil por região..... | 8 |
| Figura 1.3. Morfologia dos norovírus (NV) | 9 |
| Figura 1.4. Organização do genoma dos norovírus (NV) | 10 |
| Figura 1.5. Classificação de norovírus (NV) em cinco genogrupos (GI-V) e 32 genótipos baseada na diversidade aminoacídica da proteína de capsídeo VP1 | 12 |
| Figura 1.6. Representação esquemática da detecção de norovírus (NV) e calicivírus humanos (HuCaV) no Brasil..... | 15 |
| Figura 4.1. Mapa geográfico da Lagoa Rodrigo de Freitas, município do Rio de Janeiro, RJ: localização dos pontos de coleta..... | 25 |
| Figura 4.2. Sistema de filtração Millipore® | 27 |
| Figura 4.3. Concentrador Centriprep® YM-50, Millipore® | 27 |
| Figura 4.4. Leitura de coliformes fecais com lâmpada ultravioleta utilizando cartela Quanti-Tray®/2000 do conjunto de reagentes Colilert®-18 | 42 |
| Figura 5.1. Eletroforese em gel de agarose dos produtos da reação em cadeia pela polimerase precedida de transcrição reversa para: A. Detecção de rotavírus grupo A (RV-A) por amplificação genômica da proteína VP6; B. Detecção de norovírus genogrupo II (NV-GII) por amplificação genômica da região codificadora da polimerase viral | 47 |
| Figura 5.2. Distribuição de rotavírus grupo A (RV-A) e norovírus genogrupo II (NV-GII) de acordo com os pontos de coleta..... | 49 |
| Figura 5.3. Dendograma de classificação em subgrupos dos rotavirus grupo A (RV-A) a partir do seqüenciamento parcial do gene que codifica a proteína VP6 | 50 |
| Figura 5.4. Dendograma de caracterização molecular dos rotavirus grupo A (RV-A) a partir do seqüenciamento parcial do gene que codifica a proteína VP6..... | 51 |
| Figura 5.5. Detecção de rotavírus grupo A (RV-A), norovírus genogrupo II (NV-GII) e adenovírus humano (HuAdV) e caracterização da qualidade da água pelo parâmetro <i>E.coli</i> (própria <2000NMP/100mL; imprópria >2000NMP/100mL) nas três diferentes | |

| | |
|---|----|
| matrizes aquáticas analisadas: Rio dos Macacos (n=12), Lagoa Rodrigo de Freitas (n=120) e Praia do Leblon (n=12) | 54 |
| Figura 5.6. Detecção de rotavirus-A (RV-A), norovirus genogrupo II (NV-GII) e adenovirus humano (HuAdV) em amostras provenientes da Lagoa Rodrigo de Freitas de acordo com a caracterização da água como própria (n=114; <2000NMP/100mL) e imprópria (n=6; >2000NMP/100mL), segundo as Resoluções CONAMA 274, de 29 de Novembro de 2000, e 357, de 17 de Março de 2005..... | 57 |
| Figura 5.7. Média dos valores dos parâmetros físico-químicos obtidos para as matrizes aquáticas analisadas: Rio dos Macacos – água doce, Lagoa Rodrigo de Freitas – água salobra e Praia do Leblon – água salgada | 60 |
| Figura 5.8. Variação de cloro (mg/L) na água Lagoa Rodrigo de Freitas, no Rio dos Macacos e na Praia do Leblon, no período de Agosto de 2007 a Julho de 2008 | 61 |
| Figura 5.9. Variação de turbidez (UNT) na água da Lagoa Rodrigo de Freitas, no Rio dos Macacos e na Praia do Leblon, no período de Agosto de 2007 a Julho de 2008 | 62 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| Tabela 4.1. Divisão de classes para os parâmetros físico-químicos estudados..... | 44 |
| Tabela 5.1. Eficiência do método de concentração viral por filtração em membrana carregada negativamente descrito por Katayama e colaboradores (2002) na detecção de rotavírus grupo A (RV-A) e norovírus (NV) | 45 |
| Tabela 5.2. Detecção de rotavírus A (RV-A) e norovirus genogrupo II (NV-GII) em 144 amostras de concentrados de água de acordo com as metodologias de PCR convencional (cPCR) e quantitativo (qPCR)..... | 46 |
| Tabela 5.3. Resultados gerais de detecção viral por tipo de matriz aquática..... | 48 |
| Tabela 5.4. Valores absolutos obtidos na análise microbiológica de <i>E.coli</i> em NMP/100mL nas amostras coletadas na Lagoa Rodrigo de Freitas, Rio dos Macacos e Praia do Leblon no período de Agosto de 2007 a Julho de 2008 | 53 |
| Tabela 5.5. Detecção de rotavírus grupo A (RV-A), norovírus genogrupo II (GII-NV) e adenovírus humanos (HuAdV) em associação à análise microbiológica de <i>E. coli</i> em NMP/100mL das amostras positivas | 56 |
| Tabela 5.6. Detecção de rotavírus grupo A (RV-A), norovírus genogrupo II (NV-GII) e adenovírus humano (HuAdV) nas 120 amostras provenientes da Lagoa Rodrigo de Freitas | 58 |
| Tabela 5.7. Análise univariada dos parâmetros físico-químicos mensurados por ponto de coleta na Lagoa Rodrigo de Freitas, RJ, no período de Agosto de 2007 a Julho de 2008..... | 59 |

LISTA DE QUADROS

| | |
|---|----|
| Quadro 1.1. Valores de <i>cut-off</i> de percentagem de identidade nucleotídica que definem os diferentes genótipos de rotavírus grupo A (RV-A) considerando-se os 11 segmentos genômicos | 6 |
| Quadro 4.1. Reagentes utilizados na reação da transcrição reversa (RT) para a obtenção de DNA complementar (cDNA) a partir do RNA viral extraído..... | 29 |
| Quadro 4.2. Sequência de iniciadores de cadeia utilizados na PCR para detecção do gene que codifica a proteína VP6 dos rotavírus grupo A (RV-A) | 29 |
| Quadro 4.3. Reagentes utilizados na PCR para detecção do gene que codifica a proteína VP6 dos rotavírus grupo A (RV-A) | 30 |
| Quadro 4.4. Sequência de iniciadores de cadeia utilizados na semi-nested PCR para detecção e caracterização dos genes que codificam as proteínas VP4 e VP7 dos rotavírus grupo A (RV-A) | 31 |
| Quadro 4.5. Reagentes utilizados na PCR para detecção dos genótipos G e P de rotavírus grupo A (RV-A)..... | 32 |
| Quadro 4.6. Reagentes utilizados na semi-nested PCR para detecção de genótipos G de rotavírus grupo A (RV-A) | 33 |
| Quadro 4.7. Reagentes utilizados na semi-nested PCR para detecção de genótipos P de rotavírus grupo A (RV-A)..... | 33 |
| Quadro 4.8. Sequência de iniciadores de cadeia e sonda utilizados no PCR quantitativo (qPCR) para amplificação parcial do segmento que codifica a proteína não estrutural NSP3 dos rotavírus grupo A (RV-A) | 34 |
| Quadro 4.9. Reagentes utilizados no PCR quantitativo (qPCR) para amplificação parcial do segmento que codifica a proteína não estrutural NSP3 dos rotavírus grupo A (RV-A)..... | 34 |
| Quadro 4.10. Sequência de iniciadores de cadeia utilizados na PCR para detecção do gene que codifica a polimerase viral dos norovírus (NV) | 35 |
| Quadro 4.11. Sequência de iniciadores de cadeia utilizados na semi-nested PCR para detecção do gene que codifica a polimerase viral dos norovírus genogrupos I e II (NV-GI e NV- GII) | 35 |

| | |
|---|----|
| Quadro 4.12. Reagentes utilizados na PCR para detecção do gene que codifica a polimerase viral dos norovírus (NV) . | 36 |
| Quadro 4.13. Reagentes utilizados na semi-nested PCR para detecção do gene que codifica a polimerase viral dos norovírus genogrupos I e II (NV-GI e NV-GII) | 36 |
| Quadro 4.14. Sequência de iniciadores de cadeia utilizados na reação de seqüenciamento parcial da região D do genoma dos norovirus genogrupos I e II (NV-GI e NV-GII). | 37 |
| Quadro 4.15. Reagentes utilizados na PCR para obtenção do produto para seqüenciamento parcial da região D do genoma dos norovirus genogrupos I e II (NV-GI e NV-GII). | 38 |
| Quadro 4.16. Sequência de iniciadores de cadeia e sonda utilizados na qPCR para quantificação dos norovírus (NV) pela amplificação parcial da região de junção ORF1-ORF2 do genoma viral | 38 |
| Quadro 4.17. Reagentes utilizados no PCR quantitativo (qPCR) para quantificação dos norovírus do genogrupo I (NV-GI) | 39 |
| Quadro 4.18. Reagentes utilizados no PCR quantitativo (qPCR) para quantificação dos norovírus do genogrupo II (NV-GII) | 39 |
| Quadro 4.19. Sequência de iniciadores de cadeia e sonda utilizados no PCR quantitativo (qPCR) para amplificação parcial da região do genoma viral codificadora do hexon dos adenovírus humanos (HuAdV). | 42 |
| Quadro 4.20. Reagentes utilizados no PCR quantitativo (qPCR) para quantificação adenovírus humanos (HuAdV). | 43 |

RESUMO

O aumento das atividades recreacionais na água tem contribuído para a transmissão de doenças de veiculação hídrica. Os parâmetros de balneabilidade avaliados para exposição humana em águas naturais incluem indicadores bacteriológicos. Entretanto, a presença de vírus nestas águas não é considerada. Neste contexto, os vírus excretados nas fezes de pessoas infectadas são importantes contaminantes de águas superficiais em função do contínuo despejo de esgoto doméstico. Este estudo tem como objetivo avaliar a contaminação pelos principais agentes etiológicos da gastroenterite viral aguda, rotavírus grupo A (RV-A) e norovírus (NV), em águas superficiais da Lagoa Rodrigo de Freitas pela detecção, quantificação e caracterização molecular destes agentes, correlacionando-os com parâmetros microbiológicos e físico-químicos de qualidade da água. A Lagoa é um ponto turístico e de lazer de grande expressão na cidade do Rio de Janeiro, tem sua água classificada como água de recreação de contato primário e, atualmente, está passando por um programa de despoluição para reverter o seu estado de degradação ambiental. Entre Agosto de 2007 e Julho de 2008, 2L de água superficial foram coletados mensalmente em 12 pontos, incluindo 10 pontos na Lagoa Rodrigo de Freitas, um no Rio dos Macacos, que desemboca na Lagoa, e um na praia do Leblon, onde a água da Lagoa é escoada, totalizando 144 amostras. As amostras foram concentradas 1000X pelo método de adsorção-eluição utilizando uma membrana carregada negativamente e reconcentradas a uma volume final de 2mL em Centriprep[®]YM-50. RV-A e NV foram detectados e quantificados pelas técnicas de reação em cadeia pela polimerase convencional e quantitativa (cPCR / qPCR) precedidas por transcrição reversa (RT). Pela análise conjunta destas metodologias, RV-A e NV-GII foram detectados em 24,3% (35/144) e 18,8% (27/144) das amostras estudadas, respectivamente. A quantificação de RV-A e NV-GII variou de 3,34 a 4680 cg/100mL e 1,57 a 26,5 cg/100mL, respectivamente. As amostras positivas de RV-A foram caracterizadas pelo sequenciamento parcial do segmento 6 (VP6) como subgrupo I e genótipo I2 segundo a nova classificação proposta para estes vírus. *E.coli* foi quantificada por Kit Colilert-18Kit Quanti-Tray[®]/2000 em cada ponto de coleta como um indicador bacteriológico de contaminação fecal e 87,5% (126/144) das amostras de água foram caracterizadas como próprias conforme estabelecido pela legislação vigente. RV-A e/ou NV-GII foram detectados em 38,1% (48/126) dessas amostras, evidenciando a presença de vírus em águas que estão dentro dos padrões aceitáveis para *E.coli*, não sendo observada a associação entre este parâmetro e a detecção destes vírus. Adenovirus humano (HuAdV) foram pesquisados como possíveis marcadores virais de contaminação fecal humana, sendo detectados em 16,7% (24/144) das amostras, apresentando distribuição não homogênea em relação aos resultados de *E.coli*, RV-A e NV-GII. Parâmetros físico-químicos como salinidade, temperatura, pH, cloro e turbidez foram determinados, sendo demonstrada uma distribuição não homogênea entre RV-A e turbidez e NV-GII e pH. Os dados obtidos neste estudo enfatizam a necessidade do estabelecimento de parâmetros virais para a avaliação da qualidade da água e a necessidade de se disponibilizar protocolos de detecção viral que auxiliem para a adoção de medidas de controle de contaminação ambiental pelas autoridades Municipal e Estadual.

ABSTRACT

The increase of recreational activities in water has contributed to the transmission of waterborne diseases. The bathing parameters evaluated for human exposure in natural waters include bacteriological criteria. However the presence of virus is not considered. In this context, viruses excreted in feces of infected people are important contaminants of surface water due to the continuous discharge of domestic sewage. This study aims to evaluate the contamination by the main etiologic agents of viral acute gastroenteritis, group A rotavirus (RV-A) and norovirus (NV), in surface waters of the Rodrigo de Freitas Lagoon by detection, quantification and molecular characterization of these agents, correlating with the microbiological and physico-chemical standards for water quality. From August 2007 to July 2008, 2L of surface water were monthly collected at 12 sites, including 10 sites in the Rodrigo de Freitas Lagoon, one in the Macacos River, which flows into Lagoon, and one at Leblon Beach, where water Lagoon is drained, totalizing 144 samples. The samples were concentrated 1000X by an adsorption-elution method using a negatively charged membrane and reconcentrated to a final volume of 2mL in Centriprep[®]YM-50 concentrator. RV-A and NV were detected and quantified by conventional and quantitative polymerase chain reaction (cPCR/qPCR) preceded by reverse transcription (RT). For the joint analysis of these methodologies RV-A and NV-GII were detected in 24,3% (35/144) and 18,8% (27/144) of the studied samples, respectively. Quantification of RV-A and NV-GII ranged from 3,34 to 4680 cg/100mL and 1,57 to 26,5 cg/100mL, respectively. The RV-A positive samples were characterized by partial sequencing of segment 6 (VP6) as subgroup I and I2 genotype according to the new classification proposed. *E.coli* was quantified using Colilert[®]-18Kit Quanti-Tray[®]/2000 in each collection site as bacterial standard of fecal contamination and 87.5% (126/144) of water samples analyzed were characterized as suitable for bath as established by legislation. RV-A and/or NV-GII were detected in 38,1% (48/126) of these samples, showing the presence of viruses in waters that are within the standards for acceptable *E.coli* and there was no association between this parameter and viral detection. Human adenoviruses (HuAdV) were investigated as possible viral markers of human fecal contamination and were detected in 16,7% (21/144) of the samples showing non-homogeneous distribution in relation to the results of *E. coli*, RV-A and NV-GII. Physico-chemical parameters, like salinity, temperature, pH, chlorine and turbidity, were determined in loco. It was demonstrated a non-homogeneous distribution of positive and negative samples between RV-A and turbidity and NV-GII and pH. Data obtained in this study emphasize the need for the establishment of viral parameters for the assessment of water quality and the need to provide viral detection protocols that lead to the adoption of measures to control environmental contamination by municipal and state authorities

1. INTRODUÇÃO

A água é o constituinte mais característico da Terra, essencial para a existência da vida, e um recurso natural de valor inestimável. Dentre seus inúmeros usos estão: o abastecimento doméstico e industrial, a irrigação, a preservação da fauna e da flora, a recreação e o lazer, a criação de espécies, a geração de energia elétrica, a navegação, a harmonia paisagística e o transporte de despejos. Entretanto, em função da má utilização e não preservação deste recurso, os ecossistemas aquáticos vêm sofrendo alterações nas suas características (Von Sperling, 2005).

A qualidade da água e, portanto, da saúde humana pode ser significativamente afetada pela presença de microrganismos patogênicos derivados de esgotos não tratados lançados em águas superficiais. Estima-se que 17-25% da população mundial não tenha acesso a água potável (*United Nations Population Fund/World Bank, 2001*) e que doenças de veiculação hídrica estão entre uma das causas mais comuns de morte no mundo, afetando especialmente países em desenvolvimento (Straub & Chandler, 2003).

Neste contexto, os vírus excretados nas fezes de pessoas infectadas são importantes contaminantes de águas superficiais urbanas pelo contínuo despejo de esgotos domésticos. Surtos de doenças associadas a estes patógenos, após o contato com águas superficiais contaminadas, têm sido bem documentados, demonstrando um aumento significativo de infecções gastroentéricas, oculares, auditivas, respiratórias ou dérmicas, entre aqueles que se dedicam a atividades nesse tipo de água (Donovan et al, 2008; Sinclair et al, 2009).

Os vírus presentes no trato gastrointestinal de indivíduos infectados são eliminados pelas fezes em concentrações extremamente elevadas, podendo variar de 10^5 a 10^{13} partículas virais por grama de fezes (Farthing, 1989; Bosch et al, 2008; Espinosa et al, 2008; Hamza et al, 2009). Contaminam de forma direta ou indireta águas destinadas ao consumo humano, podendo permanecer viáveis durante vários meses, resistindo a condições adversas. Podem ser identificados durante todas as estações do ano, sendo capazes de resistir aos processos de tratamento de água e esgoto aplicados no controle bacteriano, inclusive cloração (Bosch, 1998).

Dentre os vírus gastroentéricos associados a surtos de veiculação hídrica, estão os rotavírus grupo A (RV-A) e norovírus (NV), reconhecidos como os principais agentes etiológicos da gastroenterite infantil aguda e por grande parte dos surtos de

gastroenterite não-bacteriana em todo o mundo (Parashar et al, 2006; Vainio & Myrmele, 2006; CDC, 2008; Zheng et al, 2006). Em países em desenvolvimento, 43% dos casos de gastroenterite infantil são atribuídos a vírus, sendo a maioria associada aos RV, seguido pelos NV (Ramani & Kang, 2009). Em adição, segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), 88% das mortes por diarreia nestas crianças são atribuídas à água insalubre, saneamento inadequado e pouca higiene (OMS, 2004).

1.1. Vírus gastroentéricos

1.1.1. Rotavírus

Denominados inicialmente de *Orbivirus* (Bishop et al, 1973) e *Reovirus-like* (Kapikian et al, 1974) em razão de sua semelhança morfológica aos membros da família *Reoviridae*, os RV foram descritos pela primeira vez em 1973, em Melbourne, Austrália, por microscopia eletrônica (ME) de células do epitélio de mucosa duodenal de crianças com quadro de diarreia aguda não bacteriana (Bishop et al, 1973). Posteriormente, foram denominados *Duovirus* (Davidson et al, 1975) e, finalmente, *Rotavirus*, devido ao seu aspecto semelhante ao de uma roda quando examinados por ME (Flewett & Woode, 1978).

A partícula dos RV é não-envelopada, apresenta simetria icosaédrica, mede aproximadamente 100nm de diâmetro e é composta por 11 segmentos de RNA fita dupla (RNAfd). Os segmentos genômicos variam em número de nucleotídeos (nt) de 667 (segmento 11) a 3.302 pares de bases (pb) (segmento 1), do menor para o maior gene, diferença esta que permite separá-los por eletroforese em gel de poliacrilamida (EGPA). Estes codificam seis proteínas estruturais (VP) e seis não-estruturais (NSP). Cada gene codifica para uma proteína, com exceção do segmento 11 que codifica duas proteínas, a qual terá ao menos uma função (Figura 1.1A) (Estes, 2001).

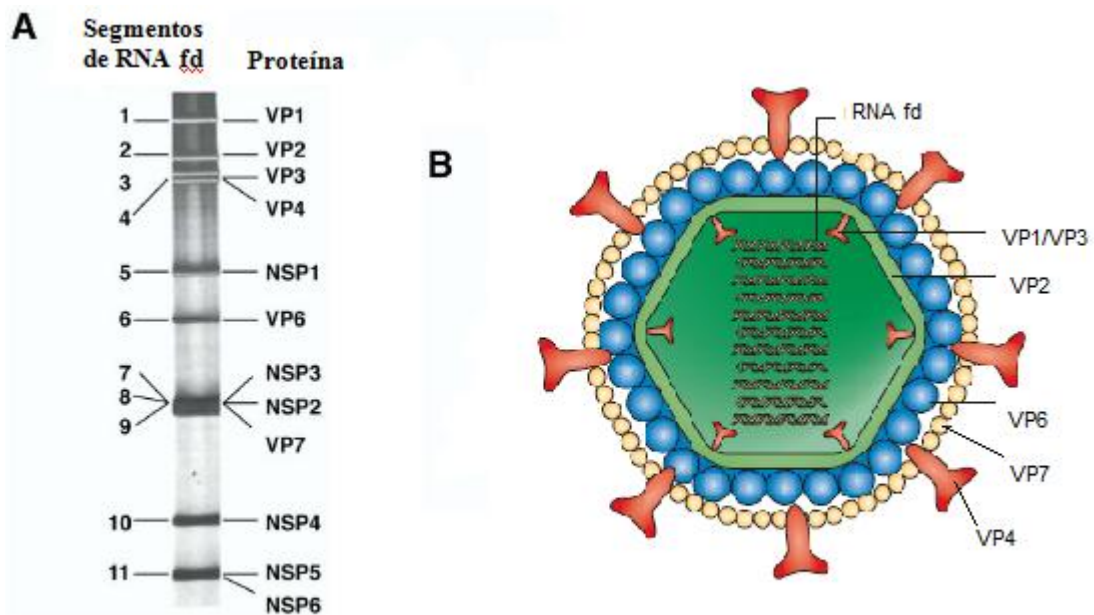


Figura 1.1. Estrutura e proteínas dos rotavírus (RV). A. Representação de um gel de poliácridamida demonstrando os 11 segmentos genômicos virais e as proteínas codificadas pelo respectivo segmento; B. Representação esquemática de uma partícula completa de rotavírus (RV). RNAfd: RNA fita dupla (Adaptado de Angel et al, 2007 e Greenberg & Estes, 2009).

A partícula viral completa é formada por três camadas protéicas (triplo capsídeo viral). O capsídeo externo é composto por trimeros da proteína VP7 e por espículas de proteína VP4. O capsídeo intermediário é composto pela proteína VP6. O capsídeo interno ou core é composto pelas proteínas VP1 (RNA polimerase-RNA dependente), VP2 e VP3 (guaniltransferase e metiltransferase) e é onde se encontra o genoma viral (Figura 1.1.B) (Hyser & Estes, 2009).

As proteínas VP1, VP2 e VP3, codificadas pelos segmentos 1, 2 e 3, respectivamente, correspondem em conjunto a aproximadamente 18% das proteínas virais e participam do complexo de replicação e de transcrição do vírion (Kapikian et al, 2001).

A VP4 é uma proteína não-glicosilada que vem sendo descrita como determinante na adesão à célula, internalização, hemaglutinação e neutralização, além de induzir imunidade protetora em animais e crianças (Estes, 2001; Kapikian et al, 2001). Além disso, ela é susceptível à proteólise e clivada em VP5 e VP8, o que resulta no aumento da infecciosidade viral e facilita a entrada do vírus na célula (Jayaram et al, 2004; Angel et al, 2007).

A proteína VP6 representa 51% da partícula viral e possui em sua superfície determinantes antigênicos que permitem a classificação dos RV em diferentes grupos e subgrupos de RV-A (Kapikian et al, 2001). Ela é composta por dois domínios que interagem com as proteínas VP7 e VP2, atuando na entrada do vírus na célula e na transcrição do RNAfd (Heiman et al, 2008).

A VP7 é a segunda proteína mais abundante da partícula viral, representando 30% das proteínas virais. É a glicoproteína mais imunogênica do capsídeo externo, induzindo a síntese de anticorpos neutralizantes. Essa proteína pode modular a atividade da VP4 no processo de adsorção e entrada dos RV-A na célula. Interage com moléculas da superfície celular, uma vez que a proteína VP4 já tenha iniciado o processo de adsorção (Jayaram et al, 2004). Além disso, acredita-se que ela esteja diretamente associada à manutenção da infecciosidade da partícula viral dos RV, uma vez que diferentes estudos têm demonstrado que concentrações apropriadas de íons cálcio (Ca^{++}) são necessárias para se manter a estabilidade da partícula, aparentemente pela estabilidade de VP7. O tratamento de partículas virais utilizando agentes quelantes de cálcio, como o EDTA, resulta na remoção do capsídeo externo através da dissociação dos trímeros de VP7 e, conseqüentemente, a perda de infecciosidade (Estes & Kapikian, 2007).

As NSPs são sintetizadas nas células infectadas e funcionam em algum momento do ciclo de replicação viral ou interagem com as proteínas do hospedeiro para influenciar a patogênese ou a resposta imune à infecção (Greenberg & Estes, 2009). A NSP1 apresenta associações com o citoesqueleto celular, favorecendo a ligação vírus-célula. A NSP2 é uma proteína altamente conservada, é expressa em altos níveis em células infectadas e associa-se com a NSP5, estando ambas as proteínas envolvidas na replicação, formação de viroplasmas e encapsidação viral (Estes, 2001; Mertens, 2004). A NSP3 está envolvida na regulação da tradução (Jayaram et al, 2004). A NSP4 foi a primeira enterotoxina viral descrita e tem importância na morfogênese e virulência viral, sendo capaz de ativar os canais dependentes de Ca^{++} do intestino e provocar uma diarreia de natureza secretória. A NSP5 possui atividade autoquinase e tem papel importante na replicação viral ao interagir com as proteínas NSP2 e NSP6 e, juntas, estarem associadas à formação do viroplasma. A NSP6 é encontrada principalmente nos viroplasmas e interage com NSP5, evidenciando sua participação nos processos de replicação e encapsidação do vírus (Estes, 2001).

Os RV são classificados em grupos (A-G) e subgrupos (SG) em função da especificidade antigênica da sua principal proteína estrutural, a VP6. Os grupos A, B, e C têm sido encontrados em humanos e animais, enquanto os grupos D-G somente em animais. Os RV do grupo A (RV-A) são epidemiologicamente os mais importantes, uma vez que são os principais responsáveis pelos episódios de diarreia aguda em crianças em todo o mundo (Kapikian et al, 2001).

Quanto aos SG, os RV-A são classificados em SGI, SGII, SGI+II e SG não I e não II pela presença ou ausência de epítomos imunoreativos frente a determinados anticorpos monoclonais. Os SG I e II têm sido os mais encontrados, sendo SGII relacionado à cepas de origem humana e o SGI relacionado à cepas de origem animal (Iturriza-Gómara et al, 2002).

Os RV-A são também classificados pelas proteínas VP4 e VP7 em dois sorotipos/genótipos representados pelas letras P (sensibilidade à protease) e G (glicoproteína), respectivamente. Como o genoma viral é segmentado, os genes que codificam essas proteínas podem segregar de forma independente, gerando uma nomenclatura binária. Até o momento foram descritos 19 sorotipos G, que são correspondentes aos genótipos. Assim, a classificação pela VP7 é dada em função apenas do seu sorotipo (G1, G2, G3 e, assim, sucessivamente). Entretanto, para a VP4 foram descritos 17 sorotipos e 27 genótipos P. Assim, descreve-se o P-tipo com o P acompanhado do número do sorotipo e o número do genótipo correspondente entre colchetes (amostra de RV-A humano Wa: G1AP1[8]) (Ciarlet et al, 2008; Greenberg & Estes, 2009).

Recentemente, Matthijnssens e colaboradores (2008) propuseram um novo sistema de classificação para os RV-A, tendo como base as propriedades moleculares dos 11 segmentos de RNAfd. Este novo sistema de classificação foi proposto baseando-se na caracterização molecular e análise filogenética do genoma completo de 53 protótipos. Os diferentes genótipos descritos para cada um dos segmentos são divididos segundo valores de *cut-off* específicos de identidade nucleotídica para cada um destes genes (Quadro 1.1). Análises filogenéticas sugerem que as características moleculares dos genes que codificam para as proteínas VP1 (*RNA-dependent RNA polymerase*), VP2 (*Core Potein*), VP3 (*Methyltransferase*), VP6 (*Inner Capsid*), NSP1 (*Interferon Antagonist*), NSP2 (*NTPase*), NSP3 (*Translation Enhancer*), NSP4 (Enterotoxin) e NSP5

(*pHosphoprotein*) resultam em 4, 5, 6, 11, 14, 5, 7, 11 e 6 diferentes genótipos, respectivamente.

Quadro 1.1. Valores de *cut-off* de percentagem de identidade nucleotídica que definem os diferentes genótipos de rotavirus grupo A (RV-A) considerando-se os 11 segmentos genômicos (Adaptado de Matthijssens e colaboradores, 2008).

| Gene | Valores de <i>cut-off</i> | | Designação dos nomes dos genótipos |
|------|--------------------------------|-----------|---|
| | de identidade nucleotídica (%) | Genótipos | |
| VP4 | 80 | 19G | Glicoproteína |
| VP7 | 80 | 27P | Sensível a protease |
| VP6 | 85 | 11I | Capsídeo interno |
| VP1 | 83 | 4R | RNA polimerase-RNA dependente |
| VP2 | 84 | 5C | Proteína do core |
| VP3 | 81 | 6M | Metiltransferase |
| NSP1 | 79 | 14A | Antagonista do Interferon |
| NSP2 | 85 | 5N | NTPase |
| NSP3 | 85 | 7T | Intensificador da tradução |
| NSP4 | 85 | 11E | Enterotoxina |
| NSP5 | 91 | 6H | Fosfoproteína (<i>pHosphoprotein</i>) |

As infecções por RV produzem uma gama de respostas que vão desde casos assintomáticos, principalmente em adultos, a casos graves de diarreia, que acometem principalmente bebês e crianças menores de cinco anos. Casos graves em adultos podem ocorrer devido às infecções por cepas não usuais ou por doses extremamente elevadas de partículas virais. A diarreia é a principal manifestação clínica, porém sintomas como vômito, dores abdominais e desidratação, sendo este último o principal fator de mortalidade do hospedeiro, podem ser observados. O período de incubação pode variar de 19 horas a dois dias e a doença é autolimitada, normalmente após cinco dias do início da infecção, podendo chegar a 10, o quadro se resolve (Estes & Kapikian, 2007; Greenberg & Estes, 2009). A eliminação de partículas virais pelas fezes inicia-se antes ou após o término da diarreia e pode levar de quatro a 57 dias, com média de 10 dias (Richardson et al, 1998).

