



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

Vanessa Moresco

**DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE PATÓGENOS  
ENTÉRICOS VIRAIS EM AMOSTRAS DE ÁGUA DO MAR**

**Florianópolis**

**2011**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

Vanessa Moresco

**DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE PATÓGENOS  
ENTÉRICOS VIRAIS EM AMOSTRAS DE ÁGUA DO MAR**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Biotecnologia – área de concentração Ambiental.

Orientadora: Profª. Dra. Célia Regina Monte Barardi

**Florianópolis**

**2011**

Catálogo na fonte pela Biblioteca Universitária  
da  
Universidade Federal de Santa Catarina

M843d Moresco, Vanessa

Deteção e quantificação de patógenos entéricos virais em amostras de água do mar [dissertação] / Vanessa Moresco ; orientadora, Célia Regina Monte Barardi. - Florianópolis, SC, 2011.

124 p.: il., grafs., tabs.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia.

Inclui referências

1. Biotecnologia. 2. Água do mar. 3. Virus. 4. Água poluída por virus. 5. Coliformes fecais. I. Barardi, Celia Regina Monte. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. III. Título.


CDU 577.23

"Detecção e quantificação de patógenos entéricos virais em amostras de água do mar". POR

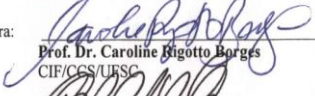
**VANESSA MORESCO**

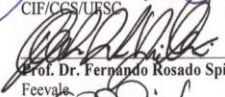
Dissertação julgada e aprovada em sua forma final, pelo Orientador e membros da Comissão Examinadora.

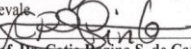
Orientador:


  
Prof. Dr. Célia Regina Monte Baraldi  
MIP/CCB/UFSC

Comissão Examinadora:

  
Prof. Dr. Caroline Bigotto Borges  
CIF/CCS/UFSC

  
Prof. Dr. Fernando Rosado Spilki  
Feevale

  
Prof. Dr. Catia Regina S. de Carvalho Pinto  
ENS/CTC/UFSC

  
Prof. Dr. Cláudia Maria Oliveira Simões – CIF/CCS/UFSC  
Coordenadora do Programa de  
Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências/CCB/UFSC  
Florianópolis, Fevereiro de 2011.



## **Dedicatória**

À minha mãe Ana e meu irmão Daniel, pela  
confiança, apoio e amor eternos.





## AGRADECIMENTOS

À minha mãe Ana Maria e meu irmão Daniel, pela confiança que depositam em mim, pelo apoio incondicional e amor.

À Profa. Dra. Célia Regina Monte Barardi pela orientação, ensinamentos, amizade e paciência durante a realização deste trabalho e durante os anos de convívio e trabalho no Laboratório de Virologia Aplicada.

À Profa. Dra. Cláudia Maria Oliveira Simões pelas valiosas sugestões durante o mestrado.

Aos membros da banca avaliadora deste trabalho, Prof. Dr. Fernando Rosado Spilki, Prof<sup>ª</sup>. Dra. Catia Regina de Carvalho Pinto, Dra. Caroline Rigotto Borges e Prof<sup>ª</sup>. Dra. Cláudia Maria Oliveira Simões, pela disponibilidade e sugestões.

Ao Dr. Paulo Augusto Esteves e à Embrapa Suínos e Aves (Concórdia/SC) pelo apoio na realização do sequenciamento das amostras e pelas sugestões.

Ao Prof. Dr. André de Àvila Ramos do Departamento de Biologia Celular, Embriologia e Genética da UFSC, pela ajuda nas análises estatísticas do presente trabalho.

Ao Prof. Dr. João Batista Calixto do Departamento de Farmacologia da UFSC por ceder o uso de equipamento, bem como ao doutorando Alisson Freire Bento pelo auxílio e disponibilidade no uso da máquina de PCR em tempo real.

Ao Prof. Dr. Antônio de Padua Carobrez por ceder o programa de estatística utilizado.

À Dra. Elayne Pereira pelo auxílio e sugestões nas análises estatísticas do trabalho.

Aos colegas e amigos que despenderam valiosas horas para a realização das intermináveis coletas de campo e quilômetros rodados pela Ilha: Ana Paula, Cristian, Doris, Helder, Lucas, Mariana Nascimento.

À colega e amiga Aline Viancelli pela ajuda e ensinamentos na realização do sequenciamento das amostras.

Aos amigos do Laboratório de Virologia Aplicada, pela ajuda, sugestões, conversas no cafezinho da tarde e, sobretudo pela amizade: Ana Paula, Annelise, Adriana, Aline, Ariadne, Caroline, Cristian, Doris, Francielle, Izabella, Jadel, Jéssica, Lucas, Marina, Mariana Lúcia, Mariana Nascimento, Mariana Rangel, Naira, Thiago.

Ao meu namorado Daniel, pelo apoio, conselhos e carinho.

Aos amigos de todos os momentos, os que estão perto e também os que estão longe: Caroline Seibert, Débora, Jéssica, Jonas, Raquel, Veronick, Simone.

Às companheiras de apartamento: Débora, Adriana e Virgínia, pelas sugestões, ajuda e amizade.

Aos demais colegas e professores dos laboratórios do 3º andar do MIP: Laboratório de Imunologia Aplicada e Laboratório de Protozoologia, pelas amizades e ajuda.

À CAPES pela concessão da bolsa.

A todos que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho.

*Vanessa Moresco*

## RESUMO

A preocupação com a contaminação do ambiente aquático e, conseqüentemente, dos recursos hídricos, têm crescido devido a uma possível escassez da água potável no planeta. A contaminação das águas costeiras por vírus entéricos é causada pelo despejo de resíduos de origem fecal, afetando as águas utilizadas em atividades de recreação, pesca e no cultivo de moluscos bivalves, sendo responsável pela maioria dos surtos de gastroenterites que ocorrem no mundo. Indicadores bacterianos de contaminação fecal como os coliformes fecais, têm sido utilizados para o controle da qualidade das águas, porém já é estabelecido em todo o mundo que esta contaminação não está correlacionada com a presença de vírus entéricos. O desenvolvimento de novos métodos de concentração e detecção de vírus entéricos é uma alternativa para o controle da contaminação destas águas a fim de assegurar a qualidade de uso das mesmas. Os objetivos deste estudo foram: **1)** Padronizar a metodologia de floculação utilizando leite desnatado acidificado na concentração de vírus em amostras de água do mar natural e artificial semeadas com quantidades conhecidas de adenovírus do sorotipo 2 (HAdV2). Comparar os resultados obtidos na recuperação viral com a metodologia já padronizada de filtração em membrana eletronegativa e reconcentração em Centriprep™; **2)** Aplicar metodologia padronizada na concentração e detecção de adenovírus humanos, poliomavírus cepa JC, vírus da hepatite A (HAV) e norovírus humano (HuNoV genogrupos GI e GII) em amostras de água do mar de 11 praias ao redor da Ilha de Santa Catarina, Florianópolis, Brasil durante um ano (Agosto de 2009 a Julho de 2010). **3)** Analisar a presença de coliformes fecais (*E. coli*) e avaliar parâmetros físico-químicos, temperatura, pH, salinidade e oxigênio dissolvido. Para as detecções virais, o material genético das amostras foi extraído e diluído 1:10 para a redução de inibidores das reações enzimáticas. *Nested*-PCR qualitativo foi usado na detecção de HAdV e para a realização do sequenciamento. A detecção e quantificação de todos os vírus pesquisados foi realizada por PCR em tempo real. Os resultados da recuperação viral quando a metodologia de floculação foi empregada foram de 14% e 13,6% e no método de filtração, foram de 2,8% e 21% para as amostras de água do mar natural e artificial respectivamente. Das 132 amostras de campo analisadas, 16% foram positivas nas reações de *nested*-PCR para HAdV. Nas análises de PCR em tempo real, o vírus mais prevalente foi o HAdV, com 55% das amostras positivas, com intervalos de detecção de  $8,40 \times 10^3$  a  $1,9 \times 10^7$  CG/ L, seguido

pelo HAV, com 51,5% de positividade, variando de  $1,60 \times 10^1$  a  $2,30 \times 10^3$  CG/ L. Para o JCPyV, 3% das amostras foram positivas, com intervalos de  $1,90 \times 10^4$  a  $1,70 \times 10^5$  CG/ L e para o NoV 7,5% e 4,5% das amostras foram positivas, com intervalos entre  $2,41 \times 10^3$  a  $5,14 \times 10^6$  e  $3,73 \times 10^4$  a  $2,10 \times 10^6$  CG/ L respectivamente para o GI e GII. As médias obtidas para os valores de coliformes fecais detectados foram de 8,0 a 1,325 UFC/100 mL em todos os pontos analisados. Somente dois dos pontos analisados não ultrapassaram o tolerável (Joaquina e Mole). Os demais pontos tiveram valores acima do permitido em algum mês do período analisado, destacando-se a Beira-Mar Norte com os valores mais elevados. As análises físico-químicas demonstraram valores concordantes com os previstos na legislação. O sequenciamento das amostras positivas para o HAdV demonstraram prevalência do adenovírus humano respiratório sorotipo 2. Os resultados obtidos evidenciam o destaque da contaminação viral nas amostras de água do mar e confirmam a não correlação da presença destes em relação à contaminação bacteriana. Este é o primeiro trabalho que avalia as condições das praias a redor da Ilha de Santa Catarina de forma mais abrangente, destacando diferentes tipos de contaminação.

**Palavras chave:** água do mar, vírus entéricos, concentração viral, coliformes fecais, técnicas moleculares.

## ABSTRACT

The concern about aquatic environment contamination and consequently water resources is increasing mainly due to the warning about potable water scarcity in our planet. The contamination of coastal waters by enteric viruses is caused by discharge of residues of fecal origin, affecting waters used for recreational activities, fishing and shellfish growing, being responsible for most outbreaks of gastroenteritis occurring in the world. Bacterial indicators such as fecal coliforms have been used as parameters of water quality, however it has been clearly established worldwide that bacterial contamination show no relationship with the presence of human enteric viruses. The development of new methods of water concentration for enteric viruses detection is an alternative to monitor the contamination of these waters in order to ensure its quality. The objectives of this study were: **1)** Standardize the methodology of flocculation using acidified skimmed milk for viral concentration in natural and artificial seawater samples previously spiked with known amounts of human adenoviruses serotype 2 (HAdV2). Results obtained with viral recovery were compared with the standardized methodology of water filtration in electronegative membrane and reconcentration by Centriprep™; **2)** Apply standardized methodology in the concentration and detection of HAdV, poliovirus (JCPyV), hepatitis A virus (HAV) and noroviruses (HuNoV GI and GII) in seawater samples harvested in 11 different beaches in Santa Catarina Island, Florianópolis, Brazil in a period of one year (August 2009 to July 2010). Were also measured the presence of fecal coliform (*E. coli*) and physical-chemical parameters such as temperature, pH, salinity and dissolved oxygen. To reduce the presence of inhibitors of PCR reactions, a tenfold dilution of DNA/RNA of each sample was used. Nested-PCR was used for qualitative detection of HAdV and for conducting sequencing analysis. The detection and quantification of all the viruses evaluated was performed by real time PCR. The results of viral recovery by the standardized method of flocculation were 14% and 13.6% and for the filtration method, were 2.8% and 21% for samples of natural and artificial seawater respectively. From 132 field samples analyzed, 16% of these were positive for HAdV in the nested-PCR assay. In the analysis of real-time PCR, the most prevalent virus was HAdV, with 55% of positive samples with intervals of detection of  $8.40 \times 10^3$  to  $1.90 \times 10^7$  GC/ L, followed by HAV, with 51,5% of positivity, ranging from  $2.30 \times 10^1$  to  $1.60 \times 10^3$  GC/ L. For JCPyV, 3% of samples were positive, with ranges between  $1.90 \times 10^4$  to  $1.70 \times 10^5$  GC/ L and

for NoV 7.5% and 4.5% of samples were positive, with intervals between  $2.41 \times 10^3$  to  $5.14 \times 10^6$  and  $3.73 \times 10^4$  to  $2.10 \times 10^6$  GC/ L respectively for GI and GII. The mean values of fecal coliforms detected were from 8.0 to 1.325 CFU/100 mL at all sites analyzed. Only two sites analyzed did not exceed the allowed by current legislation (Joaquina and Mole). The other sites showed, sometimes, values above the allowed during the period analyzed, with emphasis for Beira-Mar Norte site presenting the highest values. The physical-chemical analysis demonstrated values consistent with those recommended by legislation. The sequencing analysis of the samples positive for HAdV in qualitative PCR showed prevalence of human adenovirus respiratory serotype 2. The results show the highlight of viral contamination in the seawater samples and confirm the lack of correlation of their presence in relation to the bacterial contamination. This is the first study evaluating the conditions of the beaches around the Santa Catarina Island, highlighting different types of contamination.

**Keywords:** seawater, enteric viruses, viral concentration, fecal coliforms, molecular techniques.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Representação esquemática das rotas de transmissão dos vírus até chegar à contaminação do ambiente aquático marinho.....	27
<b>Figura 2:</b> Representação esquemática da estrutura do adenovírus .....	29
<b>Figura 3:</b> Representação esquemática da estrutura do poliomavírus símio SV40 .....	32
<b>Figura 4:</b> Representação esquemática da estrutura do capsídeo do norovírus.....	34
<b>Figura 5:</b> Estrutura do vírus da hepatite A obtida por microscopia eletrônica de transmissão.....	37
<b>Figura 6:</b> Células A549 observadas em microscópio óptico invertido .....	46
<b>Figura 7:</b> Células SVG-A não infectadas, visualizadas em microscópio óptico invertido.....	46
<b>Figura 8:</b> Células RAW264.7 visualizadas em microscópio óptico invertido .....	46
<b>Figura 9:</b> Fluxograma dos procedimentos realizados na padronização dos métodos de concentração viral .....	50
<b>Figura 10:</b> Mapa da Ilha de Santa Catarina apontando os pontos de coletas da água do mar.....	63
<b>Figura 11:</b> Imunofluorescência de células SVG-A infectadas pelo polimavírus cepa JC .....	65
<b>Figura 12:</b> Formação de Placas de Lise após a infecção de células RAW 264.7 por MNV-1.....	66
<b>Figura 13:</b> Porcentagens de recuperação viral obtidas na concentração de HAdV2 em amostras de água do mar natural e artificial submetidas às duas metodologias de concentração analisadas .....	67
<b>Figura 14:</b> Curva-padrão obtida para o Norovírus GI e GI.....	68
<b>Figura 15:</b> Número de cópias genômicas por litro (CG/ L) obtidos na quantificação dos vírus HAdV, JCPyV, HAV, Nov GI e GI das amostras de água do mar.....	72
<b>Figura 16:</b> Médias do número de cópias genômicas por litro (CG/ L) obtidos na quantificação dos vírus pesquisados nas amostras de água do mar coletadas nos pontos localizados ao redor da Ilha de Santa Catarina.....	77

<b>Figura 17:</b> Figura exemplificando o crescimento de coliformes fecais ( <i>E. coli</i> ) pela presença da formação de colônias azuis associadas à formação de gás .....	78
<b>Figura 18:</b> Média da presença de coliformes fecais ( <i>E. coli</i> ) nas amostras de águas analisadas.....	79
<b>Figura 19:</b> Média e desvios padrão dos valores obtidos nas análises físico-químicas para as amostras de água do mar coletadas ao redor da Ilha de Santa Catarina.....	82
<b>Figura 20:</b> Quantificação do vírus pesquisados no trabalho em CG/ L em todos os pontos de coletas analisados em relação ao período de coletas e a influência sazonal.....	84
<b>Figura 21:</b> Análises dos parâmetros físico-químicos coletados nas amostras de campo e analisados em relação à influência da sazonalidade.....	85
<b>Figura 22:</b> Árvore filogenética das amostras de água do mar coletadas ao redor da Ilha de Santa Catarina e submetidas ao sequenciamento.....	88



## LISTA DE QUADROS

<b>Quadro 1:</b> Sequências dos iniciadores utilizados nas reações de PCR e <i>nested</i> -PCR qualitativo de HAdV .....	55
<b>Quadro 2:</b> Iniciadores e sondas utilizados na reação de qPCR para os norovírus humanos genogrupos I e II.....	58
<b>Quadro 3:</b> Iniciadores e sondas utilizados na reação de qPCR para HAdV e JCPyV .....	60
<b>Quadro 4:</b> Iniciadores e sondas utilizados na reação de RT-qPCR para HAV e MNV.....	61



## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Porcentagem e meses onde foram positivas as amostras de campo submetidas à reação de <i>nested</i> -PCR qualitativo para a detecção de HAdV.....	70
<b>Tabela 2:</b> Intervalo e média geométrica do número de cópias genômicas por litro detectados nos ensaios de qPCR (quantitativo) para os vírus de DNA pesquisados (HAdV e JCPyV) em todos os pontos de coletas.....	73
<b>Tabela 3:</b> Intervalo e média geométrica do número de cópias genômicas por litro detectados nos ensaios de qPCR e RT-qPCR (quantitativo) para os vírus de RNA pesquisados (HAV e NoV GI e GII) em todos os pontos de coletas.....	74
<b>Tabela 4:</b> Intervalo e média de detecção de coliformes fecais ( <i>E. coli</i> ) nas amostras de água do mar coletadas ao redor da Ilha de Santa Catarina.....	80



## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

°C	graus centígrados
µg	Micrograma (s)
µL	Microlitro (s)
µM	Micromolar
A549	Células epiteliais de carcinoma de pulmão humano
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
Cdna	DNA complementar
CG	Cópias genômicas
CONAMA	Conselho Nacional do Meio Ambiente
DEPC	Dietilpirocarbonato
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle medium</i>
DNA	Ácido desoxirribonucléico
<i>dNTP</i>	Desoxirribonucleotídeos (dATP, dTTP, dCTP, dGTP)
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EPA	Agência Norte Americana de Proteção do Meio Ambiente
FRHK-4	Células de rim de macaco <i>Rhesus</i>
h	horas(s)
HAdV	Adenovírus humano
HAdV2	Adenovírus humano tipo 2
HAV	Vírus da hepatite A
HCl	Ácido clorídrico
HuNoV	Norovírus humano
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IFI	Imunofluorescência indireta

m <sup>3</sup>	Metros cúbicos
MEM	Meio Mínimo Essencial com sais de Eagle's
min	minuto(s)
MNV	Norovírus murino
MS	Ministério da Saúde
NCBI	Centro Nacional de Informações Biotecnológicas
NCR	Região não codificadora
NoV	Norovírus
ORF	<i>Open reading frame</i>
pb	pares de bases
PCR	Reação em cadeia pela polimerase
PEG	Polietilenoglicol
pH	Potencial hidrogeniônico
pmol	Picomole
PyV	Poliomavírus humano
qPCR	Reação em cadeia pela polimerase em tempo real
RAW264.7	Macrófagos transformados derivados de <i>Mus musculus</i>
RNA	Ácido ribonucléico
RT	Transcriptase reversa
s	segundo(s)
SFB	Soro fetal bovino
SVG-A	Células embrionárias gliais humanas
UDG	Uracil-DNA-glicosilase
UFC	Unidades formadoras de colônias
UFF	Unidades formadoras de foco
UFP	Unidades formadoras de placa

UFSC	Universidade Federal de Santa Catarina
UV	Radiação ultravioleta
VLPs	<i>Virus-like particles</i>
VP	<i>Viral protein</i>





## ÍNDICE

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>26</b>
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>29</b>
<b>2.1 Contaminação da água do mar por vírus .....</b>	<b>29</b>
<b>2.2 Os vírus entéricos .....</b>	<b>30</b>
2.2.1 Os adenovírus .....	31
2.2.2 Os poliomavírus.....	34
2.2.3 Os norovírus .....	37
2.2.4 Vírus da hepatite A .....	39
<b>2.3 Metodologias disponíveis para a detecção de vírus no ambiente .....</b>	<b>42</b>
<b>3 OBJETIVOS.....</b>	<b>44</b>
<b>3.1 Objetivos Gerais .....</b>	<b>44</b>
<b>3.2 Objetivos Específicos.....</b>	<b>44</b>
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>45</b>
<b>4.1 Materiais Biológicos .....</b>	<b>45</b>
<b>4.2 Cultivo de células.....</b>	<b>45</b>
<b>4.3 Produção dos estoques virais através de infecção celular <i>in vitro</i> .....</b>	<b>47</b>
<b>4.4 Determinação do título infeccioso dos estoques virais produzidos.....</b>	<b>48</b>
4.4.1 Titulação dos fluidos virais de HAdV2, JCPyV e HAV.....	48
4.4.2 Titulação do fluido viral do MNV-1 .....	49
<b>4.5 Concentração de água do mar para detecção e quantificação viral .....</b>	<b>50</b>
4.5.1 Padronização e comparação dos métodos de concentração viral .....	50

4.5.1a Método da floculação orgânica utilizando uma solução de leite acidificado pré floculado .....	51
4.5.1b Método de filtração em membrana eletronegativa e concentração em Centriprep <sup>TM</sup> YM50 (Nihon Millipore) .....	52
4.5.2 Avaliação da recuperação viral das amostras artificialmente semeadas, durante as etapas de padronização do método .....	53
<b>4.6 Extração do material genético viral das amostras de águas concentradas .....</b>	<b>53</b>
<b>4.7 Detecção dos vírus pesquisados utilizando PCR qualitativo .....</b>	<b>54</b>
4.7.1 Reação de PCR qualitativo para HAdV .....	54
<b>4.8 Visualização dos produtos amplificados gerados .....</b>	<b>55</b>
<b>4.9 Reação de transcriptase reversa (RT) para a obtenção de DNA complementar (cDNA) para a realização da reação de PCR quantitativo para HuNoV .....</b>	<b>55</b>
<b>4.10 Construção das curvas-padrão para a padronização da reação de PCR em tempo real (qPCR) para norovírus humano, genogrupos I e II.....</b>	<b>56</b>
<b>4.11 Reação de PCR em tempo real (qPCR e RT-qPCR) para a quantificação dos genomas dos vírus pesquisados .....</b>	<b>58</b>
4.11.1 Reação de qPCR para a detecção de HAdV e JCPyV .....	58
4.11.2 Reação de RT-qPCR para a detecção de vírus da hepatite A (HAV) e norovírus murino (MNV-1).....	60
<b>4.12 Sequenciamento do genoma do vírus HAdV .....</b>	<b>61</b>
<b>4.13 Monitoramento mensal de HAdV, JCPyV, HuNoV e HAV em amostras de água do mar .....</b>	<b>62</b>
<b>4.14 Medida dos parâmetros físico-químicos das amostras de campo coletadas .....</b>	<b>64</b>
<b>4.15 Análise da presença de <i>E. coli</i> nas amostras de água coletadas .....</b>	<b>64</b>

4.16	Análise estatística .....	64
5	RESULTADOS.....	65
5.1	Titulação viral pelo método da imunofluorescência indireta (IFI) .....	65
5.2	Titulação viral pelo método da contagem de placas de lise .....	65
5.3	Padronização da metodologia de floculação pelo leite acidificado e comparação da recuperação viral com o método de filtração em membrana eletronegativa .....	66
5.4	Obtenção das curvas-padrão referentes à quantificação do DNA do plasmídeo PCR 2.1-TOPO contendo sequências clonadas de cDNAs oriundos de RNA dos genogrupos GI e GII de norovírus humanos.....	67
5.5	Detecção de HAdV através <i>nested</i> -PCR qualitativo .....	68
5.6	Quantificação dos genomas de HAdV, JCPyV, HAV e HuNoV através da reação de qPCR e qRT-PCR nas amostras de campo.....	71
5.6.1	Detecção e quantificação de HAdV, JCPyV, HAV e HuNoV nas amostras de água do mar analisadas .....	71
5.6.2	Recuperação viral dos controles positivos da concentração das amostras de campo pelo método da floculação .....	75
5.6.3	Quantificação dos vírus pesquisados nas amostras quanto à localização dos pontos de coletas (Norte, Leste, Sul).....	75
5.7	Detecção de ( <i>E. coli</i> ) nas amostras de campo .....	78
5.8	Avaliação dos parâmetros físico-químicos das amostras de campo .....	81
5.9	Avaliação da sazonalidade .....	83
5.10	Correlações entre a detecção viral, bacteriana e os parâmetros físico-químicos .....	86

<b>5.11 Sequenciamento das amostras de campo positivas para HAdV .....</b>	<b>86</b>
<b>6 DISCUSSÃO.....</b>	<b>89</b>
<b>7 SUMÁRIO DOS PRINCIPAIS RESULTADOS.....</b>	<b>107</b>
<b>8 CONCLUSÕES.....</b>	<b>109</b>
<b>9 PERSPECTIVAS.....</b>	<b>110</b>
<b>10 REFERÊNCIAS.....</b>	<b>111</b>



### 1 INTRODUÇÃO

A crescente preocupação em torno da escassez dos recursos hídricos e o problema acerca da poluição ambiental têm evidenciado a necessidade de promover o uso racional da água. Este fato já chama a atenção de todo o mundo e é assunto nas mais diversas esferas sociais e políticas, sendo destacado pela Organização das Nações Unidas para a Educação, a Ciência e a Cultura (UNESCO), como o principal problema ambiental deste século.

Segundo a Fundação Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), o Brasil possui 168.870 m<sup>3</sup> de recursos hídricos superficiais, o que representa 50% do total de recursos da América do Sul e 11% dos recursos mundiais (IBGE, 2008). Do total de água existente no planeta, cerca de 97% encontra-se nos oceanos sob forma de água salgada, 2,3% está sob forma de geleiras. Do percentual restante, que representa a quantidade de água doce no planeta, 0,7% está presente em rios e lagos e apenas 0,0081% da água doce é considerada potável para o consumo humano.

A qualidade da água e, portanto da saúde humana, pode ser significativamente afetada pela presença de microrganismos entéricos patogênicos derivados de esgoto não tratado descartado em águas superficiais. Estima-se que no mundo 2,4 bilhões de pessoas não dispõem de tratamento de água para consumo (STRAUB; CHANDLER, 2003).

No Brasil, atualmente 55,2% dos municípios possuem coleta de esgoto, sendo que este número não se refere ao tratamento adequado do esgoto e sim somente à coleta. Na região sul cerca de 6 milhões e 300 mil pessoas não tem acesso à rede coletora de esgotos, segundo as grandes regiões do país, sendo que o Estado de Santa Catarina ocupa o 16º lugar em porcentagem de domicílios atendidos por rede geral de esgoto (IBGE, 2008). Conforme dados da Prefeitura Municipal de Florianópolis, atualmente, o sistema de captação e tratamento do esgotamento sanitário da capital de Santa Catarina, abrange um total de 44% da população residente. Esse índice nos mostra que 56% da população ainda não têm acesso ao destino correto do esgoto que produz, afetando enormemente os recursos hídricos destinados a diferentes práticas, como a malacocultura e pesca, e o potencial turístico que a cidade possui, além do contexto ecológico como um todo.

Dos agentes patogênicos presentes na água, o impacto causado pela contaminação pelos vírus entéricos é menos estudado do que o causado por bactérias e protozoários, principalmente devido à dificuldade em se detectar estes agentes em águas ambientais .

Surtos de doenças entéricas virais por veiculação hídrica têm sido descritos em muitos países e a lista de microrganismos potencialmente patogênicos aumenta anualmente (STRAUB; CHANDLER, 2003; YEH, et al., 2009). Estes vírus são altamente estáveis no ambiente aquático, possuem certa resistência aos agentes físicos e químicos de inativação como U.V. e cloro, podem permanecer viáveis ou potencialmente infecciosos durante meses na água, resistindo a condições ambientais diversas e a processos de tratamento de água e esgoto normalmente destinados ao controle bacteriano. Além disso, podem adsorver-se a partículas sólidas do meio aquático, promovendo maior estabilidade (LEE; KIM, 2008; TREE; ADAMS; LEES, 2003).

A pesquisa de vírus em águas tratadas e não tratadas constitui uma relevante linha de investigação em desenvolvimento no mundo, visando à garantia da qualidade da água de uso da população. Atualmente, o controle da qualidade da água é feito com base na presença de microrganismos indicadores tais como coliformes totais e fecais. Embora ainda não seja rotineira, é altamente aconselhável que as águas de consumo sejam rotineiramente avaliadas para se verificar contaminação por vírus entéricos e pelos protozoários *Cryptosporidium parvum* e *Giardia* spp. Desde o ano de 2004, a Agência Brasileira de Vigilância Sanitária (ANVISA) já declarou que esses parâmetros serão no futuro, requeridos como indicadores de potabilidade das águas (BRASIL, 2004).

Segundo a Resolução nº 274/2000 do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA), áreas de balneabilidade de contato primário em águas salinas, que incluem atividades de natação e mergulho, a presença de coliformes termotolerantes não pode exceder na ordem de 250 UFC/100mL (Unidades Formadoras de Colônias) (CONAMA, 2000). Já para águas salinas destinadas ao cultivo de moluscos para alimentação humana, a Resolução nº 357/2005 indica que os valores de coliformes termotolerantes não poderão ultrapassar 43 UFC/100mL (CONAMA, 2005). Para águas destinadas ao consumo humano, a legislação brasileira atual limita-se à presença de bactérias do grupo coliformes totais, termotolerantes e *Escherichia coli* para avaliação da potabilidade (Portaria do Ministério da Saúde - MS 518/2004) (BRASIL, 2004). Entretanto, é de conhecimento de que não existe uma correlação entre os padrões bacterianos e a ausência de vírus entéricos no ambiente aquático (JIANG; CHU; HE, 2007).

Esta portaria vem sendo revisada desde 2006 em relação à inclusão de um padrão de análise que indique a ausência de enterovírus em águas destinadas ao consumo humano. A inclusão deste novo

parâmetro microbiológico de análise da qualidade das águas pode contribuir para que os vírus entéricos sejam requeridos na avaliação da contaminação dos diferentes tipos de ambientes aquáticos.

O órgão estadual, Fundação do Meio Ambiente (FATMA) que avalia a qualidade da água dos balneários no município de Florianópolis tem por base a Resolução 274/2000 (CONAMA) e classifica as águas de balneários como próprias, quando 80% ou mais de um conjunto de amostras coletadas nas últimas 5 semanas, no mesmo local houver no máximo 800 NMP (número mais provável) *E. coli*/100mL; e impróprias, quando em mais de 20% de um conjunto de amostras coletadas nas últimas 5 semanas, no mesmo local for superior que 800 *E. coli*/100mL ou quando na última coleta o resultado for superior a 2000 *E. coli*/100mL. As coletas realizadas mensalmente de março a novembro e semanalmente no período do verão, de dezembro a fevereiro.