As vias de transmissão mais comuns são a fecal-oral, em função da sua resistência a inativação e ao contato com superfícies contaminadas (Estes & Kapikian, 2007). Estudos com voluntários demonstraram que os RV também podem ser adquiridos pela ingestão de água contaminada (Ward et al, 1986) e a superfície contendo a água evaporada também pode causar infecção em contato com a mão ou boca (Ward et al, 1991).

Os RV são os principais agentes etiológicos da gastroenterite aguda (GA) em crianças em todo o mundo (Estes & Kapikian, 2007). Estima-se que, a cada ano, os RV sejam responsáveis por cerca de 111 milhões episódios de gastroenterite, 25 milhões de consultas, 2 milhões de hospitalizações e aproximadamente 611.000 (intervalo de 454.000-705.000) óbitos em crianças menores de 5 anos de idade em todo o mundo (Parashar et al, 2003; 2006).

A doença é desigualmente distribuída entre países desenvolvidos e em desenvolvimento, provavelmente por razões socioeconômicas e epidemiológicas, com a maioria das mortes ocorrendo em países em desenvolvimento (Angel et al, 2007). Os RV são eliminados em concentrações superiores a 10^{10} partículas virais por grama de fezes e estudos de infecciosidade indicam que 10 partículas virais são suficientes para resultar em infecção, provável razão pela qual o aumento nas condições de higiene nos países desenvolvidos não reduz bruscamente a incidência de infecções por RV (Greenberg & Estes, 2009).

Ao contrário de muitos patógenos bacterianos entéricos, os RV resistem em climas temperados e tropicais. Nas regiões de clima temperado observa-se um padrão tipicamente sazonal, caracterizado pela ocorrência de surtos e epidemias durante os meses mais frios e secos do ano, sendo que nas regiões de clima tropical as infecções por RV-A ocorrem ao longo de todo o ano (Kapikian et al, 2001; D'Souza et al, 2008).

A epidemiologia dos RV é bastante complexa, com variados estudos apontando diversos genótipos P e G de RV-A co-circulando dentro de uma mesma região e que o genótipo prevalente em uma determinada região pode mudar anualmente. Outra observação é que os genótipos prevalentes em diferentes regiões de um país podem ser diferentes dentro do mesmo período epidêmico (Pérez-Vargas et al, 2006).

Em função do genoma segmentado, os genes podem segregar independentemente e gerar partículas com combinações diferentes destes genes e,

consequentemente, de suas proteínas. Mais de 40 combinações G-P já foram descritas, entretanto estudos de epidemiologia molecular de RV-A têm demonstrado que são cinco os genótipos mais comumente detectados no mundo: G1P[8], G2P[4], G3P[8], G4P[8] e G9P[8] (Santos & Hoshino, 2005).

Linhares e colaboradores (1977) descreveram o primeiro relato de casos de gastroenterite infantil aguda associados aos RV-A na América Latina, observando por ME partículas semelhantes aos RV em fezes de crianças com diarreia aguda em Belém do Pará, Brasil. Desde então, diversos outros trabalhos têm sido publicados demonstrando os casos de GA associados aos RV no país. Em uma extensa revisão dos artigos que descrevem a genotipagem de RV-A circulantes no Brasil em dois períodos pré-vacinais compreendidos entre 1982-1995 e 1996-2005, Leite e colaboradores (2008) demonstraram que as combinações mais frequentemente encontradas foram: G1P[8]/G1P[NT] (43%), G9P[8]/ G9P[NT] (20%), G2P[4]/ G2P[NT] (9%), G3P[8]/ G3P[NT] (6%), G4P[8]/ G4P[NT] (4%) e G5P[8]/ G5P[NT] (4%) (Figura 1.2).

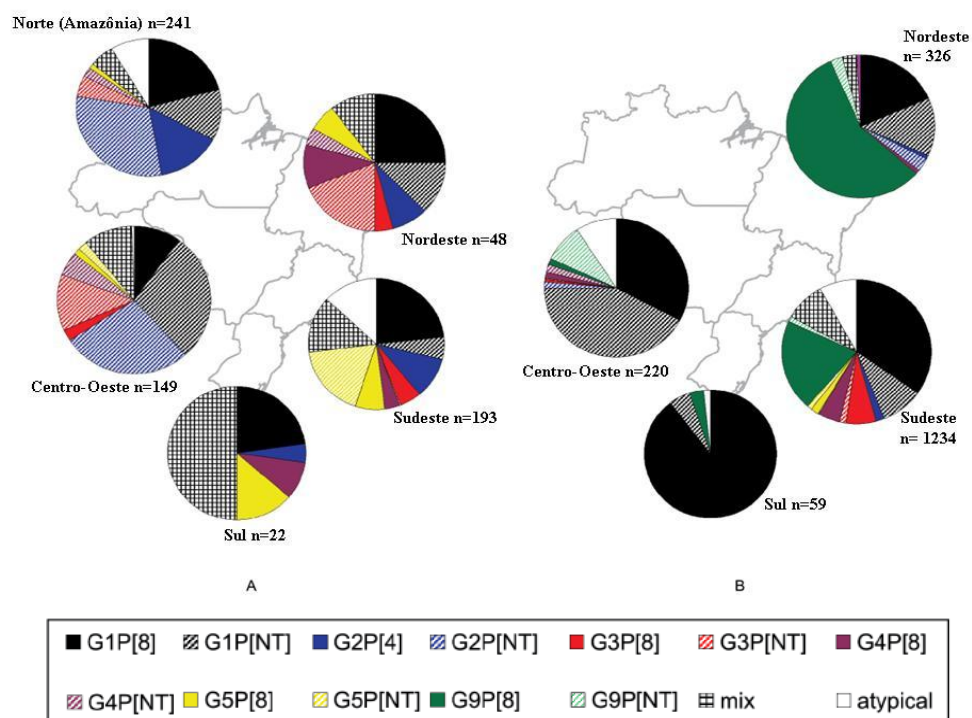


Figura 1.2. Genótipos de rotavírus grupo A (RV-A) no Brasil por região. A. 1982-1995 (653 amostras positivas); B. 1996-2005 (1.839 amostras positivas). NT: não tipado (adaptado de Leite e colaboradores (2008)).

1.1.2. Norovirus

O vírus Norwalk, atualmente a espécie protótipo do gênero *Norovirus*, foi o primeiro vírus descrito como causador da GA, sendo detectado por ME em amostras de um surto de gastroenterite em crianças de uma escola primária na cidade de Norwalk, Ohio, Estados Unidos (Kapikian et al, 1972).

Inicialmente, estes vírus foram denominados “Norwalk-like vírus” (NLV) e classificados na família *Picornaviridae*, com base na sua morfologia em ME e no genoma de RNA de fita simples (RNAsfs). Em 1978, a família *Caliciviridae* foi taxonomicamente distinguida da *Picornaviridae*, baseado na morfologia da partícula viral e na observação de que os calicivírus apresentavam uma poliproteína estrutural, da qual o capsídeo é constituído (Green et al, 2000).

A demonstração da similaridade de seqüência entre NV e outros calicivírus (CV), possibilitada pela clonagem e sequenciamento do genoma viral, foi um grande avanço que levou ao reconhecimento da relação entre os NV e outros membros da família *Caliciviridae*. Assim, o NLV foi reclassificado como um gênero denominado *Norovirus*, pelo Comitê Internacional de Taxonomia Viral (ICTV), pertencente a família *Caliciviridae*, que contém ainda os gêneros *Sapovirus*, *Lagovirus* e *Vesivirus* (Green et al, 2000).

A partícula dos NV é não-envelopada, apresenta simetria icosaédrica, mede aproximadamente 40nm de diâmetro e apresenta 32 depressões em forma de taça na sua superfície (Figura 1.3) (Green et al, 2000).

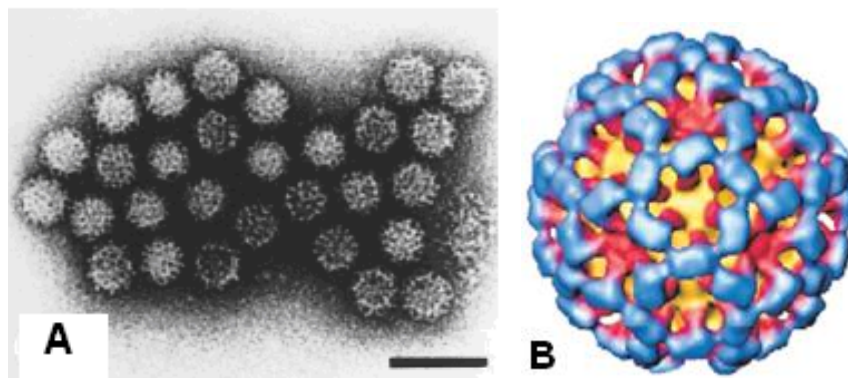


Figura 1.3. Morfologia dos norovírus (NV). A. Partículas de vírus Norwalk em filtrado de fezes visualizado por micrografia eletrônica – Barra 50nm (Green et al, 2000); B. Representação da superfície da partícula viral obtida através da criomicroscopia eletrônica (CME) (Tan & Jiang, 2007).

Seu genoma é constituído de um RNAs, polaridade positiva, com aproximadamente 7,7 Kb de comprimento, que codifica três ORFs (“Open Reading Frames” – Fases Abertas de Leitura). Apresenta uma região não traduzida (UTR), tanto no extremo 5´ quanto no extremo 3´ e uma cauda poli(A) 3'. Contém também um RNA subgenômico de 2,3 kb com as ORF 2 e 3 (Bertolotti-Ciarlet et al, 2003). A ORF 1 codifica uma poliproteína de 200 kDa que, ao sofrer processamento co- e pós-traducional, gera proteínas não estruturais (NSP), incluindo a RNA polimerase-RNA dependente (RpRd). A ORF 2 e a ORF 3 codificam a maior (VP1) e a menor (VP2) proteínas estruturais do capsídeo viral, respectivamente (Hardy, 2005) (Figura 1.4).

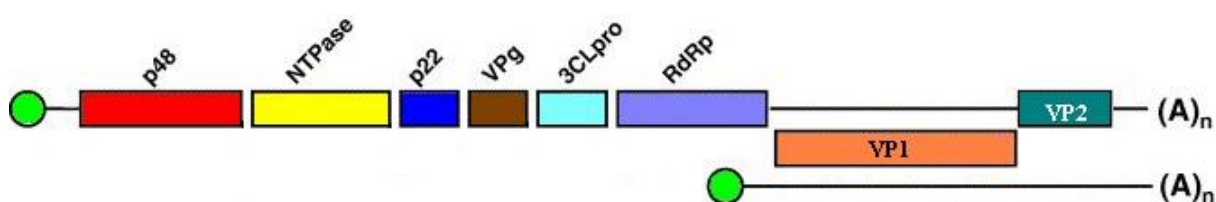


Figura 1.4. Organização do genoma dos norovírus (NV). p48: Proteína p48; NTPase: Proteína Nucleosídeo Trifosfatase; p22: Proteína p22; VPg: Proteína associada ao genoma; 3CLpro: Protease; RdRp: Polimerase; VP1: Proteína Principal do Capsídeo; VP2: Proteína Menor do Capsídeo. Círculo Verde: VPg; (A)_n: Cauda Poli(A) Hardy (2005).

A poliproteína da ORF1 pode ser dividida desde a extremidade C a extremidade N em domínios funcionais designados como proteína p48, nucleosídeo trifosfatase (NTPase), p20 ou p22 (dependendo do Genogrupo), VPg, protease 3CL e a RdRp. A p48 poderia agir como proteína de estrutura para a formação de complexos de replicação viral. A NTPase tem função de helicase. A proteína 22 está ligada ao processo de replicação viral. A proteína VPg, de 15 kDa, está unida ao RNA genômico e subgenômico e, provavelmente, atua na síntese de novas moléculas de RNA viral. A protease viral 3C realiza o processamento co- e pós-traducional da ORF1 para gerar as proteínas codificadas por esta região. A polimerase se estende do aa 1281 a região C terminal da ORF1 e apresenta domínio catalítico e elementos estruturais característicos das RpRd de outros vírus RNA polaridade positiva (Hardy, 2005).

O virion dos NV é composto de 90 dímeros da maior proteína do capsídeo, a VP1, e uma ou duas cópias da menor proteína estrutural do capsídeo, a VP2 (Prasad et al, 1994). A VP1 é constituída de 530 a 555 aa e apresenta dois domínios conservados que flanqueiam um domínio variável central, o qual pode conter determinantes antigênicos que definem a especificidade da amostra: os domínios P e S. Acredita-se que essa proteína não somente está relacionada à estrutura viral como também contém sítios de ligação à receptores celulares e sorotipos e fenótipos virais determinantes (Hardy, 2005; Zheng et al, 2006).

A proteína VP2 é composta de 208 a 268 aa e exibe alta variabilidade na seqüência entre diferentes amostras. O papel desta proteína na replicação viral não é bem definido, mas sabe-se que a fosforilação desta proteína pode possuir um papel regulatório importante nos eventos de replicação viral. Está descrito que a VP2 é a menor proteína estrutural presente em uma ou duas cópias por vírion, sendo importante na encapsidação do RNA genômico viral e na síntese de partículas infecciosas. A função da VP2 está associada à regulação da expressão e de estabilização dos blocos capsídicos da VP1 para produzir partículas que sejam resistentes à degradação proteolítica (Glass et al, 2000a; Hardy, 2005).

O gênero *Norovirus* está dividido em cinco genogrupos (GI, GII, GGIII, GIV e GV) baseando-se na análise da seqüência de informação obtida da região que codifica a proteína de capsídeo VP1, sendo os genogrupos I, II e IV responsáveis por infecções em humanos. Os G são constituídos de genótipos (GG), que representam a unidade mínima de classificação dos NV (Figura 1.5) (Zheng et al, 2006; Patel et al, 2009). Duas amostras são consideradas como pertencentes a diferentes G se a distância entre elas pelo método de distância sem correção for $\geq 45\%$. Dentro do mesmo G, amostras que apresentam distância $\geq 14,3\% \leq 43,8\%$ são agrupadas em diferentes GG (Zheng et al, 2006).

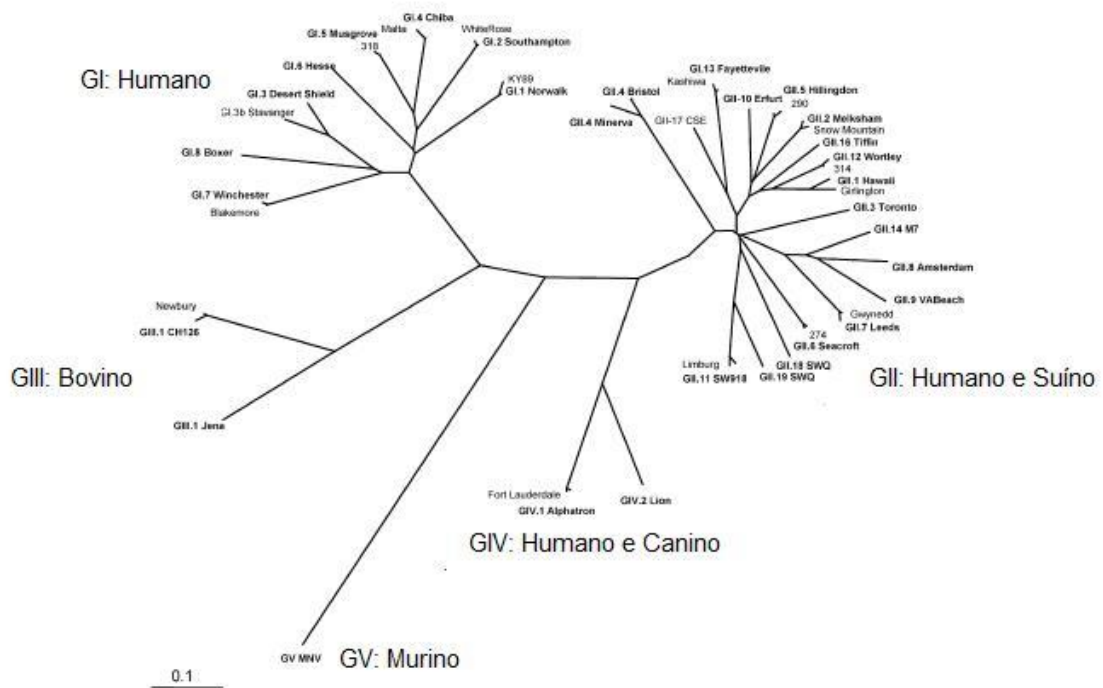


Figura 1.5. Classificação de norovírus (NV) em cinco genogrupos (GI-V) e 32 genótipos baseada na diversidade aminoacídica da proteína de capsídeo VP1 (Patel et al, 2009).

As infecções por NV são caracterizadas por diarreia e vômito. Essas manifestações podem estar acompanhadas por náusea, câimbras abdominais, cefaléia, febre e mialgia (Thornton et al, 2004; Bull et al, 2006). Os sintomas manifestam-se de 12 a 72 horas e os vírus são eliminados por um período que pode exceder 22 dias. O período de incubação é de 12 a 48 horas e a doença é normalmente branda e auto limitada, resultando em altas taxas de transmissão e grandes surtos. Os NV infectam indivíduos de todas as faixas etárias. Geralmente, indivíduos com idade superior a 1 ano desenvolvem vômito como a principal característica da doença, enquanto a diarreia é o sintoma mais freqüente em crianças menores de um ano de idade (Clark & McKendrick, 2004; Thornton et al, 2004; Patel et al, 2009). Porém, um estudo de infecção por NV em voluntários humanos demonstrou que 82% (41/52) dos voluntários foram infectados, sendo 68% (28/41) sintomáticos, 32% (13/41) com sintomas brandos e 20% (8/41) não apresentando qualquer tipo de sintoma (Gallimore et al, 2004b), além de NV terem sido detectados em crianças apresentando infecção assintomática (Monica et al, 2007).

A principal via de transmissão dos NV é fecal-oral. A infecção primária ocorre, predominantemente, através da ingestão de água e alimentos contaminados. Porém a transmissão via vômitos, por superfícies (através da mão/contato com a boca) e formação de aerossol, poderia gerar infecções secundárias e explicar a disseminação rápida e extensa de surtos de doenças em ambientes fechados, como hospitais, hotéis, cruzeiros, e creches (Estes et al, 2000; Fankhauser et al, 2002; Widdowson et al, 2005). Associado a isso, a baixa dose infecciosa requerida para ser estabelecida a infecção (<10 partículas), a eliminação prolongada de partículas nas fezes, a estabilidade no ambiente, a grande diversidade genética e a baixa imunidade contribuem na disseminação de casos (Glass et al, 2000b; Bull et al, 2006; Patel et al, 2009).

Responsáveis por 60 a 80% dos surtos de gastroenterite em todo o mundo, correspondendo a aproximadamente 93% das gastroenterites não-bacterianas, os NV infectam indivíduos de todas as idades, uma característica que os difere de outros vírus responsáveis pela etiologia das gastroenterites (Glass et al, 2000b; Zheng et al, 2006). Estima-se que os NV sejam responsáveis por 64.000 episódios diarréicos que requerem hospitalização, 900.000 consultas clínicas em crianças de países industrializados e acima de 200.000 óbitos de crianças com idade inferior a cinco anos em países em desenvolvimento (Patel et al, 2008).

Casos esporádicos de GA causados por NV podem ocorrer durante todo o ano, embora se observem diferentes padrões de sazonalidade nos hemisférios norte e sul para a maioria dos surtos. No hemisfério norte, os casos ocorrem com maior frequência no inverno ou na estação seca, enquanto que no sul são mais frequentes no verão (Froggatt et al, 2004; Parashar et al, 2004; Bon et al, 2005; Fretz et al, 2005; Ike et al, 2006).

No mundo, trabalhos desenvolvidos em diversos países, como Chile, França, Alemanha, Itália, Estados Unidos e Japão, têm demonstrado a importância dos NV nas GA, especialmente os NV GII.4, descritos como os mais prevalentes. Além disso, nesses trabalhos pode-se observar a grande diversidade genética dos NV e a descrição de novas cepas circulantes (Vidal et al, 2005; Bon et al, 2005; Okada et al, 2005; Colomba et al, 2006; Ike et al, 2006).

No Brasil, alguns trabalhos foram desenvolvidos demonstrando a circulação dos NV no país (Figura 1.6). Em trabalho realizado na Bahia por Campos e colaboradores (2008), NV foram detectados em 63% de amostras de pacientes

apresentando quadros de GA, sendo o GII.4 detectado em 72,5% das amostras, GII.3 em 8,8% e GII.9 em 10%. Outro trabalho realizado na Bahia por Xavier e colaboradores (2009) com crianças de idade inferior a 3 anos na cidade de Salvador, demonstrou que os NV foram responsáveis por 8% dos casos. Em Recife, NV foram detectados em 15% dos casos de crianças internadas com quadros diarréicos (Nakagomi et al, 2008).

No Rio de Janeiro, quatro trabalhos foram publicados demonstrando a importância dos NV. Gallimore e colaboradores (2004a) demonstraram que os NV foram responsáveis por 75% (3/4) dos surtos de gastroenterite de etiologia não conhecida em uma creche na cidade do Rio de Janeiro, dos quais dois foram causados por GII.4 e outro por GII.3, variando de 23% a 67%. Soares e colaboradores (2007) detectaram NV em 14,5% de amostras clínicas de crianças com GA, sendo 47,6% e 52,3% destas pertencentes ao genótipo I e II, respectivamente. Victoria e colaboradores (2007), ao estudarem crianças hospitalizadas por quadros de GA, detectaram NV em 20% dos casos e os genótipos envolvidos foram GII.4 (64%), GII.2 (7%) e GI.2 (4%). Ferreira e colaboradores (2008) publicaram um trabalho no qual NV foram detectados em 66% das amostras provenientes de surtos e casos esporádicos de GA na região do Vale do Paraíba no estado, com todas as amostras seqüenciadas pertencentes ao GII.4.

No Espírito Santo, NV foram detectados em 39,7% amostras provenientes de crianças hospitalizadas por GA (Ribeiro et al, 2008).

Em São Paulo, NV foram detectados em 33,3% das amostras de crianças com idade inferior a três anos (Castilho et al, 2006). Neste estudo NV GI foram detectados em 6,1% das amostras, sendo observados os genótipos GI.3b e GI.4. O GII foi encontrado em 78,7%, onde foram detectados os genótipos GII.4 (60,6%), GII.6, GII.3 e GII.2.

Na região centro-oeste do país, um estudo realizado por Borges e colaboradores (2006), detectou calicivirus humanos (HuCaV) em amostras provenientes de crianças hospitalizadas em Brasília (11,6%) e Goiânia (1,9%).

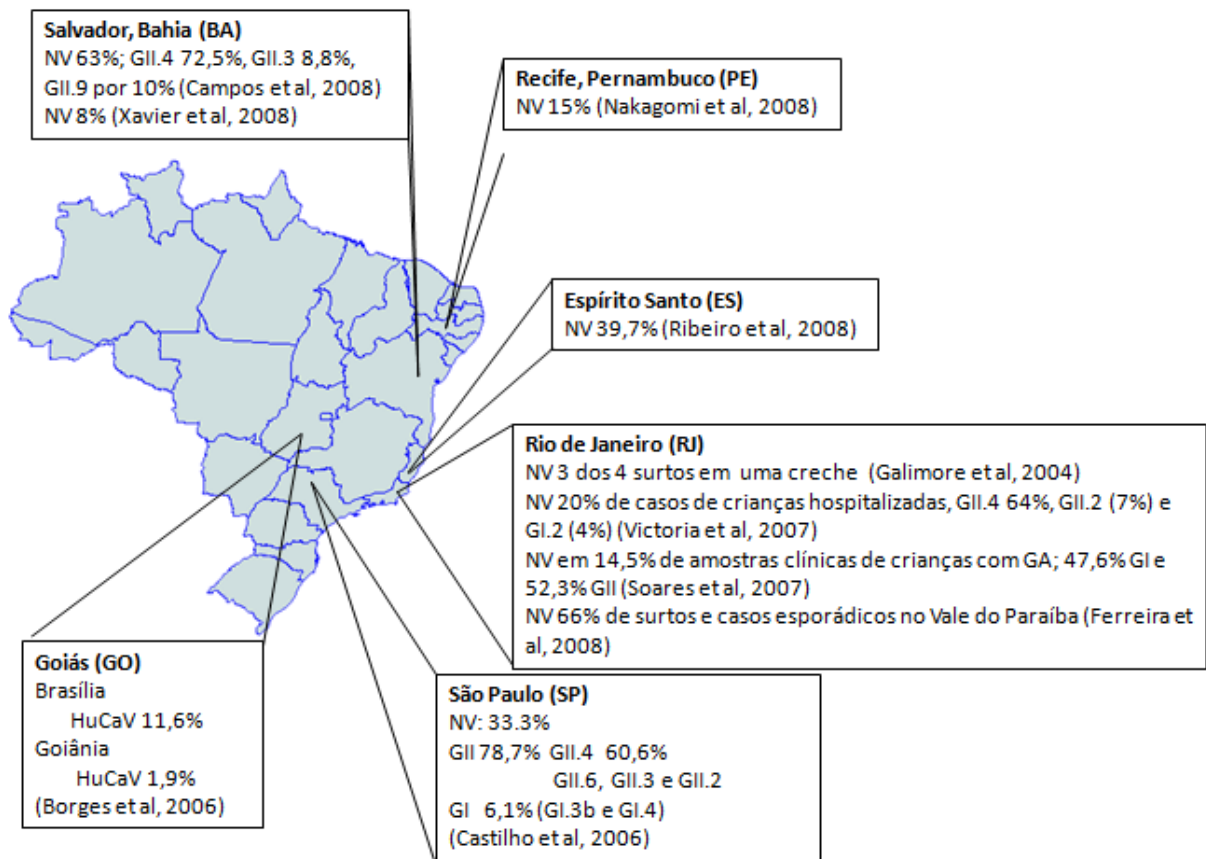


Figura 1.6. Representação esquemática da detecção de norovírus (NV) e calicivírus humanos (HuCaV) no Brasil.

1.2. Metodologias de detecção de vírus gastroentéricos

1.2.1. Rotavírus

A primeira metodologia descrita para detecção dos RV foi a visualização direta por ME das partículas virais em função da morfologia única deste patógeno, formato de roda (Kapikian et al, 2001). Atualmente, o método de escolha mais utilizado para detecção do antígeno viral é o ensaio imunoenzimático (EIE), que é disponível comercialmente para o diagnóstico de RV-A, com a utilização de anticorpos policlonais ou monoclonais dirigidos ao antígeno comum de grupo (VP6). Trata-se de um procedimento de fácil execução, acessível a laboratórios de rotina e que permite testar várias amostras simultaneamente (Flewett et al, 1989).

A EGPA representa um método diagnóstico com sensibilidade e especificidade elevadas, possibilitando a caracterização dos perfis genômicos de RV-A e a

diferenciação entre os demais grupos, que apresentam padrões eletroforéticos atípicos (Pereira et al, 1983).

A reação em cadeia pela polimerase precedida de transcrição reversa (RT-PCR) representa um método de alta sensibilidade e especificidade, sendo aplicada para genotipagem dos RV-A, pela utilização de iniciadores de cadeia consensuais e específicos que amplificam os genes que codificam para as proteínas VP4 e VP7 (Gouvêa et al, 1990; Gentsch et al, 1992; Das et al, 1994). Além destes, protocolos de amplificação genômica de outros segmentos já foram descritos (Iturriza-Gómara et al, 2002; Gallimore et al, 2006). Mais recentemente, protocolos de PCR quantitativo (qPCR) têm permitido a quantificação da carga viral em espécimens clínicos (Min et al, 2006; Gutiérrez-Aguirre et al, 2008; Zheng et al, 2008).

1.2.2. Norovirus

O maior obstáculo para o diagnóstico laboratorial das infecções por NV tem sido a ausência de um sistema de cultivo celular e modelo animal para a replicação viral (Duizer et al, 2004b). Conseqüentemente, a ME e a imunomicroscopia eletrônica (IME) foram as metodologias mais utilizadas para a detecção de partículas de NV (Atmar & Estes, 2001).

EIE são fáceis de serem realizados e não necessitam de equipamentos sofisticados. Entretanto, a diversidade antigênica dos NV e os ensaios altamente específicos requerem quantidades e qualidade suficientes de antígenos para detecção de todos os genogrupos e genótipos. Em função da insuficiência destes insumos, a viabilidade do teste para a detecção tem sido restringida (Moreno-Espinosa et al, 2004; de Bruin et al, 2006).

Em função da grande diversidade genômica dos NV, diferentes iniciadores têm sido desenhados para amplificação de distintas regiões do genoma viral em protocolos de RT-PCR, tais como regiões da RpRd e a região da junção da ORF1-ORF2, que são descritas como as mais conservadas do genoma (Ando et al, 1995; Kobayashi et al, 2000; Beuret, 2003; Kageyama et al, 2003; La Rosa et al, 2007). Outras regiões do genoma também tem sido alvo de ampliações, como a região codificadora da proteína VP1, por propiciarem a distinção e a identificação dos

genogrupos e genótipos dos NV (Atmar & Estes, 2001; Kojima et al, 2002; Vinjé et al, 2004).

Recentemente, protocolos RT-PCR em tempo real, incluindo protocolos multiplex, têm sido descritos, os quais são sensíveis e específicos, apresentam baixa taxa de contaminação e quantificam a carga viral da amostra (Kageyama et al, 2003; Pang et al, 2005; Hoehne & Schreier, 2006; Trujillo et al, 2006).

1.2.3. Detecção de vírus gastroentéricos em amostras ambientais

Para a investigação de vírus em amostras ambientais, os métodos de detecção viral devem estar associados a métodos de concentração capazes de recuperar os vírus disseminados no ambiente. Inicialmente, os métodos de concentração viral foram associados a métodos de detecção baseados em cultivo celular e os estudos de virologia ambiental estavam restritos a pesquisa vírus cultiváveis, como os adenovírus (AdV) e enterovirus (Farrah et al, 1977; Ijzerman et al, 1997; Griffin et al, 2003; Fong & Lipp, 2005).

A pesquisa de vírus entéricos considerados fastidiosos ou que não dispõem de um cultivo celular para replicação é recente e resultado dos avanços obtidos no diagnóstico molecular destes vírus, com a reação em cadeia pela polimerase (PCR) considerada atualmente uma metodologia adequada para detecção de vírus em ambientes aquáticos (Fong & Lipp, 2005). A PCR integrada a cultura celular (ICC-PCR), metodologia que combina cultura celular e detecção molecular do ácido nucléico viral, foi desenvolvida para detectar partículas virais viáveis e reduzir as desvantagens inerentes das duas técnicas (Chung et al, 1996; Reynolds et al, 1996; Chapron et al, 2000; Ko et al 2003).

As técnicas de concentração viral podem estar baseadas no tamanho da partícula viral e na massa molecular relativamente alta dos vírus, o que possibilita concentrá-los por métodos de ultrafiltração ou ultracentrifugação (Wyn-Jones & Sellwood, 2001; Fong & Lipp, 2005; García, 2006). Outras metodologias baseadas nas propriedades físico-químicas da partícula viral que conferem a capacidade de adsorção em matrizes carregadas positiva ou negativamente (membranas, lã e fibra de vidro) com posterior eluição têm sido descritas (Sobsey & Glass, 1980; Vilagines

et al, 1993; Gantzer et al, 1998; Queiroz et al, 2001; Katayama et al, 2002; Haramoto et al, 2004, 2005; Albinana-Gimenez et al, 2006).

O método de adsorção-eluição utilizando membranas carregadas positivamente tem sido amplamente utilizado para a recuperação viral em amostras ambientais (Standard Methods, 1995; Mehnert et al, 1997; Queiroz et al, 2001; Fong & Lipp, 2005). Entretanto, a utilização do extrato de carne para eluição do concentrado nestes métodos tem sido apontada como um fator inibidor da PCR, principalmente após reconcentração. Assim, protocolos envolvendo adsorção em membranas carregadas negativamente com posterior eluição em soluções inorgânicas (Katayama et al, 2002), como o utilizado neste estudo, têm se apresentado como uma alternativa quando a detecção viral é realizada por métodos moleculares. Além disso, a etapa ácida do protocolo permite a ligação dos vírus à membrana, assim como auxilia na remoção de cátions e outros inibidores. Em adição, estas membranas apresentam maior eficiência na recuperação viral a partir de água do mar e em águas com alta turbidez que as carregadas positivamente (Lukasik et al, 2000; Katayama et al, 2002; Fong & Lipp, 2005).

Diversos estudos utilizando diferentes metodologias de concentração demonstraram a presença de RV em esgoto, águas superficiais, subterrâneas, potáveis e marinhas (Mehnert & Stewien, 1993; Gajardo et al, 1995; Kittigul et al, 2001; Abbaszadegan et al, 2003; Pusch et al, 2005; Espinosa et al, 2008; Hamza et al, 2009; He et al, 2009; Rutjes et al, 2009; Wong et al, 2009). Surtos de RV, tendo a água como principal fonte de contaminação, foram descritos em diferentes países: Suécia (Lycke et al, 1978), Brasil (Sutmoller et al, 1982), Rússia (Solodovnikov et al, 1989), Finlândia (Kukkula et al, 1997) e Albânia (Villena et al, 2003).

A ausência de sistemas de vigilância tem limitado a capacidade de se estudar a etiologia e epidemiologia da gastroenterite causada por NV. Entretanto, com o aumento da disponibilidade de métodos de detecção e caracterização têm-se demonstrado a importância deste patógeno, assim como fontes de infecção (Thornton et al, 2004).

NV foram responsáveis por surtos de veiculação hídrica em estações de ski, cruzeiros, resorts e piscina (Kappus et al, 1982; Boccia et al, 2002; Anderson et al, 2003; Widdowson et al, 2004; Enserink, 2006; Podewils et al, 2007; O'Reilly et al, 2007). Estes vírus foram detectados em águas superficiais, subterrâneas, potável e mineral, águas recreacionais de rio, mar e lago (Kappus et al 1982; Kukkula et al,

1999; Beuret et al, 2002; Abbaszadegan et al, 2003; Parshionikar et al, 2003; Laverick et al, 2004; Miagostovich et al, 2008; Hamza et al, 2009). Em estudo na Finlândia, NV foram responsáveis por 18 de 41 surtos de veiculação hídrica em diferentes tipos de matrizes aquáticas, como subterrânea, poço, lago e superficial como fonte de água potável (Maunula et al, 2005).

1.3. Prevenção e controle

A prevenção de surtos de GA causados pela infecção viral depende da identificação do modo de transmissão. De modo geral, a interrupção da transmissão se dá pela implementação de medidas de controle da contaminação de alimentos e da água, mantendo ao mesmo tempo uma higiene adequada nos manipuladores de alimentos e reduzindo a propagação do surto pelo contato pessoa-pessoa (Unicef/OMS, 2009).

Vacinas estão disponíveis contra os RV, mas não para os outros agentes virais da gastroenterite aguda, como os NV. Para RV, a vacina Rotarix, de especificidade genotípica G1P[8], foi introduzida no calendário brasileiro de imunização em março de 2006, porém já estava disponível desde 2005 em clínicas e consultórios particulares. Para os NV, os primeiros avanços para o desenvolvimento de uma vacina anti-NV têm sido obtidos pela utilização de VLPs recombinantes para a imunização de camundongos e de voluntários infectados pelo NV (Tacket, 2005; Lobue et al, 2006). Outra estratégia de vacinação é a utilização de Adv recombinantes que expressam a proteína do capsídeo dos NV (Guo et al, 2008).

2. JUSTIFICATIVA

Ao longo dos últimos anos, tem sido observado um aumento nas atividades que envolvem o contato com a água, antes restrito a épocas balneares, resultando em um aumento na exposição a microrganismos patogênicos ali presentes, seja por ingestão, inalação ou penetração pela pele (Pond, 2005). Embora os perigos microbiológicos encontrados na água de recreação incluam bactérias, protozoários e vírus (Bartram & Rees, 2000), doenças de veiculação hídrica vêm sendo mais freqüentemente associadas à contaminação viral (Cabeli et al, 1982; Bosch et al, 2008).

No Brasil, a Resolução CONAMA nº 357, de 17 de Março de 2005, dispõe sobre a classificação dos corpos d'água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento e, quando considera parâmetros e padrões microbiológicos para águas destinadas à balneabilidade, remete à Resolução CONAMA nº 274, de 29 de novembro de 2000, que dispõe sobre a classificação das águas como próprias ou impróprias à balneabilidade, considerando coliformes fecais (termotolerantes), *Escherichia coli* (*E.coli*) e enterococos. Entretanto, o uso destes parâmetros como indicadores de presença viral na água vem sendo questionado e tem se mostrado inadequado, em função das diferenças existentes entre estes grupos de microrganismos. Diversos trabalhos têm demonstrado ausência de associação entre contaminação bacteriana e viral (Skraber et al, 2004; Jiang et al, 2006; Rose et al, 2006; Espinosa et al, 2009), de modo que águas de recreação que não sofrem nenhum tratamento sanitário, podem conter vírus, apesar de serem consideradas próprias para o banho de acordo com os parâmetros bacterianos (Gerba et al, 1979; Goyal et al, 1984; Miagostovich et al, 2008). Outros estudos vêm sendo realizados na tentativa de se determinar um marcador viral de contaminação humana com ênfase nos vírus DNA, por estes apresentarem maior estabilidade no ambiente, como os poliomavírus humano JC (HPyJC), torque teno vírus (TTV) e adenovírus humanos (HuAdV), e sugerem a utilização deste último por apresentar resistência aos processos de tratamento de água e esgoto utilizados (Puig et al, 1994; Pina et al, 1998; Boffil-Más et al, 2006; Hundesa et al, 2006; Carducci et al, 2008; Diniz-Mendes et al, 2008; Albiñana-Gimenez et al, 2009; Fumian et al, *in press*; Prado et al, submetido).

Águas de contato primário, definidas pelo contato direto e prolongado da água

com indivíduos durante atividades recreacionais ou desportivas (Resoluções CONAMA 274, de 29 de Novembro de 2000, e 357, de 17 de Março de 2005), são rotineiramente monitoradas seguindo os padrões determinados pela legislação vigente, como ocorre com a Lagoa Rodrigo de Freitas, objeto deste estudo.

A Lagoa Rodrigo de Freitas é um ponto turístico e de lazer de grande expressão na estrutura urbana da cidade do Rio de Janeiro e, ao longo dos anos, sofreu com o aporte incessante de águas servidas e de matéria sólida, o que prejudicou a qualidade de suas águas (Alves et al, 1998). Recentemente, um projeto de recuperação para reverter o seu atual processo de degradação ambiental vem sendo desenvolvido pelo grupo EBX em parceria com o Governo do Estado e a Prefeitura da Cidade do Rio de Janeiro (Projeto Ambiental Lagoa Limpa, 2009).

A avaliação da contaminação viral das águas da Lagoa por vírus gastroentéricos (RV e NV) é pioneira e resultante da associação de metodologias de concentração e técnicas moleculares que permitam a detecção de vírus fastidiosos, como os RV, e dos NV, que, até o momento, não dispõem de cultura celular e modelo animal para replicação. Este estudo tem como objetivo principal demonstrar a disseminação destes vírus neste ecossistema aquático, alertando sobre o possível risco de infecção pela exposição a estes agentes, especialmente por atividades desportivas recreacionais realizadas rotineiramente na Lagoa, tais como remo, ski aquático e competições náuticas.

Os resultados obtidos neste estudo fornecem dados quantitativos necessários para a realização de estudos posteriores de análise de risco de infecção, indispensáveis para se determinar a qualidade e, conseqüentemente, a balneabilidade destas águas.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Avaliar a contaminação por RV e NV em concentrados de águas superficiais da Lagoa Rodrigo de Freitas pela detecção, quantificação e caracterização molecular destes agentes, correlacionando-os com parâmetros microbiológicos e físico-químicos de qualidade da água.

3.2. Objetivos específicos

- Detectar e quantificar por amplificação genômica utilizando métodos qualitativos (cPCR) e quantitativos (qPCR) a presença do NV e RV em amostras de água da Lagoa Rodrigo de Freitas.
- Determinar os genótipos dos vírus detectados por sequenciamento nucleotídico dos *amplicons* obtidos .
- Detectar e quantificar o indicador microbiológico *E.coli* nas amostras de água e investigar sua possível correlação com a presença de RV e NV.
- Detectar adenovírus humano (HuAdV), utilizando método de qPCR, e avaliar seu papel como marcador viral de contaminação fecal.
- Determinar os parâmetros físico-químicos das amostras de água e avaliar sua possível correlação com a presença de RV e NV.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Área de Estudo

Localizada entre a restinga de Ipanema e o Leblon, na Zona Sul da cidade do Rio de Janeiro, a Lagoa Rodrigo de Freitas possui um espelho d'água de 2,2km², profundidade média de 2,8m e perímetro de 7,8km, com volume de aproximadamente 6.200.000m³. A Lagoa se inclui na categoria de lagoa sufocada, por apresentar uma única via de comunicação com o mar, o canal do Jardim de Alah, que possui 800m de comprimento e largura variando entre 10 e 18 metros, por onde processa seu balanço hídrico com o ambiente marinho (INEA, 2009).

A Lagoa Rodrigo de Freitas encontra-se situada na vertente sul da Serra Carioca, que se caracteriza por ter grande parte de suas encostas cobertas por florestas em bom estado de conservação. Atualmente, a bacia do Rio dos Macacos é o trecho em melhor estado de conservação florestal de todo o maciço da Tijuca, onde podemos encontrar a Mata do Pai Ricardo, que é conhecida por sua formação primária de Mata Atlântica dentro da cidade do Rio de Janeiro (Projeto Ambiental Lagoa Limpa, 2009).

Engastada entre a vertente sul da serra da Carioca e o mar, na malha urbana de uma área de alta densidade populacional na cidade do Rio de Janeiro, a Lagoa recebeu despejos domésticos por longo período, e ainda os recebe acidentalmente, encontrando-se, conseqüentemente, em processo de eutrofização. Dentre os problemas ambientais observados, destacam-se: grande aporte de matéria orgânica por despejos de efluentes, principalmente, domésticos, gerando um grande estoque de nutrientes; progressivo processo de aterro de suas margens, gerando uma perda de aproximadamente 50% de seu espelho d'água original; aporte de material em suspensão (sedimentos), acarretando pontos de assoreamento (INEA, 2009).

A Lagoa é considerada uma área de proteção permanente dentro do artigo 463 da Lei Orgânica do Município de 05 de Abril de 1990 e em 2004 foi criado pelo Decreto Nº 35487, de 24 de Maio de 2004, o Conselho Consultivo de Gestão da Bacia Hidrográfica da Lagoa Rodrigo de Freitas – Município do Rio de Janeiro, com a finalidade de promover a recuperação ambiental e o gerenciamento do corpo hídrico, assegurado o uso múltiplo sustentável da área de abrangência da bacia.

A Lagoa representa atualmente uma das principais atrações turísticas da capital Rio de Janeiro, onde pratica-se esportes aquáticos como o remo, ou simplesmente passeia-se de pedalinho, além de ser utilizada em competições náuticas, como nos Jogos Pan Americanos de 2007. Em seu entorno encontram-se um estádio de remo (Estádio de Remo da Lagoa), uma colônia de pescadores, uma ciclovia pavimentada com 7,5 km de extensão, diversos equipamentos de lazer e quiosques de alimentação, que oferecem itens da gastronomia regional e internacional, além de alguns dos mais importantes clubes da cidade, como Clube de Regatas do Flamengo, Jockey Club Brasileiro, Clube Caiçaras e as sedes náuticas do Clube de Regatas Vasco da Gama e Botafogo de Futebol e Regatas.

4.2. Coleta

Foram realizadas coletas mensais de 2L de água superficial na Lagoa Rodrigo de Freitas no período de Julho de 2007 a Agosto de 2008. Os pontos de coleta foram determinados utilizando-se o sistema de posicionamento global GPS (Garmin etrex[®]Legend, EUA) e escolhidos de maneira que todo o entorno lagunar fosse representado, incluindo áreas de lazer e prática de esportes, além de um ponto central, um ponto no Rio dos Macacos e um ponto na Praia do Leblon, próximo à saída do canal de Jardim de Alah (Figura 4.1). Adicionalmente, foram coletados 200mL de água para contagem de *E.coli* e realizada a mensuração de parâmetros físico-químicos no momento da coleta.

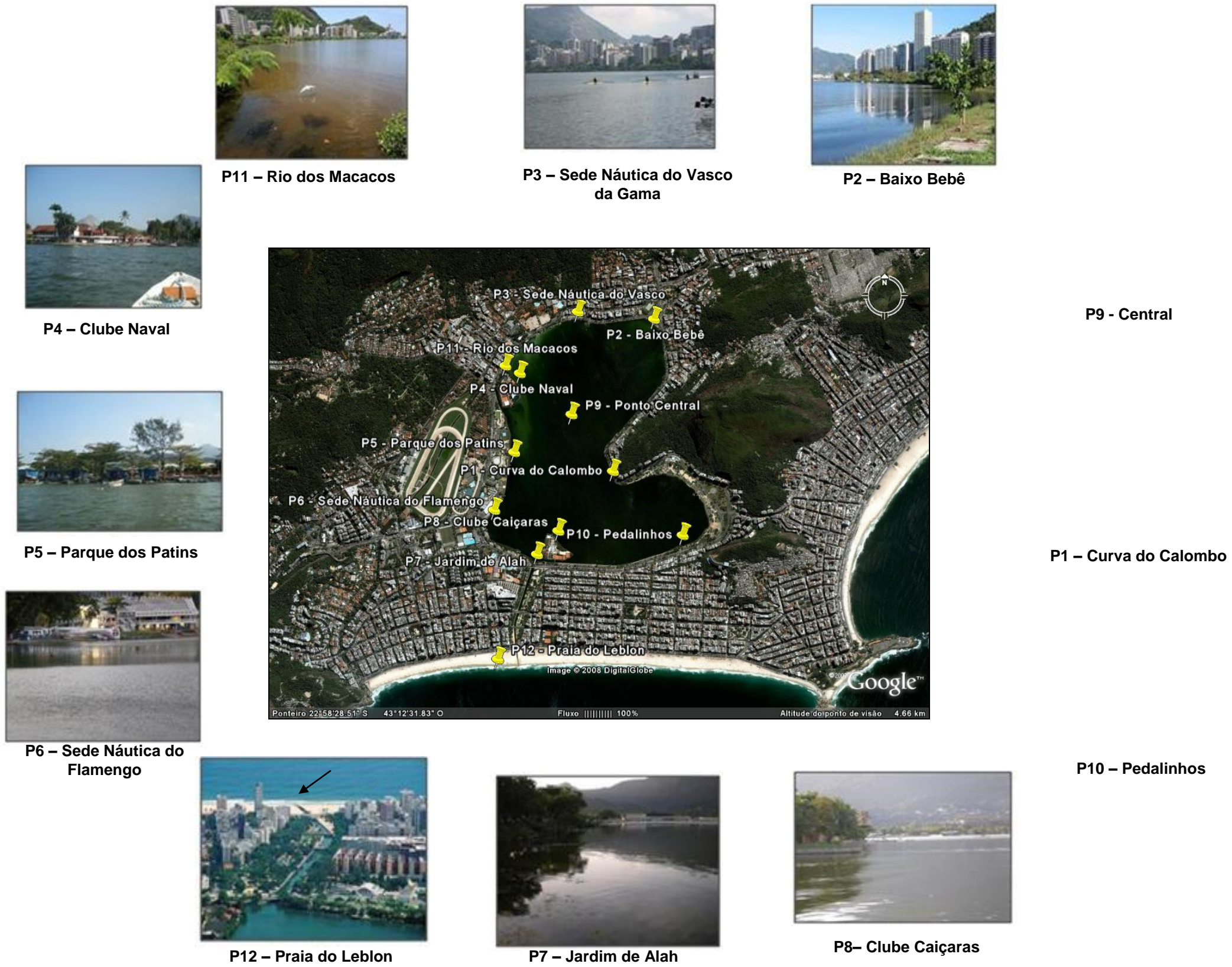


Figura 4.1. Mapa geográfico da Lagoa Rodrigo de Freitas, município do Rio de Janeiro, RJ: localização dos pontos de coleta (Fonte: Google Earth).

Segundo a Resolução CONAMA 357, as águas da Lagoa Rodrigo de Freitas são classificadas como águas salobras classe especial por esta ser uma área de proteção permanente. Entretanto, em função das modificações que este ambiente sofreu e das atividades balneares (recreação de contato primário) exercidas neste ambiente, ela enquadra-se na categoria de água salobra classe 1. O Rio dos Macacos enquadra-se na classificação de água doce classe 2, categoria que envolve águas destinadas à balneabilidade, ao abastecimento para consumo humano, após tratamento convencional, e à proteção das comunidades aquáticas. A Praia do Leblon é classificada como água salina classe 1, que compreende águas destinadas à balneabilidade, à proteção das comunidades aquáticas à aquicultura e pesca. Assim, os valores obtidos nos parâmetros analisados foram comparados aos padrões de qualidade das águas determinados nesta Resolução, que estabelece limites individuais para cada substância em cada classe.

4.3. Concentração viral

As amostras foram concentradas por metodologia baseada na adsorção-eluição dos vírus em membrana carregada negativamente, descrita por Katayama e colaboradores (2002).

As amostras foram previamente clarificadas para a remoção de resíduos grosseiros por filtração com pré-filtro AP-20[®] (membrana de 142 mm de diâmetro, malha de Millipore) utilizando um Sistema de Filtração Millipore (Millipore, RJ), constituído por uma bomba de vácuo, um recipiente de pressão e um suporte para a colocação das membranas (Figura 4.2).



Figura 4.2. Sistema de filtração Millipore®. 1 - Bomba de vácuo com manômetros; 2 - Recipiente de pressão; 3 - Suporte de membranas.

Após a clarificação, foram adicionados às amostras 25 mL de cloreto de magnésio ($MgCl_2$) a uma concentração final de 25 mM (Vetec, Brasil). O pH foi ajustado para 5,0 com a adição de ácido clorídrico 6N (HCl, Merck, Brasil). Em seguida, as mesmas foram filtradas em membrana HA carregadas negativamente (142 mm de diâmetro, malha de 0,45 μm , Millipore) acopladas ao suporte do sistema de filtração. A membrana foi rinsada com 350 mL de ácido sulfúrico 0,5 mM (H_2SO_4 , Merck, Brasil). Os vírus foram eluídos em 15 mL de hidróxido de sódio 3 mM, pH 10,5 (NaOH, Vetec, Brasil) por agitação em placa de petri durante 10 minutos. O eluato foi neutralizado pela adição de 50 μL de H_2SO_4 50 mM e 50 μL de tampão Tris-EDTA (TE) 100x (10 μM Tris, 1 mM EDTA, pH 8,0) e transferido para uma unidade do concentrador Centriprep® YM-50 (Millipore, Brasil) (Figura 4.3). Em seguida, foi realizada centrifugação a 1500 x g por 10 minutos a 4°C, até ser obtido um volume final de 2 mL.



Figura 4.3. Concentrador Centriprep® YM-50, Millipore®. 1-Tubo coletor; 2- Recipiente externo para a amostra.

4.3.1. Determinação da eficiência do método de concentração viral

Para a determinação da eficiência do método de concentração viral utilizado, foram feitas inoculações experimentais com $3,27 \times 10^7$ cópias de genoma (cg) de RV-A e $1,5 \times 10^7$ cg de NV GII em amostras representativas de cada tipo de água: pontos 10 (Pedalinho), 11 (Rio dos Macacos) e 12 (Praia do Leblon). Após a inoculação, as amostras foram processadas conforme as demais obtidas no estudo.

4.4. Extração de ácido nucleico e obtenção de DNA complementar (cDNA)

O ácido nucleico viral foi extraído das amostras concentradas utilizando-se o conjunto de reagentes comercial “Qiagen Viral RNA Kit” (Qiagen, Valencia, Espanha), seguindo as recomendações do fabricante. Foram utilizados controles negativo e positivo ao longo de todo o processamento da amostra. As amostras clínicas RJ15221 e RJ12688 foram previamente sequenciadas como controles positivos para RV e NV, respectivamente.

A síntese do cDNA de RV-A e NV foi realizada utilizando-se o iniciador randômico pd(N)₆ (Amersham Biosciences, EUA).

Foram adicionados 2 µL de dimetil sulfóxido (DMSO) (SIGMA®) a 10 µL de RNA extraído, incubou-se a 97°C por 7 minutos para desnaturação, seguido de banho de gelo por 2 minutos. Em seguida, 38 µL da mistura de reagentes (Quadro 4.1) foram adicionados e incubou-se a 25°C por cinco minutos, 50°C por uma hora e 70° por 20 minutos. O produto foi estocado a -20°C até o momento da PCR.

Quadro 4.1. Reagentes utilizados na reação da transcrição reversa (RT) para a obtenção de DNA complementar (cDNA) a partir do RNA viral extraído.

| Reagente | Volume (µL) |
|--|-------------|
| H ₂ O livre de DNAase / RNAase * ¹ | 20,9 |
| Tampão de PCR sem MgCl ₂ (10X)* | 5 |
| dXTP: dATP, dTTP, dGTP, dCTP (2,5mM)* | 4 |
| MgCl ₂ (50 mM) * | 1,5 |
| RT Superscript III™ (200 U/µL) * | 1 |
| pd(N) ₆ (25 U)* ² | 4 |
| DTT (100 mM)* | 1 |
| RNAse Out (40 U/µL) * | 0,6 |
| Total | 38 |

* Invitrogen®, Califórnia, EUA, *¹ Gibco®, Califórnia, EUA, *² Amersham Biosciences

4.5. Detecção e quantificação viral

4.5.1. Rotavirus

A detecção de RV-A foi realizada por PCR convencional (cPCR), de acordo com protocolo descrito por Iturriza-Gómara e colaboradores (2002), no qual são utilizados iniciadores de cadeia para a amplificação parcial do segmento que codifica a proteína VP6 (Quadro 4.2).

Quadro 4.2. Sequência de iniciadores de cadeia utilizados na PCR para detecção do gene que codifica a proteína VP6 dos rotavírus grupo A (RV-A).

| Proteína alvo | Iniciadores de cadeia | Nucleotídeos (posição – pb) | Fragmento (pb) | Sequência (5'- 3') |
|---------------|-----------------------|-----------------------------|----------------|----------------------|
| VP6 | VP6 - F (+) | 747 – 766 | 379 | gacggvgcractacatggt |
| | VP6 - R (-) | 1126 – 1106 | | gtccaattcatncctggtgg |

Código IUB (União Internacional de Bioquímica): N = A/C/G/T, R = A/G, V = G/A/C

Para obtenção do *amplicon*, foram acrescentados 3µL de cDNA à mistura da reação (Quadro 4.3). A reação consistiu em desnaturação do cDNA a 94 °C por 2

minutos, seguido de 40 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos, hibridação dos iniciadores de cadeia a 58°C por 30 segundos e amplificação a 72°C por 1 minuto. Ao final foi realizada uma extensão a 72°C por 7 minutos.

Quadro 4.3. Reagentes utilizados na PCR para detecção do gene que codifica a proteína VP6 dos rotavírus grupo A (RV-A).

| Reagentes | Volume (µL) |
|--|-------------|
| H ₂ O DNAase/RNAase livre* ¹ | 14,125 |
| dXTP (dCTP, dDTP, dATP, dGTP) (20µM)* ¹ | 2 |
| Tampão de PCR sem MgCl ₂ (10 X) * | 2,5 |
| MgCl ₂ (50mM)* | 1,25 |
| Iniciadores de cadeia VP6-F e VP6-R (Pool 20µM) | 2,0 |
| Taq Polimerase Platinum (5U/µL)* | 0,125 |
| Total | 22 |

* Invitrogen[®], Califórnia, EUA, * 1 Gibco[®], Califórnia, EUA

Foram consideradas positivas para RV-A as amostras que apresentaram *amplicons* específicos de 379 pb.

Os RV-A foram classificados binariamente através da amplificação parcial dos segmentos que codificam para as proteínas VP4 (Genstch et al, 1992) e VP7 (Das et al, 1994; Gouvêa et al, 1994) (Quadro 4.4).

Quadro 4.4. Sequência de iniciadores de cadeia utilizados na semi-nested PCR para detecção e caracterização dos genes que codificam para as proteínas VP4 e VP7 dos rovírus grupo A (RV-A).

| Proteína alvo | Iniciadores de cadeia | Nucleotídeos (posição – pb) | Fragmento (pb) | Sequência (5'- 3') |
|---------------|-----------------------|-----------------------------|----------------|-------------------------------|
| VP7 | 9con1 (+) | 37 – 56 | 904 | tag ctc ctt tta atg tat gg |
| | 9con2 (-) | 922 – 941 | | gta taa aat act tgc cac ca |
| | 9T1-1 (G1) (-) | 176 – 195 | 158 | tct tgt caa agc aaa taa tg |
| | 9T1-2 (G2) (-) | 262 – 281 | 244 | gtt aga aat gat tct cca ct |
| | 9T1-3 (G3) (-) | 484 – 503 | 466 | gtc cag ttg cag tgt tag c |
| | 9T1-4 (G4) (-) | 423 – 440 | 403 | ggg tcg atc gaa aat tct |
| | 9T1-9 (G9) (-) | 131 – 147 | 110 | tat aaa gtc att gca c |
| | FT5 (G5) (-) | 760 – 779 | 742 | cat gta ctc gtt gtt acg tc |
| VP4 | 4con3 (+) | 11 – 32 | 876 | tgg ctt cgc tca ttt ata gac a |
| | 4con2 (-) | 887 – 868 | | att tcg gac cat tta taa cc |
| | 1T1 P[8] (-) | 339 – 356 | 345 | tct act tgg gat aac gtg c |
| | 2T1 P[4] (-) | 474 – 494 | 483 | cta ttg tta gag gtt aga gtc |
| | 3T1 P[6] (-) | 259 – 278 | 267 | tgt tga tta gtt gga ttc aa |
| | 4T1 P[9] (-) | 385 – 402 | 391 | tga gac atg caa ttg gac |

Foram adicionados 2,5µL do cDNA à mistura de reagentes descrita no Quadro 4.5. A reação de amplificação consistiu em desnaturação do cDNA a 94°C por 2 minutos e 35 ciclos de desnaturação dos *amplicons* a 94°C por 30 segundos, hibridação dos iniciadores de cadeia a 50°C por 30 segundos e amplificação a 72°C por 1 minuto. Ao final foi realizada uma extensão a 72°C por 10 minutos.