O potencial turístico do Estado de Santa Catarina alcança expressão nacional, sendo que a Ilha de Santa Catarina encontra no turismo uma das principais fontes de renda de seus habitantes. A população flutuante, que praticamente triplica, durante a alta temporada, traz benefícios econômicos à população local, mas também aumenta a quantidade de esgoto doméstico produzido e lançado direta ou indiretamente nos ecossistemas aquáticos.

Além do destaque na área do turismo, os municípios de Florianópolis e da Grande Florianópolis possuem uma área litorânea composta de baías, que apresentam ótimas condições para o cultivo de moluscos bivalves, destacando-se nos últimos anos como os maiores produtores nacionais de ostras e mexilhões. Devido à sua capacidade de bioacumulação, os moluscos bivalves concentram patógenos bacterianos e virais presentes em suas águas de cultivo, presentes nos dejetos nelas despejados, sem o devido tratamento (CORRÊA, et al., 2007).

A qualidade microbiológica dos moluscos bivalves está intimamente relacionada com a qualidade sanitária do ambiente onde são cultivados, sendo que nos últimos anos foi detectado um aumento da poluição dos locais de cultivo de moluscos no Estado de Santa Catarina, com a detecção da presença de patógenos virais e bacterianos nos moluscos e nas águas oceânicas (RIGOTTO, et al., 2005; SINCERO, et al., 2006).

Por esta razão, a pesquisa da presença e o estudo da infecciosidade de vírus entéricos em águas, que são utilizadas, tanto para o turismo como para a produção de moluscos bivalves, é de suma importância, pois visa à obtenção de dados sobre a qualidade destas águas, bem como dos produtos da maricultura do Estado.



## **2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1 Contaminação da água do mar por vírus**

A maioria da população mundial, e isto inclui a população brasileira, vive em regiões costeiras, regiões estas que vêm sendo impactadas pelo despejo direto ou indireto de efluentes não tratados, sendo que em escala global, estas áreas recebem cerca de 90% do volume de águas residuais geradas (GRIFFIN, et al., 2003). A contaminação viral pode atingir águas oceânicas por diferentes rotas, incluindo a descarga direta de efluentes de esgotos tratados ou não tratados, descargas não intencionais por esgotos urbanos ou rurais, despejo de resíduos por embarcações e através de rios que recebem descargas de águas residuais (BOSCH; XAVIER ABAD; PINTÓ, 2005).

Apesar do grande volume de resíduos contaminantes que aportam em águas oceânicas, um fenômeno que ocorre é a rápida diluição destes contaminantes na água do mar, o que minimiza, por exemplo, o impacto da descarga viral causada por estes despejos, por esta razão, muitas vezes, a descarga de águas residuais tratadas é realizada em águas oceânicas, sendo que esta descarga deve ocorrer em distâncias consideráveis da orla (1 a 4 quilômetros) (BOSCH; XAVIER ABAD; PINTÓ, 2005).

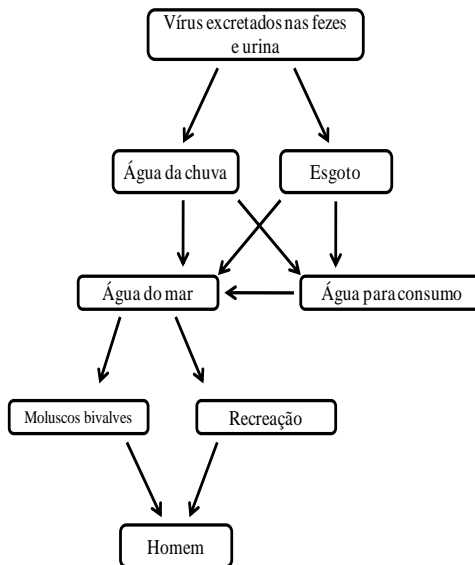
Segundo Roberts, et al. (2010) atualmente o uso de emissários para a descarga de resíduos tratados em alto mar é uma boa estratégia econômica e que apresenta pouco efeitos prejudiciais ao meio ambiente. Para tanto, os resíduos de origem fecal humana devem ser devidamente tratados antes de ser lançados em águas oceânicas e a uma determinada distância da orla marítima e em altas velocidades de descarga, promovendo desta forma uma difusão de 100:1 partes de água por efluente tratado, sendo que isto corresponderia a 99% de redução da concentração dos contaminantes lançados naquele ponto.

Mesmo que as quantidades de vírus humanos presentes na água do mar sejam pequenas devido ao volume de água total presente, estudos epidemiológicos evidenciam um baixo, mas significativo risco de infecção através do contato com águas contaminadas, em atividades recreacionais como natação, nas cercanias onde há o aporte de efluentes, ocorrendo comumente surtos de gastroenterites e infecções do trato respiratório superior, sendo a maioria dos surtos decorrentes da presença de enterovírus, vírus da hepatite A e E, adenovírus, rotavírus e norovírus (BOSCH; XAVIER ABAD; PINTÓ, 2005).

## 2.2 Os vírus entéricos

Os vírus entéricos são comumente excretados em altas concentrações nas fezes e/ou urina de humanos e animais (na ordem de  $10^8$  a  $10^{11}$  partículas virais por grama de fezes), sendo capazes de contaminar direta ou indiretamente águas destinadas ao consumo humano e água do mar que recebe esgoto, sobrevivendo no ambiente com relativa estabilidade e ocasionando a ocorrência de surtos de doenças em indivíduos susceptíveis (Fig.1) (ASHBOLT, 2004; BOSCH, et al., 2008; HAMZA, et al., 2009; WYN-JONES; SELLWOOD, 2001).

Estes vírus são normalmente introduzidos no meio ambiente aquático através de atividades humanas pelo uso de sistemas de fossas sépticas, pela presença de resíduos de atividades urbanas, industriais, agrícolas e pelo despejo de esgoto não tratado em águas estuarinas, de rios e de mar (FONG; LIPP, 2005).



**Figura 1:** Representação esquemática das rotas de transmissão dos vírus entéricos até chegar à contaminação do ambiente aquático marinho.

Os vírus entéricos são conhecidos por causarem um grande número de doenças veiculadas principalmente pela ingestão de água e alimentos contaminados. Dentre tais doenças destacam-se surtos de

gastroenterites, otites, doenças do trato respiratório, meningites virais, hepatites entre outras doenças (GRIFFIN et al., 2003).

Estes vírus são altamente estáveis no ambiente aquático, possuem certa resistência aos agentes físicos e químicos de inativação, como umidade, pH, temperatura, radiação ultravioleta e cloro, podendo permanecer viáveis ou potencialmente infecciosos durante meses na água, resistindo a condições ambientais diversas e a processos de tratamento de água e esgoto normalmente destinado ao controle bacteriano. Além disso, podem agregar-se a partículas sólidas do meio aquático, promovendo maior estabilidade (LECLERC; SCHWARTZBROD; DEI-CAS, 2002; SKRABER, et al., 2004; TREE; ADAMS; LEES, 2003).

A maioria do vírus entéricos é formada por capsídeo e material genético, sendo desprovidos de envelope bilipídico. O capsídeo possui a função tanto de promover a interação vírus-célula hospedeira, necessária para a infecção, como de proteger o material genético de degradação por nucleases entre outros fatores já citados (RODRÍGUEZ; PEPPER; GERBA, 2009).

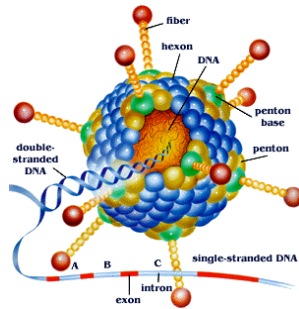
Há cerca de 140 diferentes vírus entéricos humanos conhecidos, dentre estes se destacam os vírus de RNA fita simples: calicivírus, enterovírus, vírus da hepatite A e E; vírus de RNA fita dupla: rotavírus; e de DNA fita dupla: adenovírus (GERBA, 2005; LE GUYADER, et al., 2000).

### 2.2.1 Os adenovírus

Os adenovírus humanos (HAdV) pertencem à família Adenoviridae, sendo esta, dividida em dois gêneros, *Mastadenovirus* que é o gênero responsável por causar infecção em mamíferos e o gênero *Aviadenovirus*, que causa infecção em aves. Atualmente, são conhecidos 52 sorotipos de adenovírus humanos (AdV1-AdV52), (BÁNYAI, et al., 2009). Os adenovírus estão distribuídos em seis subgêneros (A-F), sendo distinguidos pela resistência a neutralização por antisoros de outro sorotipo conhecido, em relação à similaridade da sequência do DNA ou por padrões de hematoaglutinação (ALBINANA-GIMENEZ, et al., 2009; NEMEROW, et al., 2009).

Possuem como características estruturais a ausência de envelope lipídico, capsídeo de formato icosaédrico composto de 252 capsômeros, sendo estes 240 *hexons* e 12 *pentons*. Em cada *penton* há a projeção de uma única fibra, que varia de tamanho de acordo com os sorotipos. A exceção são os sorotipos entéricos, AdV-40 e 41 que possuem duas fibras projetadas em cada *penton*. Estas fibras são

importantes no processo de adsorção às células hospedeiras (Fig. 2). O genoma dos adenovírus é composto por DNA fita dupla não segmentada, com tamanho variando entre 26 a 45 Kb, sendo que o vírion possui tamanho médio em torno de 70-100 nm de diâmetro (BERK, 2007; MENA; GERBA, 2008).



**Figura 2:** Representação esquemática da estrutura do adenovírus evidenciando-se a forma do capsídeo com seus *hexons* e *pentons*, bem como as fibras. Fonte: [www.googleimagens.com.br](http://www.googleimagens.com.br)

Os adenovírus podem ser transmitidos ao homem através da inalação de aerossóis, no contato pessoa-pessoa e via fecal-oral (através da ingestão de água ou alimentos contaminados) (FORMIGA-CRUZ, et al., 2002; RIGOTTO, et al., 2010; VAN HEERDEN, et al., 2005) causando enfermidades que acometem as vias respiratórias superiores e inferiores causando faringites, pneumonias, doença respiratória aguda, febres; infecções oculares agudas, como conjuntivites; cistites; gastroenterites e diarreia (ALLARD; ALBINSSON; WADELL, 2001; HARAMOTO, et al., 2007; KUO, et al., 2010). Uma vez dentro do organismo, os adenovírus iniciam seu processo de replicação através de uma interação de alta afinidade entre a fibra presente no capsídeo e receptores celulares. Segue-se então a internalização do vírus no citoplasma celular mediado por endocitose via formação de uma vesícula revestida por clatrina e em seguida, seguindo o processo normal de endocitose, a partícula viral, já sem a capa de clatrina, é transportada até o núcleo da célula, onde o DNA viral é liberado e transita através do poro nuclear iniciando, no núcleo, o processo de replicação (NEMEROW et al., 2009; WOLD; HORWITZ, 2007).

Alguns sorotipos dos adenovírus causam infecções assintomáticas, como por exemplo, os sorotipos pertencentes aos

subgêneros A e D, já a maioria dos sorotipos que pertencem aos subgêneros B e E causam manifestações clínicas (MENA; GERBA, 2008). Podem-se destacar os sorotipos 40 e 41 que causam doenças entéricas, enquanto que os demais sorotipos causam doenças do trato respiratório e têm sido relatados como causadores de infecções em indivíduos imunocomprometidos e crianças jovens, sendo detectados nos mais diversos tipos de águas (SIRIKANCHANA; SHISLER; MARIÑAS, 2008).

Estudos epidemiológicos estimam uma prevalência de infecção por adenovírus entre 40 a 60% em diferentes populações, sendo que os anticorpos mais encontrados são dirigidos aos sorotipos 1, 2 e 5 (WOLD; HORWITZ, 2007). No Brasil, não há dados epidemiológicos consideráveis, mas estudos realizados com amostras clínicas de fezes oriundas de crianças com até três anos de idade e hospitalizadas com diagnósticos de gastroenterite em Campo Grande, Mato Grosso do Sul, mostraram que 3,6% dos surtos ocorridos durante os anos de 2000 e 2004 foram causados por adenovírus (ANDREASI, et al., 2008).

Os surtos de infecções respiratórias que acometem principalmente crianças são causados, na sua maioria, por adenovírus dos sorotipos 1 e 6 (subgênero C) (MENA; GERBA, 2008), sendo observados casos envolvendo os sorotipos 2, 5, também pertencentes ao subgênero C (KUO, et al., 2010). Casos de pneumonia são mais raros, e estão associados aos sorotipos 3 e 7, que são os mesmos sorotipos isolados de pacientes que apresentaram infecções oculares. Em epidemias de queratoconjuntivites, foram observadas a presença dos sorotipos 8, 18 e 37. Já em casos graves de cistites hemorrágicas, os sorotipos envolvidos são os 11e 21 acometendo principalmente indivíduos do sexo masculino, destacando-se que, na maioria deles, os indivíduos eram transplantados e faziam uso de medicamentos imunossupressores (MENA; GERBA, 2008; WOLD; HORWITZ, 2007).

Apesar de os sorotipos 40 e 41(subgênero F), serem estimados como os responsáveis por cerca de 5 a 20% dos casos de diarreia no mundo, estudos vêm demonstrando que os adenovírus do subgêneros A, B e C também estão envolvidos em casos de gastroenterites que acometem principalmente crianças e adultos jovens, como o 31 (subgênero A) (CHOO; KIM, 2006; HARAMOTO et al., 2007; MENA; GERBA, 2008).

Apesar de nem todos os sorotipos de adenovírus serem responsáveis por casos de gastroenterites, todos podem ser transmitidos pela via fecal-oral, sendo excretados em concentrações na ordem de até

$10^{11}$  partículas virais por grama de fezes, sendo esta a principal via de transmissão do vírus (HARAMOTO et al., 2007). Neste sentido, a infecção por estes agentes, pode-se dar quando o indivíduo entra em contato com águas contaminadas por dejetos de origem humana sem o devido tratamento. A EPA (Agência Norte Americana de Proteção do Meio Ambiente) listou os adenovírus, como um dos quatro tipos de vírus candidatos a servirem como parâmetro de contaminação do ambiente aquático (CROMEANS, et al., 2008).

Devido às suas características estruturais, os adenovírus possuem alta estabilidade, podendo permanecer viáveis por determinados períodos de tempos em diferentes superfícies e ambientes, mesmo sem a presença de célula hospedeira. São resistentes a desinfecção por diferentes tipos de agentes químicos e físicos e até mesmo a extremos de pH (MENA; GERBA, 2008). Estudos evidenciam que o adenovírus é até 60 vezes mais resistente a danos no DNA provocados pela incidência de luz ultravioleta (U.V.) do que outros vírus que possuem material genético de RNA, como o vírus da hepatite A e enterovírus, isto porque uma das fitas de DNA não danificadas pela exposição à luz U.V. pode servir como molde para o reparo da outra fita, usando enzimas do hospedeiro para a realização deste reparo (FONG; LIPP, 2005; SIRIKANCHANA; SHISLER; MARIÑAS, 2008).

Surtos de gastroenterites ou outras enfermidades causadas pelos adenovírus vêm sendo relatadas e possuem em comum a veiculação do vírus através do ambiente aquático, como por exemplo, em águas utilizadas para recreação, como água do mar, piscinas, rios; água de superfície; água de consumo tratada ou não tratada; águas subterrâneas e águas residuais (LAMBERTINI, et al., 2008; SIRIKANCHANA; SHISLER; MARIÑAS, 2008; XAGORARAKI, et al., 2007)

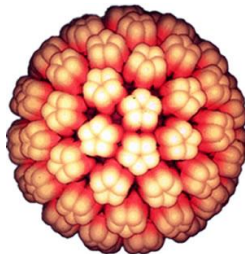
Em virtude da alta prevalência de adenovírus presente em amostras ambientais comprovada em diferentes trabalhos e levando em consideração sua implicância no desenvolvimento de surtos veiculados por transmissão hídrica, elegeu-se este, como um dos vírus a serem analisados quanto a sua presença em água do mar.

### 2.2.2 Os poliomavírus

Os poliomavírus pertencem à família Polioviridae, que contém 14 diferentes cepas capazes de infectar até 8 espécies de mamíferos, destacando-se entre estes os vírus capazes de causar infecções em humanos, como as cepas JCPyV e BKPyV, e três outras cepas recentemente descobertas (WUPyV, KIPyV e MCPyV) (FUMIAN, et al., 2010; KEAN, et al., 2009; MCNEES, et al., 2005). As

cepas JC e BK foram descobertas em 1971 em pacientes imunossuprimidos, e levam estes nomes devido às iniciais dos pacientes em que foram isolados. A cepa símia SV40 (Fig. 3) foi descoberta acidentalmente como contaminante de uma cultura de poliovírus em células de rim de macaco *Rhesus* e que haviam sido tratadas com formalina durante a produção da vacina inativada cepa Salk contra o vírus da poliomielite (BOOTHPUR; BRENNAN, 2010; NEU; STEHLE; ATWOOD, 2009).

As características estruturais destes vírus são a ausência de envelope bilipídico, apresentando a partícula viral de diâmetro variando entre 40-45 nm, consistindo de três proteínas do capsídeo, VP1, VP2 e VP3 organizadas em 72 pentâmeros, cada um contendo cinco moléculas de VP1 e uma de VP2 ou VP3. Por não possuírem envelope, são resistentes a solventes lipídicos e a inativação por formalina (IMPERIALE; MAJOR, 2007). O genoma viral consiste de DNA circular fechado de fita dupla, com tamanho aproximado de 5 quilobases e dividido em três regiões gênicas: uma região expressa precocemente, uma região expressa tardiamente e uma região regulatória que contém os sítios promotores da transcrição das regiões precoces e tardia (BOOTHPUR; BRENNAN, 2010; IMPERIALE; MAJOR, 2007).



**Figura 3:** Representação esquemática da estrutura do poliomavírus símio SV40, mostrando a estrutura do capsídeo pentamérico. Fonte: [www.googleimagens.com.br](http://www.googleimagens.com.br)

As cepas JC e BK apresentam homologia na sequência nucleotídica de aproximadamente 72% e até o momento, 4 principais tipos de poliomavírus da cepa JC já foram identificados (europeu, asiático, africano e norte americano) (BOOTHPUR; BRENNAN, 2010; NEU; STEHLE; ATWOOD, 2009). A interação destes com a célula hospedeira no momento da infecção demonstra a importância da presença de ácido siálico, mediando a ligação do vírus ao receptor celular provavelmente via proteína VP1 (IMPERIALE; MAJOR, 2007).

A forma de internalização do vírus na célula apresenta algumas diferenças entre as cepas JC e BK. Enquanto a cepa JC é internalizada através da formação de uma vesícula dependente de clatrina e depois se direciona ao caveossomo via endossomo primário, a cepa BK é endocitada diretamente via caveolina e dirige-se para o caveossomo onde, através da passagem pelo retículo endoplasmático, o DNA de ambas as cepas entram no núcleo celular iniciando o processo de replicação e finalizando com liberação viral por lise celular (BOOTHPUR; BRENNAN, 2010; NEU; STEHLE; ATWOOD, 2009).

A infecção por poliomavírus em humanos é tipicamente adquirida precocemente, BK (3-4 anos de idade) e JC (10-14 anos), sendo que ambas as cepas são ubíquas na população humana com soroprevalência de aproximadamente 80% em adultos (BOOTHPUR; BRENNAN, 2010; MCNEES et al., 2005).

A infecção em humanos inicialmente é assintomática, podendo permanecer latente, sendo possível uma reativação quando o indivíduo infectado apresentar uma deficiência imunológica permanente ou transitória. A reativação da cepa JCPyV pode levar a uma leucoencefalopatia multifocal progressiva (PML), ocorrendo principalmente em indivíduos portadores do vírus HIV, bem como em pacientes com estágios avançados de tumores (PAL, et al., 2006). As infecções pela cepa BK podem progredir para doenças como cistites hemorrágicas, estenose uretral e provocar a rejeição em pacientes transplantados renais (PAL et al., 2006).

Os poliomavírus vêm sendo recentemente estudados como um modelo de vírus emergente para a indicação de contaminação fecal, uma vez que vêm sendo encontrados com certa prevalência em diferentes amostras de esgoto analisadas em diferentes partes do mundo (HUNDESA, et al., 2006). O modo de transmissão ainda não é bem determinado, mas sugere-se que seja através da transmissão fecal-oral e por via respiratória (BOOTHPUR; BRENNAN, 2010). Estes vírus são freqüentemente excretados na urina, estima-se que a cepa JC, seja excretada por aproximadamente, 40 a 80% da população, corroborando assim, para que sirvam como indicadores de contaminação ambiental (HUNDESA et al., 2006; MCNEES et al., 2005).

No Brasil, o primeiro estudo para se avaliar a presença de poliomavírus em amostras de águas de esgoto bruto e de esgoto tratado, demonstrou um percentual de 96 e 43% de positividade para estas amostras respectivamente. Neste mesmo trabalho, amostras clínicas de urina indicaram a presença da cepa viral JC na população, tendo similaridade com os tipos africanos e europeus (FUMIAN et al., 2010).

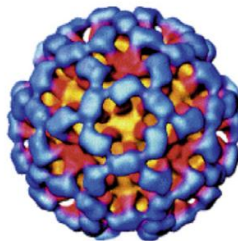


### 2.2.3 Os norovírus

O gênero *Norovirus* (NoV), da família Caliciviridae, é o principal causador de gastroenterites não bacterianas em todo o mundo, sendo estimados 23 milhões de casos por ano nos Estados Unidos da América (GENTRY; VINJÉ; LIPP, 2009). Os NoVs são agentes de diversos surtos em todo mundo, podendo contaminar, tanto a água de consumo quanto alimentos, sendo transmitidos pela via fecal-oral e por aerossóis (TAVARES; CARDOSO; DE BRITO, 2005).

Possuem como características estruturais a ausência de envelope lipídico, capsídeo de formato icosaédrico contendo 180 cópias da proteína estrutural majoritária, VP1, organizada em 90 dímeros, e algumas poucas cópias da proteína VP2, totalizando um tamanho aproximado de 27 a 35 nm (Fig. 4) (SCIPIONE, et al., 2008; TAN, et al., 2008). Os NoVs apresentam genoma formado por RNA fita simples de senso positivo, com um tamanho aproximado de 7,5 a 7,7 quilobases e contendo 3 fases abertas de leitura (ORFs – *open reading frames*). A ORF1 codifica para um grande poliproteína que em sequência é clivada e traduzida em outras seis proteínas importantes, envolvidas na replicação viral, como a polimerase viral, por exemplo. A ORF 2 codifica para a proteína estrutural VP1 e a ORF 3 para a proteína VP2 (ATMAR, 2010; GREEN, 2007).

A expressão do gene que codifica para a proteína estrutural VP1 *in vitro* leva a formação espontânea de partículas virais, sem a presença de genoma viral, as chamadas *virus-like particles* (VLPs), que podem ser utilizadas em ensaios laboratoriais, uma vez que os norovírus não são cultivados *in vitro*, com exceção das cepas murinas (GREEN, 2007).



**Figura 4:** Representação esquemática da estrutura do capsídeo do norovírus. Fonte: Scipione, et al., (2008).

Com relação ao processo de infecção e replicação viral dos NoVs, sabe-se que a entrada do vírus na célula é mediada por interação com receptores específicos, iniciando-se posteriormente a replicação viral através da síntese inicial de uma fita intermediária de RNA antisenso negativa que servirá como molde para a síntese de duas novas fitas de RNA senso positivo, uma completa e uma denominada subgenômica que contém as ORFs 2 e 3. Como os demais vírus que contém genoma de RNA, a replicação dos NoVs está associada a receptores na membrana celular do hospedeiro, sendo que o empacotamento do RNA viral, a maturação e a liberação dos vírions ainda não estão bem compreendidos (ATMAR, 2010; GREEN, 2007).

Os norovírus são capazes de causar infecções em diversos animais, como infecções no trato digestivo em humanos, suínos, bovinos e caninos; infecções no trato respiratório superior, em gatos e doenças hemorrágicas em coelhos (SCIPIONE et al., 2008). O sequenciamento completo do genoma referente ao capsídeo viral permitiu a classificação dos NoVs em cinco genogrupos (G), os que infectam humanos (GI, II e IV), bovinos (GIII), murino (GV), porcino (GII) e felinos (GVI). Devido à grande taxa de recombinação durante o processo de replicação e da inexistência de um consenso classificatório dentro da divisão de cada genogrupo, foi proposta por Zheng et al. (2006) uma subdivisão abaixo do nível de gênero, onde dentro dos cinco genogrupos foram identificados outros 33 genotipos (9 para o GI; 19 para o GII; 2 para o GIII, 2 para o GIV e um para o GV), baseados nas sequências aminoacídicas da proteína do capsídeo VP1 (ATMAR, 2010).

Estudos epidemiológicos demonstram que o genogrupo GII é o mais comumente encontrado, causando 75 a 90% dos casos relatados de norovirose no mundo, principalmente nos meses de inverno (NORDGREN, et al., 2009). Este mesmo genogrupo, GII.4 também é o mais prevalente em países em desenvolvimento (PATEL, et al., 2008).

Considerando que a forma de transmissão dos norovírus se dá principalmente de forma primária através da via fecal-oral e aerossóis e de maneira secundária através de alimentos e água contaminada, fômites e contato pessoa-pessoa, muitos casos registrados ocorrem em locais com grande concentração de pessoas, como cruzeiros, hospitais, escolas e restaurantes (ATMAR, 2010; WOBUS; THACKRAY; HERBERT, 2006). O genogrupo GI foi identificado como causador de surtos associados ao consumo de moluscos bivalves (LE GUYADER, et al., 2009). Dentre as características que permitem que os NoVs sejam tão prevalentes, auxiliando no aparecimento de surtos de gastroenterites, é a

necessidade de uma pequena dose infectante (menos de 10 partículas virais); o longo período que os vírus podem ser excretados nas fezes de uma pessoa infectada, mesmo sem sintomas aparentes, aumentando as chances de uma infecção secundária; a alta estabilidade do vírus em elevadas concentrações de cloro; capacidade de suportar temperaturas extremas de até 60 °C (PATEL et al., 2008).

Ainda não foram desenvolvidas vacinas e/ou medicações específicas para combater as infecções causadas pelos NoV. Além disso, alguns aspectos sobre a biologia destes vírus ainda não estão totalmente elucidados. A principal razão é que ainda não está disponível um modelo de cultivo celular adequado para estudos *in vitro* com os NoV humanos. Nos últimos anos, foram identificados surtos causados por norovírus em outras espécies animais, como gatos, suínos, ratos e camundongos. Destes tipos virais, o norovírus murino (MNV) foi o único que apresentou capacidade de replicação *in vitro* em cultura de células (WOBUS; THACKRAY; HERBERT, 2006). Esta cepa de norovírus está sendo apontada como modelo para inferir as características dos norovírus humanos (não adaptados ao cultivo *in vitro*) para estudos de estabilidade e quantificação *in vitro*, utilizando macrófagos da linhagem RAW 264.7 permissivos à infecção por estes vírus (BAERT, et al., 2008).

### 2.2.4 Vírus da hepatite A

O vírus da hepatite A (HAV), pertencente à família Picornaviridae, gênero *Hepatitisvirus*, é um vírus pequeno, com capsídeo de formato icosaédrico e tamanho aproximado de 30 nm, formado por várias cópias de três ou quatro proteínas VP1, VP2, VP3 e VP4, esta última, importante na formação da partícula viral, porém não se encontra presente nas partículas virais maduras (Fig. 5) (HOLLINGER; EMERSON, 2007). São vírus não envelopados e apresentam genoma RNA de fita simples de polaridade positiva com 7,5 quilobases de tamanho, contendo apenas uma fase aberta de leitura (*ORF*) (CUTHBERT, 2001; PINTÓ, et al., 2010).



**Figura 5:** Foto da estrutura do vírus da hepatite A obtida por microscopia eletrônica de transmissão. Fonte: [www.photosciencelibrary.com](http://www.photosciencelibrary.com)

A organização do genoma é dividida em três partes: **(a)** uma região 5' não codificadora (NCR) que representa cerca de 10% do genoma (734 a 740 nucleotídeos), ligada covalentemente a proteína viral VPg; **(b)** uma única fase aberta de leitura (*ORF*) (2.225 a 2.227 nucleotídeos), que codifica todas as proteínas virais, designadas pelas regiões P1 (proteínas do capsídeo), P2 e P3 (proteínas não estruturais, responsáveis pela síntese de RNA e maturação da partícula viral); e **(c)** uma pequena região terminal 3' NCR (40 a 80 nucleotídeos), ligada a uma cauda poliadenilada (HOLLINGER; EMERSON, 2007).

A replicação do vírus da hepatite A *in vivo* se dá na maioria das vezes em hepatócitos e em células epiteliais do trato gastrointestinal e *in vitro* em outros tipos de células não hepáticas. Por ser um vírus de genoma RNA de senso positivo, a replicação passa por um processo de formação de um RNA intermediário senso negativo, que serve como molde para a formação de uma nova fita de senso positivo. O modo de liberação do vírus após replicação ainda não está bem compreendido, mas acredita-se que não é necessariamente por lise celular, tendo evidências de que também possa ocorrer processo de necrose celular (CUTHBERT, 2001).

O vírus possui genoma bastante conservado, sendo que as cepas circulantes no mundo provêm de um único sorotipo. Esse único sorotipo foi classificado em 6 genotipos baseados em 168 sequências nucleotídicas da região VP1-P2, sendo que os genotipos I (mais prevalente ao redor do mundo, cerca de 80%), II e III, subdivididos posteriormente em subgenotipos (IA, IB, IIIA e IIIB) são encontrados em humanos, enquanto os genotipos IV, V e VI são conhecidos como

causadores de infecções em símios (COSTA-MATTIOLI, et al., 2003; JOTHIKUMAR, et al., 2005; VILLAR, et al., 2006).

No Brasil, estudos epidemiológicos através de caracterização por padrões heterogêneos, mostram uma baixa endemicidade de infecção por HAV nas regiões sul e sudeste, com uma prevalência sorológica (anti-HAV) de 55,7%, porém nas regiões norte e nordeste, estes valores chegam a percentuais de 92,8 e 76,5% respectivamente, sendo que os subgenotipos mais prevalentes são os IA e IB, detectados principalmente em pessoas com infecção aguda por HAV e muitas vezes co-infectadas com HCV (vírus da hepatite C) (VILLAR et al., 2006).

O HAV é o principal causador de hepatites agudas em países desenvolvidos e causa infecções endêmicas em países subdesenvolvidos (JOTHIKUMAR et al., 2005). É um dos vírus entéricos humanos mais comuns e resistentes, causando surtos de hepatite A veiculados pela água e por produtos cultivados nestas, como moluscos (MORGA, et al., 2009). Cerca de 40% dos surtos de hepatite A são causados pelo consumo de moluscos cultivados em áreas contaminadas por descargas de esgotos não tratados (PINTÓ et al., 2010).