Quadro 4.5. Reagentes utilizados na PCR para detecção dos genótipos G e P de rotavírus grupo A (RV-A).

| Reagentes | Volume (µL) |
|--|-------------|
| H ₂ O DNAase/RNAase livre* ¹ | 15,625 |
| dXTP (dCTP, dDTP, dATP, dGTP) (20µM)* ¹ | 2 |
| Tampão de PCR sem MgCl ₂ (10X) * | 2,5 |
| MgCl ₂ (50mM)* | 1,25 |
| 9con1/9con2 (G) ou 4con2/4con3 (P) (20µM)* | 1 |
| Taq Polimerase Platinum (5U/µL) * | 0,125 |
| Total | 22,5 |

* Invitrogen[™], Califórnia, EUA; *¹ Gibco[®], Califórnia, EUA

Para a caracterização dos genótipos G pela semi-nested PCR foram utilizados 0,5µL do iniciador consensual para G (9con1) e 0,5µL de cada iniciador G específico (G1, G2, G3, G4, G5 e G9) (Quadro 4.4). Para o genótipo P foram utilizados 0,5µL do iniciador consensual para P (4con3) e 0,5µL de cada iniciador específico para P[4], P[6], P[8] e P[9] (Quadro 4.4). Foram adicionadas 1µL do produto da PCR a 24µL da mistura da reação contendo os reagentes conforme o Quadro 4.6 para G tipo e o quadro 4.7 para P tipo. As reações de amplificação para ambos os tipos G e P consistiram em desnaturação inicial a 94°C por 2 minutos, seguida de 25 ciclos de desnaturação dos *amplicons* a 94°C por 30 segundos, hibridação dos iniciadores de cadeia a 47°C por 30 segundos e posterior amplificação a 72°C por 1 minuto. Ao final, foi realizada uma extensão a 72°C por 10 minutos. As amostras foram genotipadas em função do tamanho de fragmento característico de cada genótipo, conforme descrito no quadro 4.4.

Quadro 4.6. Reagentes utilizados na semi-nested PCR para detecção de genótipos G de rotavírus grupo A (RV-A).

| Reagentes | Volume (µL) |
|---|-------------|
| H ₂ O DNAase/RNAase livre* ¹ | 14,875 |
| dXTP (dCTP, dDTP, dATP, dGTP) (20µM)* ¹ | 2 |
| Tampão de PCR sem MgCl ₂ (10X)* | 2,5 |
| MgCl ₂ (50mM)* | 1 |
| Mistura dos iniciadores de cadeia de G tipo* ² | 3,5 |
| Taq Polimerase Platinum (5U/µL)* | 0,125 |
| Total | 24 |

* Invitrogen™, Califórnia, EUA; *1 Gibco®, Califórnia, EUA;

*2 Mistura de G tipo (0,5 µL de cada iniciador): 9con1 + 9T1-1 (G1) + 9T1-2 (G2) + 9T1-3 (G3) + 9T1-4 (G4) + FT5 (G5) + 9T1-9 (G9).

Quadro 4.7. Reagentes utilizados na semi-nested PCR para detecção de genótipos P de rotavírus grupo A (RV-A).

| Reagentes | Volume (µL) |
|---|-------------|
| H ₂ O DNAase/RNAase livre* ¹ | 15,875 |
| dXTP (dCTP, dDTP, dATP, dGTP) (20µM)* ¹ | 2 |
| Tampão 10X* | 2,5 |
| MgCl ₂ (50mM)* | 1 |
| Mistura dos iniciadores de cadeia de P tipo* ² | 2,5 |
| Taq Polimerase Platinum (5U/µL)* | 0,125 |
| Total | 24 |

* Invitrogen™, Califórnia, EUA; * 1 Gibco®, Califórnia, EUA;

* 2 Mistura de P(0,5 µL de cada iniciador): con3 + 1T1 P[8] + 2T1 P[4] + 3T1 P[6] + 4T1 P[9]

A quantificação foi realizada por qPCR, de acordo com protocolo descrito Zeng e colaboradores (2008), no qual são utilizados iniciadores de cadeia para a amplificação parcial do segmento que codifica para a proteína não estrutural NSP3 (Quadro 4.8).

Quadro 4.8. Sequência de iniciadores de cadeia e sonda utilizados no PCR quantitativo (qPCR) para amplificação parcial do segmento que codifica a proteína não estrutural NSP3 dos rotavírus grupo A (RV-A).

| Proteína alvo | Iniciadores de cadeia e sondas | Nucleotídeos (posição – pb) | Fragmento (pb) | Sequência (5'- 3') |
|---------------|--------------------------------|-----------------------------|----------------|--------------------------------------|
| NSP3 | NSP3 F (+) | 963–988 | 87 | accatctwcacrtraccctctatgag |
| | NSP3 R (-) | 1028–1049 | | ggtcacataacgcccctatagc |
| | Sonda NSP3 | 995–1017 | | FAM-agttaaagctaacactgtcaaaa- None |

Código IUB: R = A/G, W= A/T

O quadro 4.9 apresenta os reagentes e os volumes utilizados na reação final do qPCR. O ciclo para a amplificação genômica consistiu de 50°C por 2 minutos, 95°C por 10 minutos, seguido por 45 ciclos a 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto. Para o qPCR foi utilizado o sistema TaqMan da Applied Biosystems. As amostras foram aplicadas em duplicatas em uma microplaca de 96 cavidades (MicroAmp[®], Applied Biosystems, CA, EUA) e a reação foi realizada em plataforma ABI 7500 (Applied Biosystem, Califórnia, EUA).

Quadro 4.9. Reagentes utilizados no PCR quantitativo (qPCR) para amplificação parcial do segmento que codifica a proteína não estrutural NSP3 de rotavírus grupo A (RV-A).

| Reagentes | Volume (µL) |
|--|-------------|
| H ₂ O livre de DNAase/RNAase ¹ | 5 |
| TaqMan Universal PCR Master Mix ² | 12,5 |
| Iniciador NSP3 F (10µM) | 1 |
| Iniciador NSP3 R (10µM) | 1 |
| Sonda NSP3 FAM-none (0,5 µM) | 0,5 |
| cDNA | 5 |
| Total | 25 |

¹Gibco[®], Califórnia, EUA; ²Applied Biosystems, EUA

4.5.2. Norovirus

A detecção de NV foi realizada por semi-nested PCR, de acordo com protocolo descrito por Boxman e colaboradores (2006), no qual são utilizados iniciadores de cadeia para a amplificação parcial do gene que codifica para a polimerase viral (Quadro 4.10 e 4.11). Esse protocolo consiste de uma primeira amplificação comum aos GI e GII, seguida de semi-nested específica para cada um dos G.

Quadro 4.10. Sequência de iniciadores de cadeia utilizados na PCR para detecção do gene que codifica a polimerase viral dos norovírus (NV).

| Região Genômica | Iniciadores de cadeia | Nucleotídeos (posição – pb) | Fragmento (pb) | Sequência (5'- 3') |
|-----------------|-----------------------|-----------------------------|----------------|-----------------------|
| RNA polimerase | JV12Y (+) | 4279–4299 | 327 | ataccactatgatgcagayta |
| | JV13I (-) | 4585–4605 | | tcatcatcaccatagaigag |

Código IUB: I = inosina, Y = C/T

Quadro 4.11. Sequência de iniciadores de cadeia utilizados na semi-nested PCR para detecção do gene que codifica a polimerase viral dos norovírus genogrupos I e II (NV-GI e NV-GII).

| Genogrupo (G) | Iniciadores de cadeia | Nucleotídeos (posição – pb) | Fragmento (pb) | Sequência (5'- 3') |
|---------------|-----------------------|-----------------------------|----------------|-----------------------|
| II | JV12Y (+) | 4279–4299 | 236 | ataccactatgatgcagayta |
| | Noroll-R (-) | 4495–4515 | | agccagtgggcatggaattc |
| I | G1 (+) | 4691–4707 | 187 | tcngaaatggatgttg |
| | JV13I (-) | 4585–4605 | | tcatcatcaccatagaigag |

Código IUB: I = inosina, N = A/G/C/T, Y = C/T

Para a primeira amplificação, foram acrescentados 5µL de cDNA à mistura da reação (Quadro 4.12). A reação de amplificação consistiu em desnaturação do cDNA a 95 °C por 5 minutos, seguida de 40 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos, hibridação dos iniciadores de cadeia a 45°C por 30 segundos e amplificação a 72°C por 1 minuto. Ao final foi realizada uma extensão a 72°C por 10 minutos.

Quadro 4.12. Reagentes utilizados na PCR para detecção do gene que codifica a polimerase viral dos norovírus (NV).

| Reagentes | Volume (µL) |
|---|-------------|
| H ₂ O DNAase/RNAase livre* ¹ | 14 |
| dXTP (dCTP, dDTP, dATP, dGTP) (20µM)* ¹ | 0,5 |
| Tampão de PCR sem MgCl ₂ 10 X * | 2,5 |
| MgCl ₂ (50mM)* | 0,8 |
| Iniciadores de cadeia JV12Y e JV13I (Pool 11 pmol/ul) | 2,0 |
| Taq Polimerase Platinum (5U/µL)* | 0,2 |
| Total | 20 |

* Invitrogen[®], Califórnia, EUA, * 1 Gibco[®], Califórnia, EUA

Para a semi-nested, foram acrescentados 2µL do produto à mistura da segunda reação (Quadro 4.13). A reação de amplificação, comum a ambos os genogrupos, consistiu em desnaturação a 95 °C por 5 minutos, seguida de 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos, hibridação dos iniciadores de cadeia a 45°C por 30 segundos e amplificação a 72°C por 1 minuto. Ao final foi realizada uma de extensão a 72°C por 10 minutos.

Quadro 4.13. Reagentes utilizados na semi-nested PCR para detecção do gene que codifica a polimerase viral dos norovírus genogrupos I e II (NV-GI e NV-GII).

| Reagentes | Volume (µL) |
|---|-------------|
| H ₂ O DNAase/RNAase livre* ¹ | 16,7 |
| dXTP (dCTP, dDTP, dATP, dGTP) (20µM)* ¹ | 1,0 |
| Tampão de PCR sem MgCl ₂ (10 X) * | 2,5 |
| MgCl ₂ (50mM)* | 0,6 |
| Iniciadores de cadeia (Pool 11 pmol/ul) JV13I e G1 (GI) ou JV12Y e Noroll-R (GII) | 2,0 |
| Taq Polimerase Platinum (5U/µL)* | 0,2 |
| Total | 23 |

* Invitrogen[®], Califórnia, EUA, * 1 Gibco[®], Califórnia, EUA

Foram consideradas positivas para NV-GI as amostras que apresentaram *amplicons* específicos com 187 pares de bases e positivas para NV-GII as amostras que apresentaram *amplicons* específicos com 236 pares de bases.

A caracterização molecular dos NV foi realizada por protocolo de amplificação da região codificadora do capsídeo viral, descrito por Vinjé e colaboradores (2004) (Quadro 4.14).

Quadro 4.14. Sequência de iniciadores de cadeia utilizados na reação de sequenciamento parcial da região D do genoma dos norovirus genogrupos I e II (NV-GI e NV-GII).

| Genogrupo (G) | Iniciadores de cadeia | Nucleotídeos (posição – pb) | Sequência (5´- 3´) | Fragmento (pb) |
|---------------|-----------------------|-----------------------------|-----------------------------|----------------|
| I | Cap A (-) | 6897-6914 | GGC WGT TCC CAC AGG CTT | 177 |
| | Cap B2 (+) | 6738-6754 | TAT GTI GAY CCW GAC AC | |
| | Cap B1 (+) | 6738-6754 | TAT GTT GAC CCT GAT AC | |
| II | Cap C (-) | 6667-6684 | CCT TYC CAK WTC CCA YGG | 253 |
| | Cap D3 (+) | 6432-6452 | TGY CTY ITI CCH CAR GAA TGG | |
| | Cap D1 (+) | 6432-6451 | TGT CTR STC CCC CAG GAA TG | |

Código IUB: H = A/T/C, I = inosina, K = G/T, R = A/G, S = G/C, W = A/T, Y = C/T

O quadro 4.15 apresenta os reagentes e os volumes utilizados na reação. A reação de amplificação consistiu de 95°C por 3 minutos, seguida por 40 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 minuto, hibridação dos iniciadores de cadeia a 44°C por 1 minuto e amplificação a 72°C por 1 minuto. Ao final foi realizada uma extensão a 72°C por 10 minutos.

Quadro 4.15. Reagentes utilizados na PCR para obtenção do produto para sequenciamento parcial da região D do genoma dos norovirus genogrupos I e II (NV-GI e NV-GII).

| Reagentes | Volume (µL) |
|---|-------------|
| H ₂ O DNAase/RNAase livre* ¹ | 26,2 |
| dXTP (dCTP, dDTP, dATP, dGTP) (20µM)* ¹ | 4 |
| Tampão de PCR sem MgCl ₂ 10 X * | 5 |
| MgCl ₂ (50mM)* | 1,5 |
| Iniciadores de cadeia (Pool 50 µM/ul) Cap A, B2 e B1 ou Cap C, D1 e D3 | 3,0 |
| Taq Polimerase Platinum (5U/µL)* | 0,3 |
| cDNA | 10 |
| Total | 50 |

* Invitrogen[®], Califórnia, EUA, * 1 Gibco[®], Califórnia, EUA

A quantificação dos NV foi realizada por qPCR, de acordo com protocolo descrito por Kageyama e colaboradores (2003), no qual são utilizados iniciadores de cadeia para a amplificação parcial da região de junção ORF1-ORF2 do genoma viral (Quadro 4.16).

Quadro 4.16. Sequência de iniciadores de cadeia e sonda utilizados na qPCR para quantificação dos norovírus (NV) através da amplificação parcial da região de junção ORF1-ORF2 do genoma viral.

| Genogrupo (G) | Iniciadores de cadeia e sondas | Nucleotídeos (posição – pb) | Sequência (5'- 3') |
|---------------|--------------------------------|-----------------------------|--------------------------------|
| I | COG1F (+) | 5291–5310 | cgytggatgcgnttycatga |
| | COG1R (-) | 5375–5358 | cttagacgccatcatcattyac |
| | Sonda RING1(a) (-) | 5340–5359 | FAM-agatygcgatcycctgtcca-TAMRA |
| | Sonda RING1(b) (-) | 5340–5321 | FAM-agatcgcggtctcctgtcca-TAMRA |
| II | COG2F (+) | 5003–5023 | cargarbcnatgtyagrtggatgag |
| | COG2R (-) | 5100–5080 | tgcagccatcttcattcaca |
| | Sonda RING2 (+) | 5048–5067 | FAM-tgggagggcgatcgcaatct-TAMRA |

Código IUB: B = G/T/C, N = A/G/C/T, R = A/G, Y = C/T

O quadros 4.17 e 4.18 apresentam os reagentes e os volumes utilizados na qPCR. Para ambos os genogrupos, o seguinte ciclo foi utilizado para a amplificação genômica: 50°C por 2 minutos, seguido de 95°C por 10 minutos, 45 ciclos de 95°C por 15 segundos e 56°C por 1 minuto. Para o qPCR foi utilizado o sistema TaqMan da Applied Biosystems. As amostras foram aplicadas em duplicatas em uma microplaca de 96 cavidades (MicroAmp[®], Applied Biosystems, CA, EUA) e a reação foi realizada em plataforma ABI 7500 (Applied Biosystem, Califórnia, EUA).

Quadro 4.17. Reagentes utilizados no PCR quantitativo (qPCR) para quantificação dos norovírus do genogrupo I (NV-GI).

| Reagentes | Volume (µL) |
|--|-------------|
| H ₂ O livre de DNAase/RNAase ¹ | 3,25 |
| TaqMan Universal PCR Master Mix ² | 12,5 |
| Iniciador COG 1F (10µM) | 1 |
| Iniciador COG 1R (10µM) | 1 |
| Sonda RING1a (10µM) | 0,625 |
| Sonda RING1b (10µM) | 0,625 |
| cDNA | 5 |
| Total | 25 |

¹Gibco[®], Califórnia, EUA; ²Applied Biosystems, EUA

Quadro 4.18. Reagentes utilizados no PCR quantitativo (qPCR) para quantificação dos norovírus do genogrupo II (NV-GII).

| Reagentes | Volume (µL) |
|--|-------------|
| H ₂ O livre de DNAase/RNAase ¹ | 3,875 |
| TaqMan Universal PCR Master Mix ² | 12,5 |
| Iniciador COG 2F (10µM) | 1,5 |
| Iniciador COG 2R (10µM) | 1,5 |
| Sonda RING2 (10µM) | 0,625 |
| cDNA | 5 |
| Total | 25 |

¹Gibco[®], Califórnia, EUA; ²Applied Biosystems, EUA

4.5.3. Análise dos produtos amplificados por eletroforese em gel de agarose

Para análise dos *amplicons* obtidos, 2µL de corante azul de bromofenol (Invitrogen®) foram adicionados a 10µL de cada amplicon e os mesmos foram submetidos a eletroforese em gel de agarose (GIBCO-BRL®) a 1,5% em tampão TBE 0,5% (GIBCO-BRL®) por 1 hora a 100 volts. O gel foi previamente impregnado com Brometo de etídeo (0,5 µg/mL) e os *amplicons* foram visualizados em transiluminador de luz ultravioleta (Labnet®). Para identificar os pesos moleculares dos *amplicons* foi utilizado um marcador de peso molecular de 100 pb (GIBCO-BRL®). As imagens obtidas após a eletroforese foram registradas em sistema de captura de imagem (BioImaging Systems®) utilizando o programa Labworks 4.0.

4.6. Sequenciamento nucleotídico

Para o sequenciamento dos RV-A e NV, foram utilizados os *amplicons* obtidos pela PCR para amplificar o fragmento do gene que codifica a proteína VP6, conforme Quadro 4.2 do item 4.5.1, e região codificadora do capsídeo viral, conforme Quadro 4.14 do item 4.5.2, respectivamente.

4.6.1. Purificação e reação de sequência

Os produtos foram purificados utilizando o kit comercial QIAquick® PCR Purification kit (QIAGEN™, Valencia, CA, EUA) ou QIAquick® Gel Extraction kit (QIAGEN™, Valencia, CA, EUA). Após a purificação, os produtos foram quantificados em espectrofotômetro NanoDrop™ (Thermo Scientific, EUA).

Para o sequenciamento direto dos produtos amplificados e purificados foi utilizado o kit comercial “Big Dye Terminator® v 3.1 Cycle Sequencing Kit” (Applied Biosystems®, CA, EUA), conforme recomendado pelo fabricante. Foram utilizados os mesmos iniciadores de cadeia utilizados na reação de PCR de cada um dos vírus. As reações de sequência e os cromatogramas das sequências foram obtidos a partir do sequenciador automático de 48 capilares “ABI Prism 3730 Genetic

Analyzer” (Applied Biosystems, CA, EUA) do serviço da “Plataforma de Sequenciamento de DNA PDTIS/FIOCRUZ”.

4.7. Caracterização Molecular

As sequências nucleotídicas foram alinhadas utilizando o método CLUSTAL W (Thompson et al, 1994), contido no programa BioEdit[®] (Hall et al, 1999). As sequências protótipos representantes dos diferentes genótipos de RV-A e NV de origem humana e animal, descritas em diferentes países, foram resgatadas no site do *NCBI (National Center for Biotechnology Information* - <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) através dos seus números de acesso ou mediante a utilização da ferramenta BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*), disponível no *Genbank*.

As relações filogenéticas entre as diferentes sequências foram determinadas mediante a utilização do pacote de programas MEGA v. 4.0 (Tamura et al, 2007) através do método de reconstrução filogenética *Neighbor-joining*. As distâncias genéticas entre as diferentes amostras foram calculadas mediante o modelo *Kimura-dois-parâmetros* como modelo de substituição nucleotídica. A significância estatística das diferentes filogenias obtidas foi estimada através de 2.000 réplicas de *bootstrap*.

4.8. Parâmetros Microbiológicos

4.8.1. *E.coli*

Para a quantificação do indicador microbiológico *E.coli* foi utilizado do Kit Colilert[®]-18 Quanti-Tray[®]/2000 (IDEXX Laboratories, Westbrook, EUA), seguindo as recomendações do fabricante. Este método baseia-se na observação de fluorescência gerada pela metabolização de nutrientes presentes no meio de cultura pela *E.coli* (Figura 4.4).

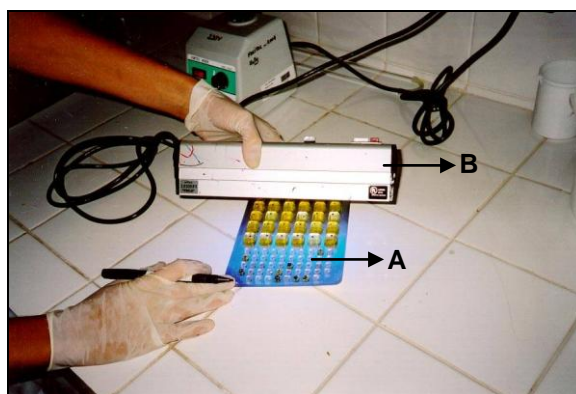


Figura 4.4. Leitura de *E.coli* com lâmpada ultravioleta utilizando Cartela Quanti-Tray[®]/2000 do conjunto de reagentes Colilert[®]-18. A. Cartela Quanti-Tray[®]/2000; B. Lâmpada ultravioleta.

O processamento das amostras foi realizado dentro de até 2 horas após a coleta e foram necessárias diluições seriadas das mesmas. As amostras coletadas nos dez pontos do entorno Lagoa e no ponto da praia do Leblon foram analisadas nas diluições 10^0 , 10^{-1} e 10^{-2} . As amostras da desembocadura do Rio dos Macacos foram analisadas nas diluições 10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3} .

4.8.2. Adenovírus humano (HuAdV)

A quantificação de adenovírus humano (HuAdV) foi realizada por qPCR, de acordo com o protocolo descrito por Heim e colaboradores (2003), no qual são utilizados iniciadores de cadeia para a amplificação parcial da região do genoma viral que codifica o hexon (Quadro 4.19).

Quadro 4.19. Sequência de iniciadores de cadeia e sonda utilizados no PCR quantitativo (qPCR) para amplificação parcial da região do genoma viral codificadora do hexon dos adenovírus humano (HuAdV).

| Iniciadores de cadeia e sonda | Sequência (5'- 3') |
|--------------------------------------|--|
| AQ1 | gccacggtggggtttctaaact |
| AQ2 | gccccagtgtcttacatcatgcacatc |
| Sonda AP | FAM – tgcaccagacccgggctcaggtactccga- TAMRA |

O quadro 4.20 apresenta os reagentes e os volumes utilizados na reação de qPCR. A reação de amplificação genômica consistiu de 50°C por 2 minutos, seguido por 45 ciclos de 95°C por 3 segundos, 55°C por 10 segundos e 65°C por 1 minuto. Para o qPCR foi utilizado o sistema TaqMan da Applied Biosystems. As amostras foram aplicadas em duplicatas em uma microplaca de 96 cavidades (MicroAmp[®], Applied Biosystems, CA, EUA) e a reação foi realizada em plataforma ABI 7500 (Applied Biosystem, Califórnia, EUA).

Quadro 4.20. Reagentes utilizados no PCR quantitativo (qPCR) para quantificação de adenovírus humano (HuAdV).

| Reagentes | Volume (µL) |
|--|-------------|
| H ₂ O livre de DNAase/RNAase ¹ | 4,5 |
| TaqMan Universal PCR Master Mix ² | 12,5 |
| Iniciador AQ1 (12,5µM) | 1 |
| Iniciador AQ2 (12,5µM) | 1 |
| Sonda AP (10µM) | 1 |
| DNA | 5 |
| Total | 25 |

¹Gibco[®], Califórnia, EUA; ²Applied Biosystems, EUA

4.9. Parâmetros físico-químicos

No momento da coleta, os parâmetros físico-químicos temperatura (°C), salinidade (%) e turbidez (UNT) foram mensurados utilizando-se o aparelho “Water Quality Checker” (Horiba[®] U-10, Irvine, CA, EUA) e os parâmetros pH e cloro livre (mg/L) pelo equipamento “Pocket colorimeter™” (Hach[®], Loveland, CO, EUA).

4.10. Análise estatística

Os dados obtidos durante as coletas foram codificados por meio de números e armazenados em um banco de dados criado no programa Access 97 (versão 6.0). A partir destes, foi realizada estatística descritiva com cálculos de freqüências, média ± desvio-padrão e valores mínimo e máximo.

As análises de correlação foram realizadas apenas com as 120 amostras provenientes da Lagoa Rodrigo de Freitas, foco de estudo, em função dos pontos Rio dos Macacos e Praia do Leblon não apresentarem uma amostragem adequada para análise (n=12 para cada ponto).

Para avaliar-se a possível correlação entre a detecção viral e parâmetros microbiológicos e físico-químicos foi realizado o teste qui-quadrado (χ^2) cuja hipótese nula foi a distribuição homogênea de detecção viral entre as classes dos parâmetros físico-químicos e microbiológicos (Tabela 4.1). Uma vez que os parâmetros pH e *E.coli* apresentam padrões estabelecidos pela legislação vigente, a divisão de classes foi baseada nestes valores.

Tabela 4.1. Divisão de classes para os parâmetros microbiológicos e físico-químicos estudados.

| Parâmetro | Classes |
|---|-----------------|
| <i>E.coli</i> * ¹ (NMP/100mL) | < 2.000 |
| | ≥ 2.000 |
| Salinidade (%) | ≤ 1 |
| | ≥ 1,1 |
| Temperatura (°C) | ≤ 25 |
| | 25,1 ≤ e ≤ 28,9 |
| | ≥ 29,0 |
| pH* ² | < 8,5 |
| | ≥ 8,5 |
| Cloro (mg/L) | 0 |
| | ≥ 0,1 |
| Turbidez (UNT) | ≤ 10 |
| | 11 ≤ e ≤ 20 |
| | ≥ 21 |

*¹Resolução CONAMA n°274, de 29 de Novembro de 2000.

*²Resolução CONAMA n°357, de 17 de Março de 2005.

5. RESULTADOS

Foram realizadas 12 coletas mensais ao longo de um ano em 12 pontos de coleta, incluindo 10 pontos na Lagoa Rodrigo de Freitas, um no Rio dos Macacos, que desemboca na Lagoa, e um na praia do Leblon, onde a água da Lagoa é escoada, totalizando 144 amostras. Inicialmente, foram realizados testes experimentais para se determinar a eficiência do método de concentração viral utilizado nos diferentes tipos de água avaliados (salobra, doce e salina). A Tabela 5.1 demonstra que o percentual de recuperação obtido no ensaio variou de 2,06% a 7,18% para RV e de 1,96% a 5,52% para NV, dependendo da matriz aquática analisada.

Tabela 5.1. Eficiência do método de concentração viral por filtração em membrana carregada negativamente descrito por Katayama e colaboradores (2002) na detecção de rotavírus grupo A (RV-A) e norovírus (NV). cg: cópias de genoma

| Tipo de Água | RV-A | | | NV | | |
|---|--------------------|--------------------|-------------------------|-------------------|--------------------|-------------------------|
| | cg inoculadas | cg recuperados | Taxa de recuperação (%) | cg inoculados | cg recuperados | Taxa de recuperação (%) |
| Lagoa Rodrigo de Freitas (Água salobra) | | $2,34 \times 10^6$ | 7,18 | | $8,28 \times 10^5$ | 5,52 |
| Rio dos Macacos (Água doce) | $3,27 \times 10^7$ | $6,74 \times 10^5$ | 2,06 | $1,5 \times 10^7$ | $4,41 \times 10^5$ | 2,94 |
| Praia do Leblon (Água salina) | | $9,22 \times 10^5$ | 2,82 | | $2,94 \times 10^5$ | 1,96 |

5.1. Detecção e quantificação viral

A tabela 5.2 apresenta o percentual de positividade obtido para detecção de RV-A e NV utilizando as metodologias cPCR e qPCR. Pelas metodologias de detecção de NV não foram detectados NVs pertencentes ao genogrupo I (NV-GI).

Tabela 5.2. Detecção de rotavírus A (RV-A) e norovirus genogrupo II (NV-GII) em 144 amostras de concentrados de água de acordo com as metodologias de PCR convencional (cPCR) e quantitativo (qPCR).

| Virus | RV-A | | NV-GII | |
|--------------|-------------------------|-------------|------------------------|-------------|
| | N (%) | cg/100mL | N (%) | cg/100mL |
| cPCR | 15 (10,4) | - | 23 (16,0) | - |
| qPCR | 25 (17,4) | 3,34 - 4680 | 6 (4,2) | 1,57 - 26,5 |
| Total | 35 (24,3) ^{*1} | | 2 (20,1) ^{*2} | |

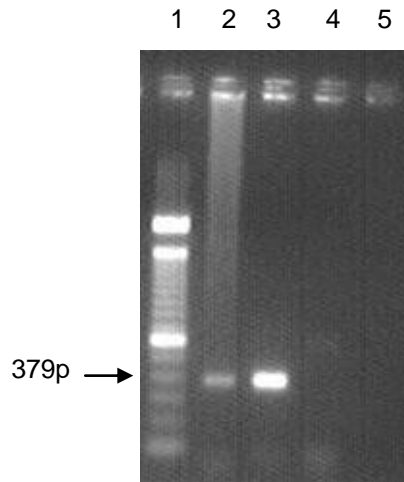
*1. 5 amostras foram positivas para RV-A por ambas as técnicas empregadas.

*2. 2 amostras foram positivas para NV-GII por ambas as técnicas empregadas.

A análise conjunta dos resultados obtidos por ambas as técnicas determinaram uma positividade de 24,3% (35/144) e 18,8% (27/144) para RV-A e NV-GII, respectivamente. A análise estatística de comparação de detecção por cPCR e qPCR demonstrou que, para RV-A, não houve diferença significativa entre as duas metodologias empregadas ($p=0,088$), enquanto para NV-GII o mesmo não foi observado ($p=0,0009$), com a maior sensibilidade de detecção obtida por cPCR.