A infecção pelo HAV costuma ser assintomática ou subclínica em crianças com até 5 anos de idade, enquanto que em adultos a infecção costuma apresentar sintomas como febre, náuseas, desconforto abdominal e icterícia, sendo que estes podem persistir por até 6 meses (PINTÓ et al., 2010).

A transmissão ocorre principalmente através do contato pessoa-pessoa, sendo transmitido por via fecal-oral, através da ingestão de água ou alimentos contaminados, sendo que a sua ocorrência está diretamente relacionada com as condições sanitárias e socioeconômicas das populações (JOTHIKUMAR et al., 2005; VILLAR et al., 2006). O HAV pode ser excretado nas fezes em grandes concentrações ( $10^6$  a  $10^{10}$  partículas virais por grama) por um período de até 2 semanas após o aparecimento dos sintomas (MUNIAIN-MUJIK, et al., 2002).

Devido as suas características físico-químicas, o HAV é muito resistente, permanecendo viável durante até 5 horas em temperatura ambiente. O fato de não apresentar envelope lipídico o torna até 20% mais resistente à inativação por clorofórmio; é também relativamente resistente a temperaturas de até 60 °C, sendo inativado parcialmente quando incubado por um período de 10 a 12 horas nesta temperatura. Sua infeciosidade pode ser preservada por até um mês quando estocado em temperatura e umidade adequadas, sobrevivendo por dias ou meses quando em contato com diferentes matrizes contaminadas, como águas

de superfície, águas residuais, sedimentos marinhos e ostras (CUTHBERT, 2001; HOLLINGER; EMERSON, 2007).

Desde o início da década de 90, há disponível no mercado uma vacina inativada contra o vírus da hepatite A, onde a imunogenicidade da mesma é comprovada pelo elevado título de anticorpos específicos formados (PINTÓ et al., 2010). Devido ao fato de existir um único sorotipo circulante no mundo, esta vacina torna-se muito eficiente na proteção contra uma possível infecção pelo mesmo, porém, devido aos altos custos de uma vacina inativada, os países subdesenvolvidos e em desenvolvimento, que apresentam os menores índices de condições sanitárias adequadas, estão longe de fornecerem tal alternativa gratuitamente à população de risco.

### **2.3 Metodologias disponíveis para a detecção de vírus no ambiente**

Segundo a Agência Norte-Americana de Proteção Ambiental (EPA), os vírus entéricos constituem o modelo mais significativo, confiável e eficiente a ser usado no monitoramento ambiental, em concordância com os parâmetros bacterianos já vigentes (PUIG, et al., 1994; YEH et al., 2009).

Um dos pontos fundamentais na pesquisa de vírus no ambiente aquático diz respeito ao volume da amostra a ser analisada. Como os vírus estão dispersos no ambiente de forma heterogênea, um volume maior de amostra analisada (em relação às amostras água de grandes mananciais, como água do mar, rios e lagos) assegura uma maior confiabilidade dos resultados de concentração e detecção. Em caso de análises de água residuais, um volume pequeno já pode representar bem a contaminação viral neste tipo de amostra.

Um bom método de concentração requer procedimentos rápidos e simples, que promovam uma boa recuperação, em um volume final pequeno além de baixo custo (BOSCH et al., 2008).

Dentre alguns dos métodos utilizados para a concentração de vírus no ambiente aquático, estão os baseados em troca iônica (filtração em membranas carregadas positiva e/ou negativamente), métodos químicos (precipitação, floculação orgânica, polietilenoglicol), métodos físicos (ultracentrifugação, ultrafiltração) e métodos de imunoafinidade (BOSCH et al., 2008).

A escolha por um determinado método deve levar em conta o tipo de amostra a ser concentrada, a presença e a quantidade de inibidores na amostra, sendo que alguns métodos apresentam um limite

de sensibilidade de detecção diferente de acordo com a origem e a composição da amostra ambiental.

Com o advento das técnicas de biologia molecular, a detecção de vírus no ambiente tornou-se mais sensível e eficaz, permitindo também o estudo das estruturas e funções virais em nível molecular, propiciando o melhor entendimento de como se dá a patogênese dos diferentes vírus. Atualmente, a análise da presença de vírus, pode ser realizada através de várias metodologias, tais como variantes da técnica de PCR, incluindo PCR em tempo real e ensaios de imunofluorescência e de cultura celular, permitindo a detecção da presença do vírus, bem como da viabilidade viral (YEH et al., 2009).

A importância e a necessidade do desenvolvimento de novas metodologias que auxiliem na detecção e verificação da viabilidade de contaminantes virais em diferentes tipos de águas, tais como, águas para o consumo, recreação, águas oceânicas, bem como o devido controle no despejo de efluentes não tratados nos diferentes tipos de águas, é de suma valia, uma vez que as águas vêm sendo constantemente saturadas pela presença destes patógenos, inviabilizando sua utilização nas mais diversas atividades.

O conhecimento e a determinação da contaminação do ambiente aquático por estes patógenos virais permitem garantir a qualidade das águas, às quais a população tem acesso, e de onde depende sua saúde e sobrevivência.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivos Gerais

- Comparar técnicas de concentração viral, detecção e quantificação de genomas de vírus em água do mar utilizando como modelos os adenovírus respiratórios (cepa HAdV 2).
- Aplicar as técnicas padronizadas na detecção e quantificação de adenovírus humanos, poliomavírus, vírus da hepatite A e norovírus humanos, em amostras de água do mar coletadas em diferentes pontos da Ilha de Santa Catarina.

#### 3.2 Objetivos Específicos

- Produzir e titular as suspensões estoques dos vírus que foram utilizados na no trabalho;
- Padronizar a técnica de flocculação utilizando água do mar natural e artificial, semeadas em quantidades conhecidas de adenovírus tipo 2 (HAdV2);
- Avaliar e comparar duas técnicas de concentração viral: flocculação e filtração seguida de reconcentração em filtro Centriprep™ através da quantificação dos genomas virais recuperados pela técnica de PCR em tempo real (qPCR);
- Estabelecer a construção de uma curva padrão na padronização da técnica de PCR em tempo real (quantitativo) para a detecção de norovírus humano, genogrupos I e II;
- Monitor mensalmente pelo período de um ano (Agosto de 2009 a Julho de 2010) para a pesquisa dos vírus mencionados em amostras de água do mar oriundas de pontos de atividades de recreação (balneários) e de sítios de cultivo de moluscos, localizados ao redor da Ilha de Santa Catarina, no município de Florianópolis;
- Utilizar técnicas PCR e *nested*-PCR (qualitativo) e de PCR em tempo real (qPCR e RT-qPCR), na detecção e quantificação dos genomas virais nas amostras de água do mar coletadas;
- Quantificar a presença *E. coli* e analisar parâmetros físico-químicos das amostras de água do mar coletadas;
- Sequenciar um fragmento genômico das amostras de campo positivas para HAdV detectadas previamente por *nested*-PCR qualitativo;
- Avaliar estatisticamente a correlação entre a contaminação viral e bacteriana observadas e os parâmetros físico-químicos coletados;



### 4 MATERIAL E MÉTODOS

#### 4.1 Materiais Biológicos

- As células A549, SVG-A e os macrófagos RAW264.7 utilizados no presente trabalho, bem como os respectivos vírus a que estas células são permissivas, HAdV2, JCPyV e MNV-1, respectivamente, foram gentilmente cedidos pela Professora Dra. Rosina Girones Llop do Departamento de Microbiologia da Universidade de Barcelona (Espanha);
- As células FRHK-4 e os vírus de hepatite A (HAV) cepa HM 175 foram gentilmente cedidos pelo Dr. Keith Williams da Macquarie University, NSW, Austrália;

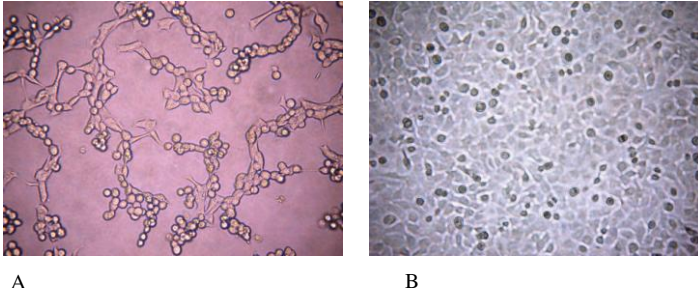
#### 4.2 Cultivo de células

As células utilizadas na produção dos estoques virais através de infecção *in vitro* foram as linhagens celulares A549 (Fig. 6) (células epiteliais derivadas de carcinoma de pulmão humano e permissivas ao adenovírus tipo 2), células SVG-A (Fig. 7) (derivadas de células embrionárias gliais humanas e permissivas ao poliomavírus), FRHK-4 (derivadas de rim de macaco *Rhesus*, e permissivas ao vírus da hepatite A cepas HM175 e HAF 203) e macrófagos RAW264.7 (*Mus musculus*) (Fig. 8) permissivas ao norovírus murino (MNV-1).

O crescimento e manutenção das células foram realizados em garrafas de cultura celular com tamanho de 75 cm<sup>2</sup> utilizando como meio de crescimento, meio essencial mínimo com sais de Eagle (MEM), suplementado com 10% de soro fetal bovino [(SFB) Gibco], 1% de antibióticos e antifúngico [(PSA Cultilab-penicilina G 100U/mL/sulfato de estreptomicina 100µg/mL/anfotericina B 0,25µg/mL)] para as células A549, SVG-A e FRHK-4.

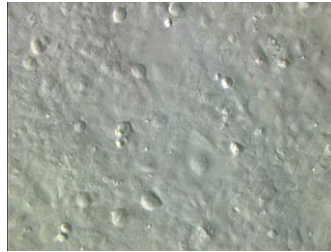
As células RAW264.7, foram cultivadas em meio DMEM (Dulbecco's modified Eagle medium) contendo alta concentração de glicose (4,500mg/L D-glicose), suplementado com 10% SFB, L-glutamina 2mM a 1% (Sigma, Aldrich Chemie, GMBH, Steinheim, Germany), Hepes, 1,5% (Sigma) e aminoácidos não essenciais (1X) (Sigma).

Todas as células cultivadas foram mantidas em estufa a 37 °C, sob atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>.

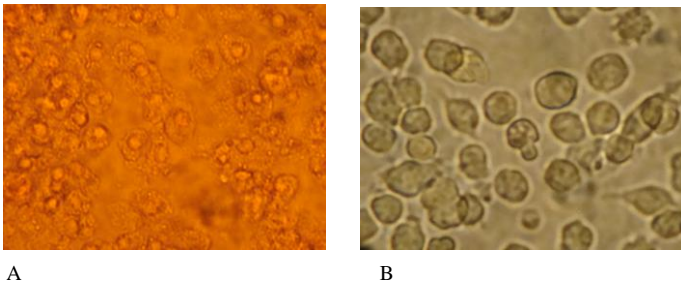


**Figura 6:** Células A549 observadas em microscópio óptico invertido sob o aumento de 100x:

**A)** células infectadas com HAdV2 apresentando efeito citopático característico; **B)** células não infectadas (controle celular).



**Figura 7:** Células SVG-A não infectadas, visualizadas em microscópio óptico invertido sob o aumento de 400x.



**Figura 8:** Células RAW264.7 visualizadas em microscópio óptico invertido sob o aumento de 400x:

**A)** células infectadas com MNV-1, apresentando efeito citopático característico; **B)** células não infectadas (controle celular).

### 4.3 Produção dos estoques virais através de infecção celular *in vitro*

Após atingir confluência, as monocamadas das linhagens celulares foram infectadas a fim de se produzir os estoques dos vírus que foram utilizados no trabalho.

Sobre a monocamada confluenta de cada uma das linhagens celulares permissivas aos respectivos vírus utilizados no trabalho, 1,0 mL do estoque inicial de cada um dos vírus foi adicionado às células e manteve-se por um período de 1 h, a 37 °C, sob atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> para que ocorresse a adsorção viral. Cada um destes vírus estava estocado a -80 °C e apresentavam os seguintes títulos: HAdV2 (6,4 x 10<sup>9</sup> UFF/mL), HAV (4,0 x 10<sup>5</sup> UFF/mL), MNV-1 (6,0 x 10<sup>8</sup> UFP/mL) e JCPyV (4,0 x 10<sup>5</sup> UFF/mL). Em seguida, o inóculo viral foi removido e adicionou-se meio de manutenção (MEM), que consiste dos mesmos reagentes citados no item acima, diferenciando-se apenas pela adição de SFB a 2% de concentração final. As diferentes células foram então mantidas a 37 °C sob atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> e observadas diariamente em microscópio óptico invertido (Olympus IT75) para a visualização da replicação viral. Essa visualização foi monitorada através do aparecimento de efeito citopático (ECP) sobre as células, evidenciando-se assim possíveis mudanças na morfologia das mesmas, caracterizando os efeitos da replicação viral e tendo como controle negativo, culturas de células não infectadas. O tempo de replicação foi variável entre os vírus utilizados, estando de acordo com o ciclo de replicação de cada um dos vírus conforme descrito na literatura.

Quando se observou uma destruição de 100% da monocamada celular, as células foram então congeladas a -80 °C e descongeladas a 37 °C por três vezes, a fim de promover a lise celular de células ainda intactas pela infecção viral e liberar os vírus intracelulares. A suspensão foi transferida para um tubo de 50 mL de capacidade e centrifugada a 350×g por 20 minutos a 4 °C, para remoção dos restos celulares. O sobrenadante dos diferentes vírus foi utilizado para novas infecções em células permissivas a fim de obter-se um estoque viral com alto título. Isto foi observado pela diminuição do tempo para observação de efeitos citopáticos nas células infectadas. Quando esta meta foi atingida, o fluido viral foi titulado, alíquotado em volumes de 2,0 mL e armazenado a -80 °C para posterior utilização nos ensaios de padronização.

#### **4.4 Determinação do título infeccioso dos estoques virais produzidos**

##### **4.4.1 Titulação dos fluidos virais de HAdV2, JCPyV e HAV**

A determinação do título infeccioso do adenovírus (HAdV 2), poliomavírus (JCPyV) e vírus da hepatite A (HAV), foi realizada através do ensaio de imunofluorescência indireta (IFI) com pequenas alterações (BARARDI, et al., 1998).

Este método consiste em utilizar células permissivas aos respectivos vírus, cultivadas em meio de crescimento durante 24h em câmaras de 8 poços (Lab Tek, NUNC), na densidade de  $3,0 \times 10^5$  células/mL. O fluido viral dos diferentes vírus foi diluído seriadamente de  $10^{-1}$  a  $10^{-7}$  em meio MEM e 100µL de cada uma dessas diluições foi inoculada nos poços contendo a monocamada de células, em duplicata e usando como controles negativos a inoculação com meio de manutenção. Após a incubação pelo período de 1h para a adsorção viral, o inóculo foi removido e adicionou-se meio de manutenção como descrito no item acima. O período de incubação para replicação viral foi determinado de acordo com o ciclo de replicação de cada um dos diferentes vírus a serem titulados o que variou de 72 h para o HAdV2, sete dias para o HAV e oito dias para o JCPyV, sendo que estes dois últimos, tiveram seu meio de manutenção substituído na metade do período de incubação, a fim de proporcionar um suprimento de nutrientes às células infectadas.

Após o período de incubação, o meio foi removido e as células foram lavadas duas vezes com solução salina (PBS) e fixadas com metanol gelado a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  duas vezes por 5 min. As células foram reidratadas pela adição de 300 µL de PBS e mantidas à temperatura ambiente (T.A.) por 5 min. Em seguida, removeu-se o PBS e adicionou-se 300 µL de uma solução bloqueadora [PBS, soroalbumina bovina a 1%, (GibcoBRL) e Tween-20 a 0,05%, (Bio-Rad)] a fim de inibir reações inespecíficas com os anticorpos a serem incubados. Esta incubação foi mantida por 30 min à T.A. sob agitação.

Para visualização da infecção provocada pelos vírus nas células, foram utilizados os anticorpos monoclonais MAb8052 (Nihon Millipore<sup>TM</sup>, Tokyo, Japan) na diluição 1:200 em solução bloqueadora para o HAdV2, MON anti-SV40/JC VP41 (gentilmente cedido pela Dra. Rosina Girones da Universidade de Barcelona) diluído 1:10 para o JCPyV e MAB 8241 (Chemicon International Inc.) diluído 1:100 para o HAV. Foram adicionados a cada poço das células fixadas 100 µL destes anticorpos e incubados por 1h a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  sob agitação.

As células foram lavadas três vezes com 300 µL da solução bloqueadora por 5 min sob agitação e mantidas por 15 min em T.A., no escuro e sob agitação com anticorpo anti-IgG de camundongo, conjugado com isotiocianato de fluoresceína (FITC, Sigma) diluído 1:100 em solução bloqueadora. A seguir, as lâminas foram lavadas três vezes com solução bloqueadora, secas à T.A. e montadas em solução de montagem [formalina 5%, NaCl 0,25M, DABCO (1,4-diazabicyclo [2.2.2] octano), pH 8,6; 2,5%]. A análise das lâminas foi realizada em microscópio de epifluorescência (Olympus BX 40). O título viral foi determinado através da contagem do número de células fluorescentes na maior diluição viral, sendo expresso em unidades formadoras de focos (UFF/mL).

### 4.4.2 Titulação do fluido viral do MNV-1

O título viral do norovírus murino (MNV-1) produzido foi obtido através do ensaio de placa de lise (BAE; SCHWAB, 2008).

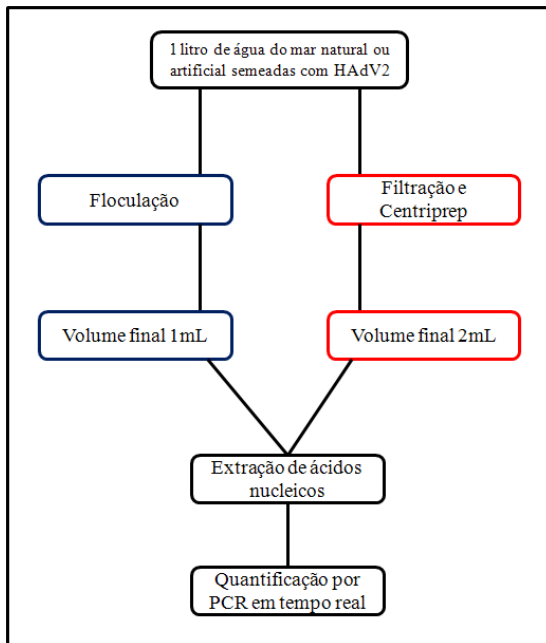
Em placas de seis cavidades, foram cultivados macrófagos RAW264.7 na densidade de  $2,0 \times 10^6$  células/mL. Quando se observou uma confluência celular de 80 a 90%, as células foram lavadas com PBS 1X e em seguida, foi realizada a infecção das células, em duplicata com 500 µL de diluições entre  $10^{-1}$  a  $10^{-7}$  do fluido de MNV-1 produzido e diluído em meio de manutenção (DMEM com 2% SFB). Após o período de adsorção viral, 1 h, a 37 °C, 5% de CO<sub>2</sub>, o inóculo foi removido e adicionou-se uma primeira camada (2 mL) de agarose de baixo ponto de fusão (Sea Plate, Sigma), na concentração 1,5% preparada em PBS e diluída em meio de manutenção completo 2X concentrado (MEM). A adição dessa camada de agarose tem por objetivo a delimitação dos locais onde houve replicação viral e lise celular.

Após aproximadamente 10 min para a solidificação da agarose, as células foram mantidas a 37 °C em estufa durante 48 h, que corresponde ao ciclo de replicação viral, e em seguida, foi adicionada às células, uma segunda camada dessa mesma agarose (2 mL), preparada da mesma forma, mas com a adição de uma solução 0,01% de vermelho neutro (Sigma) para permitir a visualização das placas de lise formadas. Entre um período que variou entre 6 a 8 h, as placas de lise formadas foram contadas sendo que o número destas na maior diluição viral permitiu a estimativa do título viral em UFP/mL (Unidades Formadoras de Placa/mL).

## 4.5 Concentração de água do mar para detecção e quantificação viral

### 4.5.1 Padronização e comparação dos métodos de concentração viral

A Figura 9 mostra um desenho esquemático dos procedimentos realizados para a comparação das metodologias de concentração viral analisadas. Os experimentos foram realizados em triplicata.



**Figura 9:** Fluxograma dos procedimentos realizados na padronização dos métodos de concentração viral com finalidade de se escolher o método que apresentasse a maior porcentagem de recuperação viral.

### 4.5.1a Método da floculação orgânica utilizando uma solução de leite acidificado pré floculado

A metodologia padronizada no presente trabalho baseou-se no método descrito por Calgua et al. (2008), que consiste na concentração de vírus presentes em um determinado volume de amostra (10 L) em um volume concentrado final aproximadamente 10 vezes menor. Esta metodologia apresenta algumas vantagens em relação a outras descritas na literatura, uma vez que utiliza apenas um passo na concentração das amostras, economizando tempo, reagentes e evitando a manipulação excessiva das mesmas, o que pode provocar possíveis perdas nas recuperações virais.

Para a padronização do método de concentração por floculação, foram utilizadas amostras de água do mar artificial, preparada a partir de 33,33g de sal marinho (*Sea Salts*-Sigma) diluídos em 1 L de água destilada; e água do mar natural filtrada (cedida gentilmente pelo Prof. Dr. Rogério Gargioni, do Laboratório de Imunologia Aplicada a Aquicultura, BEG, CCB, UFSC). As amostras de água do mar (artificial e natural), foram semeadas com quantidades conhecidas (controle positivo) do HAdV-2, na concentração de  $6,8 \times 10^8$  cópias genômicas/mL (CG/mL).

Após a adição dos vírus nas amostras de água, as mesmas foram acidificadas com HCl 0,1N a pH 3,5. Em seguida, adicionou-se às amostras 10 mL de uma solução de leite desnatado acidificado (pH 3,5) preparado em água do mar artificial (*Pre-flocculated Skimmed Milk PSM*, 0,1% - Difco), onde neste pH a solução de leite começa a formar flocos. Estes flocos funcionam como partículas sólidas onde os vírus presentes na amostra irão adsorver-se, promovendo assim, a agregação viral aos flocos de leite acidificado. Em seguida, seguiu-se um período de 8 h sob agitação, para melhor promover essa interação dos vírus com as partículas de leite floculado, seguido por um período de 8 h em repouso, onde os flocos de leite sedimentam formando um precipitado. Ao final, o sobrenadante foi aspirado (aproximadamente 900 mL), restando um precipitado que foi centrifugado a  $7.000 \times g$ , a 4 °C, por 30 min. O sobrenadante, após esta centrifugação, foi novamente descartado e o precipitado final (concentrado) foi solubilizado em 1 mL de tampão fosfato ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 0,2M, 1:2v/v, pH 7,5) com o objetivo de neutralizar a amostra que se encontrava em pH ácido. O concentrado final foi alíquotado em tubos de 1,5 mL de capacidade e estocado em freezer -80°C e em seguida, procedeu-se com a extração do material genético, a partir de 200 µL seguido pelas reações de PCR quantitativo

(qPCR) para verificação da recuperação viral obtida pelo método que será descrita em valores de cópias genômicas por litro (CG/L).

### **4.5.1b Método de filtração em membrana eletronegativa e concentração em Centriprep<sup>TM</sup> YM50 (Nihon Millipore)**

Com a finalidade de comparar os resultados obtidos na recuperação viral pelo método padronizado (floculação), foi utilizada a metodologia descrita por Katayama et al. (2002) que consiste na concentração da amostra de água por filtração através de membrana carregada negativamente, seguida de reconcentração do eluato em filtro Centriprep<sup>TM</sup> YM50 (Nihon Millipore). Esta metodologia já se encontrava padronizada no Laboratório de Virologia Aplicada, onde é utilizada para pesquisa de vírus em diferentes tipos de água de superfície.

Para isso, partiu-se de amostras idênticas às utilizadas no item 4.4.1, semeadas com a mesma quantidade de vírus, acidificadas a pH 5,0. As amostras foram filtradas num sistema a vácuo com membrana negativamente carregada (Nihon Millipore) com 90 mm de diâmetro e 0,45 $\mu$ m de porosidade, com um fluxo de 200 mL/min. Como as amostras de água do mar já possuem uma grande quantidade de íons em sua composição (sais), a interação destes íons com a membrana carregada negativamente (interação entre cargas opostas) ocorre de modo a reter as partículas virais à membrana.

Após a passagem da amostra pela membrana, passou-se por esta 350 mL de uma solução de 0,5 mM H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (pH 3,0) para assegurar a retenção das partículas virais. Em seguida procedeu-se à eluição do vírus retidos na membrana por passagem de 10 mL de uma solução de NaOH 1mM (pH 10,5), essa diferença no pH entre as soluções usadas na retenção e eluição, é a que promove a eluição dos vírus retidos na membrana. Em seguida, o filtrado final foi neutralizado com 100 $\mu$ L de solução de 50 mM H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e 100 $\mu$ L de tampão TE 100X (Tris-EDTA, 1mM, pH 8,0).

A amostra concentrada em 10 mL foi reconcentrada utilizando Centriprep YM 50 (Nihon Millipore) que tem por finalidade concentrar as partículas virais em um pequeno volume através de centrifugação. As amostras foram centrifugadas a 1.500 $\times$ g por 10min a 4 °C, obtendo-se um volume final de 2 mL.



### 4.5.2 Avaliação da recuperação viral das amostras artificialmente semeadas, durante as etapas de padronização do método

Os ensaios de padronização do método de floculação, foram realizados em triplicata, obtendo-se nos resultados dos ensaios de PCR quantitativo (qPCR) uma média de recuperação viral em CG/ L. Este resultado foi comparado com os obtidos a partir do inóculo viral inicial (fluido viral semeado nas amostras), ou seja, onde se tem 100% dos inóculos virais que foram semeados nas amostras. Desta forma foi comparada a porcentagem de recuperação, em número de cópias de genoma por litro (CG/L) obtidos na reação de qPCR entre o controle positivo (inóculo 100% de recuperação) com a recuperação obtida nas amostras de águas inoculadas, que passaram pelos processos de semeadura, concentração e detecção, determinando a porcentagem de recuperação do método. Vale ressaltar, que após o processo de concentração viral, as amostras foram submetidas à extração do material genético e quantificação viral, de acordo com os itens subsequentes. O cálculo da porcentagem de recuperação viral obtida pelos dois métodos de concentração utilizados foi realizado utilizando a fórmula abaixo.

$$\text{Eficiência da recuperação viral (\%)} = \frac{\text{Amostra de água semeada com vírus e floculada ou filtrada}}{\text{inóculo inicial semeado na amostra (controle)}} \times 100$$

### 4.6 Extração do material genético viral das amostras de águas concentradas

O material genético viral das amostras foi extraído utilizando-se o kit comercial QIAmp MinElute Virus Spin Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA), (de acordo com as instruções do fabricante), que permite a extração do material genético de vírus tanto de genomas DNA como RNA. Este kit é baseado na metodologia descrita por Boom et al. (1990), com modificações. O método baseia-se na retenção dos ácidos nucleicos a uma matriz constituída por sílica que propicia esta interação. Para tanto, partiu-se de um volume de 200 µL de amostra e obtendo-se ao final da extração, o ácido nucleico contido num volume de 60 µL. Este kit permite a extração de diversas amostras ao mesmo tempo, com o mínimo de manipulação entre elas, diminuindo possíveis contaminações cruzadas entre amostras distintas.

### 4.7 Detecção dos vírus pesquisados utilizando PCR qualitativo

No caso da avaliação da presença de HAdV, os materiais genéticos extraídos das amostras de campo foram submetidos além da reação de qPCR (quantitativo) à reação de PCR qualitativo, conforme descrito em 4.7.1, visando à obtenção de um produto de PCR de maior tamanho molecular para ser subsequentemente utilizado nas reações de sequenciamento das amostras positivas para estes vírus. Todas as reações foram realizadas com o material genético diluído na base 10, com o objetivo de se reduzirem possíveis inibidores da reação.

#### 4.7.1 Reação de PCR qualitativo para HAdV

Para detecção dos adenovírus humanos foi utilizado o protocolo descrito por Allard et al. (1992), utilizando-se os iniciadores hexAA1885 e hexAA1913 em uma primeira reação de PCR gerando um produto de PCR de 300pb e em uma segunda reação (*nested*-PCR), utilizou-se o par de iniciadores nexAA1893 e nexAA1905, que anelam em uma região interna ao produto de PCR gerado na primeira reação, gerando um produto de 142pb, aumentando assim a sensibilidade na detecção do vírus. As sequências dos iniciadores utilizados estão descritas no Quadro 1. Este conjunto de iniciadores utilizados amplifica uma região do genoma viral que codifica a proteína *hexon* do capsídeo viral, sendo esta, uma região conservada em todos os subgêneros de adenovírus.

Resumidamente, cinco microlitros do DNA extraído da amostra foram adicionados a uma mistura contendo condições salinas adequadas, 10 pmoL de cada iniciador, 0,1 mM de dATP, dCTP, dTTP e dGTP; 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 1U/μL da enzima Taq DNA polimerase (Promega Corporation, Madison, Wi, USA), totalizando um volume de 25 μL. A reação foi realizada iniciando-se por um passo de desnaturação a 94 °C por 5 min, seguindo-se de 40 ciclos de 94 °C por 1 min, 56 °C por 1 min e 72 °C por 45 s e uma extensão final de 7 min a 72 °C.

Para a reação de *nested*-PCR, 1 μL do produto de PCR da primeira reação foi adicionado a um reação idêntica a citada acima, excetuando-se pela adição dos iniciadores internos nexAA18893 e nexAA1905 em substituição aos primeiros iniciadores citados. A reação consistiu de 25 ciclos de desnaturação a 94 °C por 1 min, 57 °C por 1 min para anelamento e 72 °C por 45 s para extensão, seguido de uma extensão final de 5 min a 72 °C.

**Quadro 1: Sequências dos iniciadores utilizados nas reações de PCR e *nested*-PCR qualitativo de HAdV**

	Iniciadores	Sequência 5'-3'
Externos	hexAA1885	GCCCGCAGTGGTCTTACATGCACATC
	hexAA1913	CAGCACGCCGCGGATGTCAAAGT
Internos ( <i>nested</i> )	nexAA1893	GCCACCGAGACGTACTTCAGCCTG
	nexAA1905	TTGTACGAGTACGCGGTATCCTCGCGGTC

#### 4.8 Visualização dos produtos amplificados gerados

Os produtos amplificados pelas reações de PCR e *nested*-PCR foram analisados por eletroforese de gel de agarose a 1% e preparado em tampão TBE 1X (Trizma base 9 mM, Ácido bórico 9 mM, EDTA 2 mM). O produto de PCR foi aplicado juntamente com um tampão de carregamento (*Loading buffer* 6X- Promega) e um corante intercalante de DNA (*Gel Red*-BioAmerica Inc) em uma mistura final de 10  $\mu$ L. Foi utilizado como padrão de tamanho molecular, o marcador de 100 pb *ladder* (Promega) aplicado em cada conjunto de amostras analisadas. A corrida eletroforética foi submetida a um potencial elétrico de 100V.

Após a corrida, os géis foram visualizados sob luz ultravioleta em transluminador U.V. (Pharmacia Biotech) e fotodocumentados com equipamento Kodak Image System.

#### 4.9 Reação de transcriptase reversa (RT) para a obtenção de DNA complementar (cDNA) para a realização da reação de PCR quantitativo para HuNoV

Previamente à reação de qPCR para o HuNov, foi realizada uma reação transcrição reversa (RT), utilizando-se iniciadores randômicos para a síntese do DNA complementar (cDNA). Partindo-se de 5  $\mu$ L do RNA purificado, em uma reação de volume final de 25  $\mu$ L, o RNA foi primeiramente desnaturado a 97 °C por 5 min e resfriado por 2 min em gelo e depois adicionado à mistura da reação contendo 20 pmoL de iniciador randômico (Promega), 0,6 mM de dATP, dCTP, dTTP e dGTP; 100 U/ $\mu$ L de da enzima transcriptase reversa (MMLV-Promega), 20 U de inibidor de RNase (RNAsin-Promega), em condições salinas adequadas e incubação a 37 °C por 60 min em termociclador.

#### 4.10 Construção das curvas-padrão para a padronização da reação de PCR em tempo real (qPCR) para norovírus humano, genótipos I e II

Para a produção das curvas-padrão aplicadas na quantificação por qPCR para HuNoV genótipos I e II, foram utilizados duas seqüências “amplicons” de cDNA oriundas de RNA molde dos genótipos GI e GII cada um, clonados separadamente no vetor de clonagem PCR 2.1-TOPO (gentilmente cedidos pela Dra. Marize Pereira Miagostovich, Laboratório de Virologia Comparada e Ambiental, Fiocruz, RJ).

Bactérias competentes *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  (Invitrogen *Life Technologies*, Carlsbad, CA, USA) foram transformadas com os plasmídeos GI e GII (de acordo com as instruções do fabricante). Após a seleção das bactérias transformadas, uma colônia foi crescida em meio Luria Bertani (LB) líquido (LGC Biotecnologia), com de ampicilina a 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de concentração final (Sigma) e mantidas a 37 °C em estufa, sob agitação pelo período da noite. Após a verificação do crescimento bacteriano, foi realizada uma extração do DNA plasmidial, utilizando kit *Miniprep DNA Purification System* (Promega), de acordo com as instruções do fabricante, e o DNA foi quantificado por espectrofotometria e submetido à eletroforese em gel de agarose 0,7% (de acordo com o item 4.8) para verificação da presença do insertos.

Em seguida, com o objetivo de reduzir a possibilidade de contaminação por DNA plasmidial no laboratório, 10  $\mu\text{g}$  de DNA extraído dos plasmídeos foram tratados com a enzima de restrição BamH1 (Promega), de acordo com as instruções do fabricante para a linearização dos plasmídeos. O produto da reação enzimática foi purificado e quantificado novamente. A quantificação foi realizada a 260nm de comprimento de onda em aparelho NanoVue (GE Health Care) utilizando 2  $\mu\text{L}$  do plasmídeo linearizado.

De acordo com os valores da quantificação média obtida, fornecida em  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ , pode-se transformar esta em número de cópias do genoma por  $\mu\text{L}$  (CG/ $\mu\text{L}$ ) de acordo com a fórmula:

$$\text{Número de cópias}/\mu\text{L} = \frac{\text{Concentração (g}/\mu\text{L)}}{\text{número de pares de base do plasmídeo com o inserto} \times 660} \times 6,022 \times 10^{23}$$

Onde 660 = peso molecular aproximado de 1pb e  $6,022 \times 10^{23}$  = Número de Avogrado

Após a determinação do número de cópias de genoma viral contidas em determinada massa de plasmídeo, foram realizadas diluições seriadas na base 10 do plasmídeo preparadas em tampão TE (Tris-HCl, EDTA; pH 8,0), com concentrações variando entre  $5 \times 10^8$  a  $5 \times 10^{-2}$  de cópias de genomas (GC) em  $5 \mu\text{L}$ . Ao final do qPCR e, sendo as quantidades de DNA proporcionais aos ciclos de amplificação, essas distintas concentrações foram fracionadas em alíquotas de  $20 \mu\text{L}$  e armazenadas a  $-80 \text{ }^\circ\text{C}$  para uso como curva padrão de DNA nos ensaios de qPCR para HuNoV.

Foi realizada em sequência, uma reação de qPCR para cada um dos genogrupos GI e GII do norovírus, para confirmação do número de cópias de genoma em cada uma das diluições preparadas.

Em placas de 96 cavidades (MicroAmp - Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA), foram adicionados  $5 \mu\text{L}$  de cada uma das diluições de DNA, em triplicatas, contendo juntamente,  $20 \mu\text{L}$  da reação de qPCR, que, além dos reativos necessários para a reação (sais, nucleotídeos e enzima), foram adicionados os iniciadores e sondas TaqMan específicos para cada um dos genogrupos, totalizando um total de  $25 \mu\text{L}$  de reação. Os iniciadores e sondas utilizados (Quadro 2) estão de acordo com o protocolo descrito por Kageyama, et al. (2003) e foram usados nas concentrações finais de  $0,25 \mu\text{M}$  para os iniciadores e  $0,6 \mu\text{M}$  para as sondas. Em seguida, a placa foi selada com filme óptico (Applied Biosystems) e inserida no aparelho StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems). O perfil de temperaturas utilizado no qPCR para os dois genogrupos foi de 2 min a  $50 \text{ }^\circ\text{C}$ , seguido de 10 min a  $95 \text{ }^\circ\text{C}$ , e 45 ciclos de desnaturação a  $94 \text{ }^\circ\text{C}$  por 20 s, e de  $56 \text{ }^\circ\text{C}$  por 1 min tanto para anelamento dos iniciadores e sonda quanto para extensão dos iniciadores.

**Quadro 2: Iniciadores e sondas utilizados na reação de qPCR para os norovírus humanos genogrupos I e II**

	Iniciadores e sondas	Sequência 5' - 3'
Genogrupo GI	G1F G1R	CGYTGGATGCGNTTYCATGA CTTAGACGCCATCATCATTYAC
	Sonda G1aP G1bP	FAM-AGATYGCGATCYCCTGTCCA-TAMRA FAM-AGATCGCGGTCTCCTGTCCA-TAMRA
Genogrupo GII	G2F G2R	CARGARBCNATGTTYAGRTGGATGAG TCGACGCCATCTTCATTCACA
	Sonda G2 P	FAM-TGGGAGGGCGATCGCAATCT-TAMRA

R = A/G, B = C/G/T, Y = C/T e N = A/C/T/G

#### 4.11 Reação de PCR em tempo real (qPCR e RT-qPCR) para a quantificação dos genomas dos vírus pesquisados

Para melhor descrição das reações de PCR quantitativo (qPCR e RT-qPCR), serão explicadas em separado as reações realizadas para a detecção do vírus de genoma DNA (adenovírus humano e poliomavírus) e os vírus de genoma RNA (vírus da hepatite A e norovírus murino). Para a quantificação destes vírus foram utilizadas curvas-padrão de plasmídeos contendo as sequências gênicas virais clonadas que já haviam sido preparadas e utilizadas anteriormente no Laboratório de Virologia Aplicada da mesma forma para a curva-padrão de norovírus realizada no presente trabalho e descrita no item 4.10.

Vale ressaltar, que as reações de qPCR realizadas na quantificação de norovírus humano (HuNoV) em amostras de campo, foram realizadas de acordo com o item acima, onde a amostra adicionada, foi o cDNA obtido através de uma reação de transcrição reversa (RT) de acordo com o item 4.9 a partir do RNA extraído da amostra.

##### 4.11.1 Reação de qPCR para a detecção de HAdV e JCPyV

A quantificação do número de partículas virais (cópias de genoma) detectadas para HAdV e JCPyV (vírus de DNA), foi realizada por PCR em tempo real de acordo com os protocolos descritos por Hernroth et al. (2002) e Pal et al. (2006) respectivamente. Para tanto, utilizou-se em uma reação de 25 µL de volume final, 12,5 µL de TaqMan Universal PCR Master Mix, 2X concentrada (Applied Biosystems), mistura essa que contém os reativos necessários para a

reação de PCR, como a enzima Taq DNA Polimerase, oligonucleotídeos (dATP, dCTP, dTTP e dGTP) além das condições salinas adequadas.

Na reação de qPCR para o adenovírus, juntamente com a *Master Mix* foram adicionados os iniciadores ADF e ADR na concentração final de 0,9  $\mu\text{M}$  e sonda TaqMan ADP1 na concentração final de 0,225  $\mu\text{M}$ . Para a reação de qPCR realizada para o poliomavírus, foram adicionados os iniciadores JE3F e JE3R na concentração final de 1,0  $\mu\text{M}$  e sonda TaqMan JE3P na concentração final de 0,6  $\mu\text{M}$ .

Os ensaios foram realizados em duplicata em placa de 96 cavidades (MicroAmp Applied Biosystems), contendo também controles negativos, consistindo de apenas os reagentes sem adição de ácidos nucléicos provenientes das amostras. Todas as reações de qPCR foram preparadas em sala livre de DNA e em outra sala foram adicionadas as amostras de DNA (10  $\mu\text{L}$ ), totalizando o volume final de reação (25  $\mu\text{L}$ ). Em outro ambiente, destinado à manipulação com plasmídeos, foram adicionados às cavidades previamente estipuladas, onde não haviam sido adicionadas amostras de DNA, 10  $\mu\text{L}$  dos DNAs padrão (*standards*) clonados em plasmídeos, com as sequências-alvo de cada um dos vírus pesquisados, HAdV ou JCPyV. Esses padrões foram adicionados em diferentes concentrações de cópias genômicas ( $10^2$  a  $10^6$ , por exemplo) e em duplicata, de modo que os genomas contidos nas amostras que estavam sendo analisadas fossem quantificados com base nos parâmetros dos genomas já previamente quantificados nos padrões.

Em seguida, a placa foi devidamente selada com filme óptico (Applied Biosystems) e inserida no aparelho StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems). O perfil de temperaturas utilizado no qPCR para os dois vírus foi de 2 min a 50 °C, seguido de 10 min a 95 °C para ativação e inativação respectivamente da enzima UDG que serve como um controle de contaminação por DNA previamente presente na amostra antes da amplificação seguido por 45 ciclos de desnaturação a 95 °C por 15 s, e anelamento dos iniciadores e sonda e extensão ambos a 60 °C por 1 min. O Quadro 3, mostra as sequências dos iniciadores e sondas utilizadas nas reações de qPCR para o HAdV e JCPyV.

**Quadro 3: Iniciadores e sondas utilizados na reação de qPCR para HAdV e JCPyV**

	Iniciadores e sondas	Sequência 5' - 3'
Adenovírus	ADF ADR	CWTACATGCACATCKCSGG CRCGGGCRAAYTGCACCAG
	Sonda ADPI	FAM-CCGGGCTCAGGTACTCCGAGGCGTCCT-TAMRA
Poliomavírus	JE3F JE3R	ATGTTTGCCAGTGATGATGAAAA GGAAAGTCTTTAGGGTCTTCTACCTTT
	Sonda JE3P	FAM-AGGATCCCAACACTCTACCCACCTAAAAAGA-TAMRA

**4.11.2 Reação de RT-qPCR para a detecção de vírus da hepatite A (HAV) e norovírus murino (MNV-1)**

As reações de qRT-PCR realizada para os vírus de RNA, vírus da hepatite A e norovírus murino baseou-se nos protocolos descritos por Jothikumar et al. (2005) e Baert et al. (2008), respectivamente. Sendo assim, utilizou-se o kit QuantiTect Probe RT-PCR (Qiagen), que contém a enzima transcriptase reversa (RT), necessária para que ocorra a transcrição do RNA da amostras para cDNA, e uma mistura dos reativos: *HotStartTaq* DNA Polimerase, oligonucleotídeos (dATP, dCTP, dTTP e dGTP), além das condições salinas adequadas. Este kit permite a realização da amplificação em apenas um passo, ou seja, primeiramente as amostras são submetidas a uma temperatura específica, onde ocorre a ativação da enzima RT e realização do processo de transcrição reversa e após esse processo, as amostras seguem com o ciclo normal de amplificação, ou seja, o PCR propriamente dito.

Para o HAV partiu-se de um volume inicial de 12,5 µL da mistura dos reativos do kit (2X concentrado), em seguida adicionou-se os iniciadores HAV-F e HAV-R na concentração final de 0,25 µM e a sonda TaqMan HAVP na concentração final de 0,15 µM, num volume final de 15 µL, sendo que após a adição da amostra (10 µL), o volume final da reação foi de 25 µL.

Para o MNV-1, iniciou-se com um volume de 12,5 µL da mistura dos reativos do kit (2X concentrado), após foram adicionados os iniciadores MNV-F e MNV-R na concentração final de 0,2 µM e sonda TaqMan MNVP na concentração final de 0,2 µM e após adição da amostra de RNA, num volume final de 25 µL (Quadro 4).

O perfil de temperaturas utilizado na reação de qRT-PCR para o HAV foi de uma temperatura inicial de 50 °C por 30 min para a realização da RT, seguido por desnaturação a 95 °C por 15 min e



amplificação em 45 ciclos de 95 °C por 10 s (desnaturação), 55 °C por 20 s (anelamento) e extensão a 72 °C por 15 s. Para o MNV-1, além da temperatura inicial de 50° por 30 min para a reação de RT, seguido de desnaturação a 95 °C por 10 min e 40 ciclos de amplificação iniciando a 95 °C por 15 s para desnaturação e 60 °C por 1 min para anelamento e extensão.

A reação foi realizada em sala livre de DNA e RNA em placa de 96 cavidades (MicroAmp Applied Biosystems) e em outra sala adicionaram-se as amostras de RNA (HAV ou MNV-1). Transportou-se a placa até uma sala própria para a manipulação de plasmídeos (padrões), e estes foram adicionados (10 µL) contendo quantidades conhecidas de cópias de genomas. Em seguida procedeu-se a inclusão da placa no aparelho, como citado no item acima 4.11.1.

**Quadro 4: Iniciadores e sondas utilizados na reação de RT-qPCR para HAV e MNV**

	Iniciadores e sondas	Sequência 5' - 3'
HAV	HAV-F	GGTAGGCTACGGGTGAAAC
	HAV-R	GCGGATATTGGTGAGTTGTT
	Sonda HAVP	FAM-CTTAGGCTAATACTTTATGAAGAGATGC-TAMRA
MNV-1	MNV-F	CACGCCACCGATCTGTTCTG
	MNV-R	GCGCTGCGCCATCACTC
	Sonda MNVP	FAM-CGCTTTGGAACAATG-MGBNFQ

#### **4.12 Sequenciamento do genoma do vírus HA $\nu$ V**

Amostras de campo que foram positivas para adenovírus humano nas reações de PCR qualitativo (4.7.1) e representando oito diferentes pontos de coletas analisados no trabalho foram selecionadas e submetidas ao sequenciamento para determinar os possíveis sorotipos mais frequentemente encontrados nas amostras.

A partir do produto de PCR submetido à eletroforese, as bandas do material amplificado foram cortadas do gel e o material genético destas extraído utilizando o kit *MinElute Gel Extration* (Qiagen). Este procedimento permitiu selecionar a banda no tamanho específico e esperado.

As reações de sequenciamento foram realizadas em colaboração com a EMBRAPA Suínos e Aves, localizada na cidade de Concórdia, SC sob a supervisão do Dr. Paulo Augusto Esteves. Para o sequenciamento, utilizou-se o kit *BigDye Terminator Cycle Sequencing*

ver. 3.1 (Applied Biosystems) e o equipamento 3130xl *Genetic Analyzer* (Applied Biosystems) de acordo com as instruções do fabricante.

Resumidamente, 2  $\mu$ L do material genético extraído do gel de agarose, que consistia dos fragmentos de material genético amplificado de 142 pb obtidos na reação de *nested*-PCR foram utilizados no preparo das reações de sequenciamento, que consistiam de 3,2 pmol de cada um dos iniciadores (neXAA1893 ou neXAA1905), em reações separadas, juntamente com o tampão da reação e o *BigDye*, totalizando um volume final de 20  $\mu$ L. As reações foram dispostas no termociclador e submetidas a 32 ciclos de temperaturas a 94 °C por 35 s, 50 °C por 30 s e 60 °C por 4 min. Após esta etapa, as amostras foram purificadas através da utilização do kit *BigDye*<sup>®</sup> *XTerminator*<sup>™</sup> *Purification* (Applied Biosystems).

As sequências obtidas foram analisadas pelo programa *Sequence Scanner* ver. 1 (Applied Biosystems), alinhadas e editadas através do programa *BioEdit* ver. 7.0.5 (HALL, 1999). As sequências do presente trabalho foram comparadas com outras sequências nucleotídicas depositadas no banco de dados do GenBank usando o programa BLAST do Centro Nacional para Informações Biotecnológicas (NCBI). As análises comparativas foram realizadas através da utilização do programa MEGA ver. 3.1 (KUMAR; TAMURA; NEI, 2004). A árvore filogenética foi construída utilizando o método de *neighbor-joining* e com um *bootstrap* de 500 repetições.

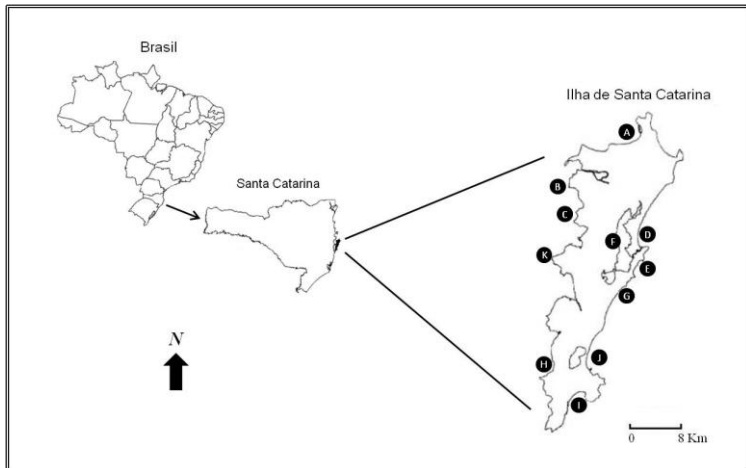
### 4.13 Monitoramento mensal de HAdV, JCPyV, HuNoV e HAV em amostras de água do mar

A metodologia padronizada foi empregada na verificação da presença dos vírus HAdV, JCPyV, HuNoV e HAV em amostras de 10 L de água do mar, coletadas nos locais que servem para atividades de recreação (balneários) e pontos que servem para o cultivo de moluscos, localizados no município de Florianópolis, a fim de se avaliar a presença dos mesmos como indicadores de contaminação viral no ambiente aquático.

Os pontos de coletas de amostras de água localizaram-se em diferentes locais ao redor da Ilha de Santa Catarina. Três pontos no Norte (Praias de Canasvieiras, Sambaqui e Santo Antônio de Lisboa), quatro no Leste (Praias da Joaquina, Mole, Barra da Lagoa e Lagoa da Conceição), três no Sul (Praias do Ribeirão da Ilha, Armação e Pântano do Sul) e um no centro (Ponta do Coral, Beira-Mar Norte). Esses locais destinam-se a uma ou mais das seguintes práticas: banho, esportes, pesca e cultivo de moluscos (Fig. 10).

As coletas foram realizadas mensalmente, durante o período de um ano (Agosto de 2009 a Julho de 2010). As amostras de água foram coletadas em um volume de 10 L por ponto analisado e transportadas em galões de PVC até o devido processamento no laboratório, onde foram concentradas através da metodologia padronizada (floculação), como descrito no item 4.5.1a, totalizando o volume final do concentrado em aproximadamente 10 mL. Em seguida as amostras concentradas passaram pelo procedimento de extração de material genético e detecção por reações de *nested*-PCR e qPCR e RT-qPCR, como descrito nos itens 4.6; 4.7.1; 4.10; 4.11.1 e 4.11.2 respectivamente.

Durante as coletas, usou-se como controle positivo do processamento da amostra, uma amostra de 1 L de água do mar de um dos pontos de coleta, selecionada por sorteio. Esta amostra foi semeada com quantidades conhecidas de 2 vírus pesquisados no presente trabalho, HAdV2 e o MNV-1, como substituto para o HuNoV. E os vírus JCPyV e HAV foram utilizados como controles positivos nos procedimentos de extração e amplificação gênica. Este procedimento visou garantir que as amostras que campo tiveram o procedimento de concentração viral realizado corretamente.



**Figura 10:** Mapa da Ilha de Santa Catarina. Locais de coletas de água do mar: A) Canasvieiras; B) Sambaqui; C) Santo Antônio de Lisboa; D) Barra da Lagoa; E) Mole; F) Lagoa da Conceição; G) Joaquina; H) Ribeirão da Ilha; I) Pântano do Sul; J) Armação; L) Beira-Mar Norte.

### **4.14 Medida dos parâmetros físico-químicos das amostras de campo coletadas**

No momento das coletas, os seguintes parâmetros físico-químicos das amostras de águas foram aferidos: pH, temperatura, salinidade e oxigênio dissolvido, estes dois últimos, analisados através da utilização de um kit comercial para água do mar (Alfa Kit, Florianópolis, SC, Brasil). Dados relevantes sobre as condições climáticas no momento da coleta foram apontados com base em pesquisa no portal do Instituto de Pesquisas Espaciais (INPE), através da verificação de tais dados como presença de precipitação e temperatura ambiental. Esses dados foram coletados para averiguar uma possível correlação entre a presença de determinados patógenos virais e ou bacterianos com as condições climáticas e ambientais.

### **4.15 Análise da presença de *E. coli* nas amostras de água coletadas**

No momento da coleta, uma parte das amostras de águas coletadas foi destinada à análise de coliformes fecais, permitindo assim uma correlação entre os resultados obtidos com os preconizados pela legislação ambiental (resoluções CONAMA nº 274 de 2000 e 357 de 2005). Para tanto, 1 mL das amostras de campo coletadas, foram colocados em contato com meio de crescimento presente na cartela do kit Petrifilm™ *E. coli*/Coliform Count (EC) Plate (3M) e incubados em estufa a 37 °C. As observações do crescimento de colônias azuis com gás (*E. coli*) foram acompanhadas por um período de 24 h, onde as colônias que cresceram foram contadas e marcadas, seguido de observação por mais 24 h. O número total de colônias positivas permitiu expressar o resultado em Unidades Formadoras de Colônias (UFC/100 mL).

### **4.16 Análise estatística**

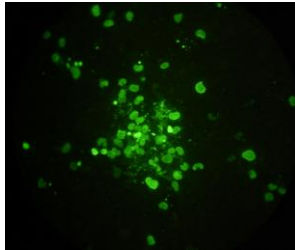
Foi usado o teste de Correlação de Pearson para avaliar a relação entre a presença de vírus, coliformes fecais e parâmetros físico-químicos utilizando as médias geométricas e avaliando o padrão sazonal. Para avaliar a interação entre a detecção viral, a presença de coliformes fecais e os valores obtidos nas análises dos parâmetros físico-químicos, foi realizado um teste de medidas repetidas (ANOVA), visando verificar a relação destes resultados em relação aos locais de coleta ou estação do ano, verificando a possível ocorrência de um padrão sazonal e quando necessário foi realizado o teste de Tukey

(múltiplas comparações). Em todas as análises o nível de significância adotado foi 5%. Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa *Statistica* versão 9 (StatSoft South America), gentilmente cedido pelo Prof. Dr. Antônio de Pádua Carobrez, do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, CCB, UFSC.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Titulação viral pelo método da imunofluorescência indireta (IFI)

O método da imunofluorescência indireta foi utilizado para a titulação dos estoques virais produzidos de HAdV2, JCPyV (Fig 11) e HAV cepa 175, a partir da contagem do número de focos fluorescentes na maior diluição observada, obtendo-se os valores de  $6,4 \times 10^9$  UFF/mL,  $4,0 \times 10^5$  UFF/mL e  $3,0 \times 10^4$  UFF/mL para cada um destes vírus respectivamente e que foram utilizados para diferentes finalidades no presente trabalho.



**Figura 11:** Imunofluorescência de células SVG-A infectadas pelo polimavírus cepa JC, incubadas primeiramente com o anticorpo monoclonal MON anti-SV40/JC VP41 e posteriormente com um anti-IgG de camundongo conjugado a FITC (isotiocianato de fluoresceína). Aumento 100x em microscopia de fluorescência evidenciando-se ao centro a formação de um foco de células fluorescentes.

### 5.2 Titulação viral pelo método da contagem de placas de lise

Este método foi utilizado para a determinação do título viral do MNV-1, obtendo-se o valor de  $6,0 \times 10^8$  UFP/mL. A Figura 12 ilustra as placas de lise formadas na obtenção do título viral do MNV-1.



**Figura 12:** Formação de Placas de Lise após a infecção de células RAW 264.7 por MNV-1, visualizadas em imagem digital sem aumento.

### 5.3 Padronização da metodologia de floculação pelo leite acidificado e comparação da recuperação viral com o método de filtração em membrana eletronegativa

A Figura 13 mostra os valores da recuperação viral em cópias genômicas por litro (CG/ L), obtidos nas amostras de água do mar natural e artificial submetidas aos dois métodos de concentração viral descritos: o método padronizado, de floculação orgânica utilizando leite desnatado acidificado e o método já padronizado no Laboratório de Virologia Aplicada, de filtração de água em membrana eletronegativa, ambos descritos nos itens 4.5.1a e 4.5.1b. Os resultados são referentes a três experimentos independentes realizados para os dois procedimentos de concentração viral.

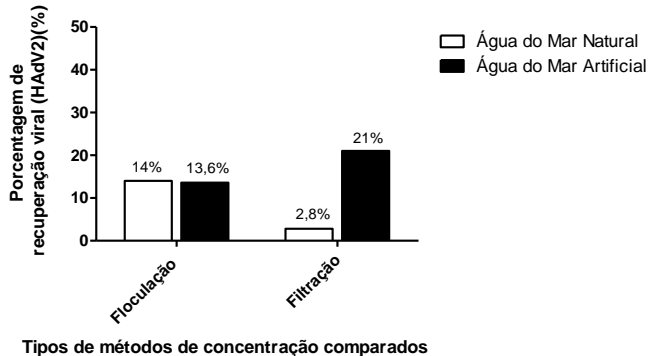
Após a concentração das amostras e extração do material genético, estes foram submetidos à reação de PCR em tempo real (qPCR) para a quantificação do HAdV2 semeado nas amostras, determinando-se assim, a recuperação viral de ambos os métodos. Esta quantificação foi realizada em duplicata com o DNA extraído puro e diluído 1:10 em água tratada com DEPC (dietilpirocarbonato), visando a verificação e diminuição de possíveis inibidores das reações enzimáticas presentes nas amostras concentradas.

Da quantidade de HAdV2 semeado,  $6,8 \times 10^8$  CG/ mL, separou-se uma alíquota de 1 mL que serviu como controle do inóculo, representado 100% de recuperação. Os resultados da quantificação mostraram que a média de vírus semeado nas amostras foi de  $1,15 \times 10^9$  CG/ L. Para as amostras submetidas à floculação, a média de recuperação viral em água do mar foi de  $1,60 \times 10^8$  CG/ L e para água do mar artificial foi de  $1,57 \times 10^8$  CG/ L, isto representa respectivamente uma porcentagem de recuperação de 14% e 13,6% (Fig. 13).

Para as amostras submetidas ao processo de filtração, os valores de recuperação viral foram de  $3,33 \times 10^7$  e  $2,42 \times 10^8$  CG/ L para as

amostras de água do mar natural e artificial respectivamente, com porcentagens de recuperação de 2,8% e 21% (Fig. 13).

O método de floculação orgânica foi eleito como método de concentração viral para amostras de água do mar natural no trabalho de campo realizado. Na verificação de possível inibição da reação de qPCR, determinou-se a utilização do material genético na diluição 1:10 para todas as demais reações envolvendo a quantificação viral nas amostras de campo apresentando esta diluição o menor indício de inibição na reação de qPCR.



**Figura 13:** Porcentagens de recuperação viral obtidas na concentração de HAAdV2 em amostras de água do mar natural e artificial submetidas às duas metodologias de concentração, o método de floculação orgânica com leite acidificado e o método de filtração e reconcentração em Centriprep.

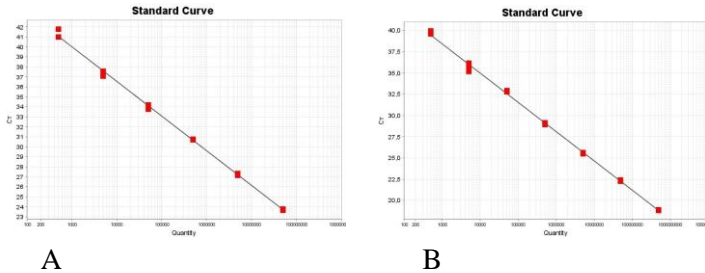
#### 5.4 Obtenção das curvas-padrão referentes à quantificação do DNA do plasmídeo PCR 2.1-TOPO contendo sequências clonadas de cDNAs oriundos de RNA dos genótipos GI e GII de norovírus humanos

A Figura 14A e 14B ilustram as retas de regressão linear obtidas após a realização da reação de qPCR no estabelecimento da curva-padrão para o HuNoV genótipo GI e GII respectivamente, para serem usadas como referência na quantificação de norovírus humanos nas amostras de campo.

Para a curva-padrão do NV GI, o coeficiente de regressão linear ( $R_2$ ) obtido foi de 0,998 e inclinação da reta de -3,475. Para a curva-padrão do NV GII, o valor de  $R_2$  foi de 0,998, com inclinação da reta de -3,436. Estes valores denotam uma proporcionalidade direta entre o número de genomas detectados em relação a fluorescência emitida.

As curvas-padrão obtidas demonstraram que as concentrações de sondas e iniciadores utilizados para ambos os qPCR foram ideais na otimização dos protocolos.

Foram aliqüotados valores que eram correspondentes desde a  $5,0 \times 10^1$  até  $5,0 \times 10^8$  cópias genômicas em um volume de  $5,0 \mu\text{L}$ . As aliqüotas foram de  $20 \mu\text{L}$  (suficientes para ensaios em triplicatas) e foram estocadas a  $-80^\circ\text{C}$  para a posterior utilização nas reações de qPCR.