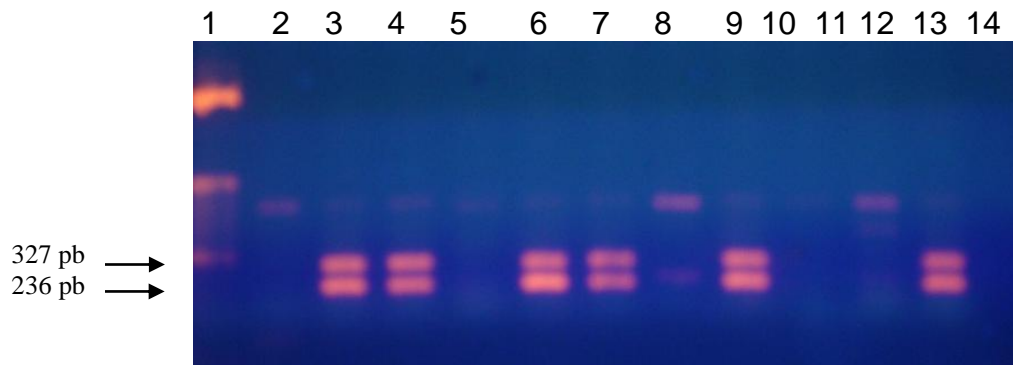
A Figura 5.1 apresenta eletroforese em gel de eletroforese dos produtos de amplificação por cPCR para os vírus estudados.

A) RV-A



Linha 1: Marcador de peso molecular (100 pb); linha 2: amostra positiva; linha 3: controle positivo; linha 4: amostra negativa; linha 5: controle negativo.

B) NV-GII



Linha 1: marcador de peso molecular (100 pb); linhas 2, 5, 8, 10, 11 e 12: amostras negativas; linha 3, 4, 6, 7 e 9: amostras positivas; linha 13: controle positivo; linha 14: controle negativo. 327pb: produto da primeira reação de PCR; 236pb: produto da segunda reação de PCR.

Figura 5.1. Eletroforese em gel de agarose dos produtos da reação em cadeia pela polimerase precedida de transcrição reversa (RT-PCR) para: A. Detecção de rotavírus grupo A (RV-A) por amplificação genômica região codificadora da proteína VP6; B. Detecção de norovírus genogrupo II (NV-GII) por amplificação genômica da polimerase viral.

A Tabela 5.3 apresenta a distribuição de positividade considerando o resultado de detecção total por cPCR e qPCR de acordo com as matrizes aquáticas avaliadas.

Tabela 5.3. Resultados gerais de detecção viral por tipo de matriz aquática.

| Localidade (matriz) | RV-A positivas/estudadas (%) | NV-GII positivas/estudadas (%) | Total de vírus positivas/estudadas (%) |
|--|---|---|---|
| Lagoa Rodrigo de Freitas (Água salobra) | 30/120 (25) | 21/120 (17,5) | 48/120 (40) ^{*1} |
| Rio dos Macacos (Água doce) | 3/12 (25) | 4/12 (33,3) | 5/12 (41,7) ^{*2} |
| Praia do Leblon (Água salina) | 2/12 (16,7) | 2/12 (16,7) | 4/12 (33,3) |
| Total | 35/144 (24,3) | 27/144 (18,8) | 57/144 (39,6) |

^{*1}. Em 3 amostras foram detectados RV-A e NV-GII.

^{*2}. Em 2 amostras foram detectados RV-A e NV-GII.

A distribuição dos vírus investigados, de acordo com os pontos de coleta, demonstra a disseminação destes em todos os pontos estudados (Figura 5.2).

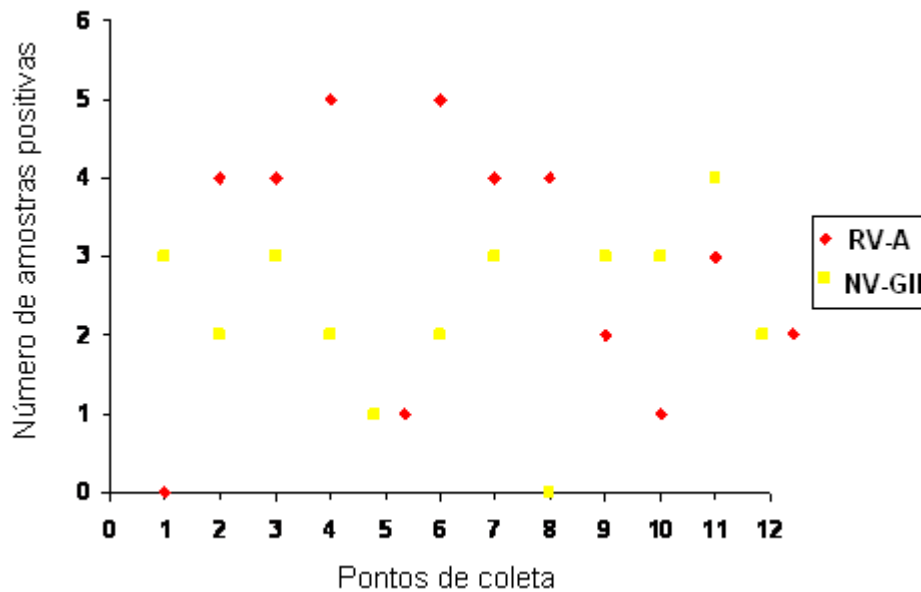


Figura 5.2. Distribuição de rotavírus grupo A (RV-A) e norovírus genogrupo II (NV-GII) de acordo com os pontos de coleta. Pontos de coleta: 1- Curva do Calombo; 2- Baixo Bebê; 3- Sede Náutica do Vasco da Gama; 4- Clube Naval; 5- Parque dos Patins; 6- Sede Náutica do Flamengo; 7- Jardim de Alah; 8- Clube Caiçaras; 9- Central; 10- Pedalinhos; 11- Rio dos Macacos; 12- Praia do Leblon.

5.2. Caracterização molecular dos vírus gastroentéricos detectados

5.2.1. Rotavírus

Após a detecção por amplificação parcial do gene que codifica a proteína VP6 de RV-A pela RT-PCR, sete amostras positivas foram sequenciadas e classificadas como pertencentes ao SG I e como I2 pela nova classificação proposta (Figuras 5.3 e 5.4). Os valores de identidade nucleotídica para subgrupo e para a nova classificação foram idênticos e variaram de 98,7 a 99,6% entre as amostras da Lagoa e de 97,4 a 99,3% entre as amostras da Lagoa e às provenientes das crianças hospitalizadas por gastroenterites no Rio de Janeiro.

Com o objetivo de se realizar a classificação binária dos RV-A, as amostras positivas foram amplificadas com iniciadores específicos para as regiões codificadoras das proteínas VP4 e VP7. Somente uma amostra apresentou resultado positivo, sendo classificada como P4.

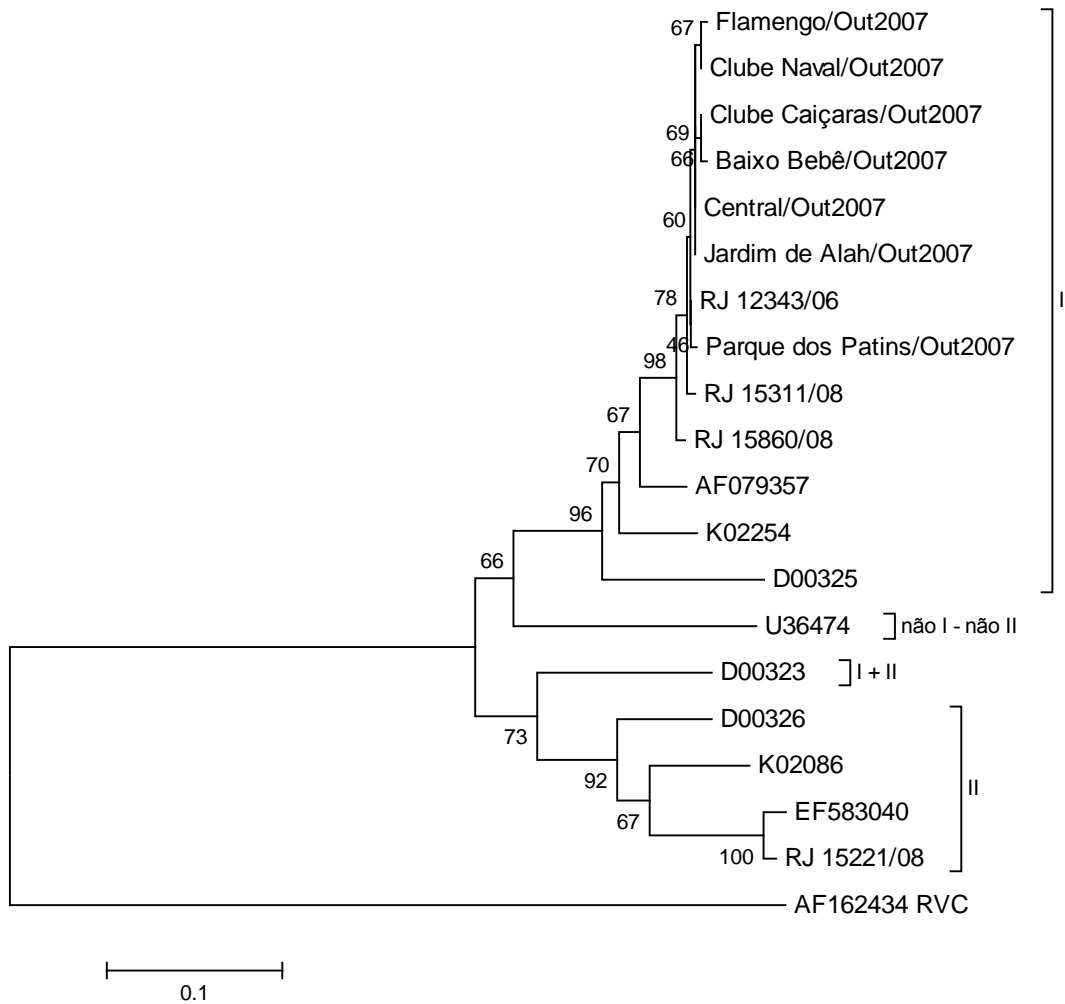


Figura 5.3. Dendograma de classificação em subgrupos dos rotavirus grupo A (RV-A) a partir do sequenciamento parcial do gene que codifica a proteína VP6.

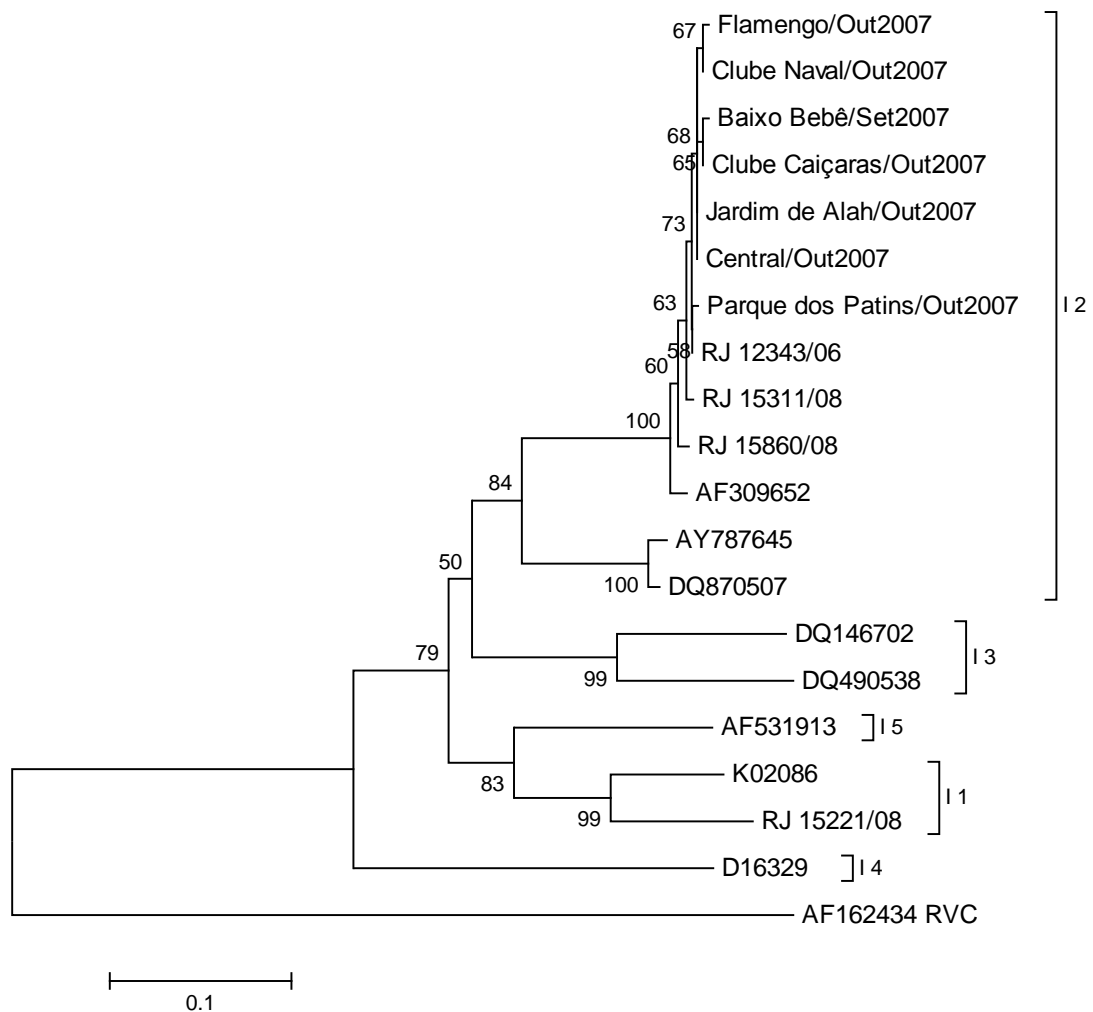


Figura 5.4. Dendrograma de caracterização molecular dos rotavirus grupo A (RV-A) a partir do sequenciamento parcial do gene que codifica a proteína VP6.

5.2.2. Norovírus

As 27 amostras positivas de NV-GII foram submetidas ao protocolo de amplificação parcial da região codificadora da proteína VP1 para sequenciamento e caracterização molecular dos NV-GII em genótipos. Deste total, 10 foram amplificadas e, posteriormente, sequenciadas. Entretanto, não foram obtidos resultados satisfatórios nos cromatogramas gerados na reação de sequência destas amostras.

5.3. Parâmetros microbiológicos

5.3.1. *E.coli*

Segundo as Resoluções CONAMA n^{os} 274 e 357, as águas destinadas a balneabilidade (recreação de contato primário) têm sua condição avaliada nas categorias próprias e impróprias baseando-se nos valores obtidos para *E.coli*. Em função de as coletas serem realizadas mensalmente, considerou-se o parágrafo 4º do artigo 2º da Resolução 274 para a análise da água por este parâmetro, que considerada amostras próprias aquelas cujos valores obtidos encontram-se abaixo de 2000 NMP(número mais provável) de *E.coli*/100mL. Seguindo este critério, 16,7% (2/12) das águas provenientes do Rio dos Macacos, assim como 83,3% (10/12) da Praia do Leblon e 95% (114/120) das águas da Lagoa foram consideradas próprias, totalizando 87,5 % (126/144) de amostras com valores abaixo do estabelecido para este parâmetro.

A tabela 5.4 apresenta os valores absolutos obtidos para o parâmetro bacteriológico *E. Coli* ao longo do estudo. Os valores encontram-se em NMP/100mL de acordo com a tabela apresentada pelo fabricante.

Tabela 5.4. Valores absolutos obtidos na análise microbiológica de *E.coli* em NMP/100mL nas amostras coletadas na Lagoa Rodrigo de Freitas, Rio dos Macacos e Praia do Leblon no período de Agosto de 2007 a Julho de 2008. Os valores em vermelho indicam não conformidade com a legislação vigente.

| Pontos Meses | Curva do | Baixo | Sede | Clube | Parque | Sede | Jardim | Clube | Central | Pedalinhos | Rio dos | Praia do |
|-----------------|----------|-------|--------------------------------|-------|---------------|------------------------|---------|----------|---------|------------|---------|----------|
| | Calombo | bebê | Náutica do Vasco da Gama | Naval | dos Patins | Náutica do Flamengo | de Alah | Caiçaras | | | Macacos | Leblon |
| Agosto | 548 | 870 | 755 | 549 | 496 | 446 | 507 | 792 | 756 | 629 | 860 | 630 |
| Setembro | 722 | 824 | 599 | 373 | 706 | 960 | 310 | 100 | 1111 | 432 | 12400 | 7170 |
| Outubro | 496 | 757 | 294 | 504 | 368 | 1290 | 2952 | 612 | 203 | 236 | 13000 | 504 |
| Novembro | 74 | 104 | 144 | 310 | 386 | 345 | 359 | 116 | 630 | 134 | 7358 | 30 |
| Dezembro | 10 | 74 | 31 | 41 | 20 | 92 | 75 | 10 | 100 | 10 | 2180 | 41 |
| Janeiro | 328 | 272 | 322 | 111 | 377 | 546 | 8704 | 6294 | 170 | 91 | 3224 | 669 |
| Fevereiro | 74 | 518 | 276 | 175 | 116 | 20 | 393 | 63 | 100 | 96 | 4471 | 934 |
| Março | 126 | 30 | 185 | 84 | 100 | 234 | 234 | 10 | 10 | 121 | 5348 | 450 |
| Abril | 222 | 194 | 160 | 295 | 116 | 74 | 235 | 67 | 233 | 1388 | 5120 | 164 |
| Mai | 38 | 104 | 1946 | 61 | 644 | 195 | 12760 | 1430 | 605 | 75 | 1354 | 239 |
| Junho | 55 | 10700 | 12 | 763 | 488 | 269 | 1362 | 249 | 216 | 132 | 8960 | 289 |
| Julho | 58 | 240 | 250 | 68 | 60 | 238 | 7520 | 331 | 70 | 172 | 5912 | 9528 |

5.3.2. Adenovirus Humano (HuAdV)

HuAdV foram detectados em 16,7% (24/144) das amostras de águas analisadas e apresentaram carga viral variando de 4,86 a 488 cg/100mL, sendo as maiores quantificações obtidas nas amostras provenientes das águas da Lagoa Rodrigo de Freitas. Deste total, 83% (20/24) foram provenientes de amostras da Lagoa, 8,3% (2/24) do Rio dos Macacos e 8,3% (2/24) da Praia do Leblon.

5.3.3. Correlação entre detecção de RV-A e NV-GII e parâmetros microbiológicos

A Figura 5.5 apresenta o percentual total de detecção dos vírus investigados (RV, NV e HuAdV), assim como o percentual de amostras de água consideradas próprias e impróprias pelo parâmetro *E.coli* nas três diferentes matrizes aquáticas analisadas.

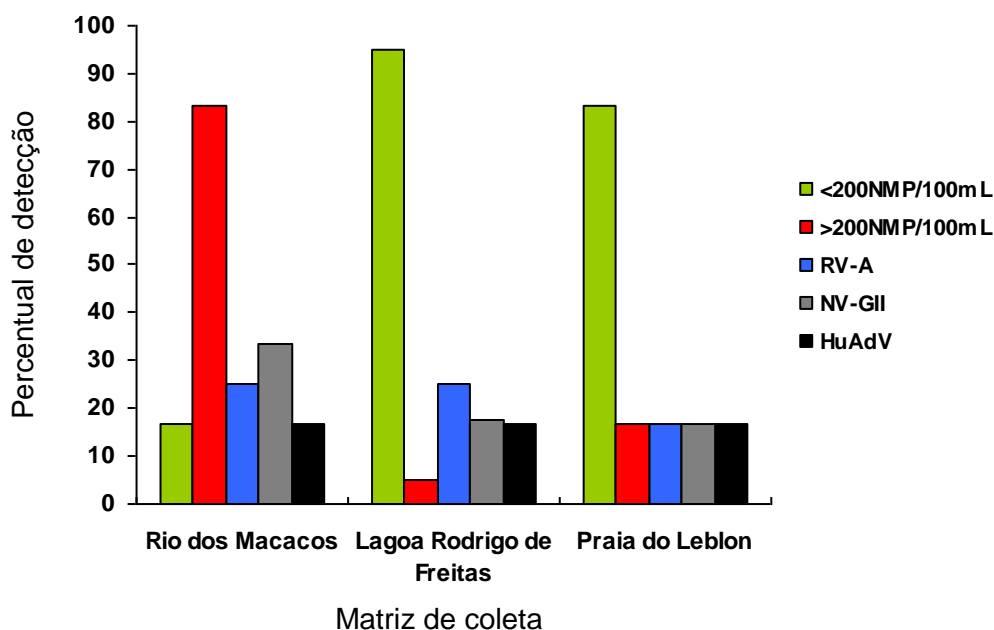


Figura 5.5. Detecção de rotavírus grupo A (RV-A), norovírus genogrupo II (NV-GII) e adenovírus humano (HuAdV) e caracterização da qualidade da água pelo parâmetro *E.coli* (própria <200NMP/100mL; imprópria >200NMP/100mL) nas três diferentes matrizes aquáticas analisadas: Rio dos Macacos (n=12), Lagoa Rodrigo de Freitas (n=120) e Praia do Leblon (n=12).

A tabela 5.5 apresenta os resultados obtidos para detecção viral por amostra de água analisada de acordo com o mês, destacando a presença dos vírus em águas consideradas próprias (<2000NMP/100mL de *E.coli*). RV-A e/ou NV-GII foram detectados em 38,1% (48/126) dessas amostras, sendo três amostras positivas para ambos os vírus e, quando analisados individualmente, RV-A e NV-GII foram detectados em 23,8% (30/126) e 16,7% (21/126), respectivamente, com maior número de amostras detectadas em outubro de 2007 (RV-A) e Junho de 2008 (NV-GII). HuAdV foram detectados em 15,1% (19/126) das amostras consideradas próprias.

Tabela 5.5. Detecção de rotavírus grupo A (RV-A), norovírus genogrupo II (GII-NV) e adenovírus humano (HuAdV) em associação à análise microbiológica de *E. coli* em NMP/100mL das amostras positivas. Em vermelho pode-se observar a detecção viral nos pontos caracterizados como próprios para balneabilidade segundo as Resoluções CONAMA 274 de 29 de Novembro de 2000 e 357 de 17 de Março de 2005.

| Pontos Meses | Curva do Calombo | Baixo Bebê | Sede Náutica do Vasco da Gama | Clube Naval | Parque dos Patins | Sede Náutica do Flamengo | Jardim de Alah | Clube Caiçaras | Central | Pedalinho | Rio dos Macacos | Praia do Leblon |
|-----------------|------------------|------------|-------------------------------|-------------|-------------------|--------------------------|----------------|----------------|-------------|--------------|-----------------|-----------------|
| Agosto | | RV | NV-GII | RV | | | NV-GII | RV | HuAdV | | | |
| Setembro | NV-GII | RV | | | | RV | | RV | | | | NV-GII |
| Outubro | | RV | RV | RV | RV | RV NV-GII | RV | RV | RV HuAdV | HuAdV | HuAdV | |
| Novembro | NV-GII | NV-GII | RV HuAdV | RV | | | NV-GII | | | | | NV-GII |
| Dezembro | NV-GII | RV | RV | RV | | | | | NV-GII | RV NV-GII | NV-GII HuAdV | |
| Janeiro | | HuAdV | RV | | | HuAdV | HuAdV | HuAdV | | | | |
| Fevereiro | | HuAdV | | | | RV HuAdV | NV-GII | | NV-GII | | RV NV-GII | RV |
| Março | HuAdV | | | NV-GII | HuAdV | | | | HuAdV | | | HuAdV |
| Abril | | | | NV-GII | | | HuAdV | | | | | |
| Maiο | | | | RV | | RV HuAdV | RV | RV | | HuAdV | RV | NV-GII |
| Junho | | NV-GII | NV-GII | HuAdV | | RV NV-GII | RV | | RV | NV-GII | RV NV-GII | RV HuAdV |
| Julho | | HuAdV | NV-GII | | NV-GII | | RV HuAdV | HuAdV | | NV-GII | | |

5.3.3.1. Correlação entre detecção de RV-A e NV-GII e parâmetros microbiológicos nas amostras provenientes da Lagoa Rodrigo de Freitas

A correlação entre a detecção viral e os parâmetros microbiológicos (*E.coli* e HuAdV), foram determinadas somente nas amostras provenientes da Lagoa Rodrigo de Freitas, em função do maior número de amostras obtidas neste ecossistema, objeto de estudo deste trabalho.

A Figura 5.6 apresenta o percentual de detecção viral de acordo com a caracterização da água como próprias (n=114) e impróprias (n=6), segundo as Resoluções CONAMA 274 de 29 de Novembro de 2000 e 357 de 17 de Março de 2005.

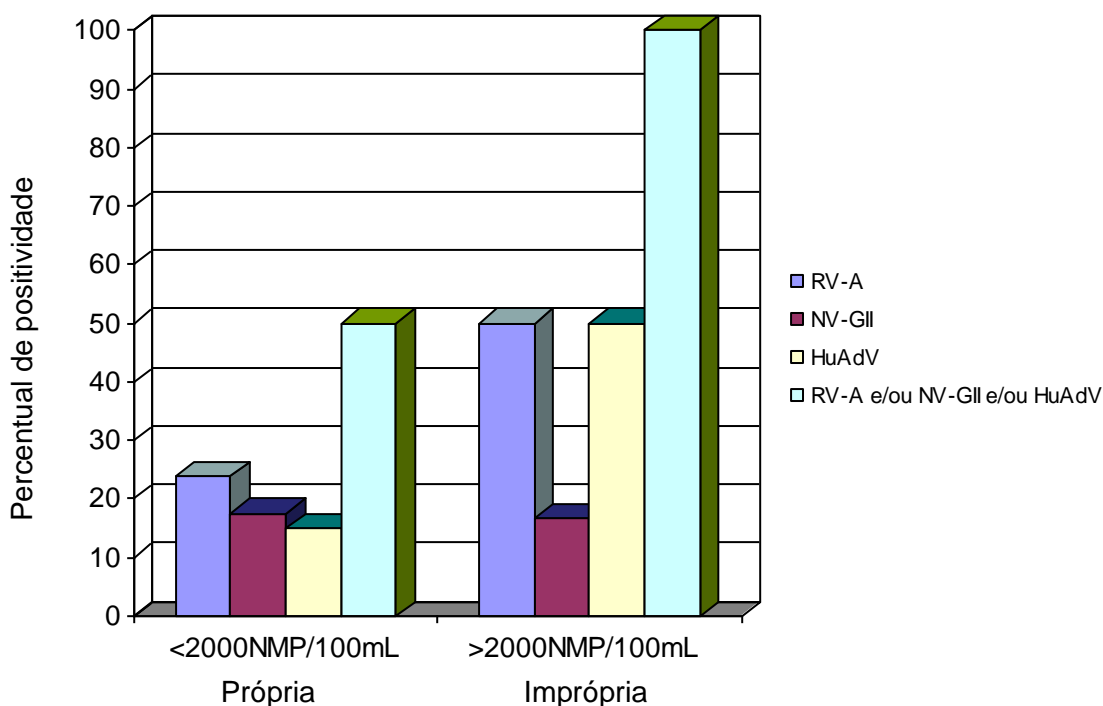


Figura 5.6. Detecção de rotavirus-A (RV-A), norovirus genogrupo II (NV-GII) e adenovirus humano (HuAdV) em amostras provenientes da Lagoa Rodrigo de Freitas de acordo com a caracterização da água como própria (n=114; <2000NMP/100mL) e imprópria (n=6; >2000NMP/100mL), segundo as Resoluções CONAMA 274, de 29 de Novembro de 2000, e 357, de 17 de Março de 2005.

Os resultados da análise estatística demonstraram que não houve uma associação entre presença/ausência de RV-A e NV-GII com a classificação da água, segundo a análise do parâmetro *E.coli* (RV-A - $p>0,1$; NV-GII - $p>0,9$).

Em relação à detecção de HuAdV, a análise destes resultados demonstrou uma distribuição não homogênea entre positivos e negativos para HuAdV com a classificação da água segundo a análise do parâmetro *E.coli* ($p<0,01$), entretanto não se pode afirmar que há uma relação positiva entre valores elevados de *E.coli* e detecção viral.

Em relação à correlação da presença de HuAdV e RV-A e NV-GII analisados individualmente, foi observado uma distribuição não homogênea entre positivos e negativos entre eles ($p<0,01$), entretanto não pode ser afirmada uma correlação positiva entre detecção de HuAdV e RV-A e NV-GII. Em 43% (43/100) das amostras negativas para HuAdV observou-se a presença de RV-A e/ou NV-GII (Tabela 5.6).

Tabela 5.6. Detecção de rotavírus grupo A (RV-A), norovírus genogrupo II (NV-GII) e adenovírus humano (HuAdV) nas 120 amostras provenientes da Lagoa Rodrigo de Freitas.

| Vírus | RV-A e NV-GII | RV-A | NV-GII | RV-A + NV-GII |
|--------------|---------------|-----------|-----------|---------------|
| | (-) | (+) | (+) | |
| HuAdV (+) | 15 | 5 | 0 | 0 |
| HuAdV (-) | 57 | 22 | 18 | 3 |
| Total | 72 | 27 | 18 | 3 |

5.4. Parâmetros físico-químicos

A tabela 5.7 apresenta os valores médios \pm desvio padrão, valores mínimo e máximo de salinidade (%), temperatura ($^{\circ}\text{C}$), pH, cloro livre (mg/L) e turbidez (UNT), obtidos nos 12 pontos de coleta durante os 12 meses de estudo.