**Figura 14:** A) Curva-padrão obtida para o Norovírus GI e B) Curva-padrão obtida para o Norovírus GII. No eixo X tem-se quantidade de cópias genômicas e no eixo Y o ciclo de amplificação (Ct), ponto onde se inicia o sinal de amplificação.

### 5.5 Detecção de HAdV através *nested*-PCR qualitativo

Durante o presente trabalho, realizou-se a reação de *nested*-PCR qualitativo para avaliar-se da presença de adenovírus humanos e também, visando a obtenção de um produto de PCR para posterior sequenciamento das amostras.

A Tabela 1, resume os resultados obtidos na detecção de HAdV nas amostras de campo, sendo que tais produtos de PCR foram obtidos utilizando amostras de DNA na diluição 1:10, a partir da constatação de que essa diluição mostrou-se mais eficaz no processo de amplificação gênica, apresentando menor interferência de inibidores da reação.

De um total 132 amostras analisadas, 22 foram positivas (16%) para HAdV na reações de PCR qualitativo. As maiores porcentagens de amostras positivas foram observadas nos pontos de coletas localizados no Leste da Ilha, sendo que neste ponto 10 amostras foram positivas para HAdV (46%), seguindo dos pontos localizados no Norte da Ilha (36%) e 18% nos pontos localizados no Sul da Ilha. Apenas o local de coleta localizado no Ribeirão da Ilha não apresentou nenhuma amostra positiva. O mês de maio foi o que apresentou o maior número de



amostras positivas, 05, totalizando 23% de amostras positivas para HAdV neste mês.

**Tabela 1:** Porcentagem e meses onde foram positivas as amostras de campo submetidas à reação de *nested*-PCR qualitativo para a detecção de HAdV.

HAdV											
Pontos de coletas	Lagoa da Conceição	Mole	Barra da Lagoa	Joaquina	Canasvieiras	Sambaqui	Santo Antônio de Lisboa	Beira-Mar Norte	Ribeirão da Ilha	Armação	Pântano do Sul
(%) de positivos	25% (3/12)	8,3% (1/12)	25% (3/12)	25% (3/12)	16,6% (2/12)	16,6% (2/12)	8,3% (1/12)	16,6% (2/12)	ND	25% (3/12)	16,6% (2/12)
Meses referência	Set., Out. e Maio	Jun.	Fev., Mar. e Maio	Ago., Jan., e Maio	Nov. e Maio	Out. e Abril	Mar.	Maio e Jul.	-	Set., Jan. e Fev.	Ago. e Mar.

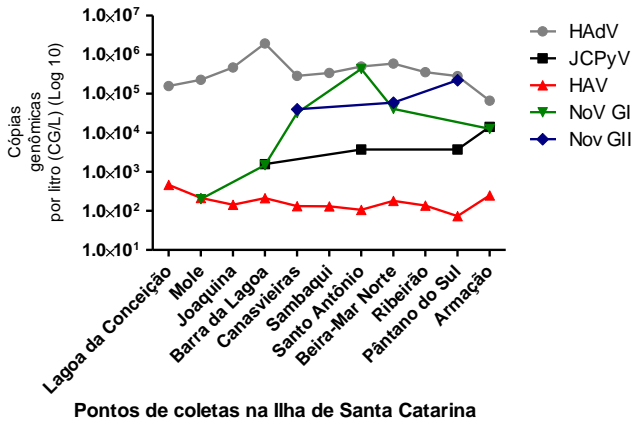
## **5.6 Quantificação dos genomas de HAdV, JCPyV, HAV e HuNoV através da reação de qPCR e qRT-PCR nas amostras de campo**

As amostras de água do mar coletadas mensalmente pelo período de Agosto de 2009 a Julho de 2010 foram devidamente concentradas de acordo com o item 4.5.1a, tiveram seu material genético (DNA e RNA) extraído de acordo com o item 4.6 e foram realizadas as reações de qPCR e RT-qPCR quantitativo como descritos nos itens 4.10 para a pesquisa de HuNoV; 4.11.1 para HAdV e JCPyV e 4.11.2 HAV e MNV-1.

### **5.6.1 Detecção e quantificação de HAdV, JCPyV, HAV e HuNoV nas amostras de água do mar analisadas**

Os resultados obtidos na quantificação dos genomas virais pesquisados no presente trabalho estão globalmente apresentados na Figura 15, onde se apresentam as médias geométricas dos valores obtidos em número de cópias genômicas por litro de água do mar (CG/L) para todos os vírus analisados e em todos os pontos de coleta durante o período de Agosto de 2009 a Julho de 2010, demonstrando de forma geral a distribuição destes vírus durante o período de coleta.

Do total de 132 amostras analisadas para cada um dos vírus pesquisados, 73 foram positivas para HAdV (55%), com valores de quantificação variando de  $8,40 \times 10^3$  a  $1,9 \times 10^7$  CG/L. Para o HAV, 68 amostras foram positivas (51,5%), com valores compreendendo o intervalo de  $1,60 \times 10^1$  a  $2,30 \times 10^3$  CG/L. Das amostras analisadas para JCPyV somente 3% foram positivas (4/132), com valores de detecção entre  $1,90 \times 10^4$  e  $1,70 \times 10^5$  CG/L. Já para a quantificação de HuNoV, o genogrupo GI apresentou 10 amostras positivas (7,5%), com intervalos de  $2,41 \times 10^3$  a  $5,14 \times 10^6$  CG/L e para o genogrupo GII, apenas 4,5% das amostras foram positivas (6/132), com valores entre  $3,73 \times 10^4$  e  $2,10 \times 10^6$  CG/L.



**Figura 15:** Número de cópias genômicas por litro (CG/ L) obtidos na quantificação dos vírus HAdV, JCPyV, HAV, Nov GI e GII das amostras de água do mar coletadas em todos os pontos analisados.

As Tabelas 2 e 3 resumizam os resultados obtidos na quantificação dos vírus de DNA (HAdV e JCPyV) e RNA (HAV e NoV) respectivamente, analisados nas amostras de campo durante o período de coleta. Os valores apresentados são referentes ao intervalo do número de cópias genômicas por litro detectado (valores menores e maiores) e a média geométrica. Nestas tabelas, também constam o número de amostras que puderam ser quantificadas sobre o número total de amostras analisadas, evidenciando assim, a distribuição dos vírus pesquisados nos diferentes pontos analisados.

Pode-se perceber que, em todos os pontos analisados, a detecção do HAdV comportou-se de maneira semelhante, permanecendo com uma média de quantificação próxima. O mesmo pode ser observado na quantificação do HAV, onde os resultados obtidos variam pouco em relação aos pontos onde as amostras foram coletadas. Já para os demais vírus analisados, JCPyV e HuNoV, o mesmo não é observado, pois estes apresentam uma detecção pontual nos locais de coletas analisados (Tabela 2 e 3).

**Tabela 2:** Intervalo e média geométrica do número de cópias genômicas por litro detectados nos ensaios de qPCR (quantitativo) para os vírus de DNA pesquisados (HAdV e JCPyV) em todos os pontos de coletas.

Pontos de coletas	HAdV		JCPyV	
	Intervalo <sup>a*</sup>	Média <sup>b*</sup>	Intervalo <sup>a*</sup>	Média <sup>b*</sup>
Lagoa da Conceição	$6,08 \times 10^4 - 8,30 \times 10^5$	$1,58 \times 10^5$ (7/12)	ND	-
Mole	$2,24 \times 10^5 - 1,80 \times 10^6$	$2,29 \times 10^5$ (3/12)	ND	-
Barra da Lagoa	$5,54 \times 10^4 - 1,90 \times 10^7$	$1,94 \times 10^6$ (7/12)	$0 - 1,90 \times 10^4$	$1,58 \times 10^3$ (1/12)
Joaquina	$8,40 \times 10^3 - 2,60 \times 10^6$	$4,68 \times 10^5$ (7/12)	ND	-
Canasvieiras	$5,34 \times 10^4 - 1,14 \times 10^6$	$2,87 \times 10^5$ (8/12)	ND	-
Sambaqui	$8,79 \times 10^4 - 1,11 \times 10^6$	$3,41 \times 10^5$ (9/12)	ND	-
Santo Antônio de Lisboa	$1,96 \times 10^4 - 4,23 \times 10^6$	$5,01 \times 10^5$ (7/12)	$0 - 4,50 \times 10^4$	$3,75 \times 10^3$ (1/12)
Beira-Mar Norte	$6,56 \times 10^4 - 2,45 \times 10^5$	$6,67 \times 10^4$ (6/12)	ND	-
Ribeirão da Ilha	$7,49 \times 10^4 - 2,20 \times 10^6$	$3,49 \times 10^5$ (6/12)	ND	-
Armação	$9,40 \times 10^3 - 1,50 \times 10^6$	$3,56 \times 10^5$ (8/12)	$0 - 1,70 \times 10^5$	$1,42 \times 10^4$ (1/12)
Pântano do Sul	$1,04 \times 10^5 - 1,10 \times 10^6$	$2,82 \times 10^5$ (5/12)	$0 - 4,50 \times 10^4$	$3,75 \times 10^3$ (1/12)

<sup>a</sup> Intervalo de valores detectados (menor e maior valor)

<sup>b</sup> Média geométrica dos valores detectados em todos os meses analisados

\*Cópias genômicas por litro (CG/ L)

ND Não determinado

**Tabela 3:** Intervalo e média geométrica do número de cópias genômicas por litro detectados nos ensaios de qPCR e RT-qPCR (quantitativo) para os vírus de RNA pesquisados (HAV e NoV GI e GII) em todos os pontos de coletas.

Pontos de coletas	HAV		NoV GI		NoV GII	
	Intervalo <sup>a*</sup>	Média <sup>b*</sup>	Intervalo <sup>a*</sup>	Média <sup>b*</sup>	Intervalo <sup>a*</sup>	Média <sup>b*</sup>
<b>Lagoa da Conceição Mole</b>	$6,70 \times 10^1 - 2,3 \times 10^3$	$4,65 \times 10^2$ (6/12)	ND	-	ND	-
<b>Barra da Lagoa Joaquina</b>	$2,68 \times 10^1 - 1,9 \times 10^3$	$2,15 \times 10^2$ (9/12)	$0 - 2,41 \times 10^3$	$2,01 \times 10^2$ (1/12)	ND	-
<b>Canasvieiras</b>	$5,07 \times 10^1 - 1,6 \times 10^3$	$2,13 \times 10^2$ (7/12)	$0 - 1,79 \times 10^4$	$1,49 \times 10^3$ (1/12)	ND	-
<b>Sambaqui</b>	$3,85 \times 10^1 - 1,1 \times 10^3$	$1,44 \times 10^2$ (4/12)	ND	-	ND	-
<b>Santo Antônio de Lisboa</b>	$2,09 \times 10^1 - 1,0 \times 10^3$	$1,32 \times 10^2$ (5/12)	$1,10 \times 10^5 - 2,76 \times 10^5$	$3,22 \times 10^4$ (2/12)	$3,73 \times 10^4 - 4,43 \times 10^5$	$4,00 \times 10^4$ (2/12)
<b>Beira-Mar Norte</b>	$5,0 \times 10^1 - 7,80 \times 10^2$	$1,31 \times 10^2$ (6/12)	ND	-	ND	-
<b>Ribeirão da Ilha</b>	$3,0 \times 10^1 - 5,90 \times 10^2$	$1,07 \times 10^2$ (7/12)	$7,80 \times 10^4 - 5,14 \times 10^6$	$4,35 \times 10^5$ (2/12)	ND	-
<b>Armação Pântano do Sul</b>	$1,60 \times 10^1 - 1,0 \times 10^3$	$2,49 \times 10^2$ (7/12)	$7,12 \times 10^4 - 3,36 \times 10^5$	$4,11 \times 10^4$ (3/12)	$5,0 \times 10^4 - 6,60 \times 10^5$	$5,92 \times 10^4$ (2/12)
	$3,81 \times 10^1 - 9,2 \times 10^2$	$1,81 \times 10^2$ (7/12)	ND	-	ND	-
	$2,60 \times 10^1 - 5,2 \times 10^2$	$1,38 \times 10^2$ (5/12)	$0 - 1,52 \times 10^5$	$1,27 \times 10^4$ (1/12)	ND	-
	$3,0 \times 10^1 - 5,20 \times 10^2$	$7,35 \times 10^1$ (5/12)	ND	-	$5,80 \times 10^5 - 2,10 \times 10^6$	$2,23 \times 10^5$ (2/12)

<sup>a</sup> Intervalo de valores detectados (menor e maior valor)

<sup>b</sup> Média geométrica dos valores detectados em todos os meses analisados

\*Cópias genômicas por litro (CG/ L)

ND Não determinado

### **5.6.2 Recuperação viral dos controles positivos da concentração das amostras de campo pelo método da floculação**

Durante o período das coletas, realizou-se a concentração de 1 L adicional de cada uma das amostras de campo de água do mar, escolhida por sorteio, permitindo que ao final do período de coletas, ao menos um dos pontos de amostragem tivesse um controle positivo do processo de concentração. Estas amostras, foram semeadas com quantidades conhecidas dos vírus HAdV2 e MNV-1, sendo esta escolha justificada por selecionar um vírus de DNA e outro de RNA respectivamente.

Os resultados obtidos neste procedimento demonstraram percentual de recuperação viral de aproximadamente 10% para ambos os vírus, permitindo assim, o controle do processo de concentração das amostras de campo.

Os demais vírus produzidos durante o trabalho (JCPyV e HAV), foram usados como controles nos procedimentos de extração do material genético e reações de PCR e qPCR ou qRT-PCR.

### **5.6.3 Quantificação dos vírus pesquisados nas amostras quanto à localização dos pontos de coletas (Norte, Leste, Sul)**

Os resultados apresentados nas Figuras 16A, B e C são os valores das médias de cópias genômicas por litro de água do mar (CG/L) obtidas juntamente com seus respectivos desvios padrão. Os resultados foram analisados em separado de acordo com o ponto da Ilha de Santa Catarina onde foram coletados: **a)** Norte (compreendendo os pontos de coletas de Canasvieiras, Sambaqui, Santo Antônio de Lisboa e Beira-Mar Norte); **b)** Leste (Lagoa da Conceição, Mole, Barra da Lagoa e Joaquina) e **c)** Sul (Ribeirão da Ilha, Armação e Pântano do Sul), com o objetivo de serem mais facilmente analisados.

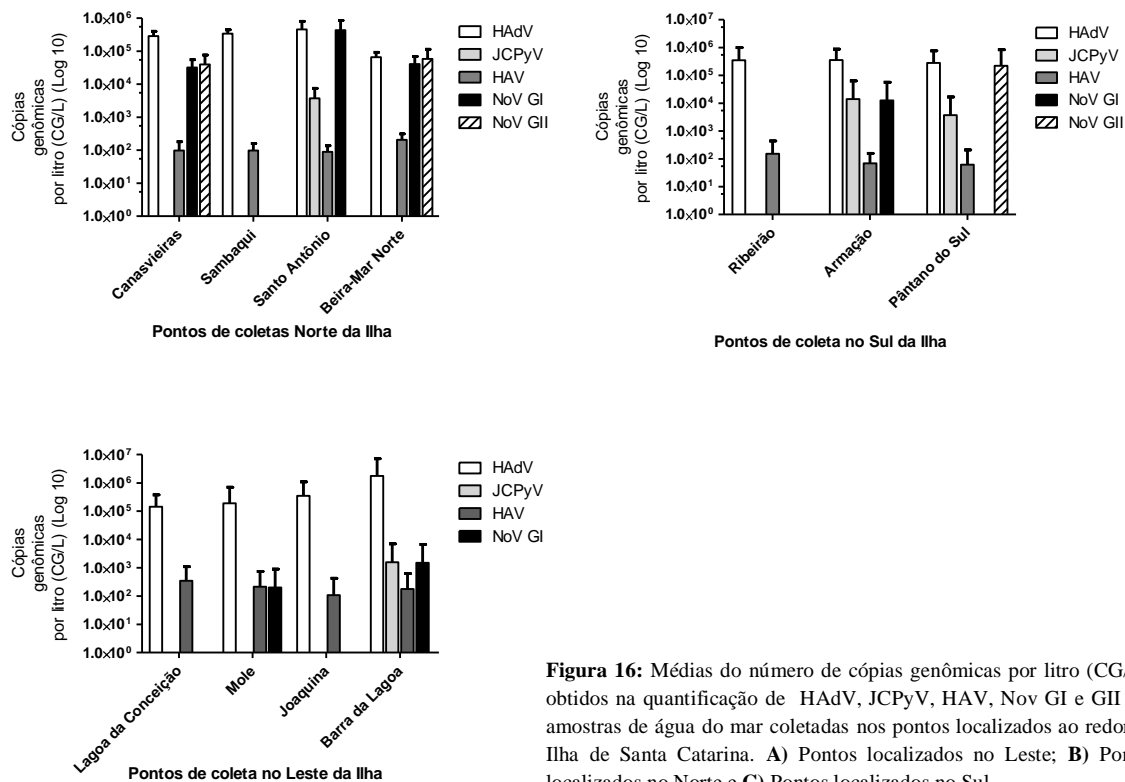
No Leste da Ilha, os resultados observados na detecção de HAdV e HAV, mostram que os valores de quantificação destes vírus permaneceram relativamente constantes com pequenas flutuações ao longo do período analisado. Com relação ao HAdV, no ponto da Barra da Lagoa ocorreu uma média mais elevada pois no mês de Setembro 2009 houve um pico de detecção de  $1,90 \times 10^7$  CG/L, que contribuiu para uma elevação da média de detecção deste vírus. A quantificação dos demais vírus mostrou irregularidade nos pontos de coletas localizados no Leste, sendo que apenas o ponto da Barra da Lagoa mostrou-se positivo para a presença de JCPyV e para NoV apenas o genogrupo GI foi detectado em duas ocasiões, nos pontos de coleta da praia Mole e Barra da Lagoa (Fig. 16A).

No Norte da Ilha, os resultados indicam que a quantificação dos vírus pesquisados apresentou valores em CG/ L muito próximos para adenovírus em todos os pontos analisados. O mesmo foi observado para o vírus da hepatite A, onde todos os pontos de coletas tiveram valores de CG/ L semelhantes, destacando-se Santo Antônio de Lisboa e Beira-Mar Norte como os pontos mais prevalentes, sendo que 58% das amostras analisadas foram positivas para HAV nesses locais. Apenas uma amostra coletada em Santo Antônio de Lisboa (Norte da Ilha) foi positiva para JCPyV. Porém no Norte da Ilha foram observados os maiores valores de detecção para NoV GI e GII (68% de positividade) para ambos os genogrupos (11 das 16 amostras positivas). Destas, 07 amostras foram positivas para GI (Canasvieiras, Santo Antônio de Lisboa e Beira-Mar Norte) e 4 para o GII (Canasvieiras e Beira-Mar Norte), sendo que os valores mais significativos foram observados em Santo Antônio de Lisboa ( $5,14 \times 10^6$  CG/ L para o NoV GI) e Beira-Mar Norte ( $6,60 \times 10^5$  CG/ L para o NoV GII) (Fig.16B).

O Sul da Ilha apresentou resultados de quantificação de HAdV e HAV semelhantes aos demais pontos analisados no Leste e Norte, destacando valores de quantificação mais acentuados para o HAdV e valores menores para o HAV. Na quantificação de JCPyV, duas amostras coletadas no Sul da Ilha foram positivas (Pântano do Sul e Armação), representando assim, 50% das amostras positivas para este vírus.

Para o NoV, três amostras foram positivas para ambos os genogrupos, uma delas para o genogrupo GI na Armação e duas para o genogrupo GII no Pântano do Sul, sendo neste último ponto, o maior valor de quantificação obtido,  $2,10 \times 10^6$  CG/ L (Fig. 16C).

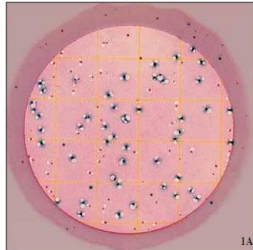




**Figura 16:** Médias do número de cópias genômicas por litro (CG/ L) obtidos na quantificação de HAdV, JCPyV, HAV, Nov GI e GII nas amostras de água do mar coletadas nos pontos localizados ao redor da Ilha de Santa Catarina. **A)** Pontos localizados no Leste; **B)** Pontos localizados no Norte e **C)** Pontos localizados no Sul.

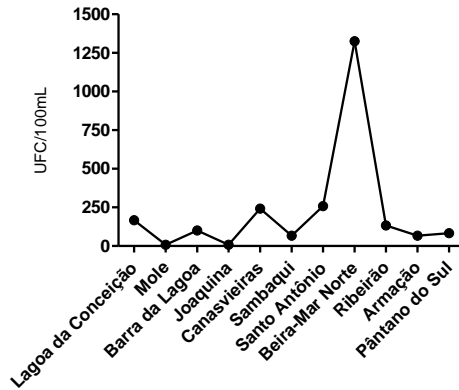
### **5.7 Detecção de (*E. coli*) nas amostras de campo**

Para a determinação dos níveis de coliformes fecais nas amostras de água do mar analisadas no presente trabalho e permitir assim, uma possível correlação com a contaminação viral observada, 1 mL de cada amostra de água, foi mensalmente analisada quanto ao crescimento de *E. coli* em kit comercial Petrifilm™ *E. coli*/Coliform Count (EC) Plate (3M). (Fig.17).



**Figura 17:** Figura exemplificando o crescimento de coliformes fecais (*E. coli*) pela presença da formação de colônias azuis associadas à formação de gás. Fonte: 3M Petrifilm™ Interpretation Guide.

Após o período de observação das colônias azuis associadas à formação de gás, indicando assim a presença de coliformes de origem fecal, as mesmas foram devidamente contadas e expressas em valores de Unidades Formadoras de Colônias em 100 mL (UFC/100 mL). Conforme preconizado na legislação (resoluções CONAMA n° 274 de 2000 e 357 de 2005), os níveis aceitáveis de coliformes fecais em água do mar destinada a atividades recreacionais (balneários) não podem ultrapassar os 250UFC/100 mL, sendo que em áreas de cultivo de moluscos bivalves esse valor cai para 43UFC/100 mL. A Figura 18 representa a média de coliformes fecais detectados nos pontos de coletas durante o período de um ano, que apresentaram valores variando entre 8,0 e 1,325 UFC/100 mL.



Pontos de coletas na Ilha de Santa Catarina

**Figura 18:** Média da presença de coliformes fecais (*E. coli*) nas amostras de águas analisadas. Valores expressos em UFC/100 mL.

A Tabela 4 mostra intervalo dos valores obtidos na detecção de coliformes fecais nas amostras de campo, bem como a média geométrica e desvio padrão que estes valores expressam. Baseando-se somente no valor das médias, tem-se que a maioria dos pontos analisados está dentro do considerado tolerável pela legislação, porém analisando os valores brutos, percebe-se que em alguns meses esses valores ultrapassaram o tolerável.

Os valores de coliformes fecais mais baixos observados são referentes aos pontos localizados nas praias Mole e Joaquina e os valores mais elevados são do ponto de coleta localizado na Beira-Mar Norte.

**Tabela 4:** Intervalo e média de detecção de coliformes fecais (*E. coli*) em UFC/100 mL nas amostras de água do mar coletadas ao redor da Ilha de Santa Catarina.

<b>Coliformes fecais* (<i>E. coli</i>)</b>											
Pontos de coletas	Lagoa da Conceição	Mole	Barra da Lagoa	Joaquina	Canasvieiras	Sambaqui	Santo Antônio de Lisboa	Beira-Mar Norte	Ribeirão da Ilha	Armação	Pântano do Sul
<b>Intervalo<sup>a</sup></b>	0-600	0-100	0-300	0-100	0-1600	0-300	0-2100	0-6800	0-700	0-500	0-1000
<b>Média<sup>b</sup></b>	166	08	100	08	241	66	258	1325	133	66	83
<b>Desvio Padrão</b>	196	28	120	28	512	98	597	1916	246	143	288

<sup>a</sup> Intervalo de valores detectados (menor e maior valor)

<sup>b</sup> Média geométrica dos valores detectados em todos os meses e pontos analisados

\* Valores expressos em UFC/100 mL

### **5.8 Avaliação dos parâmetros físico-químicos das amostras de campo**

Durante a realização das coletas foram avaliados alguns parâmetros físico-químicos como temperatura, pH, salinidade e nível de oxigênio dissolvido (OD) nas amostras de água do mar coletadas. As Figuras 19A, B e C que seguem, apresentam as médias desses valores, seguindo a divisão de análise por ponto de coleta (Norte, Leste e Sul da Ilha de Santa Catarina) respectivamente.

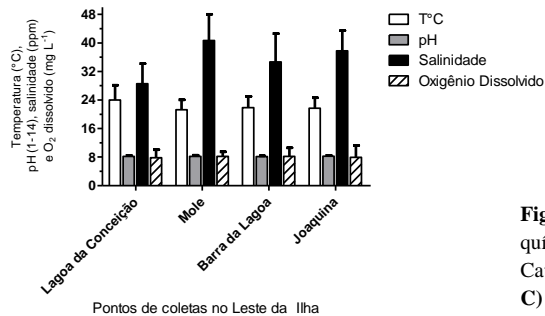
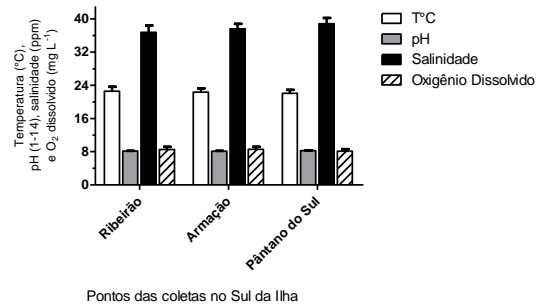
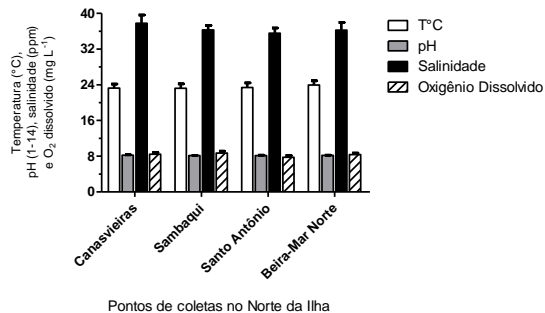
As análises de salinidade e oxigênio dissolvido foram realizadas utilizando kit comercial para análise de água salgada (Alfa Kit), os valores considerados estão de acordo com o estabelecido pela resolução CONAMA n° 375 de 2000, que dispõe sobre a classificação dos corpos de água e trata das diretrizes ambientais para o seu enquadramento, indicando, portanto, que os valores aceitáveis de salinidade são os a partir de 30 ppm (partes por milhão), valores de OD de no mínimo 6 mg L<sup>-1</sup> e valores de pH entre 6,5 e 8,5.

Os resultados obtidos demonstram que de maneira geral as temperaturas das amostras de águas foram próximas, independente do ponto da Ilha onde a amostra foi coletada. Valores mais elevados foram observados no Norte da Ilha (intervalos de 23,2 a 24 °C), sendo que no Leste os valores variaram entre 21,2 e 24 °C e no Sul, as médias foram de 22 °C em todas as coletas.

A salinidade média de todos os pontos de coletas foi de 36,5 ppm sendo que os valores mais discrepantes foram observados nos pontos da Lagoa da Conceição, sendo este o único a apresentar média de salinidade inferior (28 ppm), com valores variando entre 22 e 40 ppm, sendo isso esperado, devido à característica salobra da água. Por outro lado, o ponto que apresentou a maior média de salinidade foi a praia Mole (40 ppm) com valores entre 33 e 50 ppm.

Os valores de OD obtidos foram todos de acordo com estabelecido pela legislação, com valores variando entre 7,8 e 8,8 mg L<sup>-1</sup>. Para as análises do pH das amostras, as médias obtidas nos pontos de coletas variaram entre 8,1 e 8,2 valores próximos da neutralidade.

Outro parâmetro analisado foi a temperatura ambiental apontada durante os dias de realização das coletas (uma vez que as coletas eram realizadas em três dias consecutivos de uma mesma semana), os resultados demonstram médias de 21,5 °C para os pontos do Leste, 24,5 °C para os pontos do Norte e 21 °C para os pontos do Sul.



**Figura 19:** Média e desvios padrão dos valores obtidos nas análises físico-químicas para as amostras de água do mar coletadas ao redor da Ilha de Santa Catarina. **A)** Pontos localizados no Norte; **B)** Pontos localizados no Leste e **C)** Pontos localizados no Sul. Os valores foram expressos em partes por milhão (ppm) nas análises de salinidade e mg L<sup>-1</sup> para OD.

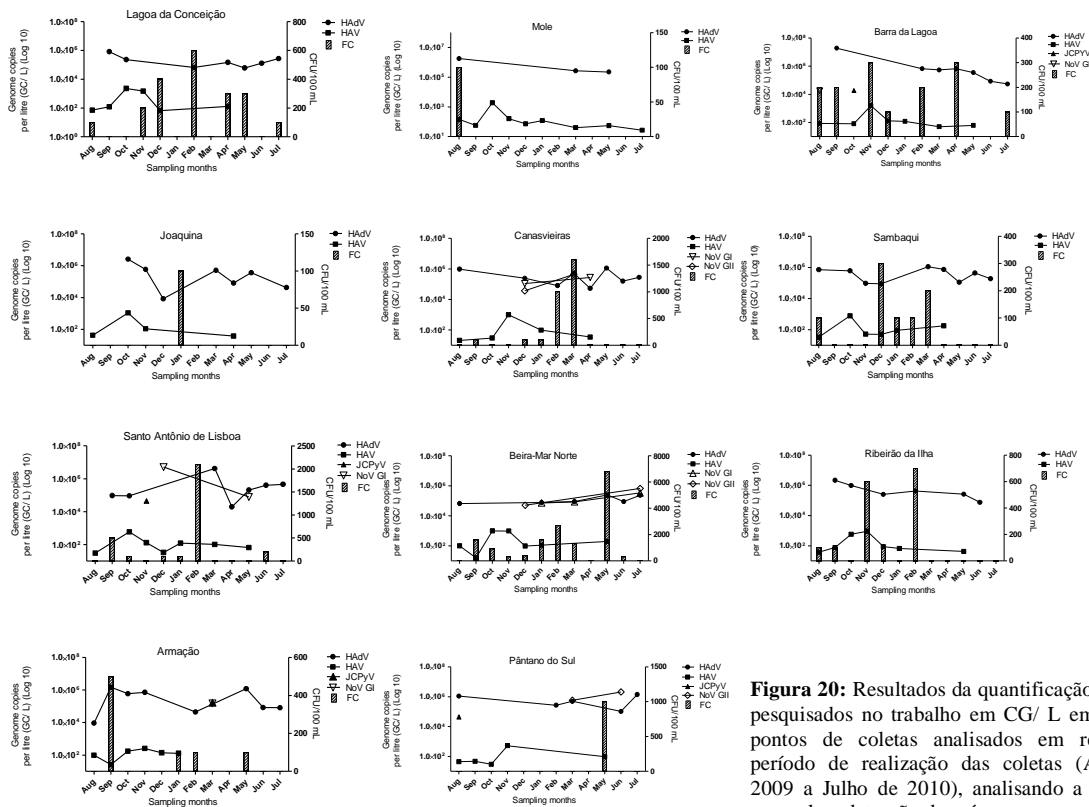
### 5.9 Avaliação da sazonalidade

Para avaliar se os resultados obtidos nas amostras de campo frente às variáveis analisadas sofreram efeito em relação ao período das coletas foram realizadas, realizou-se um teste de medidas repetidas (ANOVA) em relação às estações do ano e regiões de coletas.

Das análises realizadas para a detecção dos vírus pesquisados com relação à estação do ano, destacam-se a interação observada entre as regiões de coletas e a presença de HAV ( $P = 0,047$ ). Quando o teste de Tukey foi aplicado, os valores de HAV na região Leste da Ilha durante a primavera foram significativamente diferentes dos valores observados nas demais regiões e nas diferentes estações do ano ( $P < 0,05$ ). Para os demais vírus analisados não houve uma interação observada entre a detecção dos mesmos e a região de coleta e estação do ano ( $P > 0,05$ ).

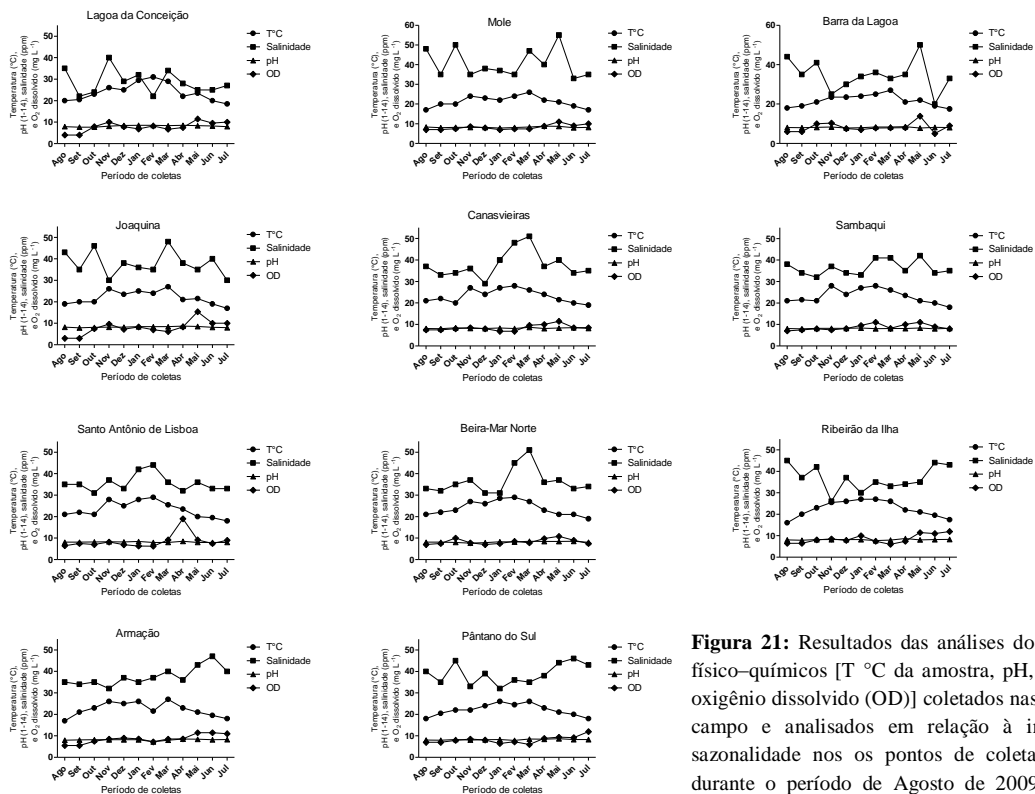
Os resultados obtidos para as análises estatísticas realizadas para os parâmetros físico-químicos demonstraram não haver uma interação significativa entre os valores observados da temperatura das amostras e a presença de coliformes fecais em relação à região de coleta e às estações no ano ( $P > 0,05$ ). Já para os valores de salinidade obtidos nas amostras, houve uma relação entre estes e a região Sul das coletas, onde os valores da salinidade observados em todas as estações diferiram estatisticamente entre si ( $P = 0,0005$ ). A última interação observada foi em relação aos valores de oxigênio dissolvido (OD) obtidos, sendo que estes apresentam uma tendência de, na região Norte, serem significativamente distintos das demais regiões de coleta, destacando-se a estação do outono ( $P = 0,025$ ).

As Figuras 20 e 21 ilustram respectivamente os valores de detecção obtidos para todos os vírus avaliados no presente trabalho juntamente com os valores de *E. coli*; e os valores dos parâmetros físico-químicos coletados em todos os pontos de coletas analisados durante o período de Agosto de 2009 a Julho de 2010. Através da análise das figuras pode-se verificar a não ocorrência de um padrão sazonal observado na detecção dos diferentes vírus, *E. coli* e valores dos parâmetros físico-químicos avaliados.



**Figura 20:** Resultados da quantificação dos vírus pesquisados no trabalho em CG/ L em todos os pontos de coletas analisados em relação ao período de realização das coletas (Agosto de 2009 a Julho de 2010), analisando a influência sazonal na detecção dos vírus.





**Figura 21:** Resultados das análises dos parâmetros físico-químicos [T °C da amostra, pH, salinidade e oxigênio dissolvido (OD)] coletados nas amostras de campo e analisados em relação à influência da sazonalidade nos os pontos de coletas analisados durante o período de Agosto de 2009 a Julho de 2010.

### 5.10 Correlações entre a detecção viral, bacteriana e os parâmetros físico-químicos

O teste de Correlação de Pearson foi utilizado para verificar a relação existente entre a detecção dos vírus pesquisados, a presença de coliformes fecais e os parâmetros físico-químicos avaliados nas amostras ambientais. Uma primeira correlação realizada entre os valores das médias obtidas para cada variável analisada foi realizada, demonstrando que a temperatura média das amostras de água do mar diminui em relação ao aumento da salinidade nas mesmas ( $r = -0,6190$ ,  $P < 0,04$ ); os valores médios obtidos na detecção do vírus da hepatite A aumentam em relação à diminuição da salinidade das amostras ( $r = -0,6576$ ,  $P < 0,02$ ) e uma correlação já esperada, de que a temperatura média das amostras aumenta em relação ao aumento da temperatura média ambiental ( $r = 0,6481$ ,  $P < 0,03$ ).

Quando o teste de Correlação de Pearson foi aplicado para a análise da correlação dos resultados obtidos em relação às estações do ano, as estações da primavera e do outono, não apresentaram nenhuma correlação entre a detecção das variáveis analisadas, já para a estação do verão, foram observadas correlações entre a detecção de coliformes fecais e NoV GII, sendo que o aumento da quantidade de um está correlacionado com o aumento do outro ( $r = 0,7645$ ,  $P < 0,006$ ). Os níveis de coliformes fecais detectados nesta estação também aumentaram em relação ao aumento da temperatura ambiental ( $r = 0,6745$ ,  $P < 0,02$ ). Na estação do inverno, foram observados os maiores valores de correlação, destacando-se para os vírus, a presença de HAdV e JCPyV ( $r = 0,6910$ ,  $P < 0,01$ ); JCPyV e NoV GII ( $r = 0,6164$ ,  $P < 0,04$ ); NoV GI e NoV GII ( $r = 0,7219$ ,  $P < 0,01$ ); para os parâmetros físico-químicos, temperatura da amostra e salinidade ( $r = -0,6050$ ,  $P < 0,04$ ); salinidade e níveis de oxigênio dissolvido (OD) ( $r = 0,8521$ ,  $P < 0,001$ ); e para parâmetros duplos, os níveis de coliformes fecais e salinidade das amostras ( $r = -0,6644$ ,  $P < 0,02$ ) e níveis de OD e a presença de coliformes fecais ( $r = 0,6057$ ,  $P < 0,04$ ).

### 5.11 Sequenciamento das amostras de campo positivas para HAdV

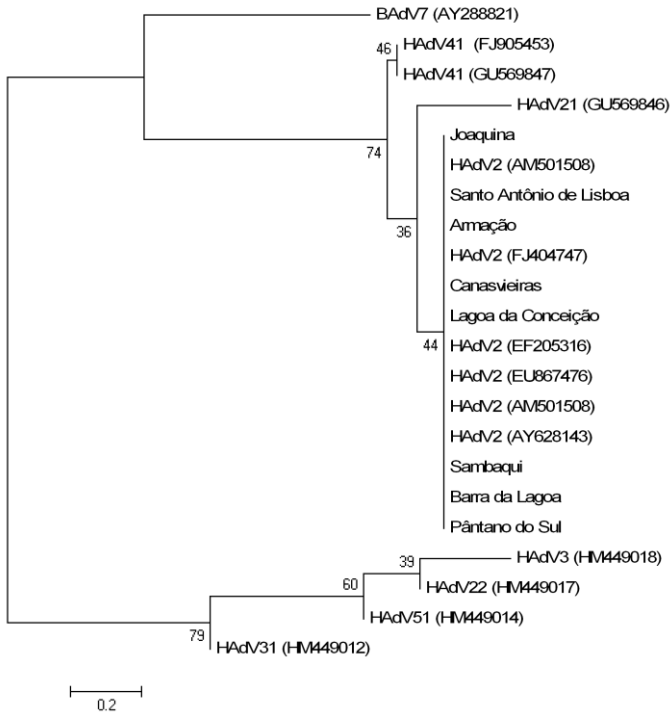
De acordo com os resultados demonstrados no item 5.5 na detecção de HAdV nas amostras de campo submetidas a reação de *nested*-PCR qualitativo, 22 amostras foram positivas para este vírus. Destas, 10 amostras foram selecionadas para a realização das reações de sequenciamento, sendo que estas amostras representam 10 pontos

diferentes de coletas ao redor da Ilha de Santa Catarina. Esta seleção teve por objetivo analisar os sorotipos de adenovírus mais prevalentes nos diferentes pontos de coletas, sendo que o único ponto não contemplado foi o ponto de coleta do Ribeirão da Ilha, uma vez que este não apresentou nenhuma amostra positiva na reação de *nested*-PCR.

Após a realização das reações de sequenciamento, apenas 08 sequências apresentaram qualidade suficiente para serem analisadas. Avaliou-se a presença de sequências de consenso único entre todas as amostras sequenciadas. Após o alinhamento das sequências consenso, com o auxílio do programa BioEdit, foi realizada uma busca no programa Blast para verificar a correlação destas com sequências já depositadas para este vírus.

As sequências obtidas no presente trabalho foram comparadas com sequências depositadas no banco de dados do GenBank, como sequências de adenovírus humanos pertencentes aos sorotipos 2, 3, 21, 22, 31, 51 além do sorotipo entérico 41 e uma sequência de um adenovírus não humano (adenovírus bovino), permitindo assim uma análise adequada e mais segura em relação as sequências obtidas.

Os resultados obtidos na comparação das sequências mostraram que todas as sequências obtidas no presente trabalho foram agrupadas dentro do sorotipo 2 de adenovírus humanos, subgênero C (sorotipo respiratório também de transmissão fecal-oral), sendo que as presentes sequências isoladas apresentaram cerca de 95 a 99% de similaridade com as sequências de HAdV2 depositadas no GenBank (Fig. 22).



**Figura 22:** Árvore filogenética deduzida a partir da amplificação de um fragmento de 142 pares de bases da proteína *hexon* do capsídeo viral, em amostras de água do mar coletadas ao redor da Ilha de Santa Catarina, submetidas à sequenciamento. As sequências obtidas no presente estudo foram comparadas com sequências depositadas no banco de dados do GenBank. Árvore filogenética construída utilizando o método de *neighbor-joining* e com um *bootstrap* de 500 repetições

## 6 DISCUSSÃO

O litoral do estado de Santa Catarina é um dos mais procurados durante o período de veraneio, sendo o município de Florianópolis, um dos que recebem a maior parcela de turistas contribuindo assim para o aumento da economia do município. Tendo em vista o aumento populacional observado em Florianópolis nos últimos anos e a influência da população flutuante durante o período de verão, que contribuem de forma efetiva para um aumento na produção de resíduos de origem fecal, este trabalho teve por objetivo avaliar a ocorrência e distribuição de diferentes vírus entéricos em amostras de água do mar localizadas em diferentes pontos da Ilha de Santa Catarina, evidenciando assim, a necessidade de uma análise da contaminação por estes patógenos nas diferentes áreas da Ilha destinadas a atividades de recreação e ao cultivo de moluscos bivalves.

Para tal finalidade, faz-se importante o desenvolvimento de técnicas com alta sensibilidade para a concentração e detecção de vírus entéricos e não entéricos no ambiente aquático. Atualmente o desenvolvimento de diferentes métodos vem demonstrando grande relevância a partir do momento em que se entende que a contaminação destes ambientes está aumentando em grandes proporções sendo de conhecimento geral que os mais distintos tipos de águas, destacando as águas de superfície, recebem constantemente o despejo de efluentes não tratados, justificando desta forma a pesquisa em torno da análise dos diferentes tipos de contaminação que atingem estes tipos de águas (GIRONES, et al., 2010).

Uma vez que a contaminação viral não está correlacionada com a contaminação bacteriana, métodos eficientes são necessários para tornar a detecção de vírus entéricos no ambiente, uma atividade corriqueira e de exigência obrigatória pelos órgãos de fiscalização, a fim de promover o controle da contaminação ambiental por efluentes não tratados e o controle de surtos de doenças veiculadas por vírus presentes em águas (FONG; LIPP, 2005).

Um bom método de concentração de vírus em amostras de águas requer atenção em alguns pontos, como o desenvolvimento de uma técnica de aplicação simples, rápida, com alta porcentagem de recuperação, adequada na concentração e recuperação de diferentes tipos de vírus, permitindo a concentração da amostra em volumes finais pequenos e apresentando custo de realização baixo (BOSCH et al., 2008).

A maioria dos procedimentos de concentração viral em amostras de águas utiliza dois passos consecutivos, um passo inicial que

é o de promover a adsorção das partículas virais em uma matriz (membrana) seguido da eluição viral com soluções alcalinas protéicas (extrato de carne) e um segundo passo que é a precipitação do material protéico onde as partículas virais estavam agregadas através de trocas de pH (iônicas), ressuspensando o volume final em um tampão neutro (BOSCH et al., 2008; CALGUA, 2008).

O método de concentração viral padronizado e escolhido para a concentração dos vírus entéricos no presente trabalho utiliza apenas um passo na concentração, permitindo dessa forma, uma menor manipulação das amostras e impedindo possíveis perdas virais quando na utilização de dois passos de concentração, além de apresentar menor inibição nos ensaios enzimáticos, sendo que a eficiência na recuperação viral depende de vários fatores, como o tipo de amostra, volume e quantidade de vírus presente nesta amostra (CALGUA, 2008).

Como demonstrado na Figura 13, os resultados obtidos na padronização da metodologia, mostraram porcentagens de recuperação de 14 e 13,6% em amostras de água do mar natural e artificial respectivamente, ambas semeadas com HAdV2. Estes resultados se mostraram inferiores aos obtidos por Calgua et al. (2008), que observou valores de recuperação viral de 42 e 52% respectivamente para água do mar natural e artificial. Estas distintas taxas de recuperação viral podem ser explicadas devido a diferenças entre a realização dos procedimentos entre diferentes laboratórios e a diferentes sensibilidades nas reações de qPCR.

Diversos estudos utilizando amostras de água do mar para avaliar a presença de vírus, descrevem diferentes metodologias na concentração viral, demonstrando distintas taxas de recuperação viral. Na maioria destes estudos foram utilizados dois passos no procedimento de concentração viral, observando-se valores de recuperação viral de 60 a 80% quando foram utilizados cartuchos de filtros para a concentração de vírus entéricos em água do mar partindo-se de volumes de 400 L e concentrando em volumes finais de 10 a 70 mL (FARRAH, et al., 1977). Outro estudo utilizando outro tipo de filtro revelou uma recuperação de 41% na concentração de rotavírus partindo-se de 400 L de água do mar (TORANZOS; GERBA, 1989). Contudo, estes métodos, apesar de mais representativos, não foram utilizados no presente trabalho já que são muito laboriosos em práticas de rotina.

A metodologia de filtração em membrana eletronegativa, seguido de reconcentração em Centriprep utilizada para a comparação de recuperação viral com o método padronizado, foi a metodologia descrita por Katayama et al. (2002), sendo esta, uma metodologia

realizada em dois passos de concentração. No presente trabalho as porcentagens de recuperação foram de 2,8% para água do mar natural e 21% para água do mar artificial (Fig. 13), justificando assim a escolha do método de floculação para a concentração das amostras de campo (água do mar natural). Os percentuais de recuperação do método de filtração variam de acordo com o tipo de amostra analisada, chegando à percentual de 100% para água de consumo a 10% para água do mar (RIGOTTO, et al., 2009).

A baixa porcentagem de recuperação viral obtida no processo de filtração para amostras de água do mar natural explica-se em parte pela existência de uma alta força iônica que dificulta a adsorção dos vírus à membrana, diminuindo assim a eficiência observada na recuperação viral quando se utiliza métodos de adsorção e eluição em amostras de água do mar (LUKASIK, et al., 2000). Victoria et al. (2009), demonstrou que a adição de sais ( $MgCl_2$ ) em concentrações mais elevadas proporciona uma melhor taxa de recuperação de HAdV quando submetidas ao processo de filtração em membrana eletronegativa.

Outros métodos de floculação orgânica envolvem o uso de outras substâncias floculantes, como o polietilenoglicol (PEG) sendo este utilizado num segundo passo de concentração viral, apresentando valores de recuperação para água do mar semeadas com poliovírus de até 53% (WETZ, et al., 2004). Porém já está amplamente descrito que o PEG pode ser um forte inibidor das reações enzimáticas usadas na detecção e quantificação dos vírus presentes nas amostras (BOSCH et al., 2008).

O uso de ensaios moleculares como o PCR e PCR em tempo real (qPCR) para a detecção de vírus em amostras de águas vem sendo amplamente utilizado em diferentes estudos (ALBINANA-GIMENEZ et al., 2009; MIAGOSTOVICH, et al., 2008; RIGOTTO et al., 2010). Estas técnicas apresentam limites de detecção com alta sensibilidade em relação às técnicas de detecção por cultivo celular, promovem resultados rápidos e avaliam presença e no caso do qPCR, a quantidade de vírus presentes na água (GIRONES et al., 2010).

A aplicação da metodologia de concentração viral por floculação com leite acidificado, seguido de quantificação do genoma dos vírus pesquisados por técnica molecular de PCR em tempo real (qPCR), permitiu, no presente estudo, avaliar os vírus entéricos (HAdV, JCPyV, HAV e HuNoV) circulantes na água do mar utilizadas em atividades de recreação ou como locais destinados ao cultivo de moluscos bivalves em diferentes pontos.

Dentre os vírus analisados, destaca-se a alta prevalência de amostras positivas para o HAdV (55%) sendo este relatado em diversos trabalhos, como um dos mais prevalentes, avaliando-se diferentes tipos de águas de superfície e em moluscos bivalves (CHOO; KIM, 2006; HUNDESA et al., 2006; MIAGOSTOVICH et al., 2008). Formiga-Cruz et al. (2002) demonstrou que o HAdV é o vírus mais encontrado em amostras de moluscos e que sua presença apresenta uma clara relação com a presença de outros vírus entéricos na mesma amostra.

No Brasil existem poucos trabalhos analisando a presença de vírus entéricos em água do mar, tendo a detecção de HAdV um destaque na positividade avaliando-se amostras tais como água de mar, de consumo, de lagoa e carne de ostras (RIGOTTO et al., 2010), bem como em outros tipos de amostras, como água de rios (MIAGOSTOVICH et al., 2008), lodo de esgoto e águas residuais (SCHLINDWEIN, et al., 2010).

A metodologia de qPCR utilizada no presente trabalho para a quantificação de HAdV presente nas amostras de campo, é amplamente utilizada em demais estudos analisando diferentes tipos de amostras e apresentando índices de sensibilidade de detecção superiores aos obtidos utilizando apenas reações de PCR qualitativo (KATAYAMA; SHIMASAKI; OHGAKI, 2002; XAGORARAKI et al., 2007). Os iniciadores e sonda utilizados para a quantificação das amostras permitem a detecção de todos os sorotipos de adenovírus humanos, amplificando uma região conservada do gene *hexon* do capsídeo do vírus (HERNROTH et al., 2002). Calgua, et al. (2008), analisando amostras de água do mar através da metodologia de concentração por flocculação e detecção por qPCR, obteve médias de quantificação genômica para o HAdV de  $1,26 \times 10^4$  CG/ L. Outro trabalho analisando amostras de água do mar, obteve médias de concentração genômica de  $8,8 \times 10^3$  CG/L(WYN-JONES, et al., 2010).

Os iniciadores utilizados nas reações de qPCR não distinguem dentre os sorotipos de HAdV os tipos entéricos F (Adv 40 e 41), sendo que uma possível análise das amostras positivas demonstraria a baixa prevalência destes sorotipos em água do mar. Xagorarakı et al. (2007), analisando amostras de água de recreação detectou 3 amostras de adenovírus entéricos a partir de 14 amostras positivas para HAdV, demonstrando a baixa prevalência destes sorotipos de adenovírus nas águas.

Quando comparados os resultados obtidos no presente trabalho em relação à detecção de HAdV por qPCR com os resultados obtidos no *nested*-PCR fica claro a maior sensibilidade do primeiro em relação ao



segundo, sendo que na reação por PCR qualitativo apenas 22 amostras foram positivas (16%).

No presente estudo, a detecção de HAdV nas amostras de campo apresentou valores de quantificação semelhantes durante todo o período de análise. Como se pode observar na Figura 21 a presença deste vírus não demonstrou nenhum padrão de sazonalidade, nem mesmo quando se analisaram pontos de coletas que recebem uma maior população flutuante no verão (como Canasvieiras, Barra da Lagoa, Armação), demonstrando que todos os pontos de coletas analisados recebem, indistintamente, descargas de águas residuais não devidamente tratadas. As análises estatísticas comprovaram a não existência de uma interação entre a detecção do HAdV e as estações do ano.

Analisando os valores das médias de cópias genômicas por litro obtidos para HAdV nas diferentes estações do ano, o verão apresentou um valor mais inferior (log) quando comparado as demais estações. Apesar de alguns vírus entéricos serem sensíveis a degradação quando expostos a uma maior incidência de raios U.V., isto não é comumente observado para o HAdV, sendo este um vírus muito estável mesmo quando exposto à altas temperaturas (SIRIKANCHANA; SHISLER; MARIÑAS, 2008). Porém outros trabalhos relatam a diminuição na detecção de adenovírus durante o verão, assegurando que altas temperaturas podem influenciar na estabilidade do vírus (FONG; GRIFFIN; LIPP, 2005). No presente trabalho, estas considerações citadas acima podem ter influenciado nesta diminuição da detecção observada, porém outro fator relevante foi em relação a uma maior presença de inibidores da reação de qPCR possivelmente presentes nas amostras coletadas no período do verão, isto se dá em virtude do aumento populacional que algumas praias sofrem neste período, acarretando um incremento de efluentes lançados em suas águas, incluindo potenciais inibidores de reações enzimáticas.

Quando se avaliou a existência de alguma correlação entre a detecção de HAdV e outros vírus analisados, houve uma correlação positiva entre a detecção de HAdV e JCPyV durante a estação do inverno sendo esta associação demonstrada em diversos trabalhos avaliando principalmente amostras de águas residuais ou provenientes de estações de tratamento de esgoto (BOFFIL-MAS, et al., 2006; BOFFIL-MAS; PINA; GIRONES, 2000). Isto pode decorrer devido a estes vírus apresentarem uma maior estabilidade no período do inverno, sendo que neste período há também uma menor incidência de radiação U. V. contribuindo para uma menor taxa de inativação viral por esta radiação.

O ponto de coleta localizado na Beira-Mar Norte é conhecido como um ponto que recebe diferentes descargas de águas residuais tratadas e não tratadas, porém, este ponto apresentou a menor média de quantificação de HAdV, isto pode ser explicado pelo fato destas amostras possuírem maior quantidade de inibidores da reação de qPCR, demonstrando assim, valores de quantificação mais baixos.

A média de cópias genômicas por litro detectadas em todas as amostras avaliadas para a presença de HAdV, foi de  $10^5$  CG/ L, porém sabe-se que a detecção através de ensaios de qPCR não fornece resultados no que diz respeito a infecciosidade dos vírus detectados, indicando somente presença e concentração viral, sendo dessa forma uma ferramenta que não permite estimar o risco de se contrair uma infecção causada pelos vírus detectados naquela amostra de água, quando se entra em contato com esta (GIRONES et al., 2010; WETZ et al., 2004).

Outro vírus de DNA analisado no presente trabalho foi o JCPyV, que está sendo recentemente reportado na literatura como um dos vírus de DNA mais prevalentes em amostras ambientais, destacando-se amostras de águas residuais (BOFFIL-MAS et al., 2006; FUMIAN et al., 2010; HUNDESA et al., 2006). A importância em se analisar este vírus está no fato de que cerca de 40 a 80% da população excreta este vírus na urina, servindo a detecção deste como um indicador de contaminação ambiental (HUNDESA et al., 2006; MCNEES et al., 2005).

Existem poucos trabalhos analisando a presença de JCPyV em amostras de água do mar, porém um estudo recente avaliou a presença de poliomavírus humano (HPyVs) como um indicador microbiológico associado a contaminação humana para o monitoramento da qualidade de áreas destinadas a atividades de recreação. A presença de (HPyVs) indicou a contaminação da área pelo recebimento de resíduos de origem humana, como o despejo de efluentes de esgoto através de sistemas sépticos ou emissários que lançam resíduos indevidamente tratados (ABDELZAHER, et al., 2010).

No presente trabalho, apenas 3% das amostras de água do mar analisadas foram positivas para o JCPyV, com valores de detecção médios de  $10^3$  CG/L. Boffil-Mas et al.(2010) obteve valores semelhantes na quantificação de JCPyV em amostras de água de rio e de água residual, porém com uma porcentagem de detecção mais elevada. As diferenças observadas entre as porcentagens de detecção de JCPyV em comparação com outros trabalhos justifica-se pelas

diferenças entre o método de concentração das amostras e o tipo de amostra (HAMZA et al., 2009).

Outro fator importante ligado às diferenças entre as detecções obtidas é em relação ao limite de sensibilidade da reação de qPCR, sendo que os iniciadores e sonda utilizados hibridizam em uma região conservada do genoma do poliomavírus, porém somente para o JCPyV, sendo que estes iniciadores não apresentam homologia com os demais sorotipos de poliomavírus (PAL et al., 2006).

Em relação à verificação da viabilidade viral, a avaliação da infecciosidade do JCPyV em amostras ambientais é de difícil realização, as células permissivas a replicação deste vírus não apresentam efeito citopático visível sendo a replicação extremamente fastidiosa. Alguns trabalhos analisam a viabilidade deste vírus através do tratamento da amostra com DNAses que degradam o DNA viral desprovido de capsídeo presente na amostra, eliminando os vírus não viáveis. Entretanto a grande quantidade de sais presentes nas amostras de água do mar, podem inibir a ação das DNAses (BOFFIL-MAS; PINA; GIRONES, 2000).

Na falta de trabalhos analisando água do mar em relação à contaminação por JCPyV, a análise de moluscos bivalves cultivados em áreas que sofrem a contaminação por resíduos não tratados é uma boa alternativa. Em amostras de ostras e mexilhões analisadas para a presença de JCPyV, 50% delas foram positivas para o vírus, com quantificação de 1 a 10 partículas virais por grama (BOFFIL-MAS, et al., 2001).

Apesar de não ser considerado um vírus entérico, estudos vêm analisando a possível transmissão do JCPyV pela via fecal-oral, através da ingestão de água ou alimentos contaminados. O JCPyV demonstrou ser estável em valores de pH de 1, 3 e 5, sugerindo desta forma que através da ingestão os vírus permaneceriam viáveis ou parcialmente viáveis ao passar pelo trato gastrointestinal (BOFFIL-MAS et al., 2001).

O uso de vírus de DNA altamente prevalentes, comumente excretados nas fezes ou na urina e estáveis no meio ambiente, representa uma ferramenta de boa escolha para se monitorar a contaminação de diferentes tipos de fontes águas, especialmente em relação à contaminação viral (HUNDESA et al., 2006).

A contaminação dos vírus de DNA analisados nas amostras de campo não demonstrou nenhuma relação com a contaminação por coliformes fecais, reforçando a não existência de uma correlação entre as duas contaminações.

Estudos sobre a prevalência de HAdV e JCPyV em diferentes amostras de águas de superfície, bem como em águas subterrâneas e águas residuais é de extrema importância, uma vez que estes vírus são extremamente estáveis no ambiente aquático e aos tratamentos realizados nas estações de coleta de esgoto. Identificar a distribuição dos diferentes sorotipos circulantes no ambiente aquáticos permitirá a construção de dados epidemiológicos destes vírus no Brasil, contribuindo assim para que estes patógenos sejam considerados importantes contaminantes ambientais.

Nas amostras de campo analisadas, o vírus da hepatite A (HAV), foi o segundo mais prevalente durante o período de análise, sendo detectado em 51,5% das amostras analisadas e com média de quantificação genômica de  $10^2$  CG/ L. Brooks et al. (2005) quantificou valores semelhantes em cópias genômicas por litro de HAV em amostras de água do mar, utilizando PCR em tempo real.

A técnica de RT-qPCR utilizada no presente trabalho mostrou ter uma grande sensibilidade, detectando até mesmo baixas quantidades de genoma presentes nas amostras, permitindo assim a detecção de um grande número de amostras positivas, devido à grande especificidade dos iniciadores e sonda utilizados. Ao contrário do que normalmente ocorre quando se utiliza apenas reações de RT-PCR qualitativo, onde normalmente necessita-se de uma segunda reação de PCR (*nested*) para aumentar a sensibilidade da detecção, o RT-PCR quantitativo promove uma detecção viral eficiente em amostras de campo (JOTHIKUMAR et al., 2005). De Paula et al. (2007), analisando amostras de água de rio quanto a presença de HAV, obteve valores de 23% de amostras positivas quando usando *nested*-RT-PCR e 92% utilizando RT-qPCR, confirmando o fato de o PCR qualitativo apresentar uma maior sensibilidade aos inibidores presentes nas amostras.