Tabela 5.7. Análise univariada dos parâmetros físico-químicos mensurados por ponto de coleta na Lagoa Rodrigo de Freitas, RJ, no período de Agosto de 2007 a Julho de 2008.

| Parâmetro | Pontos de Coleta | | | | | | | | | | | |
|-------------------------|----------------------------|----------------------------|-------------------------------|----------------------------|-----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|-----------------------------|----------------------------|---------------------------|
| | Curva do Calombo | Baixo Bebê | Sede Náutica do Vasco da Gama | Clube Naval | Parque dos Patins | Sede Náutica do Flamengo | Jardim de Alah | Clube Caiçaras | Central | Pedalinhos | Rio dos Macacos | Praia do Leblon |
| Salinidade (%) | 1,04±0,40 (0,69-1,77) | 1,00±0,36 (0,69-1,73) | 1,00±0,37 (0,70-1,74) | 0,96±0,40 (0,46-1,79) | 1,01±0,35 (0,70-1,73) | 1,04±0,40 (0,69-1,79) | 0,98±0,39 (0,62-1,76) | 1,02±0,39 (0,70-1,80) | 1,04±0,40 (0,69-1,77) | 1,02±0,39 (0,69-1,80) | 0,30±0,23 (0,01-0,89) | 3,45±0,25 (2,72-3,71) |
| Temperatura (°C) | 26,83±2,28 (23,0-30,0) | 26,83±2,44 (23,0-30,0) | 26,91±2,67 (23,0-30,0) | 27,00±2,55 (23,0-31,0) | 27,00±2,66 (23,0-30,0) | 27,16±2,79 (23,0-31,0) | 27,08±2,81 (23,0-32,0) | 27,00±2,89 (23,0-31,0) | 26,58±2,74 (23,0-30,0) | 26,91±2,96 (23,0-31,0) | 25,58±2,23 (23,0-29,0) | 24,66±1,72 (22,0-27,0) |
| pH | 8,66±0,98 (7,0-11,0) | 8,50±0,79 (7,0-9,0) | 8,66±0,77 (7,0-9,0) | 8,41±0,79 (7,0-9,0) | 8,16±0,38 (8,0-9,0) | 8,41±0,66 (7,0-9,0) | 8,25±0,62 (7,0-9,0) | 8,50±0,67 (7,0-9,0) | 8,33±0,65 (7,0-9,0) | 8,33±0,77 (7,0-9,0) | 7,41±1,08 (5,0-9,0) | 8,00±0,85 (6,0-9,0) |
| Cloro (mg/L) | 0,15±0,17 (0,0-0,6) | 0,09±0,07 (0,0-0,3) | 0,16±0,14 (0,0-0,4) | 0,26±0,15 (0,0-0,5) | 0,23±0,13 (0,0-0,5) | 0,19±0,18 (0,0-0,6) | 0,11±0,15 (0,0-0,4) | 0,10±0,14 (0,0-0,5) | 0,12±0,10 (0,0-0,3) | 0,08±0,11 (0,0-0,3) | 0,00±0,00 (0,0-0,0) | 0,08±0,15 (0,0-0,5) |
| Turbidez (UNT) | 21,25±9,28 (6,00-43,00) | 16,91±3,96 (7,00-21,00) | 19,83±4,73 (10,00-21,00) | 17,08±3,91 (9,00-25,00) | 20,75±8,65 (10,00-41,00) | 16,16±5,40 (8,00-28,00) | 17,50±4,31 (9,00-28,00) | 16,58±4,16 (8,00-21,00) | 19,25±5,78 (9,00-31,00) | 17,25±4,09 (10,00-24,00) | 14,08±6,66 (7,00-27,00) | 8,83±7,51 (0,00-24,00) |

A figura 5.7 apresenta a média dos valores obtidos dos parâmetros físico-químicos para cada uma das matrizes aquáticas analisadas. Os resultados obtidos para o parâmetro salinidade confirmaram as características das matrizes estudadas como: Lagoa Rodrigo de Freitas – água salobra, Rio dos Macacos - água doce e Praia do Leblon – água salina. Os valores obtidos para o parâmetro temperatura não apresentaram grandes variações nas diferentes matrizes analisadas.

Os valores estabelecidos pela legislação vigente para balneabilidade para o parâmetro pH são de 6,0 a 9,0 para água doce de classe 2 e 6,5 a 8,5 para água salina classe 1 e salobra classe especial. Para água doce, observou-se que os valores encontrados estão de acordo com o exigido. Na água salina as amostras referentes aos meses de Agosto a Dezembro de 2007 apresentaram-se acima do estipulado (pH 8,55 a 8,79) e na água salobra 61 amostras apresentaram-se com valores acima do estipulado pela legislação (pH 8,52 a 9,22).

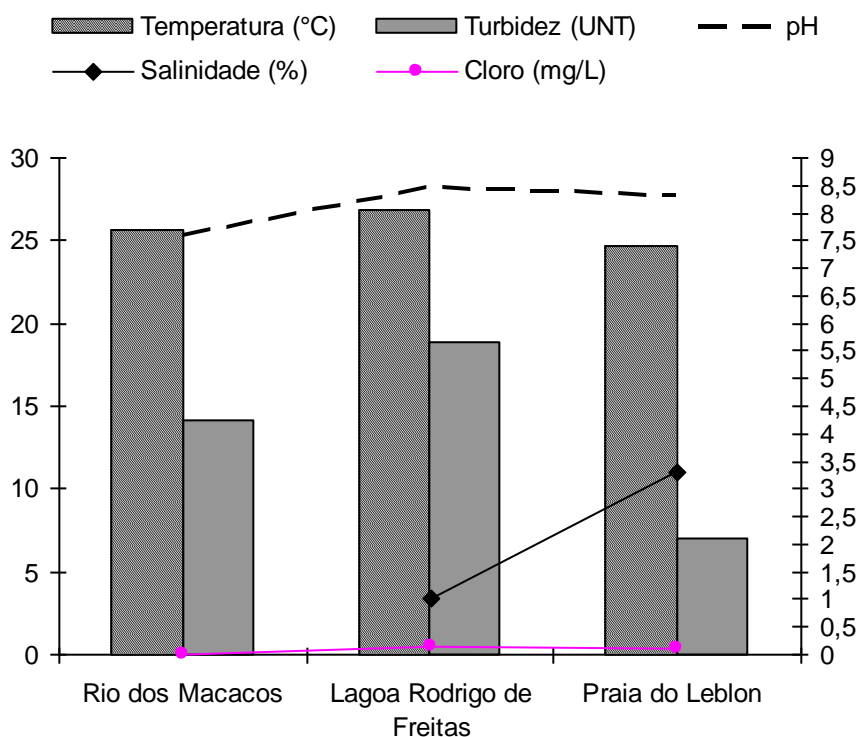


Figura 5.7. Média dos valores dos parâmetros físico-químicos obtidos para as matrizes aquáticas analisadas: Rio dos Macacos – água doce, Lagoa Rodrigo de Freitas – água salobra e Praia do Leblon – água salina.

Os valores de cloro e turbidez apresentaram maior oscilação entre as matrizes. Para cloro, os maiores valores foram observados nos pontos referentes a sedes de clubes e residências, que recebem abastecimento de águas cloradas (Figura 5.8).

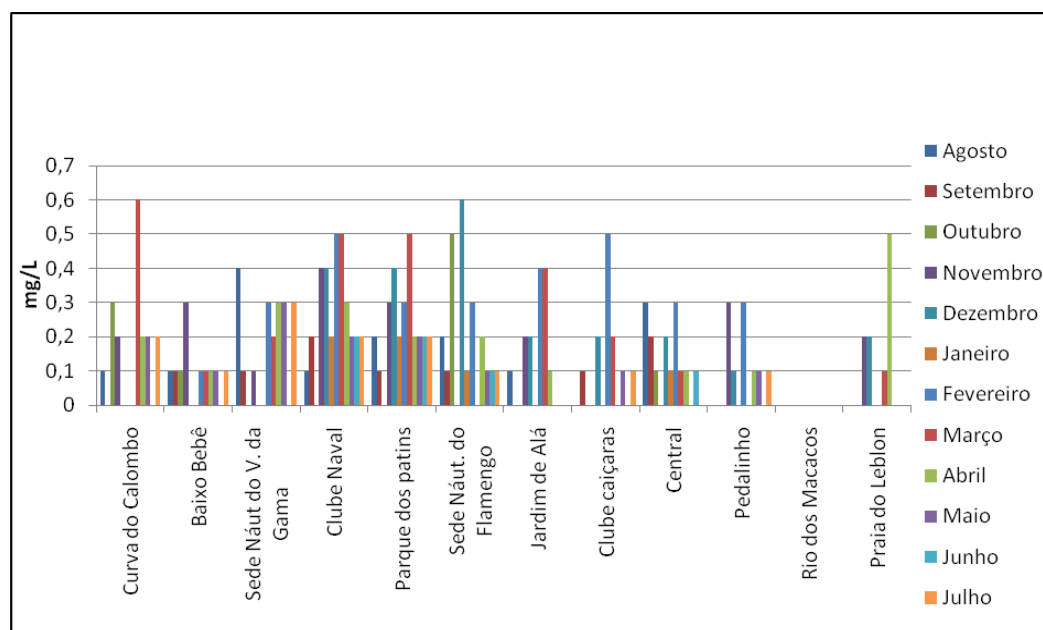


Figura 5.8. Variação de cloro (mg/L) na água Lagoa Rodrigo de Freitas, no Rio dos Macacos e na Praia do Leblon, no período de Agosto de 2007 a Julho de 2008.

No parâmetro turbidez, as oscilações ocorreram em todos os pontos e mensalmente durante as coletas (Figura 5.9), com maiores valores obtidos nos pontos do entorno da Lagoa e menores valores no ponto Praia do Leblon. Os valores estabelecidos pela legislação vigente para o parâmetro turbidez são de até 100UNT para água doce de classe 2 e materiais flutuantes e substâncias que produzem cor, odor e turbidez: virtualmente ausentes para água salina classe 1 e salobra classe especial. Os valores obtidos no estudo encontram-se de acordo com a legislação vigente para todos os tipos de água estudados.

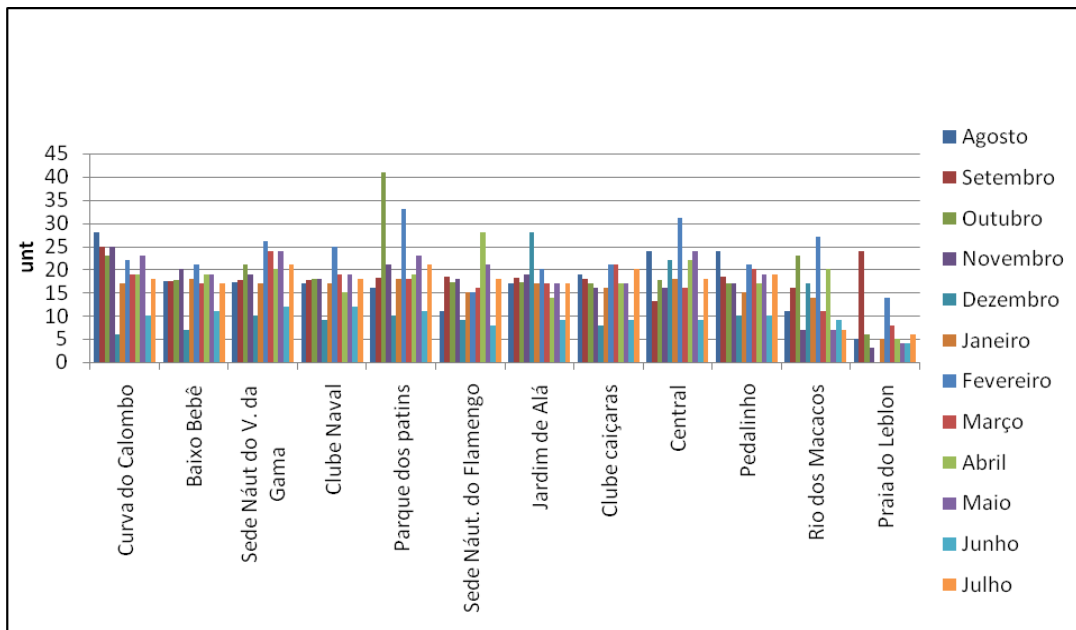


Figura 5.9. Variação de turbidez (UNT) na água da Lagoa Rodrigo de Freitas, no Rio dos Macacos e na Praia do Leblon, no período de Agosto de 2007 a Julho de 2008.

5.4.1. Correlação entre detecção de RV-A e NV-GII e parâmetros físico-químicos nas amostras provenientes da Lagoa Rodrigo de Freitas

A análise estatística para o parâmetro salinidade desmonstrou uma distribuição homogênea em relação à presença RV-A ($p > 0,05$) e NV-GII ($p > 0,09$) nas amostras de água provenientes da Lagoa Rodrigo de Freitas, indicando não correlação entre eles.

Em relação ao parâmetro temperatura, observou-se que os maiores valores obtidos correspondem aos meses Outubro e Dezembro de 2007 e Fevereiro e Março de 2008. Para este parâmetro não foi observada correlação com a detecção de RV-A ($p > 0,38$) e NV-GII ($p > 0,50$).

RV-A e NV-GII foram detectados em 33% (20/61) e 18% (11/61) das amostras salobras que apresentaram pH acima do valor estipulado pela legislação vigente, respectivamente. Para RV-A, foi demonstrada uma distribuição homogênea de positivos entre as classes ($p > 0,1$), indicando uma não correlação entre estes parâmetros. Para NV-GII, não houve distribuição homogênea de positivos entre as

classes de pH ($p < 0,01$), entretanto não foi possível afirmar uma correlação positiva ou negativa entre aumento/diminuição de pH e detecção viral.

Em relação ao parâmetro cloro, não foi observada correlação com a detecção de RV-A ($p > 0,10$) e NV-GII ($p > 0,60$).

Para o parâmetro turbidez, foi observada uma distribuição não homogênea de positivos para RV-A entre as classes ($p < 0,05$), entretanto não foi possível afirmar uma correlação positiva entre aumento/diminuição de turbidez e detecção viral. Para NV-GII foi demonstrada uma distribuição homogênea de positivos entre as classes, indicando uma não correlação entre estes ($p > 0,05$).

6. DISCUSSÃO

O uso da água para fins recreativos suscita uma série de riscos para a saúde, que dependem de diversos fatores, como a natureza do perigo, a característica do corpo d'água e o estado imunológico do usuário. Embora evidências obtidas a partir de estudos epidemiológicos e relatórios de surtos tenham demonstrado uma relação entre os efeitos adversos à saúde e a imersão em água de recreação de má qualidade, as dificuldades associadas à atribuição de uma infecção em função do contato com a água são numerosas (Pond, 2005).

A associação de metodologias de concentração e detecção molecular tem permitido o esclarecimento de surtos de doenças de veiculação hídrica, assim como a avaliação de contaminação viral em diferentes ecossistemas aquáticos (La Rosa et al, 2007; Miagostovich et al, 2008; Wong et al, 2009).

Muitas águas utilizadas na recreação em zonas balneares de todo o mundo estão localizadas próximas a zonas urbanas e, portanto, estão sujeitas à contaminação por dejetos humanos, sendo, por isto, objeto de monitoramento para determinação da qualidade microbiológica da água. A Lagoa Rodrigo de Freitas está situada na zona sul da cidade do Rio de Janeiro e, em função da intensa ocupação urbana em seu entorno e da falta de infra-estrutura adequada, sofreu com o aumento das atividades antropogênicas, como ligações clandestinas de esgoto na rede pluvial e lançamentos de esgoto "in natura" diretamente em suas águas. Este estudo apresenta resultados pioneiros na detecção de vírus gastroentéricos na Lagoa, demonstrando a disseminação destes vírus neste ambiente.

6.1. Eficiência do método de concentração, detecção e caracterização de RV-A e NV-GII

Um dos desafios da análise de vírus em amostras de água é a recuperação do baixo número de partículas virais diluídos em grandes volumes de amostra, o que é particularmente importante quando os métodos de concentração viral estão associados a técnicas moleculares de detecção (Katayama et al, 2002; Bosch et al, 2008).

O percentual de detecção de RV-A e NV-GII demonstrou que a metodologia

utilizada neste estudo possibilitou a recuperação destes vírus nas diferentes matrizes aquáticas, embora tenham sido observadas baixas taxas de recuperação viral, principalmente nas águas provenientes de água salina (Praia do Leblon) e doce (Rio dos Macacos). Deve-se ressaltar que o método de concentração utilizando membranas carregadas negativamente (Katayama et al, 2002) foi originalmente descrito para a recuperação de poliovírus em água marinha e apresentou taxas de recuperação de 38 a 89%.

Diferentes percentuais de detecção foram obtidos utilizando esta mesma metodologia para recuperação de NV (15%) e enterovirus (51%) em águas de rio (Furhman et al 2005; Haramoto et al 2009). Furhman e colaboradores (2005) demonstraram que concentrações virais mais baixas refletem melhor a realidade de concentração de vírus em amostras ambientais, apresentando uma taxa de recuperação menor e mais variável, e obtiveram uma recuperação de poliovírus de 17% para água doce e 12% em água marinha. Rose e colaboradores (2006), por sua vez, obtiveram taxas de recuperação em água marinha de 71% para poliovírus e 12% para vírus da hepatite A (HAV).

Em relação especificamente a detecção de NV, Victoria e colaboradores (2009) demonstraram uma taxa de recuperação de 9,1% e 4,9% para água doce e marinha, respectivamente, utilizando a mesma concentração de $MgCl_2$ utilizada neste estudo. Não há estudos avaliando o percentual de recuperação de RV-A em diferentes matrizes aquáticas, assim como não há relatos na literatura da utilização desta metodologia em água salobra.

Diversos fatores podem influenciar nas diferentes etapas do processo de concentração viral em amostras de águas. Substâncias químicas orgânicas e inorgânicas como RNAses, polissacarídeos, ácido húmico e tânico, metais pesados, íons metálicos (como ferro e alumínio) presentes em diferentes tipos de água têm sido descritos como importantes fatores de inibição de detecção viral (Shieh et al, 1995; Ijzerman et al, 1997; Wilson, 1997).

O extrato de carne utilizado como eluente em diferentes métodos de concentração viral tem sido descrito como um fator importante de inibição nas reações moleculares de detecção viral (Abbaszadegan et al, 1993; Schwab et al, 1995; Katayama et al, 2002; Fong & Lipp, 2005; Albinana-Gimenez et al, 2006). Em contrapartida, a eluição dos vírus em soluções inorgânicas tem sido descrita como não inibitória nas reações de amplificação genômica, resultando no aumento de

trabalhos que utilizam esta metodologia para detecção de NV, RV, enterovírus, astrovírus (AstV) e HAV em diferentes matrizes aquáticas, tais como água de rio, mar, esgoto bruto e tratado e água de consumo (Rose et al, 2006; de Paula et al, 2007; Guimarães et al, 2008; Miagostovich et al, 2008; Victoria et al, 2010).

As interações eletrostáticas e hidrofóbicas geradas entre os vírus e as membranas na presença de cátions multivalentes também podem influenciar a eluição dos vírus destas matrizes (Haramoto et al, 2007; Hamza et al, 2009). Com o intuito de reduzir a inibição das reações de amplificação genômica, medidas como a diluição das amostras são recomendadas (Albinana-Gimenez et al, 2006; Hamza et al, 2009). Neste estudo, a diluição do RNA extraído a 10^{-1} não influenciou no percentual de detecção viral (dados não demonstrados).

Metodologias moleculares de detecção genômica não fornecem informações sobre a infecciosidade da partícula viral, podendo detectar genomas provenientes de partículas infecciosas e/ou derivados de vírus inativados ou defectivos (Gassilloud et al, 2003; Haramoto et al, 2007; Hamza et al, 2009). Entretanto, a baixa estabilidade do RNA livre no ambiente sugere que estas metodologias detectem partículas virais intactas e não o genoma viral livre da partícula, apesar de o mesmo poder ser detectado mesmo quando os vírus estão inativados por desinfecção química, calor ou proteases presentes na água (Meleg et al, 2006; Carducci et al, 2008). Haramoto e colaboradores (2007) demonstraram que o método de concentração aplicado nesta dissertação concentra partículas virais completas preferencialmente a genomas virais livres no ambiente, indicando uma possível infecciosidade destes vírus. Espinosa e colaboradores (2008) sugeriram que a detecção do genoma viral pode ser um indicador adequado para a contaminação de águas superficiais, uma vez que encontrou uma correlação entre infecciosidade e detecção do genoma viral.

O percentual de vírus gastroentéricos encontrado no Rio dos Macacos (41,7%), que desemboca na Lagoa, demonstra que estas águas podem ser uma fonte de contaminação da Lagoa Rodrigo de Freitas. A investigação de RV-A e NV em águas fluviais realizada em diferentes países, tais como: Brasil, Alemanha, Tailândia e Venezuela, têm demonstrado diferentes níveis de contaminação deste ecossistema, com percentuais variando de 20 a 90% e 5,8 a 72% para RV-A e NV, respectivamente (Pusch et al, 2005; Miagostovich et al, 2008; Hamza et al, 2009; Rodríguez-Díaz et al, 2009; Rutjes et al, 2009). Até momento não há relatos na literatura referentes à detecção de RV e NV em lagoas de água salobra. Entretanto,

estudos em amostras de água de estuários apresentaram detecção de 8,3% e 70% de NV (Gentry et al, 2009; Hernandez-Morga et al, 2009).

A detecção de RV-A e/ou NV-GII na Praia do Leblon (33,3%) revelou a disseminação destes vírus nesta matriz aquática. Recentemente, diferentes grupos detectaram RV-A (9%), NV-GI (27%) e HuAdV (14%) em praias de Indiana, Lisboa e Barcelona, respectivamente, caracterizando a contaminação viral neste ecossistema (Calga et al, 2008; Wong et al, 2009; Silva et al, 2010). Vale lembrar, que os percentuais de detecção destes vírus nas diferentes matrizes aquáticas são influenciados não apenas pelo nível de contaminação viral, como também pelos diferentes métodos de recuperação e detecção utilizados.

Para detecção e quantificação de RV-A e NV, foram utilizados protocolos de RT-PCR cujos iniciadores foram desenhados para amplificar regiões conservadas do genoma, de modo a aumentar a possibilidade de detecção de um maior número de genótipos. Para os RV-A, o qPCR (NSP3) apresentou melhores resultados quando comparado com o cPCR (VP6), apesar de não haver diferença estatisticamente significativa. Estes resultados corroboram com estudos que apontam esta metodologia como mais sensível para detecção viral (Mackay et al, 2002; Pang et al, 2004). Em adição, o segmento que codifica para a proteína NSP3 é descrito como mais conservado que codificador para a VP6 (Matthijnssens et al, 2008). Entretanto, o protocolo de amplificação da VP6 foi previamente descrito como mais sensível para a detecção de RV-A em amostras ambientais, principalmente quando comparado a detecção e caracterização pela amplificação dos genes que codificam as proteínas VP4 e VP7 (Ferreira et al, 2009). Neste estudo, os protocolos de VP4 e VP7 apresentaram resultados insatisfatórios e somente uma amostra foi caracterizada como P4, genótipo descrito como mais prevalente atualmente, corroborando a sensibilidade do método de detecção de VP6 para amostras ambientais (Ferreira et al, 2009). A baixa detecção de RV-A por estes protocolos pode ter ocorrido em função da alta variabilidade destes vírus ou em função das próprias condições de amplificação da PCR, geradas em função da necessidade de amplificar fragmentos de 876pb (VP4) e 904pb (VP7).

Um novo protocolo de amplificação para VP6 utilizando iniciadores internos (nested-PCR) foi descrito por Galimore e colaboradores (2006), demonstrando um aumento de sensibilidade de detecção de RV-A em amostras ambientais (superfícies). Nesta dissertação, 25% (5/20) das amostras positivas pelo qPCR e

negativas pelo cPCR apresentaram positividade quando este protocolo foi utilizado (dados não demonstrados).

A caracterização molecular dos RV-A demonstrou a circulação de amostras do subgrupo I e I2 de origem humana, segundo nova classificação proposta por Matthijnssens e colaboradores (2008). As sequências nucleotídicas obtidas apresentaram 99% de identidade nucleotídica com sequências de VP6 de amostras G2P4 (dados não demonstrados). Os RV-A do SG I e I2, humanos e bovinos, são descritos como associados ao genótipo G2P4, enquanto SGII e I1, suínas e humanas, estão associados a G1P8 (Iturriza-Gómara et al, 2002; Lin et al, 2008; Matthijnssens et al, 2008). No Brasil, este genótipo vem sendo detectado em elevado percentual em amostras clínicas e tem se apresentado como o mais predominante em amostras de populações vacinadas (Okitsu-Negishi et al, 2004; Santos & Hoshino, 2005; Gurgel et al, 2007; Leite et al, 2008; Ribeiro et al, 2008). No estado do Rio de Janeiro, segundo levantamento do Laboratório de Virologia Comparada e Ambiental, referência em Rotavíruses, os RV-A do genótipo G2P4 foram detectados em 57% e 75% das amostras clínicas estudadas nos anos de 2007 e 2008, respectivamente. O percentual de identidade nucleotídica observado entre os RV-A detectados em amostras provenientes da Lagoa e de espécimens clínicos de casos de gastroenterite aguda ocorridos na cidade do Rio de Janeiro demonstra como a abordagem ambiental pode fornecer dados sobre a circulação de um determinado vírus na população.

Para detecção de NV, a aplicação de técnicas moleculares vem sendo amplamente utilizada, uma vez que estes vírus não dispõem de cultura celular e modelos animais para sua replicação (Duizer et al, 2004b). Neste estudo observou-se diferença estatisticamente significativa entre as metodologias de detecção/quantificação utilizadas. Ao contrário do esperado, a semi-nested PCR foi a metodologia que apresentou maior sensibilidade. Em estudo anterior realizado com amostras ambientais, Victoria e colaboradores (2010) demonstraram que a utilização deste mesmo protocolo de qPCR duplicou o número de amostras quando comparadas a semi-nested PCR. Bastien e colaboradores (2008) relacionam uma série de condições de reações e possíveis fatores que tornam o qPCR menos sensível que o cPCR, como o método de extração do ácido nucléico. A aplicação do método de isotiociano de guanidina/sílica descrito por Boom e colaboradores (1990)

em 36 amostras obtidas neste estudo demonstrou um aumento de detecção de 8,3% para NV (dados não demonstrados).

Apenas NVs pertencentes ao genogrupo II foram detectados, corroborando com estudos clínicos e ambientais que apontam maior circulação deste genogrupo no Brasil e no mundo (Fankhauser et al, 2002; Froggat et al, 2004; Bon et al, 2005; Okada et al, 2005; Vidal et al, 2005; Colomba et al, 2006; Ike et al, 2006; Victoria et al, 2010).

Descrita como a região mais variável da ORF-2, a região D foi utilizada para caracterização molecular dos NV em função de apresentar regiões com percentual de homologia que possibilitam a distinção entre genogrupos e genótipos (Vinjé et al, 2004). Dentre as 27 amostras positivas, apenas 10 foram positivas para a região D, sendo que os cromatogramas gerados não permitiram a construção de um dendograma. A grande quantidade de materiais inespecíficos e inibidores presentes nos concentrados de água, a baixa concentração de produtos gerados nos ciclos de amplificação e a não hibridação dos iniciadores com as sequências alvo devido à alta variabilidade genética desta região podem ser responsáveis pelos resultados negativos encontrados e pela baixa qualidade das sequências nucleotídicas obtidas.

Mattison e colaboradores (2009) demonstraram que a região D apresentou um percentual de genotipagem (52%) inferior ao obtido pela região C (78%), situada no início da ORF-2 e também utilizada para genotipagem dos NV (Kojima et al, 2002), recomendando a utilização de protocolos de genotipagem pela região C nas rotinas dos laboratórios e pela região D quando for necessária a identificação de novas cepas GII.4 circulantes.

6.2. Correlação entre detecção de RV-A e NV-GII e parâmetros microbiológicos

6.2.1. *E.coli*

Os resultados obtidos na determinação de *E.coli* demonstraram que 87,5% das amostras estudadas encontravam-se dentro dos padrões de balneabilidade estabelecidos pela legislação vigente. Os pontos do Rio dos Macacos e Jardim de Alah apresentaram índices mais elevados de contaminação para este parâmetro. Vale lembrar que estes dois ambientes influenciam diretamente a qualidade da água

da Lagoa, o primeiro pelo aporte de água doce e carga orgânica contribuindo com a degradação do ecossistema lagunar e o segundo pela realização do balanço hídrico com o mar.

Indicadores bacterianos de contaminação fecal são utilizados rotineiramente para avaliar a qualidade microbiológica da água. Entretanto, a capacidade desses microrganismos de refletir a ocorrência e concentração virais e os potenciais riscos para a saúde humana vêm sendo questionada (Rajal et al, 2007; Silva et al, 2010), dados corroborados neste trabalho pela ausência de correlação entre detecção de RV-A e NV-GII e valores de *E.coli* acima do estabelecido pela legislação vigente.

A presença de vírus no ambiente é um indicador de poluição fecal que representa um risco potencial para a população exposta, uma vez que tais agentes não constituem a microbiota gastrointestinal normal, e só são excretados por indivíduos infectados (Abad et al, 1997). Desta forma, atribuir segurança em termos sanitários para águas de recreação, quando as bactérias indicadoras estão dentro dos padrões considerados satisfatórios, é admitir ou aceitar uma falha, com sério potencial de risco para a saúde, uma vez que a presença de vírus não pode ser descartada.

6.2.2. Adenovírus humano (HuAdV)

Alguns estudos têm sugerido os HuAdV como indicadores virais de contaminação fecal humana em função de sua disseminação no ambiente, estabilidade em esgotos domésticos e amostras ambientais e resistência aos processos de tratamento de água e esgoto (Puig et al, 1994; van Heerden et al, 2003; Pusch et al, 2005; Boffil-Mas et al, 2006).