A concentração de HAV em amostras de águas de superfície apresenta diferentes índices de recuperação viral, dependendo da origem da amostra, sendo que em alguns estudos utilizando métodos de adsorção-eluição, a recuperação obtida para água do mar foi inferior aos demais tipos de água, justificando-se pela maior quantidade de inibidores presentes (VILLAR et al., 2006). Rigotto et al. (2010) obteve valores de 16% na detecção de HAV por *nested*-PCR em amostras de água do mar coletadas no Norte da Ilha de Santa Catarina.

O HAV é conhecido por ser o vírus de RNA mais resistente no meio ambiente aquático, como a água do mar, por exemplo, dos que outros vírus de RNA fita simples, como o poliovírus (RZEZUTKA; COOK, 2004). É estável em valores de pH 1,0 e resiste ao aquecimento

por 30 minutos à 56 °C, além de apresentar uma rápida taxa de recombinação com outros vírus entéricos presentes no meio ambiente aquático (CUTHBERT, 2001).

Uma grande preocupação frente aos resultados obtidos na quantificação de HAV nas amostras analisadas é em relação à contaminação dos pontos destinados ao cultivo de moluscos bivalves, como Ribeirão da Ilha, Sambaqui e Santo Antônio de Lisboa, uma vez que a presença do HAV em águas de superfície mesmo em baixas concentrações pode acarretar em infecção e o surgimento de surtos associados ao consumo de moluscos cultivados nestas águas (CUTHBERT, 2001). Bosch et al. (2010) demonstrou que o RNA viral costuma ser detectado tanto em moluscos cultivados em áreas poluídas, como em moluscos já submetidos a um processo de depuração, ou até mesmo àqueles já liberados para o consumo humano e que a classificação de áreas para o cultivo de moluscos baseadas somente em relação à contaminação por *E. coli* não determina se os moluscos cultivados nestas áreas podem ser destinados ao consumo humano em relação a presença de vírus entéricos.

Em relação às análises estatísticas realizadas frente aos resultados de detecção do HAV, os resultados obtidos com o emprego da Correlação de Pearson indicam que há um decaimento na concentração de HAV nas amostras de campo em contrapartida ao aumento da salinidade na amostra, porém, sabe-se que os sais presentes na água do mar, muitas vezes desempenham um papel importante na agregação do vírus no ambiente aquático, ora protegendo os vírus da inativação por calor, ora ao contrário (GERBA, 2005). Wetz et al. (2004), demonstrou que a salinidade desempenha papel fundamental na agregação viral, porém tal agregação está associada a perda do título viral na amostra. Outra correlação observada é de que a salinidade das amostras aumenta em relação ao diminuição da temperatura da água, parecendo assim, haver um sinergismo entre a diminuição da temperatura, o aumento da salinidade, promovendo a diminuição da quantidade de HAV quantificado nas amostras.

Quando se analisou a detecção de HAV em relação às estações do ano, verificou-se que os valores detectados na primavera no ponto de coleta do Leste, diferiram estatisticamente em relação aos valores observados nas outras estações do ano e em relação a todos os pontos de coletas, mesmo os do Leste. Morga et al. (2009) analisando amostras de água do mar encontrou valores mais acentuados na detecção de HAV na estação da primavera, salientando que, nesta estação, as temperaturas das amostras diminuem, o mesmo ocorrendo no presente estudo, onde a

temperatura das amostras no período da primavera são superiores somente às da estação do inverno.

Pode ser observado que a detecção de HAV não apresentou nenhuma correlação com a contaminação por *E. coli*, reforçando mais uma vez a necessidade de se avaliar também a presença de vírus entéricos em amostras de águas de superfície. Porém, Gersberg et al. (2006) encontrou correlação entre a contaminação de água de mar por HAV e enterovírus com a contaminação por *E. coli* e enterococcus, estes dois, sendo a critério da EPA indicados como parâmetros de contaminação de água do mar, contudo, vale destacar que esta correlação entre contaminação viral e bacteriana foi observada em pontos de coleta que recebem constantemente despejo de águas residuais.

Em relação à avaliação da presença de NoV no presente trabalho, esta apresentou porcentagem de amostras positivas de 12%, com prevalência de detecção do genogrupo GI (7,5%) em relação a detecção do genogrupo GII (4,5%), com valores de quantificação compreendendo intervalos de  $2,41 \times 10^3$  a  $5,14 \times 10^6$  para o GI e  $3,73 \times 10^4$  a  $2,10 \times 10^6$  CG/ L para GII, sendo que apenas duas amostras foram positivas para ambos os genogrupos (Canasvierias em Dezembro e Beira-Mar Norte em Julho). Victoria et al.(2009), analisando amostras de água do mar durante o período de um ano no município de Florianópolis, detectou NoV em 12,5% das amostras através de *semi-nested*-PCR qualitativo. Valores mais elevados na detecção de NoV em amostras ambientais, são esperados quando são analisadas amostras de águas residuais, com porcentagens de positividade de até 100% (KATAYAMA, et al., 2008; NORDGREN et al., 2009).

Existem poucos trabalhos avaliando a contaminação do ambiente aquático marinho, La Rosa et al. (2007), analisou diversas amostras de água do mar, detectou 11% de positividade para NoV por *semi-nested*-PCR. Em outros trabalhos, a porcentagem de amostras positivas varia de acordo com o local de coleta e da presença de pontos de despejo de efluentes não tratados (KATAYAMA; SHIMASAKI; OHGAKI, 2002; MORGA et al., 2009).

Todavia existem muitos estudos analisando amostras clínicas provenientes de surtos de gastroenterites (KAGEYAMA et al., 2003; PANG; PREIKSAITIS; LEE, 2005), amostras de água de rio e água mineral (NGAZOA; FLISS; JEAN, 2008; RUTJES, et al., 2006) e mais comumente, em amostras de águas residuais em estações de tratamento de esgoto (KATAYAMA et al., 2008; NORDGREN et al., 2009). Este último tipo de amostra ambiental citado é muito analisado devido ao

fato de que uma pessoa infectada por norovírus é capaz de eliminá-lo nas fezes por um período prolongado e também devido ao fato destes vírus serem muito resistentes à inativação pelos tratamentos convencionais realizados nas estações de tratamento de águas residuais (PATEL et al., 2008).

Devido ao fato de os NoV estarem muito associados com surtos provocados pela ingestão de moluscos bivalves cultivados em áreas contaminadas, estudos avaliando a contaminação destes moluscos, permitem inferir a conseqüente contaminação do ambiente marinho onde estes animais são cultivados (JOTHIKUMAR et al., 2005; LOISY, et al., 2005). Atualmente, métodos para a concentração de norovírus em amostras de moluscos estão bem estabelecidos, bem como a detecção por métodos moleculares (RT-PCR e RT-qPCR), permitindo uma detecção eficiente nestas amostras (GENTRY; VINJÉ; LIPP, 2009). No presente trabalho, apenas duas amostras de água do mar provenientes de um sítio de cultivo de moluscos, ambas em Santo Antônio de Lisboa, foram positivas, sendo estas pertencentes ao genogrupo GI, este frequentemente associado a surtos provocados na ingestão de moluscos contaminados (LE GUYADER et al., 2009) e apresentando este ponto o maior valor de cópias genômicas por litro obtido ( $5,14 \times 10^6$ ).

Alguns trabalhos no Brasil, citam o NoV GII como o mais prevalente em amostras clínicas, sendo possivelmente o genogrupo responsável pela maioria dos surtos de gastroenterites causados por este vírus (VICTORIA, et al., 2007; XAVIER, et al., 2009). A prevalência do genogrupo GII em relação ao GI no acometimento de surtos pode ser explicada devido à baixa notificação baseada em relatos de alguns casos de surtos esporádicos.

As amostras positivas para NoV no presente trabalho revelaram, entretanto, uma prevalência mais significativa do genogrupo I em relação ao genogrupo II, fato este que pode ser explicado pelas diferenças na detecção de genogrupos em relação ao tipo de amostra, sendo que em amostras clínicas provenientes de surtos a prevalência é de GII enquanto que o GI é mais detectado juntamente com o genogrupo GII em amostras ambientais, tanto em diferentes tipos de águas como em moluscos (HEWITT, et al., 2007; KATAYAMA et al., 2008; LE GUYADER et al., 2009). Wyn-Jones et al. (2010) em trabalho recente analisando amostras de água do mar, também obteve maior porcentagem de amostras positivas para NV GI em relação ao GII. Da Silva et al. (2007) analisando amostras de água residual em estações de tratamento de esgoto, evidenciou a presença mais elevada de GI, sendo este, possivelmente mais resistente ao processo de desinfecção. Diferenças na

inativação e estabilidade no meio ambiente podem explicar as diferenças entre a presença de um genogrupo na população ou no meio ambiente (RUTJES et al., 2006). Outro fato relevante para justificar o maior número de amostras GI do que GII é que diferentes trabalhos usam metodologias distintas para a detecção, dificultando dessa forma resultados mais homogêneos (DA SILVA et al., 2007). Alguns métodos moleculares de detecção podem apresentar melhores resultados em relação a outros, sendo menos susceptíveis à ação dos inibidores presentes nas amostras ou apresentando uma maior especificidade na detecção do genogrupo GI ou GII ou a ambos através da utilização de sondas e iniciadores que apresentam maior sensibilidade na detecção (LAMHOUEB, et al., 2008; RUTJES et al., 2006).

No presente estudo, utilizou-se a metodologia de RT-PCR em tempo real descrita por Kageyama et al. (2003), que utiliza sondas e iniciadores que permitem a amplificação de uma região conservada do genoma do NoV (junção ORF1-ORF2), com limites de sensibilidade de 10 cópias genômicas por tubo de reação, sendo o limite de sensibilidade do GI um ciclo de amplificação (Ct) mais elevado. No presente trabalho os limites de sensibilidade foram de 10 cópias genômicas para o GI e 100 cópias genômicas para o GII, sendo desta forma a detecção do GI mais sensível do que a do GII.

As análises estatísticas realizadas na verificação de um padrão sazonal de detecção de NoV, demonstraram não haver um predomínio de amostras positivas de acordo com a estação do ano, porém, alguns trabalhos citam uma maior ocorrência de surtos e detecção de amostras no inverno (KATAYAMA; SHIMASAKI; OHGAKI, 2002; MORGA et al., 2009). Vale salientar, entretanto que os estudos analisam amostras quanto a presença de NoV somente durante esta estação, quando muitos surtos são notificados, dando destaque à detecção de NoV neste período (HEWITT et al., 2007; MORGA et al., 2009). No entanto a análise da contaminação por estes vírus durante todo o ano é importante para se avaliar como se dá a distribuição sazonal do NoV, demonstrando a prevelência dos dois genogrupos durante o ano inteiro, inclusive no período do verão, permitindo assim, o aprimoramento dos dados epidemiológicos a respeito dos surtos provocados por este vírus (AW, et al., 2009; KATAYAMA et al., 2008).

No presente trabalho, as maiores porcentagens de detecção dos NoV foram no período do outono, com destaque para a detecção do NoV GI, porém a detecção de NoV nas amostras de campo não apresentou nenhuma relação estatisticamente significativa levando em consideração a estação do ano. Quando se avaliou a correlação



(Correlação de Pearson) entre a detecção de NoV e os diferentes vírus pesquisados, contaminação bacteriana e os parâmetros físico-químicos avaliados em relação à estação do ano, houve uma correlação positiva entre a presença de NoV GI e GII simultaneamente e entre a presença do GII e a do JCPyV. Alguns trabalhos já determinaram a presença de ambos os vírus NoV GII e JCPyV em amostras de água de rio, de consumo e água residual, porém nenhuma correlação foi verificada (ALBINANA-GIMENEZ, et al., 2009; HUNDESA et al., 2006). No verão foi observada uma correlação positiva entre a presença do NoV GII e a detecção de coliformes fecais, embora não haja uma correlação entre os valores de NoV GII detectados e os de coliformes. Pode-se explicar esta correlação levando em consideração o aumento populacional no município de Florianópolis na época do verão onde há um incremento na produção de esgoto e consequentemente, do despejo deste em águas de superfície oceânicas.

De todas as amostras positivas tanto para NoV GI quanto para o GII, vale salientar a contaminação dos seguintes pontos de coleta: **1)** Canasvieiras, que apresentou as maiores quantidades detectadas no período do verão, época do ano que a população do bairro aumenta consideravelmente; **2)** Os pontos de coletas localizados no Sul da Ilha (Pântano do Sul e Armação), que tiveram valores mais elevados de detecção no período do outono, e este fato coincidiu com a ocorrência de uma grande ressaca que atingiu essas praias nesta época do ano; **3)** O ponto de coleta localizado na Beira-Mar Norte, sendo este um ponto que recebe constante despejo de efluentes tratados ou não tratados, tratando-se de um local impróprio para banho e outras atividades.

Apesar do baixo número de amostras positivas para NoV no presente trabalho, é de conhecimento geral o destaque que a contaminação por estes vírus no ambiente aquático representa, uma vez que este ocupa o primeiro lugar em surtos de gastroenterites não bacterianas provocadas pela ingestão de água ou alimentos contaminados.

Como já foi mencionado, os resultados obtidos na quantificação dos vírus presentes em amostras ambientais, não significa que estes estejam viáveis, ou seja, com capacidade de causar infecção. Entretanto, a probabilidade de serem viáveis é bastante elevada já que os vírus de genoma RNA fita simples danificados, ou seja, que possuem seu material genético desprovido de capsídeo e que, portanto, são inviáveis, dificilmente permanecem no meio ambiente devido a extrema labilidade dos vírus que possuem este tipo de genoma.

Outro ponto a se discutir em relação à avaliação da viabilidade para os vírus de RNA avaliados no presente trabalho é no que diz respeito à realização de ensaios *in vitro*, porém tais ensaios dependendo do vírus em questão são muito demorados, como é o caso do HAV, sendo este vírus muito fastidioso na replicação em cultura de células, ou até mesmo o NoV humano, que não está adaptado a cultura celular, sendo dessa forma a ferramenta molecular, uma boa opção na detecção de vírus de RNA em contaminações recentes (GERSBERG et al., 2006).

A estabilidade dos vírus entéricos na água do mar pode ser afetada ou mantida por diferentes fatores. A temperatura da água é um fator que conhecidamente afeta a estabilidade da maioria dos vírus, porém os vírus entéricos, destacando-se o HAdV e o HAV são conhecidos por serem muito termoestáveis (GERBA, 2005). Outro fator importante é o pH, sendo que os vírus entéricos sobrevivem bem em águas com valores de pH entre 5 e 9. Diferentes estudos demonstram que a ação de diferentes microrganismos, proteases extracelulares, nucleases e outras enzimas presentes na água do mar, contribuem conjuntamente ou individualmente no declínio da estabilidade dos vírus em entéricos neste tipo de água (WETZ et al., 2004). A maior causa de degradação do RNA livre em amostras de água do mar ocorre por ação de microrganismos não virais presentes na água (TSAI; TRAN; PALMER, 1995).

O monitoramento da contaminação viral em águas oceânicas pode-se tornar de difícil realização uma vez que para se ter uma amostra representativa, seria necessária a concentração de um grande volume de amostra de água, inviabilizando muitas vezes a prática rotineira da avaliação da contaminação. Uma alternativa para contornar este problema seria a utilização de moluscos bivalves como sentinelas da contaminação de águas oceânicas que recebem o despejo de efluentes de águas residuais, estes animais seriam alocados em pontos que recebem constante contaminação e por serem capazes de bioacumular patógenos, acabariam por concentrar os vírus (ASAHINA, et al., 2009).

Outro problema em relação à contaminação do ambiente aquático é o fato de a legislação brasileira exigir a análise somente de parâmetros de contaminação bacteriana das águas. As análises realizadas no presente trabalho indicam que os valores obtidos na detecção de coliformes fecais (*E. coli*) estão acima do permitido pela legislação em várias coletas analisadas pelo período entre Agosto de 2009 a Julho de 2010.

As análises estatísticas realizadas para verificação de um padrão sazonal de detecção de coliformes fecais demonstrou que não há uma

interação entre a detecção dos mesmos em relação à estação do ano. Porém, quando se avaliou a correlação entre a presença de *E. coli* e os demais vírus analisados, os dados vieram a corroborar com os demais estudos que demonstram que tal correlação não existe, fazendo-se pertinente incluir a análise de parâmetros virais nas análises de balneabilidade entre outras, requeridas para águas utilizadas para diversos fins (FONG; GRIFFIN; LIPP, 2005; WONG, et al., 2009). Esta inexistência de correlação entre os contaminantes virais e bacterianos pode ser explicada pelo decaimento ou estabilidade distinta que tais microrganismos apresentam no meio ambiente aquático, principalmente em relação a temperatura (JIANG; CHU; HE, 2007).

As correlações obtidas em relação à presença de coliformes fecais (CF) foram duas correlações, uma negativa e outra positiva predominantemente nos meses de inverno, uma delas entre a presença de CF e os níveis de salinidade (negativa) e a outra foi entre os níveis de CF e os valores de oxigênio dissolvido (OD) nas amostras de água do mar (positiva). A primeira pode ser explicada pelo fato de a salinidade diminuir em função do aumento da quantidade de águas que aportam no mar, neste caso para haver o incremento do nível de CF pode-se supor que houve um aumento de efluentes não tratados na água do mar, permitindo assim a diminuição dos níveis de salinidade pela maior dissolução dos sais presentes. A segunda correlação é contrária ao que normalmente ocorre (o aumento nos níveis de CF na água e a diminuição dos níveis de OD). Uma hipótese para a explicação dessa correlação pode ser em relação a um maior aporte de águas contendo material orgânico, ocasionando o aumento de CF e permitindo consequentemente uma elevação nos níveis de OD. Devido a este aporte de águas, que promoveria uma maior diluição dos contaminantes.

Pode-se observar analisando os valores obtidos para as médias de detecção de coliformes (Tabela 4), que os valores só ultrapassaram o mínimo exigido pela legislação nos pontos da Beira-Mar Norte e Santo Antônio de Lisboa, e se levarmos em consideração que o último ponto citado é um local de cultivo de moluscos, a contaminação se torna mais acentuada, o mesmo ocorrendo para locais como Ribeirão da Ilha e Sambaqui. Vale lembrar que os únicos pontos de coleta que nunca tiveram os níveis de CF detectados acima do permitido, foram os pontos da Joaquina e Mole, conhecidamente pontos de recreação com poucas residências fixas e restaurantes no entorno, provavelmente ocorrendo nestes um menor aporte de efluentes não tratados.

Como citado anteriormente, os vírus entéricos costumam ser estáveis em água do mar com pH entre 5 e 9. Os resultados obtidos nas

análises das amostras de campo mostraram valores de pH dentro dessa média, contribuindo dessa forma para a estabilidade dos vírus analisados (GERBA, 2005). Já para os valores de salinidade obtidos, estes estão dentro do considerado normal para águas salinas, com exceção do ponto da Lagoa de Conceição, sendo este um ponto considerado como água salobra, ou seja, com níveis de salinidade mais inferiores (CONAMA, 2005). Houve uma correlação negativa entre os valores de salinidade observados e os valores de temperatura das amostras de água, isto pode ser analisado em relação à maior evaporação da água do mar em determinados períodos, o que contribuiria para o aumento da salinidade da água. Alguns estudos demonstram que os níveis de salinidade influenciam fortemente a concentração de indicadores bacterianos, sendo que locais com menores valores de salinidade são em geral os que apresentam os maiores níveis de contaminação por bactérias (ORTEGA, et al., 2009). Entretanto, no presente estudo nenhuma correlação neste sentido foi observada.

Como se pode observar na Figura 21, os valores de temperatura ambiental e da água não variaram consideravelmente durante o período de análise, tendo um destaque um pouco maior nos pontos de coleta localizados no Norte da Ilha, com um incremento de temperatura nos meses mais quentes. Uma correlação já esperada ocorreu entre a temperatura da amostra e a ambiental, onde ambas aumentam ou diminuem uma em relação à outra. Porém uma correlação positiva não esperada foi observada em relação ao aumento da temperatura da água com o aumento nos níveis de CF no período do verão. Os coliformes são microrganismos mais termolábeis, ou seja, são mais susceptíveis à degradação pelo calor, porém como já foi mencionado em outro momento, durante este período há um aumento considerável no número da população em Florianópolis e conseqüentemente uma maior produção de resíduos de origem fecal humana entrando em contato com o meio ambiente aquático.

Devido a grande porcentagem de detecção de HAdV nas amostras analisadas, foi realizada a caracterização molecular dos sorotipos de HAdV presentes nestas amostras através de sequenciamento, permitindo dessa forma determinar os sorotipos circulantes nos pontos de coletas analisados. Das amostras sequenciadas, todas foram determinadas como pertencentes ao adenovírus respiratório humano sorotipo 2, subgênero C. Existem poucos trabalhos caracterizando amostras ambientais de adenovírus detectado em água do mar, sendo que um recente trabalho determinou a caracterização dentre outros sorotipos de HAdV, o sorotipo 2, sendo

este detectado somente após ser submetido previamente ao cultivo celular (WYN-JONES et al., 2010). Existem outros trabalhos, entretanto, onde foram caracterizadas amostras de águas residuais e água de rio, onde os principais sorotipos encontrados foram os sorotipos entéricos 40 e 41, pertencentes ao subgênero F (HUNDESA et al., 2006; MIAGOSTOVICH et al., 2008; PRADO, et al., 2010). Adenovírus é o vírus mais comumente encontrado em águas de superfície, sendo o sorotipo 2 como um dos mais encontrados e excretados pelo homem (MENA; GERBA, 2008) sendo que este resultado vem a corroborar com demais estudos que demonstram a grande prevalência deste vírus no meio ambiente aquático, além de sugerir que este vírus é excretado intermitentemente nas fezes da maioria dos indivíduos adultos (WYN-JONES et al., 2010).

Existem poucos estudos analisando o risco de se contrair uma infecção através de atividades de recreação, ao entrar em contato com águas do mar impactadas pelo despejo de efluentes não tratados (BROOKS; GERSBERG; DHAR, 2005). Alguns estudos vêm analisando o risco associado à realização de atividades de natação e evidenciaram a contaminação de pessoas que entram em contato com águas contaminadas por água residuais (BEGIER, et al., 2008). Muitos casos de surtos de conjuntivites foram associados à contaminação de pessoas que nadaram em piscinas públicas ou lagos, sendo estes casos provocados por diferentes sorotipos de adenovírus (MENA; GERBA, 2008).

A EPA (Agência Norte Americana de Proteção do Meio Ambiente) criou um órgão que analisa a qualidade e o risco de infecção associado a diferentes águas destinadas às atividades de recreação, estimando as quantidades mínimas necessárias de cada patógeno presentes na lista de contaminantes que podem causar surtos quando presentes nestas águas (SOLLER, et al., 2010).

A detecção de diferentes tipos de vírus entéricos em amostras de água do mar no presente estudo evidencia como este tipo de água é utilizado para o despejo de efluentes não tratados ou tratados inadequadamente. O crescimento populacional do município de Florianópolis observado nos últimos anos demonstra a necessidade de se assegurar a coleta e o tratamento de esgoto produzido, permitindo assim o uso seguro da água do mar para diversos fins, inclusive quando se leva em consideração o potencial turístico e econômico na produção de moluscos bivalves.

As águas oceânicas podem ser uma boa alternativa para a eliminação de águas residuais devidamente tratadas, com a utilização de

emissários com longo alcance e profundidade, permitindo assim a correta difusão e diluição dos contaminantes tratados na água do mar e não afetando áreas costeiras destinadas a outras atividades.

Finalizando, o presente trabalho de dissertação é o primeiro trabalho que avalia as condições das praias ao redor da Ilha de Santa Catarina, identificando os diferentes tipos de contaminantes microbiológicos e levantando a discussão sobre a inexistência de um controle mais rígido em relação ao lançamento de efluentes nas águas oceânicas.

### 7 SUMÁRIO DOS PRINCIPAIS RESULTADOS

- A escolha da metodologia de floculação padronizada para a concentração de vírus em amostras de água do mar foi eficiente e superior em comparação com o método de filtração seguido de concentração em Centriprep;
- O método de floculação com leite desnatado acidificado foi economicamente viável e permitiu a recuperação de 14% dos HAdV2 artificialmente semeados nas amostras de água do mar natural;
- Através do ensaio molecular qualitativo de *nested*-PCR para a detecção de HAdV a positividade nas amostras de campo foi de 16%;
- Através de ensaios quantitativos de qPCR, o HAdV mostrou-se o vírus mais prevalente nas amostras de campo analisadas pelo período de Agosto de 2009 a Julho de 2010, com 55% de amostras positivas e com intervalo de quantificação de  $8,40 \times 10^3$  a  $1,90 \times 10^7$  CG/L;
- O segundo vírus avaliado mais prevalente foi o HAV, com 51,5% das amostras positivas tendo intervalo de quantificação de  $1,60 \times 10^1$  a  $2,30 \times 10^3$  CG/L;
- O vírus JCPyV apresentou positividade de 3% das amostras analisadas, apresentando intervalos de quantificação de  $1,90 \times 10^4$  a  $1,70 \times 10^5$  CG/L;
- A presença de NoV nas amostras de campo mostrou-se positiva em 12% das amostras analisadas, sendo 68% destas localizadas nos pontos de coleta do Norte da Ilha;
- Ainda para o NoV, o genogrupo GI foi mais prevalente com 7,5% das amostras positivas, e o genogrupo GII em 4,5% das amostras, com intervalos de quantificação de  $2,41 \times 10^3$  a  $5,14 \times 10^6$  para o GI e  $3,73 \times 10^4$  e  $2,10 \times 10^6$  CG/L para o GII;
- Não foi observada nenhuma correlação significativa entre a contaminação viral, bacteriana, parâmetros físico-químicos e sazonalidade nas amostras de água do mar analisadas;
- Os parâmetros físico-químicos apresentaram valores dentro do esperado para as avaliações de temperatura, pH, OD e salinidade, destacando somente o Ponto da Lagoa da Conceição com valores médios de salinidade um pouco inferiores ao recomendado;

## Sumário dos principais resultados 108

- A temperatura das amostras mostrou concordância com a estação do ano, demonstrando pequena elevação nos pontos localizados no Norte da Ilha;
- O número de coliformes fecais observados ultrapassou o mínimo permitido em todos os pontos analisados, excetuando-se, a praia Mole e Joaquina, com destaque para o ponto da Beira-Mar Norte como mais contaminado por coliformes fecais;
- O sequenciamento de amostras positivas para HAdV demonstrou uma maior prevalência do sorotipo respiratório 2, subgênero C;



## 8 CONCLUSÕES

Através dos resultados obtidos no presente estudo foi possível concluir que:

- A técnica de floculação pelo leite acidificado comprovou ser economicamente viável para a detecção de vírus em águas oceânicas;
- Comprovou-se que não há correlação entre contaminações virais, bacterianas, parâmetros físico-químicos e sazonalidade nas amostras de águas do mar avaliadas;
- A alta prevalência de HAdV nas amostras de campo, sugere que este vírus é excretado continuamente nas fezes da maioria dos indivíduos;
- Este trabalho foi o primeiro estudo brasileiro que demonstrou que as águas oceânicas ao redor da Ilha de Santa Catarina apresentam contaminações variadas de vírus de transmissão fecal-oral;
- A contaminação destas águas apresentou prevalência de vírus importantes que podem estar envolvidos com o surgimento de surtos de gastroenterites e outras doenças, sendo a avaliação destes, importante em possíveis estudos epidemiológicos;
- O presente trabalho expôs a importância em se rever a atual legislação brasileira, incluindo assim, a análise da qualidade da água do mar frente à contaminação viral como um parâmetro de balneabilidade;

## 9 PERSPECTIVAS

A continuidade de presente trabalho terá como pontos principais:

- Padronizar uma metodologia eficiente na avaliação da viabilidade dos vírus detectados nas amostras de água do mar;
- Realizar o sequenciamento das amostras de NoV positivas para determinar os diferentes genogrupos circulantes nas águas do mar ao redor da Ilha de Santa Catarina;

**10 REFERÊNCIAS**

ABDELZAHER, A.M.; WRIGHT, M.E.; ORTEGA, C.; SOLO-GABRIELE, H.M.; MILLER, G.; ELMIR, S.; NEWMAN, X.; SHIH, P.; BONILLA, A.; BONILLA, T.D.; PALMER, C.J.; SCOTT, T.; LUKASIK, J.; HARWOOD, V., J.; MCQUAIG, S.; SINIGALLIANO, C.; GIDLEY, M.; PLANO, L.R.W.; ZHU, X.; WANG, J.D.; FLEMING, L.E. Presence of pathogens and indicator microbes at a non-point source subtropical recreational marine beach. **Applied and Environmental Microbiology**, v.76, p.724-732, 2010.

ALBINANA-GIMENEZ, N.; CLEMENTE-CASARES, P.; CALGUA, B.; HUGUET, J.M.; COURTOIS, S.; GIRONES, R. Comparison of methods for concentration human adenoviruses, polyomavirus JC and noroviruses in source waters and drinking water using quantitative PCR. **Journal of Virological Methods**, v.158, p.104-109, 2009.

ALBINANA-GIMENEZ, N.; MIAGOSTOVICH, M.P.; CALGUA, B.; HUGUET, J.M.; 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 Research**, v.43, p.2011-2019, 2009.

ALLARD, A.; ALBINSSON, B.; WADELL, G. Detection of adenoviruses in stools from healthy persons and patients with diarrhea by two-step polymerase chain reaction. **Journal of Medical Virology**, v.37, p.149-157, 1992.

ALLARD, A.; ALBINSSON, B.; WADELL, G. Rapid typing of human adenoviruses by a general PCR combined with restriction endonuclease analysis. **Journal of Clinical Microbiology**, v.39, p.498-505, 2001.

ANDREASI, M.S.; CARDOSO, D.D.; FERNANDES, S.M.; TOZETTI, I.A.; BORGES, A.M.; FIACCADORI, F.S.; SANTOS, R.A.; SOUZA, M. Adenovirus, calicivirus and astrovirus detection in fecal samples of hospitalized children with acute gastroenteritis from Campo Grande, MS, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.103, p.741-744, 2008.

ASAHINA, A.Y.; LU, Y.; WU, C.; FUJIOKA, R.S.; LOH, P.C. Potential biosentinels of human waste in marine coastal waters: Bioaccumulation of human noroviruses and enteroviruses from sewage-polluted waters by indigenous mollusks. **Journal of Virological Methods**, v.158, p.46-50, 2009.

- ASHBOLT, N.J. Microbial contamination of drinking water and disease outcomes in developing regions. **Toxicology**, v.198, p.229-238, 2004.
- ATMAR, R.L. Noroviruses: State of the art. **Food and Environmental Virology**, v.2, p.117-126, 2010.
- AW, T.G.; YEW-HOON GIN, K.; LIN EAN OON, L.; CHEN, E.X.; HOE WOO, C. Prevalence and genotypes of human noroviruses in tropical urban surface waters and clinical samples in Singapore. **Applied and Environmental Microbiology**, v.75, p.4984-4992, 2009.
- BAE, J.; SCHWAB, K.J. Evaluation of murine norovirus, feline calicivirus, poliovirus and MS2 as surrogates for human norovirus in a model of viral persistence in surface water and groundwater. **Applied and Environmental Microbiology**, v.74, p.477-484, 2008.
- BAERT, L.; WOBUS, C.E.; COILLIE, E.V.; THACKRAY, L.B.; DEBEVERE, J.; UYTENDAELE, M. Detection of murine norovirus 1 by using plaque assay, transfection assay, and real time reverse transcription-PCR before and after heat exposure. **Applied and Environmental Microbiology**, v.74, p.543-546, 2008.
- BÁNYAI, K.; MARTELLA, V.; MELG, E.; KISFALI, P.; PÉTERFI, Z.; BENKÖ, M.; MELEGH, B.; SZUCS, G. Searching for HAoV-52, the putative gastroenteritis-associated human adenovirus serotype in Southern Hungary. **New Microbiologica**, v.32, p.185-188, 2009.
- BARARDI, C.R.M.; YIP, H.; EMSLIE, K.R.; VESEY, G.; SHANJER, R.S.; WILLIAMS, K.L. Flow cytometry and RT-PCR for rotavirus detection in artificially seeded oyster meat. **International Journal of Food Microbiology**, v.49, p.9-18, 1998.
- BEGIER, E.M.; OBERSTE, M.S.; LANDRY, M.L.; BRENNAN, T.; MLYNARSKI, D.; MSHAR, P.A.; FRENETTE, K.; RABATSKY-HER, T. An outbreak of concurrent echovirus 30 and coxsackievirus A1 infections associated with sea swimming among a group of travelers to Mexico. **Clinical Infectious Diseases**, v.47, p.616-623, 2008.
- BERK, A.J. Adenoviridae: The viruses and their replication. In: Knipe, D. M.; Howley, P. M. (Eds). **Fields Virology**. 5th. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2007. v.1, p. 2356-2394.

BOFFIL-MAS, S.; ALBINANA-GIMENEZ, N.; CLEMENTE-CASARES, P.; HUNDESA, A.; RODRIGUEZ-MANZANO, J.; ALLARD, A.; CALVO, M.; GIRONES, R. Quantification and stability of human adenoviruses and polyomavirus JCPyV in wastewater matrices. **Applied and Environmental Microbiology**, v.72, p.7894-7896, 2006.

BOFFIL-MAS, S.; FORMIGA-CRUZ, M.; CLEMENTE-CASARES, P.; CALAFELL, F.; GIRONES, R. Potential transmission of human polyomaviruses through the gastrointestinal tract after exposure to virions or viral DNA. **Journal of Virology**, v.75, p.10290-10299, 2001.

BOFFIL-MAS, S.; PINA, S.; GIRONES, R. Documenting the epidemiology patterns of polyomaviruses in human populations by studying their presence in urban sewage. **Applied and Environmental Microbiology**, v.66, p.238-245, 2000.

BOFFIL-MAS, S.; RODRIGUEZ-MANZANO, J.; CALGUA, B.; CARRATALÁ, A.; GIRONES, R. Newly described human polyomaviruses Merkel Cell, KI and WU are present in urban sewage and may represent potential environmental contaminants. **Virology Journal**, v.7, p.2-5, 2010.

BOOM, R.; SOL, C.J.; SALIMANS, M.M.; JANSEN, C.L.; WERTHEIM-VAN DILLEN, P.M.; VAN DER NOORDAA, J. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. **Journal of Clinical Microbiology**, v.28, p.495-503, 1990.

BOOTHUPUR, R.; BRENNAN, D.C. Human polyoma viruses and disease with emphasis on clinical BK and JC. **Journal of Clinical Virology**, v.47, p.306-312, 2010.

BOSCH, A.; GUIX, S.; SANO, D.; PINTO, R.M. New tools for the study and direct surveillance of viral pathogens in water. **Current Opinion in Biotechnology**, v.19, p.295-301, 2008.

BOSCH, A.; LE GUYADER, F. Viruses in shellfish. **Food and Environmental Virology**, v.2, 2010.

BOSCH, A.; XAVIER ABAD, F.; PINTÓ, R.M. Human pathogenic viruses in the marine environment. In: Belkin; Colwell (Eds). **Ocean and health: Human pathogenic viruses in the marine environment**. New York: Springer, 2005. p. 109-131.

BRASIL - MINISTÉRIO DA SAÚDE. Estabelece procedimentos e responsabilidades relativos ao controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade, e dá outras providências. Portaria n. 518, de 25 de março de 2004. **Ministério da Saúde**: Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Diário Oficial da União, 26 de março 2004.

BROOKS, H.A.; GERSBERG, R.M.; DHAR, A.K. Detection and quantification of hepatitis A virus in seawater via real-time RT-PCR. **Journal of Virological Methods**, v.127, p.109-118, 2005.

CALGUA, B.M., A.; GRÜNERT, A.; BOFILL-MAR, S.; CLEMENTE-CASARES, P.; HUNDESA, A.; WYN-JONES, A. P.; LÓPEZ-PILA, J. M.; GIRONES, R. Development and application of a one-step low cost procedure to concentrate viruses from seawater samples. **Journal of Virological Methods**, v.153, p.79-83, 2008.

CHOO, Y.-J.; KIM, S.-J. Detection of human adenoviruses and enteroviruses in Korean oysters using cell culture, integrated cell culture-PCR, and direct PCR. **The Journal of Microbiology**, v.44, p.162-170, 2006.

CONAMA - CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE. Define os critérios de balneabilidade em águas brasileiras. Resolução n. 274, de 20 de março de 2000. **Ministério do Meio Ambiente**: Conselho Nacional do Meio Ambiente, Diário Oficial da União, p.256-258, 25 de janeiro 2001.

CONAMA - CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE. Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes e dá outras providências. Resolução n. 357, de 17 de março de 2005. **Ministério do Meio Ambiente**: Conselho Nacional do Meio Ambiente, Diário Oficial da União, p.58-63, 18 de março 2005.

CORRÊA, A.A.; ALBARNAZ, J.D.; MORESCO, V.; POLI, C.R.; TEIXEIRA, A.L.; SIMÕES, C.M.O.; BARARDI, C.R.M. Depuration dynamics of oysters (*Crassostrea gigas*) artificially contaminated by *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. **Marine Environmental Research**, v.63, p.479-489, 2007.

COSTA-MATTIOLI, M.; FERRÉ, V.; CASANE, D.; PEREZ-BERCOFF, R.; COSTE-BUREL, M.; IMBERT-MARCILLE, B.M.; ANDRE, E.C.M.;

BRESSOLLETTE-BODIN, C.; BILLAUDEL, S.; CRISTINA, J. Evidence of recombination in natural populations of hepatitis A virus. **Virology**, v.311, p.51-59, 2003.

CROMEANS, T.L.; LU, X.; ERDMAN, D.D.; HUMPHREY, C.D.; HILL, V.R. Development of a plaque assay for adenoviruses 40 and 41. **Journal of Virological Methods**, v.151, p.140-145, 2008.

CUTHBERT, J.A. Hepatitis A: old and new. **Clinical Microbiology Reviews**, v.14, p.38-58, 2001.

DA SILVA, A.K.; LE SAUX, J.C.; PARNAUDEAU, S.; POMMEPUY, M.; ELIMELECH, M.; LE GUYADER, F. Evaluation of removal of noroviruses during wastewater treatment using real-time reverse transcription-PCR: different behaviors of genogroup I and II. **Applied and Environmental Microbiology**, v.73, p.7891-7897, 2007.

DE PAULA, V.S.; DINIZ-MENDES, L.; VILLAR, L.M.; LUZ, S.L.; SILVA, L.A.; JESUS, M.S.; DA SILVA, N.M.; GASPAS, A.M. Hepatitis A virus in environmental water samples from the Amazon Basin. **Water Research**, v.41, p.1169-1176, 2007.

FARRAH, S.R.; GOYAL, S.M.; GERBA, C.P.; WALLIS, C.; MELNICK, J., L. Concentration of enterovirus from estuarine water. **Applied and Environmental Microbiology**, v.33, p.1192-1196, 1977.

FONG, T.T.; GRIFFIN, D.W.; LIPP, E.K. Molecular assays for targeting human and bovine enteric viruses in coastal waters and their application for library-independent source tracking. **Applied and Environmental Microbiology**, v.71, p.2070-2078, 2005.

FONG, T.T.; LIPP, E.K. Enteric viruses of humans and animals in aquatic environments: health risks, detection, and potential water quality assessment tools. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v.69, p.357-371, 2005.

FORMIGA-CRUZ, M.; TOFINO-QUESADA, G.; BOFILL-MAS, S.; LEES, D.N.; HENSHILWOOD, K.; ALLARD, A.K.; CONDEN-HANSSON, A.C.; HERNROTH, B.E.; VANTARAKIS, A.; TSIBOUXI, A.; PAPAPETROPOULOU, M.; FURONES, M.D.; GIRONES, R. Distribution of human virus contamination in shellfish from different

growing areas in Greece, Spain, Sweden, and the United Kingdom. **Applied and Environmental Microbiology**, v.68, p.5990-5998, 2002.

FUMIAN, T.M.; GUIMARAES, F.R.; PEREIRA VAZ, B.J.; DA SILVA, M.T.; MUYLAERT, F.F.; BOFFIL-MAS, S.; GIRONES, R.; LEITE, J.C.; MIAGOSTOVICH, M. Molecular detection, quantification and characterization of human polyomavirus JC from waste water in Rio de Janeiro, Brazil. **Journal of Water and Health**, v.8, p.438-445, 2010.

GENTRY, J.; VINJÉ, J.; LIPP, E.K. A rapid and efficient method for quantification of genogroups I and II norovirus from oysters and application on other complex environmental samples. **Journal of Virological Methods**, v.156, p.59-65, 2009.

GERBA, C.P. Survival of viruses in the marine environment. In: Belkin; Colwell (Eds). **Oceans and health: Pathogens in the marine environment**. New York: Springer, 2005. p. 133-141.

GERSBERG, R.M.; ROSE, M.A.; ROBLES-SIKISAKA, R.; DHAR, A.K. Quantitative detection of hepatitis A and enteroviruses near the United States-Mexico border and correlation with levels of fecal indicator bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, v.72, p.7438-7444, 2006.

GIRONES, R.; FERRÚS, M.A.; ALONSO, J.L.; RODRIGUEZ-MANZANO, J.; CALGUA, B.; CORRÊA, A.A.; HUNDESA, A.; CARRATALÁ, A.; BOFILL-MAS, S. Molecular detection of pathogens in water - the pros and cons of molecular techniques. **Water Research**, v.44, p.4325-4339, 2010.

GREEN, K.Y. Caliciviridae: The Noroviruses. In: Knipe, D. M.; Holey, P. M. (Eds). **Fields Virology**. 5th. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2007. p. 950-979.

GRIFFIN, D.W.; DONALDSON, K.A.; PAUL, J.H.; ROSE, J.B. Pathogenic human viruses in coastal waters. **Clinical Microbiology Reviews**, v.16, p.129-143, 2003.

HALL, T.A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, v.41, p.95-98, 1999.



HAMZA, I.A.; 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. **Water Research**, v.43, p.2657-2668, 2009.

HARAMOTO, E.; KATAYAMA, H.; OGUMA, K.; OHGAKI, S. Quantitative analysis of human enteric adenoviruses in aquatic environments. **Journal of Applied Microbiology**, v.103, p.2153-2159, 2007.

HERNROTH, B.E.; CONDÉN-HANSSON, A.C.; REHNSTAM-HOLM, A.S.; GIRONES, R.; ALLARD, A.K. Environmental factors influencing human viral pathogens and their potential indicator organisms in the blue mussel, *Mytilus edulis*: the first Scandinavian report. **Applied and Environmental Microbiology**, v.68, p.4523-4533, 2002.

HEWITT, J.; BELL, D.; SIMMONS, G.C.; RIVERA-ABAN, M.; WOLF, S.; GREENING, G.E. Gastroenteritis outbreak caused by waterborne norovirus at New Zealand Ski Resort. **Applied and Environmental Microbiology**, v.73, p.7853-7857, 2007.

HOLLINGER, F.B.; EMERSON, S.U. Hepatitis A Virus. In: Knipe, D. M.; Howley, P. M. (Eds). **Fields Virology**. 5th. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2007. p. 912-947.

HUNDESA, A.; MALUQUER DE MOTES, C.; BOFILL-MAS, S.; ALBINANA-GIMENEZ, N.; GIRONES, R. Identification of human and animal adenoviruses and polyomaviruses for determination of sources of fecal contamination in the environment. **Applied and Environmental Microbiology**, v.72, p.7886-7893, 2006.

IBGE - INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Pesquisa Nacional de Saneamento Básico 2008. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br>. Acesso em: 08 de novembro 2010, p.1-219, 2010.

IMPERIALE, M.J.; MAJOR, E.O. Polyomaviruses. In: Knipe, D. M.; Howley, P. M. (Eds). **Fields Virology**. 5th. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2007. p. 2264-2298.

JIANG, S.C.; CHU, W.; HE, J.-W. Seasonal detection of human viruses and coliphage in Newport Bay, California. **Applied and Environmental Microbiology**, v.73, p.6468-6474, 2007.

- JOTHIKUMAR, N.; CROMEANS, T.L.; SOBSEY, M.D.; ROBERTSON, H. Development and evaluation of a broadly reactive TaqMan assay for rapid detection of hepatitis A virus. **Applied and Environmental Microbiology**, v.71, p.3359-3363, 2005.
- KAGEYAMA, T.; KOJIMA, S.; SHINOHARA, M.; UCHIDA, K.; FUKUSHI, S.; HOSHINO, F.B.; TAKEDA, N.; KATAYAMA, K. Broadly reactive and highly sensitive assay for Norwalk-Like viruses based on real-time quantitative reverse transcription-PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v.41, p.1548-1557, 2003.
- KATAYAMA, H.; HARAMOTO, E.; OGUMA, K.; YAMASHITA, H.; TAJIMA, A.; NAKAJIMA, H.; OHGAKI, S. One-year monthly quantitative survey of noroviruses, enteroviruses, and adenoviruses in wastewater collected from six plants in Japan. **Water Research**, v.42, p.1441-1448, 2008.
- 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. **Applied and Environmental Microbiology**, v.68, p.1033-1039, 2002.
- KEAN, J.M.; RAO, S.; WANG, M.; GARCEA, R.L. Seroepidemiology of human polyomaviruses. **PLoS Pathogens**, v.5, p.1-10, 2009.
- KUMAR, S.; TAMURA, K.; NEI, M. MEGA 3.1: Integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. **Briefings in Bioinformatics**, v.5, p.150-163, 2004.
- KUO, D.H.-W.; SIMMONS, F.J.; BLAIR, S.; HART, E.; ROSE, J.B.; XAGORARAKI, I. Assessment of human adenovirus removal in a full-scale membrane bioreactor treating municipal wastewater. **Water Research**, v.44, p.1520-1530, 2010.
- 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. **Applied and Environmental Microbiology**, v.73, p.4152-4161, 2007.
- LAMBERTINI, E.; SPENCER, S.K.; BERTZ, P.D.; LOGE, F.J.; KIEKE, B.A.; BORCHARDT, M.A. Concentration of enteroviruses, adenoviruses

and noroviruses from drinking water by use of glass wool filters. **Applied and Environmental Microbiology**, v.74, p.2990-2996, 2008.

LAMHOUEB, S.; FLISS, I.; NGAZOA, S.E.; JEAN, J. Evaluation of the persistence of infectious human noroviruses on food surfaces by using real-time nucleic acid sequence-based amplification. **Applied and Environmental Microbiology**, v.74, p.3349-3355, 2008.

LE GUYADER, F.; HAUGARREAU, L.; MIOSSEC, R.; DUBOIS, E.; POMMEPUY, M. Three-year study to assess human enteric viruses in shellfish. **Applied and Environmental Microbiology**, v.66, p.3248-3248, 2000.

LE GUYADER, F.; PARNAUDEAU, S.; SCHAEFFER, J.; BOSCH, A.; LOISY, F.; POMMEPUY, M.; ATMAR, R.L. Detection and quantification of norovirus in shellfish. **Applied and Environmental Microbiology**, v.75, p.618-624, 2009.

LECLERC, H.; SCHWARTZBROD, L.; DEI-CAS, E. Microbial agents associated with waterborne diseases. **Critical Reviews in Microbiology**, v.28, p.371-409, 2002.

LEE, C.; KIM, S.J. Molecular detection of human enteric viruses in urban rivers in Korea. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.18, p.1156-1163, 2008.

LOISY, F.; ATMAR, R.L.; GUILLON, P.; LE CANN, P.; POMMEPUY, M.; LE GUYADER, F. Real-time RT-PCR for norovirus screening in shellfish. **Journal of Virological Methods**, v.123, p.1-7, 2005.

LUKASIK, J.; SCOTT, T.M.; ANDRYSHAK, D.; FAHHAH, S.R. Influence of salts on virus adsorption to microporous filters. **Journal of Applied Microbiology**, p.2914-2920, 2000.

MCNEES, A.L.; WHITE, Z.S.; ZANWAR, P.; VILCHEZ, R.A.; BUTEL, J.S. Specific and quantitative detection of human polyomaviruses BKV, JCV, and SV40 by real time PCR. **Journal of Clinical Virology**, v.34, p.52-62, 2005.

MENA, K.D.; GERBA, C.P. Waterborne Adenovirus. **Reviews of Environmental Contamination and Toxicology**, v.198, p.133-167, 2008.

- MIAGOSTOVICH, M.P.; FERREIRA, F.F.; GUIMARAES, F.R.; FUMIAN, T.M.; DINIZ-MENDES, L.; LUZ, S.L.; SILVA, L.A.; LEITE, J.P. Molecular detection and characterization of gastroenteritis viruses occurring naturally in the stream waters of Manaus, central Amazonia, Brazil. **Applied and Environmental Microbiology**, v.74, p.375-382, 2008.
- MORGA, J.H.; LEON-FELIX, J.; PERAZA-GARAY, F.; GIL-SALAS, B.G.; CHAIDEZ, C. Detection and characterization of hepatitis A virus and norovirus in estuarine water samples using ultrafiltration-RT-PCR integrated methods. **Journal of Applied Microbiology**, v.106, p.1579-1590, 2009.
- MUNIAIN-MUJICA, I.; GIRONES, R.; TOFINO-QUESADA, G.; CALVO, M.; LUCENA, F. Depuration dynamics of viruses in shellfish. **Journal of Food Microbiology**, v.77, p.125-133, 2002.
- NEMEROW, G.R.; PACHE, L.; REDDY, V.; STEWART, P.L. Insights into adenovirus host cell interactions from structural studies. **Virology**, v.384, p.380-388, 2009.
- NEU, U.; STEHLE, T.; ATWOOD, W.J. The Polyomaviridae: Contributions of virus structure to our understanding of virus receptors and infectious entry. **Virology**, v.384, p.389-399, 2009.
- NGAZOA, S.E.; FLISS, I.; JEAN, J. Quantitative study of persistence of human norovirus genome in water using TaqMan real-time RT-PCR. **Journal of Applied Microbiology**, v.104, p.707-715, 2008.
- NORDGREN, J.; MATUSSEK, A.; MATTSSON, A.; SVENSSON, L.; LINDGREN, P.-E. Prevalence of norovirus and factors influencing virus concentrations during one year in a full-scale wastewater treatment plant. **Water Research**, v.43, p.1117-1125, 2009.
- ORTEGA, C.; SOLO-GABRIELE, H.M.; ABDELZAHER, A.; WRIGHT, M.; DENG, Y.; STARK, L.M. Correlations between microbial indicators, pathogens, and environmental factors in a subtropical estuary. **Marine Pollution Bulletin**, v.58, p.1374-1381, 2009.
- PAL, A.; SITORA, L.; MAUDRU, T.; PEDEN, K.; LEWIS JR, A.M. Real-time, quantitative PCR assays for the detection of virus-specific DNA in samples with mixed populations of polyomaviruses. **Journal of Virological Methods**, v.135, p.32-42, 2006.

PANG, X.L.; PREIKSAITIS, J.K.; LEE, B. Multiplex real time RT-PCR for the detection and quantification of norovirus genogroups I and II in patients with acute gastroenteritis. **Journal of Clinical Virology**, v.33, p.168-171, 2005.

PATEL, M.M.; WIDDOWSON, M.A.; GLASS, R.I.; AKAZAWA, K.; VINJÉ, J.; PARASHAR, U.D. Systematic literature review of role of noroviruses in sporadic gastroenteritis. **Emerging Infectious Diseases**, v.14, p.1224-1231, 2008.

PINTÓ, R.M.; COSTAFREDA, M.I.; PÉREZ-RODRIGUEZ, F.J.; ANDREA, L.D.; BOSCH, A. Hepatitis A: State of the art. **Food and Environmental Virology**, v.2, p.127-135, 2010.

PRADO, T.; SILCA, D.M.; GUILAYN, W.C.; ROSE, T.L.; GASPAR, A.M.; MIAGOSTOVICH, M. Quantification and molecular characterization of enteric viruses detected in effluents from two hospital wastewater treatment plants. **Water Research**, v.45, p.1287-1297, 2010.

PUIG, M.; JOFRE, J.; LUCENA, F.; ALLARD, A.; WADELL, G.; GIRONES, R. Detection of adenoviruses and enteroviruses in polluted waters by nested PCR amplification. **Applied and Environmental Microbiology**, v.60, p.2963-2970, 1994.

RIGOTTO, C.; KOLESNIKOVAS, C.K.M.; MORESCO, V.; SIMÕES, C.M.; BARARDI, C.R. Evaluation of HA negatively charged membranes in the recovery of human adenoviruses and hepatitis A virus in different water matrices. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.104, p.970-974, 2009.

RIGOTTO, C.; SINCERO, T.C.; SIMÕES, C.M.; BARARDI, C.R. Detection of adenoviruses in shellfish by means of conventional-PCR, nested-PCR, and integrated cell culture PCR (ICC/PCR). **Water Research**, v.39, p.297-304, 2005.

RIGOTTO, C.; VICTORIA, M.; MORESCO, V.; KOLESNIKOVAS, C.K.M.; CORREA, A.A.; SOUZA, D.S.M.; MIAGOSTOVICH, M.; SIMÕES, C.M.; BARARDI, C.R. Assessment of adenovirus, hepatitis A virus and rotavirus presence in environmental samples in Florianópolis, South Brazil. **Journal of Applied Microbiology**, v.109, p.1979-1987, 2010.

ROBERTS, P.J.W.; SALAS, H.J.; REIFF, F.M.; LIBHABER, M.; LABBE, A.; THOMSON, J.C. Marine wastewater outfalls and treatment systems. **Water** 21, London, p. 22-26, october, 2010.

RODRÍGUEZ, R.A.; PEPPER, I.L.; GERBA, C.P. Application of PCR-based methods to assess the infectivity fo enteric viruses in environmental samples. **Applied and Environmental Microbiology**, v.75, p.297-307, 2009.

RUTJES, S.A.; VAN DEN BERG, H.H.J.L.; LODDER, W.J.; RODA HUSMAN, A.M. Real-Time detection of noroviruses in surface water by use of a broadly reactive nucleic acid sequence-based amplification assay. **Applied and Environmental Microbiology**, v.72, p.5349-5358, 2006.

RZEZUTKA, A.; COOK, N. Survival of human enteric viruses in the environmental and food. **FEMS Microbiology Reviews**, v.28, p.441-453, 2004.

SCHLINDWEIN, A.D.; RIGOTTO, C.; SIMÕES, C.M.; BARARDI, C.R. Detection of enteric viruses in sewage sludge and treated wastewater effluent. **Water Science Technology**, v.61, p.537-544, 2010.

SCIPIONE, A.; MAUROY, A.; VINJÉ, J.; THIRY, E. Animal noroviruses. **The Veterinary Journal**, v.178, p.32-45, 2008.

SINCERO, T.C.; LEVIN, D.B.; SIMÕES, C.M.; BARARDI, C.R. Detection of hepatitis A virus (HAV) in oysters (*Crassostrea gigas*). **Water Research**, v.40, p.895-902, 2006.

SIRIKANCHANA, K.; SHISLER, J.L.; MARIÑAS, B.J. Inactivation kinetics of adenovirus serotype 2 with monochloramine. **Water Research**, v.42, p.1467-1474, 2008.

SKRABER, S.; GASSILLOUD, 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 Research**, v.38, p.2927-2933, 2004.

SOLLER, J.A.; BARTRAND, T.; ASHBOLT, N.J.; RAVENSCROFT, J.; WADE, T. Estimating the primary etiologic agents in recreational fresh water impacted by human sources of faecal contamination. **Water Research**, v.44, p.4736-4747, 2010.

STRAUB, T.M.; CHANDLER, D.P. Towards a unified system for detecting waterborne pathogens. **Journal of Microbiological Methods**, v.53, p.185-197, 2003.

TAN, M.; FANG, P.; CHACHIYO, T.; XIA, M.; HUANG, P.; FANG, Z.; JIANG, W.; JIANG, X. Noroviral P particle: structure, function and applications in virus-host interaction. **Virology**, v.382, p.115-123, 2008.

TAVARES, M.T.; CARDOSO, D.D.P.; DE BRITO, W.M.E.D. Vírus entéricos veiculados por água: aspectos microbiológicos de controle de qualidade da água. **Revista de Patologia Tropical**, v.34, p.85-104, 2005.

TORANZOS, G.A.; GERBA, C.P. An improved method for the concentration of rotaviruses from large volumes of water. **Journal of Virological Methods**, v.24, p.131-140, 1989.

TREE, J.A.; ADAMS, M.R.; LEES, D.N. Chlorination of indicator bacteria and viruses in primary sewage effluent. **Applied and Environmental Microbiology**, v.69, p.2038-2043, 2003.

TSAI, Y.L.; TRAN, B.; PALMER, C.J. Analysis of viral RNA persistence in seawater y reverse transcription-PCR. **Applied and Environmental Microbiology**, v.61, p.363-366, 1995.

VAN HEERDEN, J.; EHLERS, M.M.; HEIN, A.; GRABOW, W.O.K. Prevalence, quantification and typing of adenoviruses detected in river and treated drinking water in South Africa. **Journal of Applied Microbiology**, v.99, p.234-242, 2005.

VICTORIA, M.; CARVALHO-COSTA, F.A.; HEINEMANN, M.B.; LEITE, J.C.; MIAGOSTOVICH, M. Prevalence and molecular epidemiology of noroviruses in hospitalized children with acute gastroenteritis in Rio de Janeiro, Brazil, 2004. **Pediatric Infectious Disease Journal**, v.26, p.602-606, 2007.

VICTORIA, M.; GUIMARAES, F.; FUMIAN, T.; FERREIRA, F.; VIEIRA, C.; LEITE, J.P.; MIAGOSTOVICH, M. Evaluation of an adsorption-elution method for detection of astrovirus and norovirus in environmental waters. **Journal of Virological Methods**, v.156, p.73-76, 2009.

VICTORIA, M.; RIGOTTO, C.; MORESCO, V.; CORRÊA, A.A.; KOLESNIKOVAS, C.K.M.; LEITE, J.P.G.; MIAGOSTOVICH, M.P.; BARARDI, C.R. Assessment of norovirus contamination in environmental samples from Florianópolis City, southern Brazil. **Journal of Applied Microbiology**, v.109, p.231-238, 2009.

VILLAR, L.M.; MORAIS, L.M.; ALOISE, R.; MELO, M.M.; CALADO, I.A.; LAMPE, E.; GASPAR, A.M. Co-circulation of genotypes IA and IB of hepatitis A virus in Northeast Brazil. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.39, p.873-881, 2006.

WETZ, J.J.; LIPP, E.K.; GRIFFIN, D.W.; LUKASIK, J.; WAIT, D.; SOBSEY, M.D.; SCOTT, T.M.; ROSE, J.B. Presence, infectivity, and stability of enteric viruses in seawater: relationship to marine water quality in the Florida Keys. **Marine Pollution Bulletin**, v.48, p.698-704, 2004.

WOBUS, C.E.; THACKRAY, L.B.; HERBERT, W. Murine norovirus: a model system to study norovirus biology and pathogenesis. **Journal of Virology**, v.80, p.5104-5112, 2006.

WOLD, W.S.M.; HORWITZ, M.S. Adenoviruses. In: Knipe, D. M.; Howley, P. M. (Eds). **Fields Virology**. 5th. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2007. p. 2396-2436.

WONG, M.; KUMAR, L.; JENKINS, T.M.; XAGORARAKI, I.; PHANIKUMAR, M.S.; ROSE, J.B. Evaluation of public health risks at recreational beaches in Lake Michigan via detection of enteric viruses and a human-specific bacteriological marker. **Water Research**, v.43, p.1137-1149, 2009.

WYN-JONES, A.P.; CARDUCCI, A.; COOK, N.; D'AGOSTINO, M.; DIVIZIA, M.; FLEISCHER, J.; GANTZER, C.; GAWLER, A.; GIRONES, R.; HOLLER, C.; HUSMAN, A.M.; KAY, D.; KOZYRA, I.; LÓPEZ-PILA, J.; MUSCILLO, M.; NASCIMENTO, M.S.; PAPAGEORGIOU, G.; RUTJES, S.; SZEWZYK, R.; WYER, M. Surveillance of adenoviruses and noroviruses in European recreational waters. **Water Research**, v.45, p.1025-1038, 2010.

WYN-JONES, A.P.; SELLWOOD, J. Enteric viruses in the aquatic environment. **Journal of Applied Microbiology**, v.91, p.945-962, 2001.



XAGORARAKI, I.; KUO, D.H.-W.; WONG, K.; WONG, M.; ROSE, J.B. Occurrence of human adenoviruses at two recreational beaches of the Great Lakes. **Applied and Environmental Microbiology**, v.73, p.7874-7881, 2007.

XAVIER, M.P.; OLIVEIRA, S.A.; FERREIRA, M.S.; VICTORIA, M.; MIRANDA, V.; SILVA, M.F.; STRINA, A.; BARRETO, M.L. Detection of caliciviruses associated with acute infantile gastroenteritis in Salvador, an urban center in Northeast Brazil. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.42, p.438-444, 2009.

YEH, H.Y.; YATES, M.V.; CHEN, W.; MULCHANDANI, A. Real-time molecular methods to detect infectious viruses. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, v.20, p.49-54, 2009.

ZHENG, D.P.; ANDO, T.; FANKHAUSER, R.L.; BEARD, R.S.; GLASS, R.I.; MONROE, S.S. Norovirus classification and proposed strain nomenclature. **Virology**, v.346, p.312-323, 2006.