O percentual de detecção de HuAdV obtido neste estudo foi inferior aos percentuais encontrados para RV e NV, corroborando dados obtidos por outros trabalhos (Pusch et al, 2005; Miagostovich et al, 2008). Por outro lado, Prado e colaboradores (submetido) demonstraram alto percentual de detecção de HuAdV (71% e 85%) em amostras obtidas no afluente de duas estações de tratamento de esgoto, onde foram detectados RV-A (50%-95%), HAV (28%-70%), NV-GII (28%-45%) e NV-GI (7%-10%).

No presente estudo, foi estatisticamente observada uma distribuição não

homogênea de amostras positivas e negativas para HuAdV e RV-A e NV-GII e *E.coli*, porém não pôde ser afirmada a associação entre eles. Em adição, a detecção de RV-A e NV-GII em amostras negativas para HuAdV, o fato de apenas 5% (6/120) das amostras encontrarem-se fora do padrão vigente para *E.coli* e o pequeno número amostral do trabalho, que interferem na análises estatísticas, devem ser considerados e apontam, então, a necessidade de novos estudos de HuAdV como marcadores virais de contaminação ambiental.

6.3. Correlação entre detecção de RV-A e NV-GII e parâmetros físico-químicos

O risco de transmissão de doenças virais por veiculação hídrica depende da capacidade dos vírus de se manterem infecciosos por um determinado período de tempo até que entrem em contato com um hospedeiro suscetível. Nesse contexto, é fundamental a realização de estudos que determinem os fatores ambientais e os efeitos que estes exercem na persistência de partículas virais em diferentes tipos de água, de modo a se avaliar o potencial risco à saúde pública associado ao uso da água (Ward et al, 1986; Espinosa et al, 2008).

Dentre os fatores que podem influenciar a inativação e resistência dos vírus em ambientes aquáticos estão o pH, a turbidez e exposição a luz, a temperatura e o cloro, além de outras substâncias presentes no meio, como enzimas bacterianas, proteases e RNAses (Ward et al, 1986; Carter, 2005; Fong & Lipp, 2005). Espinosa e colaboradores (2008) demonstraram a redução da infecciosidade de RV em amostras de água subterrânea e superficial resultante não somente das condições de incubação, como também pela ação de componentes presentes em ambos os tipos de água.

A salinidade foi descrita como um fator que não exerce efeito direto na resistência dos vírus no ambiente (Gantzer et al, 1998), assim como observado neste estudo.

Em relação ao parâmetro pH, a avaliação estatística indicou uma possível associação entre detecção de NV-GII e pH fora do padrão vigente pela legislação, entretanto esta mesma correlação não foi detectada para RV-A. Pancorbo e colaboradores (1987), correlacionaram positivamente valores elevados de pH e

redução de título de RV-A, uma vez que um pH elevado influenciaria a agregação viral e, conseqüentemente, a susceptibilidade destes agente a outros fatores virucidas presentes na água. Estudos desenvolvidos sobre inativação de calicivírus demonstraram que a exposição de NV a pH 2,7 por 3h não foi suficiente para inativá-lo completamente (Dolin et al, 1972). Além disso, estes vírus foram detectados em amostras de pH 2, 3, 10 e 12 (Duizer et al, 2004a) e, em amostras ambientais, foram detectados em pH 4,5 e 7,0 (Podewils et al, 2007; Miagostovich et al, 2008).

A turbidez de uma amostra é definida como o grau de atenuação de intensidade que um feixe de luz sofre ao atravessá-la. As principais causas da turbidez da água são a presença de matérias sólidas em suspensão, organismos microscópicos e algas (Couto, 2010). Os elevados valores de turbidez encontrados nos pontos da Lagoa e do Rio dos Macacos revelam uma elevada presença de partículas nestas matrizes, possivelmente em função do lançamento de esgotos nesses ambientes, o que não foi observado no ponto da Praia do Leblon, provavelmente pela maior diluição destas partículas. A adsorção dos vírus a materiais particulados resulta em maior proteção a fatores de inativação, tais como raios UV, enzimas e a outros fatores degradantes presentes na água (Gantzer et al, 1998; Rzezutka & Cook, 2004). Neste estudo, observou-se uma distribuição não homogênea de RV-A e homogênea de NV nas classes de turbidez estudadas, porém não pôde ser afirmada detecção de RV-A em valores mais elevados. Em amostras ambientais, RV-A e NV foram detectados em diversas matrizes aquáticas com valores de turbidez baixos, como água potável, praias e piscinas, e elevados, como águas contaminadas por esgotos e esgotos domésticos (Lodder et al, 1999; Hafliger et al, 2000; John & Rose, 2005; Podewils et al, 2007; Miagostovich et al, 2008; Ferreira et al, 2009; Hamza et al, 2009; Rutjes et al, 2009; Wong et al, 2009; Victoria et al, 2010).

Os vírus são descritos como capazes de resistir por meses ou anos à temperaturas reduzidas e a temperatura ambiente e, mesmo que as taxas de inativação diminuam com a redução da temperatura, valores acima de 16°C causaram uma rápida perda de infecciosidade de RV-A em amostras de água doce (Ward et al, 1986; Carter, 2005). Uma maior redução de infecciosidade viral em diferentes tipos água foi correlacionada à temperaturas elevadas, que podem danificar o material genético e o capsídeo viral, o que pode afetar a adsorção do

vírus em seu hospedeiro, e inativar enzimas requeridas para a replicação (Fong & Lipp, 2005; John & Rose, 2005). Entretanto, apesar de terem sido observadas temperaturas acima da ambiente, e até 30°C em determinadas coletas, não se observou associação entre os valores obtidos e a detecção viral.

A cloração é uma prática economicamente viável e muito utilizada para desinfecção da água para abastecimento humano. Entretanto, a tolerância viral a este processo de tratamento foi descrita (Payment, 1999; Espinosa et al, 2008). Keswick e colaboradores (1985) demonstraram que os NV são inativados na concentração de 10mg/L de cloro, enquanto os RV-A a 3,75 mg/L (Carter, 2005), o que indica claramente resistência à cloração. Neste estudo, foi demonstrada uma não correlação entre os valores de cloro e detecção de RV e NV, sendo todos os vírus detectados em águas com níveis de cloro inferiores a 0,6 mg/L.

Os resultados gerais obtidos nesta dissertação indicam que os ambientes estudados recebem contaminação por dejetos e são reservatórios de RV-A e NV-GII. Entretanto, podem estar subestimados em função da baixa recuperação do método, pelo fato de os esgotos domésticos serem lançados abaixo da lâmina d'água e pela grande quantidade de lodo na Lagoa, onde estes vírus podem estar agregados.

Vale a pena ressaltar que o programa de despoluição estabelecido na Lagoa Rodrigo de Freitas vem gerando melhora na qualidade das suas águas, entretanto, apenas em nível físico-químico e bacteriológico, uma vez que a presença de vírus em 40% (48/120) das amostras evidencia uma contaminação por esgoto doméstico, cujo risco de infecção humana deve ser avaliado. Desta forma, os dados deste estudo apontam para a necessidade de se estabelecer um protocolo de monitoramento de contaminação viral neste ecossistema para se atribuir segurança em termos sanitários a estas águas.

7. CONCLUSÕES

- O método de concentração utilizado permitiu a detecção de RV-A e NV-GII nos diferentes tipos de matrizes aquáticas utilizadas, apresentando maior eficiência de recuperação viral em água salobra, doce e salina, nesta ordem;
- A associação dos métodos de detecção qualitativa e quantitativa (cPCR e qPCR) demonstrou a presença de RV-A e NV-GII em 24,3% e 18,8% das amostras de água coletadas, respectivamente;
- A comparação dos métodos de detecção qualitativo e quantitativo demonstrou que estas metodologias devem ser avaliadas para cada vírus investigado, por apresentarem diferentes percentuais de detecção;
- RV-A e/ou NV-GII foram detectados em 40% (48/120), 41,7% (5/12) e 33,3% (4/12) nas amostras provenientes da Lagoa Rodrigo de Freitas, Rio dos Macacos e Praia do Leblon, respectivamente, demonstrando a disseminação em todos os ambientes estudados;
- As quantificações virais variaram de 3,34 a 4680 e 1,57 a 26,5 cg/100mL para RV-A e NV-GII, respectivamente.
- Os RV-A SGI/I2 e os NV-GII detectados corroboram com dados que os apontam como os mais prevalentes na população;
- A avaliação microbiológica (*E.coli*) das amostras caracterizou 87,5% (126/144) das amostras como próprias conforme estabelecido pela legislação vigente;
- A detecção de *E.coli* dentro dos padrões aceitos para água de recreação não significou a ausência de RV-A e NV-GII e a ausência de correlação entre estes comprovou que os padrões bacterianos de qualidade não são suficientes para determinar a qualidade virológica da água;
- Os HuAdV foram detectados em amostras cujos valores de *E.coli* encontraram-se acima dos estabelecidos pela legislação vigente e foi observada uma distribuição

não homogênea entre positivos e negativos para HuAdV com a classificação da água, porém não pode ser afirmada uma correlação positiva entre valores elevados de *E.coli* e detecção viral;

- Embora tenha sido observada uma distribuição não homogênea entre amostras positivas e negativas para HuAdV e RV-A e NV-GII, não se pôde determinar uma correlação positiva entre eles. A detecção de RV-A e/ou NV-GII em 43% da amostras negativas para HuAdV apontam a necessidade de novos estudos para se determinar o HuAdV como marcador viral de contaminação;
- A análise estatística dos parâmetros físico-químicos demonstrou uma heterogeneidade na distribuição de amostras de RV-A apenas com o parâmetro turbidez, porém não pode ser afirmada uma correlação positiva entre eles;
- Em relação aos NV-GII, a análise estatística dos parâmetros físico-químicos demonstrou uma heterogeneidade na distribuição de amostras NV-GII apenas com o parâmetro pH, porém não pode ser afirmada uma relação positiva entre eles;
- Os resultados obtidos neste estudo enfatizam a necessidade do estabelecimento de parâmetros virais para a avaliação da qualidade da água e a necessidade de se disponibilizar protocolos de detecção viral que auxiliem para a adoção de medidas de controle de contaminação ambiental pelas autoridades Municipal e Estadual.

8. PERSPECTIVAS

- Realizar o sequenciamento parcial das amostras positivas para NV.
- Utilizar cultura de células para determinação de infecciosidade de RV-A das amostras.
- Dar continuidade ao estudo de contaminação viral em ambientes aquáticos, aplicando os dados obtidos para caracterizar e quantificar o risco de infecção, morbidade e mortalidade à exposição humana na Lagoa Rodrigo de Freitas e em outras matrizes aquáticas.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abad FX, Pintó RM, Villena C, Bosch A: Astrovirus survival in drinking water. *Appl Environ Microbiol.* 1997 Aug; 63 (8): 3119-22.

Abbaszadegan M, Huber MS, Gerba CP, Pepper IL. Detection of enteroviruses in groundwater with the polymerase chain reaction. *Appl Environ Microbiol.* 1993 May; 59 (5): 1318-24.

Abbaszadegan M, LeChevallier M, Gerba CP. Occurrence of viruses in US ground water. *JAWWA.* 2003; 95 (9): 107-20.

Albinana-Gimenez N, Clemente-Casares P, Bofill-Mas S, Hundesa A, Ribas F, Girones R. Distribution of human polyomaviruses, adenoviruses and hepatitis E virus in the environment and in a drinking-water treatment plant. *Environ Sci Technol.* 2006 Dec; 40 (23): 7416–22.

Albinana-Gimenez N, Miagostovich MP, Calga B, Huguet JM, Matia L, Girones R. Analysis of adenoviruses and polyomaviruses quantified by qPCR as indicators of water quality in source and drinking-water treatment plants. *Water Res.* 2009 Apr; 43 (7): 2011-9.

Alves DTM, Argento MSF, Cruz CBM, Zee D. Qualidade Ambiental da Lâmina d'água da Lagoa Rodrigo de Freitas – RJ. Subsídios aos Estudos de Impactos Ambientais em Lagoas Costeiras. IX Simpósio Brasileiro de Sensoriamento Remoto; 11-18 setembro de 1998; Santos, Brasil. Rio de Janeiro: INPE, 1998.

Anderson AD, Heryford AG, Sarisky JP, Higgins C, Monroe SS, Beard RS, et al. A waterborne outbreak of Norwalk like virus among snowmobilers – Wyoming, 2001. *J Infect Dis.* 2003 Jan; 187 (2): 303-6.

Ando T, Monroe SS, Gentsch JR, Jin Q, Lewis DC, Glass RI. Detection and differentiation of antigenically distinct small round-structured viruses (Norwalk-Like Viruses) by reverse transcription-PCR and southern hybridization. *J Clin Microbiol.*

1995 Jan; 33 (1): 64–71.

Angel J, Franco MA, Greenberg HB. Rotavirus vaccines: recent developments and future considerations. *Nat Rev Microbiol*. 2007 Jul; 5 (7): 529 – 39.

Atmar RL, Estes MK. Diagnosis of noncultivable gastroenteritis viruses, the Human Caliciviruses. *Clin Microbiol Rev*. 2001 Jan; 14 (1): 15–37.

Bartram J, Rees G. *Monitoring Bathing Waters - A practical guide to the design and implementation of assessments and monitoring programmes*. 1st ed. E & FN Spon - London and New York: World Health Organization; 2000.

Bastien P, Procop GW, Reischl U. GUEST COMMENTARY. Quantitative real-time PCR is not more sensitive than “conventional” PCR. *J Clin Microbiol*. 2008 Jan; 46 (6): 1897–1900.

Bertolotti-Ciarlet A, Crawford SE, Hutson AM, Estes MK. The 3' end of Norwalk virus mRNA contains determinants that regulate the expression and stability of the viral capsid protein VP1: a novel function for the VP2 protein. *J Virol*. 2003 Nov; 77 (21): 11603-15.

Beuret C. A simple method for isolation of enteric viruses (noroviruses and enteroviruses) in water. *J Virol Methods*. 2003 Jan; 107 (1): 1-8.

Beuret C, Khoeler D, Baumgartner A, Luthi TM. Norwalk-like virus sequences in mineral water: one-year monitoring of three brands. *Appl Environ Microbiol*. 2002 Apr; 68 (4): 1925-31.

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 Dec; 2 (7841): 1281-3.

Boccia D, Tozzi AE, Cotter B, Rizzo C, Russo T, Buttinelli G, et al. Waterborne outbreak of norwalk-like virus gastroenteritis at a tourist resort, Italy. *Emerg Infect Dis.* 2002 Jun; 8 (6): 563-8.

Bofill-Mas S, Albinana-Gimenez N, Clemente-Casares P, Hundesa A, Rodriguez-Manzano J, Allard A, et al. Quantification and stability of human adenoviruses and polyomavirus JCPyV in wastewater matrices. *Appl Environ Microbiol.* 2006 Dec; 72 (12): 7894–6.

Bon F, Ambert-Balay K, Giraudon H, Kaplon J, Le Guyader S, Pommepuy M, et al. Molecular Epidemiology of Caliciviruses Detected in Sporadic and Outbreak Cases of Gastroenteritis in France from December 1998 to February 2004. *J Clin Microbiol.* 2005 Sep; 43 (9): 4659–64.

Boom R, Sol CJ, Salimans MM, Jansen CL, Wertheim-Van Dillen PM, Van Der Noorda J. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *J Clin Microbiol.* 1990 Mar; 28 (3): 495-503.

Borges AMT, Teixeira JMS, da Costa PSS, Giugliano LG, Fiaccadori FS, Franco RC, et al. Detection of calicivirus from fecal samples from children with acute gastroenteritis in the West Central region of Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2006 Nov; 101 (7): 721-4.

Bosch A. Human enteric viruses in the water environment: a minireview. *Int Microbiol.* 1998 Sep; 1 (3): 191-6.

Bosch A, Guix S, Sano D, Pintó RM. New tools for the study and direct surveillance of viral pathogens in water. *Curr Opin Biotechnol.* 2008 Jun; 19 (3): 295-301.

Boxman IL, Vennema H, Jonker K, Boer ED, Koopmans M. Detection of noroviruses in shellfish in the Netherlands. *Int J Food Microbiol.* 2006 May; 108 (3): 391 - 6.

Brasil. Ministério do Meio Ambiente. Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA). Resolução nº 274, de 29 de novembro de 2000.

Brasil. Ministério do Meio Ambiente. Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA). Resolução nº 357, de 17 de março de 2005.

Bull RA, Tu ET, McIver CJ, Rawlinson WD, White PA. Emergence of a New Norovirus Genotype II.4 Variant Associated with Global Outbreaks of Gastroenteritis. *J Clin Microbiol*. 2006 Feb; 44 (2): 327–33.

Cabelli VJ, Dufour AP, McCabe LJ, Levin MA. Swimming-associated gastroenteritis and water quality. *Am J Epidemiol*. 1982 Apr; 115 (4): 606-16.

Calgua B, Mengewein A, Grunert A, Bofill-Mas S, Clemente-Casares P, Hundesa A, et al. Development and application of a one-step low cost procedure to concentrate viruses from seawater samples. *J Virol Methods*. 2008 Nov; 153 (2): 79-83.

Campos GS, Moreau VH, Bandeira A, Barberino G, Almeida PF, Amador DM, et al. Molecular detection and genetic diversity of norovirus in hospitalized young adults with acute gastroenteritis in Bahia, Brazil. *Arch Virol*. 2008 Jun; 153 (6):1125–9.

Carducci A, Morici P, Pizzi F, Battistini R, Rovini E, Verani M. Study of the viral removal efficiency in a urban 12 wastewater treatment plant. *Water Sci Technol*. 2008; 58 (4): 893-7.

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

Castilho JG, Munford V, Resque HR, Fagundes-Neto U, Vinjé J, Rácz ML. Genetic diversity of Norovirus among children with gastroenteritis in São Paulo State, Brazil. *J Clin Microbiol*. 2006 Nov; 44 (11): 3947–53.

CDC. Rotavirus surveillance worldwide, 2001-2008. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 2008 Nov; 57 (46): 1255-7.

Chapron CD, Ballester NA, Fontaine JH, Frades CN, Margolin AB. Detection of astrovirus, enteroviruses, and adenovirus types 40 and 41 in surface waters collected

and evaluated by the information collection rule and an integrated cell culture-nested PCR procedure. *Appl Environ Microbiol.* 2000 Jan; 66 (6): 2520-5.

Chung H, Jaykus LA, Sobsey MD. Detection of human enteric viruses in oysters by in vivo and in vitro amplification of nucleic acids. *Appl Environ Microbiol.* 1996 Oct; 62 (10): 3772-8.

Ciarlet M, Hoffmann C, Lorusso E, Baselga R, Cafiero MA, Banyai K, et al. Genomic characterization of a novel group A lamb rotavirus isolated in Zaragoza, Spain. *Virus Genes.* 2008 Oct; 37 (2): 250-65.

Clark B, McKendrick M. A review of viral gastroenteritis. *Cur Opin Infect Dis.* 2004 Oct; 17 (5):461–9.

Colomba C, De Grazia S, Giammanco GM, Saporito L, Scarlata F, Titone L, et al. Viral gastroenteritis in children hospitalised in Sicily, Italy. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2006 Sep; 25 (9):570-5.

Couto, JLV. Turbidez. UFRRJ – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro [online]. Rio de Janeiro, Brasil; [capturado em 05 de Janeiro de 2010]. Disponível em: <http://www.ufrj.br/institutos/it/de/acidentes/turb.htm>

Das BK, Gentsch JR, Cicirello HG, Woods PA, Gupta A, Ramachandran M, et al. Characterization of rotavirus strains from newborns in New Delhi, India. *J Clin Microbiol.* 1994 Jul; 32 (7): 1820-2.

Davidson GP, Bishop RF, Townley RR, Holmes IH. Importance of a new virus in acute sporadic enteritis in children. *Lancet.* 1975 Feb; 1 (7901): 242-6.

de Bruin E, Duizer E, Vennema H, Koopmans MPG. Diagnosis of Norovirus outbreaks by commercial ELISA or RT-PCR. *J Virol Methods.* 2006 Nov; 137 (2): 259–64.

de Paula VS, Diniz-Mendes L, Villar LM, Luz SL, Silva LA, Jesus MS, et al. Hepatitis A virus in environmental water samples from the Amazon Basin. *Water Res.* 2007 Mar; 41 (6): 1169-76.

Diniz-Mendes L, Paula VS, Luz SL, Niel C. High prevalence of human Torque teno virus in streams crossing the city of Manaus, Brazilian Amazon. *J Appl Microbiol.* 2008 Jul;105 (1): 51-8.

Dolin R, Blacklow NR, DuPont H, Buscho RF, Wyatt RG, Kasel JA, et al. Biological properties of Norwalk agent of acute infectious nonbacterial gastroenteritis. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1972 Jun; 140 (2): 578-83.

Donaldson EF, Lindesmith LC, Lobue AD, Baric RS. Viral shape-shifting: norovirus evasion of the human immune system. *Nat Rev Microbiol.* 2010 Mar; 8 (3): 231-41.

Donovan E, Unice K, Roberts JD, Harris M, Finley B. Risk of Gastrointestinal Disease Associated with Exposure to Pathogens in the Water of the Lower Passaic River. *Appl Environ Microbiol.* 2008 Feb; 74 (4): 994-1003.

D'Souza RM, Hall G, Becker NG. Climatic factors associated with hospitalizations for rotavirus diarrhoea in children under 5 years of age. *Epidemiol Infect.* 2008 Jan; 136 (1): 56-64.

Duizer E, Bijkerk P, Rockx B, de Groot A, Twisk F, Koopmans M. Inactivation of Caliciviruses. *Appl Environ Microbiol.* 2004a Aug; 70 (8): 4538-43.

Duizer E, Schwab KJ, Neill FH, Atmar RL, Koopmans MPG, Estes MK. Laboratory efforts to cultivate noroviruses. *J Gen Virol.* 2004b Jan; 85 (pt 1): 79-87.

Ensernick M. Gastrointestinal Virus Strikes European Cruise Ships. *Science.* 2006 Aug; 313 (5788): 747.

Espinosa AC, Mazari-Hiriart M, Espinosa R, Maruri-Avidal L, Méndes E, Arias CF. Infectivity and genome persistence of rotavirus and astrovirus in groundwater and surface water. *Wat Res.* 2008 May; 42 (10-11): 2618-28.

Espinosa AC, Arias CF, Sánchez-Colón S, Mazari-Hiriart M. Comparative study of enteric viruses, coliphages and indicator bacteria for evaluating water quality in a tropical high-altitude system. *Environ Health.* 2009 Oct; 8: 49.

Estes M. Rotaviruses and their replication. In: *Fields Virology* 4th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2001.

Estes MK, Ball JM, Guerrero RA, Opekun AR, Gilger MA, Pacheco SS. Norwalk virus vaccines: Challenges and progress. *J Infect Dis.* 2000 May; 181 (Suppl 2): S367–73.

Estes M, Kapikian AZ. Rotaviruses. In: *Fields Virology*. 5th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2007.

Fankhauser RL, Monroe SS, Noel JS, Humphrey CD, Bresee JS, Parashar UD, et al. Epidemiologic and Molecular Trends of “Norwalk-like Viruses” Associated with Outbreaks of Gastroenteritis in the United States. *J Infect Dis.* 2002 Jul; 186 (1):1–7.

Farrah SR, Goyal SM, Gerba CP, Wallis C, Melnick JL. Concentration of enteroviruses from estuarine water. *Appl Environ Microbiol.* 1977 May; 33 (5):1192–6.

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

Ferreira FF, Guimarães FR, Fumian TM, Victoria M, Vieira CB, Luz S, et al. Environmental dissemination of group A rotavirus: P-type, G-type and subgroup characterization. *Water Sci Technol.* 2009; 60 (3): 633-42.

Ferreira MSR, Xavier MPTP, Fumian TM, Victoria M, Oliveira SA, Pena LHA, et al. Acute gastroenteritis cases associated with Noroviruses infection in the State of Rio de Janeiro. *J Med Virol.* 2008 Feb; 80 (2): 338–44.

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

Flewett TH, Arias CF, Avendano LF, Ghafoor A, Mathan MM, Mendis L, et al. Comparative evaluation of the WHO and DAKOPATTS enzymelinked immunoassay kits for rotavirus detection. *Bull World Health Organ.* 1989; 67 (4): 369-74.

Fretz R, Herrmann L, Christen A, Svoboda P, Dubuis O, Viollier EH, et al. Frequency of Norovirus in stool samples from patients with gastrointestinal symptoms in Switzerland. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2005 Mar; 24 (3): 214–6.

Fong T-T, Lipp EK. Enteric viruses of humans and animals in aquatic environments: health risks, detection, and potential water quality assessment tools. *Microbiol Molec Biol Rev.* 2005 Jun; 69 (2): 357-71.

Froggatt PC, Vipond BI, Ashley CR, Lambden PR, Clarke IN, Caul EO. Surveillance of norovirus infection in a study of sporadic childhood gastroenteritis in South West England and South Wales during one winter season (1999-2000). *J Med Virol.* 2004 Feb; 72 (2): 307-11.

Fuhrman JA, Liang X, Noble RT. Rapid detection of enteroviruses in small volumes of natural waters by real-time quantitative reverse transcriptase PCR. *Appl Environ Microbiol.* 2005 Aug; 71 (8): 4523-30.

Fumian MF, Guimarães FR, Vaz BJP, Silva MTT, Muylaert FF, Bofill-Mas S, et al. Molecular detection, quantification and characterization of human polyomavirus JC from wastewater in Rio de Janeiro, Brazil. *J Wat Health.* In press.

Gajardo R, Bouchriti N, Pinto RM, Bosch A. Genotyping of rotaviruses isolated from sewage. *Appl Environ Microbiol.* 1995 Sep; 61 (9): 3460-2.

Gallimore CI, Barreiros MAB, Brown DWG, Nascimento JP, Leite JPG. Noroviruses associated with acute gastroenteritis in a children's day care center facility in Rio de Janeiro, Brazil. *Braz J Med Biol Res.* 2004a Mar; 37 (3): 321-6.

Gallimore CI, Cubitt D, du Plessis N, Gray JJ. Asymptomatic and symptomatic excretion of Noroviruses during a hospital outbreak of gastroenteritis. *J Clin Microbiol.* 2004b May; 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 Feb; 44 (2): 395-9.

Gantzer C, Dubois E, Crance J-M, Billaudel S, Kopecka H, Schwartzbrod L, et al. Influence of environmental factors on the survival of enteric viruses in seawater. *Oceanol.* 1998 Nov; 21 (6): 983–92.

García, ME. Virus en aguas de consumo. *Hig Sanid Ambient.* 2006; 6: 173-89.

Gassilloud B, Schwartzbrod L, Gantzer C. Presence of viral genomes in mineral water: a sufficient condition to assume infectious risk?. *Appl Environ Microbiol.* 2003 Jul; 69 (7): 3965-9.

Gentry J, Vinje J, Guadagnoli D, Lipp EK. Norovirus distribution within an estuarine environment. *Appl Environ Microbiol.* 2009 Sept; 75 (17): 5474–80.

Gentsch JR, Glass RI, Woods P, Gouvea V, Gorziglia M, Flores J, et al. Identification of group A rotavirus gene 4 types by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol.* 1992 Jun; 30 (6): 1365-73.

Gerba CP, Goyal SM, Labelle NL, Cech I, Bogdan GF. Failure of indicator bacteria to reflect the occurrence of enterovirus in marine waters. *Am J Public Health* 1979 Nov; 69 (11): 1116-9.

Glass PJ, White LJ, Ball JM, Leparc-Goffart I, Hardy ME, Estes MK. Norwalk Virus Open Reading Frame 3 Encodes a Minor Structural Protein. *J Virol.* 2000a Jul; 74 (14): 6581–91.

Glass RI, Noel J, Ando T, Fankhauser R, Belliot G, Mounts A, et al. The Epidemiology of Enteric Caliciviruses from Humans: A Reassessment Using New Diagnostics. *J Infect Dis.* 2000b May; 181 (Suppl 2): S254–61.

Gouvea V, Glass RI, Woods P, Taniguchi K, Clark HF, Forrester B, et al. Polymerase chain reaction amplification and typing of rotavirus nucleic acid from stool specimens. *J Clin Microbiol.* 1990 Feb; 28 (2): 276-82.

Gouvea V, Santos N, Timenetsky MC. Identification of bovine and porcine rotavirus G types by PCR. *J Clin Microbiol.* 1994 May; 32 (5): 1338-40.

Goyal SM, Adams WN, O'malley L, Lear DW. Human pathogenic viruses at sewage sludge disposal sites in the middle atlantic region. *Appl Environ Microbiol.* 1984 Oct; 48 (4): 758-63.

Green KY, Ando T, Balayan MS, Berke T, Clarke IN, Estes MK, et al. Taxonomy of the caliciviruses. *J Infect Dis.* 2000 May; 181 (Suppl 2): S322-30.

Greenberg HB, Estes MK. Rotavirus: from pathogenesis to vaccination. *Gastroenterology.* 2009 May; 136 (6): 1939-51.

Griffin DW, Donaldson KA, Paul JH, Rose JB. Pathogenic human viruses in coastal waters. *Clin Microbiol Reviews.* 2003 Jan; 16 (1): 129-43.

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

Guo L, Wang J, Zhou H, Si H, Wang M, Song J, et al. Intranasal administration of a recombinant adenovirus expressing the norovirus capsid protein stimulates specific

humoral, mucosal, and cellular immune responses in mice. *Vaccine*. 2008 Jan; 26 (4): 460-8.

Gurgel RQ, Cuevas LE, Vieira SCF, Barros VCF, Fontes PB, Salustino EF, et al. Predominance of Rotavirus P[4]G2 in a vaccinated population, Brazil. *Emerg Infect Dis*. 2007 Oct; 13 (10): 1571-3.

Gutiérrez-Aguirre, Steyer A, Boben J, Gruden K, Polsak M, Ravnikar M. Sensitive detection of multiple rotavirus genotypes with a single reverse transcription- real time quantitative PCR assay. *J Clin Microbiol*. 2008 Aug; 46 (8): 2547-54.

Hafliger D, Hubner PH, Luthy J. Outbreak of viral gastroenteritis due to sewage-contaminated drinking water. *Intern J Food Microbiol*. 2000 Mar; 54 (1-2): 123–6.

Hall TA. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*. 1999; 41: 95-98.

Hamza IA, Jurzik L, Stang A, Sure K, Uberla K, Wilhelm M. Detection of human viruses in rivers of a densely-populated area in Germany using a virus adsorption elution method optimized for PCR analyses. *Wat Res*. 2009 Jun; 43 (10): 2657-68.

Haramoto E, Katayama H, Ohgaki S. Detection of noroviruses in tap water in Japan by means of a new method for concentrating enteric viruses in large volumes of freshwater. *Appl Environ Microbiol*. 2004 Apr; 70 (4): 2154–60.

Haramoto, E, Katayama, H, Oguma, K, Ohgaki, S. Application of cationcoated filter method to detection of noroviruses, enteroviruses, adenoviruses, and Torque Teno viruses in the Tamagawa river in Japan. *Appl Environ Microbiol*. 2005 May; 71 (5): 2403–11.

Haramoto E, Katayama H, Oguma K, Ohgaki S. Recovery of naked viral genomes in water by virus concentration methods. *J Virol Methods*. 2007 Jun; 142 (1-2): 169-73.

Haramoto E, Katayama H, Utagawa E, Ohgaki S. Recovery of human norovirus from water by virus concentration methods. *J Virol Methods*. 2009 Sep; 160 (1-2): 206-9.

Hardy ME. Norovirus protein structure and function. *FEMS Microbiol Lett*. 2005 Dec; 253 (1): 1-8.

He XQ, Cheng L, Zhang DY, Li W, Xie XM, Ma M, et al. First Molecular detection of group A rotavirus in drinking water sources in Beijing, China. *Bull Environ Contam Toxicol*. 2009 Jul; 83 (1): 120-4.

Heim A, Ebnet C, Harste G, Pring-Akerblom P. Rapid and quantitative detection of human adenovirus DNA by real-time PCR. *J Med Virol*. 2003 Jun; 70 (2): 228-39.

Heiman EM, McDonald SM, Barro M, Taraporewala ZF, Bar-Magen T, Patton JT. Group A human rotavirus genomics: evidence that gene constellations are influenced by viral protein interactions. *J Virol*. 2008 Nov; 82 (22): 11106-16.

Hernandez-Morga J, Leon-Felix J, Peraza-Garay F, Gil-Salas BG, Chaidez C. Detection and characterization of hepatitis A virus and Norovirus in estuarine water samples using ultrafiltration – RT-PCR integrated methods. *J Appl Microbiol*. 2009 May; 106 (5): 1579–90

Hoehne M, Schreier E. Detection of Norovirus genogroup I and II by multiplex real-time RT-PCR using a 3'-minor groove binder-DNA probe. *BMC Infect Dis*. 2006 Apr; 6: 69.

Hundesda A, Motes CM, Bofill-Mas S, Gimenez NA, Girones R. Identification of human and animal adenoviruses 7 and polyomaviruses for determination of sources of fecal contamination in the environment. *Appl Environ Microbiol*. 2006 Dec; 72 (12): 7886-93.

Hyser JM, Estes MK. Rotavirus vaccines and pathogenesis. *Curr Opin Gastroenterol* 2009 Jan; 25 (1): 36-43.

Ijzerman MM, Dahilling DR, Fout GS. A method to remove environmental inhibitors prior to the detection of waterborne enteric viruses by reverse transcription-polymerase chain reaction. *J Virol Methods*. 1997 Jan; 63 (1-2):145-53.

Ike AC, Brockmann SO, Hartelt K, Marschang RE, Contzen MC, Oehme RM. Molecular epidemiology of Norovirus in Outbreaks of Gastroenteritis in Southwest Germany from 2001 to 2004. *J Clin Microbiol*. 2006 Apr; 44 (4): 1262-7.

INEA – Instituto Estadual do Ambiente. Rio de Janeiro, Brasil; [capturado em 20 de Dezembro de 2009]. Disponível em: www.inea.rj.gov.br/fma/lagoa-rodrigo-freitas

Iturriza-Gomara M, Wong C, Blome S, Desselberger 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 Jul; 76 (13): 6596-601.

Jayaram H, Estes MK, Prasad BV. Emerging themes in rotavirus cell entry, genome organization, transcription and replication. *Virus Res*. 2004 Apr; 101 (1): 67-81.

Jiang S. Human Adenoviruses in Water: Occurrence and Health Implications: A critical Review. *Environ Sci Tec*. 2006 Dec; 40 (23): 7132-40.

John DE, Rose JB. Review of Factors Affecting Microbial Survival in Groundwater *Environ Sci Technol*. 2005 Oct; 39 (19): 7345-56

Kageyama T, Kojima S, Shinohara M, Uchida K, Fukushi S, Hoshino FB, et al. Broadly Reactive and Highly Sensitive Assay for Norwalk-Like Viruses Based on Real-Time Quantitative Reverse Transcription-PCR. *J Clin Microbiol*. 2003 Apr; 41 (4): 1548–157.

Kapikian AZ, Hoshino Y & Chanock RM. Rotaviruses. In: *Fields Virology*. 4th ed. Philadelphia: Lippincott-Raven Press; 2001.

Kapikian AZ, Kim HW, Wyatt RG, Rodriguez WJ, Ross S, Cline WL, et al. Reoviruslike agent in stools: association with infantile diarrhea and development of serologic tests. *Science*. 1974 Sep; 185 (156): 1049-53.

Kapikian AZ, Wyatt RG, Dolin R, Thornhill TS, Kalica AR, Chanock RM. Visualization by immune electron microscopy of a 27-nm particle associated with acute infectious nonbacterial gastroenteritis. *J Virol*. 1972 Nov; 10 (5): 1075-81.

Kappus KD, Marks JS, Holman RC, Bryant JK, Baker C, Gary GW, et al. An outbreak of Norwalk gastroenteritis associated with swimming in a pool and secondary person-to-person transmission. *Am J Epidemiol*. 1982 Nov; 116 (5): 834-9.

Katayama H, Shimasaki A, Ohgaki S. Development of a virus concentration method and its application to detection of enterovirus and norwalk virus from coastal seawater. *Appl Environ Microbiol*. 2002 March; 68 (3): 1033-9.

Keswick BH, Satterwhite TK, Johnson PC, DuPont HL, Secor SL, Bitsura JA, et al. Inactivation of Norwalk virus in drinking water by chlorine. *Appl Environ Microbiol*. 1985 Aug; 50 (2): 261-4.

Kittigul L, Khamoun P, Sujirarat D, Utrarachkij F, Chitpirom K, Chaichantanakit N, et al. An improved method for concentrating rotavirus from water samples. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2001 Aug; 96 (6): 815-21.

Ko G, Cromeans TL, Sobsey MD. Detection of infectious adenovirus in cell culture by mRNA reverse transcriptase-PCR. *Appl Environ Microbiol*. 2003 Dec; 69 (12): 7377-84.

Kojima S, Kageyama T, Fukushi S, Hoshino FB, Shinohara M, Uchida K, et al. Genogroup-specific PCR primers for detection of Norwalk-like viruses. *J Virol Methods*. 2002 Feb; 100 (1-2): 107-14.

Kobayashi S, Sakae K, Suzuki Y, Shinozaki K, Okada M, Ishiko H, et al. Molecular cloning, expression, and antigenicity of Seto virus belonging to genogroup I Norwalk-like viruses. *J Clin Microbiol.* 2000 Sep; 38 (9): 3492-4.

Kukkula M, Arstila P, Klossner ML, Maunula L, Bonsdorff CH, Jaatinen P. Waterborne outbreak of viral gastroenteritis. *Scand J Infect Dis.* 1997; 29 (4): 415-8.

Kukkula M, Maunula L, Silvennoinem E, von Bonsdorff CV, Jaatinen P. Outbreak of viral gastroenteritis due to drinking water contaminated by Norwalk-like viruses. *J Infect Dis.* 1999 Dec; 180 (6): 1771-6.

La Rosa G, Fontana S, Di Grazia A, Iaconelli M, Pourshaban M, Muscillo M. Molecular Identification and Genetic Analysis of Norovirus Genogroups I and II in Water Environments: Comparative Analysis of Different Reverse Transcription-PCR Assays. *Appl Environ Microb.* 2007 Jul; 73 (13): 4152–61.

Laverick MA, Wyn-Jones AP, Carter MJ. Quantitative RT-PCR for the enumeration of noroviruses (Norwalk-like viruses) in water and sewage. *Lett Appl Microbiol.* 2004; 39 (2): 127-36.

Leite JP, Carvalho-Costa FA, Linhares AC. Group A rotavirus genotypes and the ongoing Brazilian experience: a review. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2008 Dec; 103 (8): 745-53.

Lin Y-P, Kao C-L, Chang S-Y, Taniguchi K, Hung P-Y, Lin H-C, et al. Determination of Human Rotavirus VP6 Genogroups I and II by Reverse Transcription-PCR. *J Clin Microbiol.* 2008 Oct; 46 (10): 3330–7.

Linhares AC, Pinheiro FP, Schmetz C Müller G, Peters DI. Duovirus (rotavirus) em Belém do Para. *Rev Inst Med Trop.* 1977 Jul-Aug; 19 (4): 278-9.

Lodder WJ, Vinjé J, van de Heide R, de Roda Husmand AM, Leenen EJTM, Koopmans MPG. Molecular Detection of Norwalk-like Calicivirus in Sewage. *Appl Environ Microbiol.* 1999 Dec; 65 (12): 5624-7.

Lobue AD, Lindesmith L, Yount B, Harrington PR, Thompson JM, Johnston RE, et al. Multivalent norovirus vaccines induce strong mucosal and systemic blocking antibodies against multiple strains. *Vaccine*. 2006 Jun; 24 (24): 5220-34.

Lukasik J, Scott TM, Andryshak D, Farrah SR. Influence of salts on virus adsorption to microporous filters. *Appl Environ Microbiol*. 2000 Jul; 66 (7): 2914-20.

Lycke E, Blomberg J, Berg G, Eriksson A, Madsen L. Epidemic acute diarrhoea in adults associated with infantile gastroenteritis virus. *Lancet*. 1978 Nov; 2 (8098): 1056-7.

Mackay IM, Arden KE, Nitsche A. Real-time PCR in virology. *Nucleic Acids Res*. 2002 Mar; 30 (6): 1292–305.

Matthijnssens J, Ciarlet M, Heiman E, Arijs I, Delbeke T, McDonald SM, et al. Full genome-based classification of rotaviruses reveals a common origin between human Wa-Like and porcine rotavirus strains and human DS-1-like and bovine rotavirus strains. *J Virol*. 2008 Apr; 82 (7): 3204-19.

Mattison K, Grudeski E, Auk B, Charest H, Drews SJ, Fritzing A, et al. Multicenter comparison of two norovirus ORF2-based genotyping protocols. *J Clin Microbiol*. 2009 Dec; 47 (12): 3927-32.

Maunula L, Miettinen IT, von Bonsdorff CH. Norovirus Outbreaks from Drinking Water. *Emerg Infect Dis*. 2005 Nov; 11 (11): 1716-21.

Mehnert DU, Stewien KE. Detection and distribution of rotavirus in raw sewage and creeks in Sao Paulo, Brazil. *Appl Environ Microbiol*. 1993 Jan; 59 (1): 140-3.

Mehnert DU, Stewien KE, Harsi CM, Queiroz AP, Candeias JM, Candeias JA. Detection of rotavirus in sewage and creek water: efficiency of the concentration method. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1997 Jan-Feb; 92 (1): 97-100.

Meleg E, Jakab F, Kocsis B, Banyai K, Meleg B, Szucs G. Human astroviruses in raw sewage samples in Hungary. *J Appl Microbiol*. 2006 Nov; 101 (5):1123–9.

Mertens P. The dsRNA viruses. *Virus Res*. 2004 Apr; 101 (1): 3-13.

Miagostovich MP, Ferreira FFM, Guimaraes FR, Fumian TM, Diniz-Mendes L, Luz SLB, et al. Molecular Detection and Characterization of Gastroenteritis Viruses Occurring Naturally in the Stream Waters of Manaus, Central Amazonia, Brazil. *Appl Environ Microbiol*. 2008 Jan; 74 (2): 375–82.

Min B-S, Noh Y-J Shin J-H, Baek S-Y, Min K-II, Ryu S-R, et al. Assessment of the quantitative real-time polymerase chain reaction using a cDNA standard for human group A rotavirus. *J Virol Methods*. 2006 Nov; 137 (2): 280–6.

Monica B, Ramani S, Banerjee I, Primrose B, Iturriza-Gomara M, Gallimore CI, et al. Human caliciviruses in symptomatic and asymptomatic infections in children in Vellore, South India. *J Med Virol*. 2007 May; 79 (5): 544–51.

Moreno-Espinosa S, Farkas T, Jiang X. Human Caliciviruses and Pediatric Gastroenteritis. *Semin Pediatr Infect Dis*. 2004 Oct; 15 (4): 237-45.

Nakagomi T, Correia JB, Nakagomi O, Montenegro FMU, Cuevas LE, Cunliffe NA, et al. Norovirus infection among children with acute gastroenteritis in Recife, Brazil: disease severity is comparable to rotavirus gastroenteritis. *Arch Virol*. 2008 May; 153 (5): 957–60.

Okada M, Ogawa T, Kaiho I, Shinozaki K. Genetic Analysis of Noroviruses in Chiba Prefecture, Japan, between 1999 and 2004. *J Clin Microbiol*. 2005 Sep; 43 (9): 4391–401.

Okitsu-Negishi S, Nguyen TA, Phan TG, Ushijima H. Molecular epidemiology of viral gastroenteritis in Asia. *Pediatrics International*. 2004 Apr; 46 (2): 245–52.

OMS – Organização Mundial da Saúde / WHO - World Health Organization. Water, sanitation and hygiene links to health. Facts and figures. November, 2004.

O'Reilly CE, Bowen AB, Perez NE, Sarisky JP, Spherd CA, Miller MD, et al. A Waterborne Outbreak of Gastroenteritis with Multiple Etiologies among Resort Island Visitors and Residents: Ohio, 2004. *Clin Infect Dis.* 2007 Feb; 44 (4): 506-12.

Pancorbo OC, Evanshen BG, Campbell WF, Lambert S, Curtis SK, Woolley TW. Infectivity and antigenicity reduction rates of human rotavirus strain Wa in fresh waters. *Appl Environ Microbiol.* 1987 Aug; 53 (8): 1803–11.

Pang XL, Lee B, Boroumand N, Leblanc B, Preiksaitis JK, Yu ICC. Increased detection of rotavirus using a real time reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) assay in stool specimens from children with diarrhea. *J Med Virol.* 2004 Mar; 72 (3): 496–501.

Pang XL, Preiksaitis JK, Lee B. Multiplex real time RT-PCR for the detection and quantitation of norovirus genogroups I and II in patients with acute gastroenteritis. *J Clin Virol.* 2005 Jun; 33 (2): 168-71.

Parashar UD, Hummelman EG, Bresee JS, Miller MA, Glass RI. Global illness and deaths caused by rotavirus disease in children. *Emerg Infect Dis.* 2003 May; 9 (5): 565–72.

Parashar UD, Gibson CJ, Bresse JS, Glass RI. Rotavirus and severe childhood diarrhea. *Emerg Infect Dis.* 2006; 12: 304-306.

Parashar UD, Li JF, Cama R, DeZalia M, Monroe SS, Taylor DN, et al. Human caliciviruses as a cause of severe gastroenteritis in Peruvian children. *J Infect Dis.* 2004 Sep; 190 (6): 1088-92.

Parshionikar SU, William-True S, Fout GS, Robbins DE, Seys SA, Cassady JD, et al. Waterborne Outbreak of Gastroenteritis Associates with Norovirus. *Appl Environ Microbiol.* 2003 Sep; 69 (9): 5263-8.

Patel MM, Hall AJ, Vinjé J, Parashar UD. Noroviruses: A comprehensive review. *J Clin Virol*. 2009 Jan; 44 (1): 1–8.

Patel MM, Widdowson M-A, Glass RI, Akazawa K, Vinjé J, Parashar UD. Systematic Literature Review of Role of Noroviruses in Sporadic Gastroenteritis. *Emerg Infect Dis*. 2008 Aug; 14(8): 1224- 31.

Payment P. Poor efficacy of residual chlorine disinfectant in drinking water to inactivate waterborne pathogens in distribution systems. *Can J Microbiol*. 1999 Aug; 45 (8): 709–15.

Pereira HG, Azeredo RS, Leite JP, Barth OM, Suttmoller F, de Farias V, et al. Comparison of polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE), immuno-electron microscopy (IEM) and enzyme immunoassay (EIA) for the rapid diagnosis of rotavirus infection in children. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1983 Oct-Dec; 78 (4): 483-90.

Perez-Vargas J, Isa P, Lopez S, Arias CF. Rotavirus vaccine: early introduction in Latin America-risks and benefits. *Arch Med Res*. 2006 Jan; 37 (1): 1-10.

Pina S, Puig M, Lucena F, Jofre J, Girones R. Viral pollution in the environment and in shellfish: human 11 adenovirus detection by PCR as an index of human viruses. *Appl Environ Microbiol*. 1998 Sep; 64 (9): 3376 – 82.

Podewils LJ, Blevins LZ, Hagenbuch M, Itani D, Burns A, Otto C, et al. Outbreak of norovirus illness associated with a swimming pool. *Epidemiol Infect*. 2007 Jul; 135 (5): 827-33.

Pond, Kathy. Water recreation and disease. Plausibility of Associated Infections: Acute Effects, Sequelae and Mortality. World Health Organization. 1st ed. London: IWA Publishing; 2005.

Prado T, Silva DM, Pereira WC, Rose TL, Gaspar AMC, Miagostovich MP. Removal efficiency of enteric viruses by UASB reactor, anaerobic 1 filters and 2 activated sludge processes from hospital wastewater. *Appl Environ Microbiol*.

Submetido.

Prasad BV, Matson DO, Smith AW. Three-dimensional structure of Calicivirus. *J Mol Biol.* 1994 Jul; 240 (3): 256-64.

Projeto Ambiental Lagoa Limpa. Online. Rio de Janeiro, Brasil. [capturado em 20 de dezembro de 2009]. Disponível em www.lagoalimpa.com.br/oprojeto

Puig M, Jofre J, Lucena F, Allard A, Wadell G, Girones R. Detection of adenoviruses and enteroviruses in polluted waters by nested PCR amplification. *Appl Environ Microbiol.* 1994 Aug; 60 (8): 2963-70.

Pusch D, Oh DY, Wolf S, Dumke R, Schroter-Bobsin U, Hohne M, et al. Detection of enteric viruses and bacterial indicators in German environmental waters. *Arch Virol.* 2005 May; 150 (5): 929-47.

Queiroz AP, Santos FM, Sassaroli A, Harsi CM, Monezi TA, Mehnert DU. Electropositive filter membrane as an alternative for the elimination of PCR inhibitors from sewage and water samples. *Appl Environ Microbiol.* 2001 Oct; 67 (10): 4614-8.

Ramani S, Kang G. Viruses causing childhood diarrhoea in the developing world. *Curr Opin Infec Dis.* 2009 Oct; 22 (5): 477-82

Rajal VB, MacSwain BS, Thompson DE, Leutenegger CM, Wuertz S. Molecular Quantitative analysis of human viruses in California stormwater. *Wat Res.* 2007 Nov; 41 (19): 4287-98.

Reynolds KA, Gerba CP, Pepper IL. Detection of infectious enteroviruses by an integrated cell culture-PCR procedure. *Appl Environ Microbiol.* 1996 Apr; 62 (4): 1424-7.

Ribeiro LR, Giuberti RSO, Barreira DMPG, Saick KW, Leite JPG, Miagostovich MP, et al. Hospitalization due to norovirus and genotypes of rotavirus in pediatric patients, state of Espírito Santo. *Mem Inst Osw Cruz.* 2008 Mar; 103 (2): 201-6.

Richardson S, Grimwood K, Gorrell R, Palombo E, Barnes G, Bishop R. Extended excretion of rotavirus after severe diarrhoea in young children. *Lancet*. 1998 Jun; 351 (9119): 1844-8.

Rodríguez-Díaz J, Querales L, Caraballo L, Vizzi E, Liprandi F, Takiff H, et al. Detection and Characterization of Waterborne Gastroenteritis Viruses in Urban Sewage and Sewage-Polluted River Waters in Caracas, Venezuela. *Appl Environ Microbiol*. 2009 Jan; 75 (2): 387–94.

Rose MA, Dhar AK, Brooks HA, Zecchini F, Gersberg RM. Quantitation of hepatitis A virus and enterovirus levels in the lagoon canals and Lido beach of Venice, Italy, using real-time RT-PCR. *Water Res*. 2006 Jul; 40 (12): 2387-96.

Rutjes SA, Lodder WJ, van Leeuwen AD, Roda Husman AM. Detection of infectious rotavirus in naturally contaminated source waters for drinking water production. *J Appl Microbiol*. 2009 Jul; 107 (1): 97–105.

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

Santos N, Hoshino Y. Global distribution of rotavirus serotypes/genotypes and its implication for the development and implementation of an effective rotavirus vaccine. *Rev Med Virol*. 2005 Jan-Feb; 15 (1): 29-56.

Schwab KJ, De Leon R, Sobsey MD. Concentration and purification of beef extract mock eluates from water samples for the detection of enteroviruses, hepatitis A virus, and Norwalk virus by reverse transcription-PCR. *Appl Environ Microbiol*. 1995 Feb; 61(2): 531-7.

Shien YSC, Wait D, Tai L, Sobsey MD. Methods to remove inhibitors in sewage and other fecal wastes for enterovirus detection by the polymerase chain reaction. *J Virol Methods*. 1995 Jul; 54 (1): 51-66.

Silva AM, Vieira H, Martins N, Granja AT, Vale MJ, Vale FF. Viral and bacterial contamination in recreational waters: a case study in the Lisbon bay area. *J Appl Microbiol.* 2010; 108 (3): 1023–31

Sinclair RS, Jones EL, Gerba CP. Viruses in recreational water-borne disease outbreaks: a review. *J Appl Microbiol.* 2009. 107 (6): 1769–80.

Skraber S, Gassiolloud B, Schwartzbrod L, Gantzer C. Survival of infectious Poliovirus-1 in river water compared to the persistence of somatic coliphages, thermotolerant coliforms and Poliovirus-1 genome. *Water Res.* 2004 Jul; 38 (12): 2927-33.

Soares CC, Santos N, Beard RS, Albuquerque MC, Maranhão AG, Rocha LN, et al. Norovirus detection and genotyping for children with gastroenteritis, Brazil. *Emerg Infect Dis.* 2007 Aug; 13 (8): 1244-6.

Sobsey MD, Glass JS, Poliovirus concentrations from tap water with electropositive adsorbent filters. *Appl Environ Microbiol.* 1980 Aug; 40 (2): 201–10.

Solodovnikov IuP, Nechiporenko NG, Tregub AV, Kuz'mina NA, Balandin AI. The epidemiology of rotavirus gastroenteritis. *Zh Microbiol Epidemiol Immunobiol.* 1989 Oct; 10: 43-8.

Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 19th ed. Washington, DC: American Public Health Association; 1995.

Straub TM, Chandler DP. Towards a unified system for detecting waterborne pathogens. *J Microbiol Methods.* 2003 May; 53 (2): 185-97.

Sutmoller F, Azeredo RS, Lacerda MD, Barth OM, Pereira HG, Hoffer E, et al. An outbreak of gastroenteritis caused by both rotavirus and *Shigella sonnei* in a private school in Rio de Janeiro. *J Hyg (Lond).* 1982 Apr; 88 (2): 285-93.

Tackett CO. Plant-derived vaccines against diarrheal diseases. *Vaccine*. 2005 Mar; 23 (15): 1866-9.

Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol*. 2007 Aug; 24 (8): 1596-9.

Tan M, Jiang X. Norovirus – host interaction: implications for disease control and prevention. *Expert Rev Mol Med*. 2007 Jul; 9 (19): 1-22.

Thornton AC, Jennings-Conklin KS, McCormick MI. Norovirus: agents in outbreaks of acute gastroenteritis. *Dis Manag Resp*. 2004 Jan-Mar; 2 (1): 4-9.

Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res*. 1994 Nov; 22 (22): 4673-80.

Trujillo AA, McCaustland KA, Zheng DP, Hadley LA, Vaughn G, Adams SM, et al. Use of taqman real-time reverse transcription-pcr for rapid detection, quantification, and typing of Norovirus. *J Clin Microbiol*. 2006 Apr; 44 (4): 1405-12.

United Nations Population Fund / World Bank, The state of the world population 2001. Footprints and milestones: population and environmental change.

Unicef/WHO. United Nations Children's Fund (Unicef)/World Health Organization (WHO) – OMS – Organização Mundial de Saúde. Diarrhoea: Why children are still dying and what can be done, 2009.

Vainio K, Myrmet M. Molecular epidemiology of Norovirus outbreaks in Norway during 2000 to 2005 and comparison of four Norovirus real-time reverse transcriptase PCR assays. *J Clin Microbiol*. 2006 Oct; 44 (10): 3695-702.

Van Heerden J, Ehlers MM, Van Zyl WB, Grabow HOK. Incidence of adenoviruses in raw and treated water. *Wat Res*. 2003 Sep; 37 (15): 3704–8

Victoria M, Carvalho-Costa FQ, Heinemann MB, Leite JP, Miagostovich M. Prevalence and Molecular Epidemiology of Noroviruses in Hospitalized Children With Acute Gastroenteritis in Rio de Janeiro, Brazil, 2004. *Ped Infect Dis J.* 2007 Jul; 26 (7): 602-6.

Victoria M, Guimarães F, Fumian T, Ferreira F, Vieira C, Leite JP, et al. Evaluation of an adsorption–elution method for detection of astrovirus and norovirus in environmental waters. *J Virol Methods.* 2009 Mar; 156 (1-2): 73–6.

Victoria M, Guimarães F, Fumian T, Ferreira F, Vieira C, Shubo T, et al. One year monitoring of Norovirus in a Sewage Treatment Plant in Rio de Janeiro, Brazil. *J Wat Health.* 2010 Mar; 8 (1): 158-65.

Vidal R, Solari V, Mamami N, Jiang X, Voltaire J, Roessler P, et al. Caliciviruses and Foodborne Gastroenteritis, Chile. *Emerg Infect Dis.* 2005 Jul; 11 (7): 1134-6.

Vilagines P, Sarrette B, Husson G, Vilagines R. Glass wool for virus concentration at ambient water pH level. *Water Sci Technol.* 1993; 27: 299–306.

Villena C, Gabrieli R, Pinto RM, Guix S, Donia D, Buonomo E, et al. A large infantile gastroenteritis outbreak in Albania caused by multiple emerging rotavirus genotypes. *Epidemiol Infect.* 2003 Dec; 131 (3):1105-10.

Vinje J, Hamidjaja RA, Sobsey MD. Development and application of a capsid VP1 (region D) based reverse transcription PCR assay for genotyping of genogroup I and II noroviruses. *J Virol Methods.* 2004 Mar; 116 (2): 109–17.

Von Sperling, M. Introdução ao tratamento das águas e ao tratamento de esgotos. Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental – UFMG. 1st ed. Belo Horizonte; 2005.

Xavier MPTP, Oliveira SA, Ferreira MSR, Victoria M, Miranda V, Silva MFM, et al. Detection of caliciviruses associated with acute infantile gastroenteritis in Salvador, an urban center in Northeast Brazil. *Braz J Med Biol Res.* 2009 May; 42 (5): 438-44.

Ward RL, Knowlton DR, Winston PE. Mechanism of inactivation of enteric viruses in fresh water. *Appl Environ Microbiol.* 1986 Sep; 52 (3): 450-9.

Ward RL, Bernstein DI, Knowlton DR, Sherwood JR, Young EC, Cusack TM, et al. Prevention of surface-to-human transmission of rotaviruses by treatment with disinfectant spray. *J Clin Microbiol.* 1991 Sep; 29 (9): 1991-6.

Widdowson MA, Cramer EH, Hadley L, Breese JS, Beard RS, Butens SN, et al. Outbreaks of acute gastroenteritis on cruise ships and on land: identification of a predominant circulating strain of Norovirus – United States, 2002. *J Infect Dis.* 2004 Jul; 190 (1): 27-36.

Widdowson MA, Sulka A, Bulens SN, Beard RS, Chaves SS, Hammond R, et al. Norovirus and foodborne disease, United States, 1991–2000. *Emerg Infect Dis.* 2005 Jan; 11 (1): 95–102.

Wilson IG. Inhibition and Facilitation of Nucleic Acid Amplification. *Appl Environ Microbiol.* 1997 Oct; 63 (10): 3741-51.

Wong M, Kumar L, Jenkins TM, Xagorarakis I, Phanikumar MS, Rose JB. Evaluation of public health risks at recreational beaches in Lake Michigan via detection of enteric viruses and a human-specific bacteriological marker. *Water Research.* 2009 Mar; 43 (4): 1137–49.

Wyn-Jones, Sellwood J. Enteric viruses in the aquatic environment. *J Appl Microbiol.* 2001 Dec; 91 (6): 945-62.

Zheng DP, Ando T, Fankhauser RL, Beard RS, Glass RI, Monroe SS. Norovirus classification and proposed strain nomenclature. *Virology.* 2006 Mar; 346 (2): 312–23.

Zeng SQ, Halkosalo A, Salminen M, Szakal ED, Puustinen L, Vesikari T. One-step quantitative RT-PCR for the detection of rotavirus in acute gastroenteritis. *J Virol Methods.* 2008 Nov; 153 (2): 238–40.