

Natália Alzira Damazo

**ANÁLISE DA ESTABILIDADE E INFECCIOSIDADE DA CEPA  
VACINAL DE ROTAVÍRUS A EM DIFERENTES MATRIZES  
AQUÁTICAS E TEMPOS DE ESTOCAGEM**

Trabalho de Conclusão de  
Curso de Graduação em  
Ciências Biológicas  
(Bacharelado) da Universidade  
Federal de Santa Catarina.  
Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Célia  
Regina Monte Barardi  
Co-orientadora: MSc. Vanessa  
Moresco

Florianópolis  
2015

Damazo, Natália Alzira  
Métodos Para a Análise da Estabilidade e Infeciosidade  
da Cepa Vacinal de Rotavírus A em Diferentes Matrizes  
Aquáticas e Tempos de Estocagem / Natália Alzira Damazo ;  
orientadora, Célia Regina Monte Barardi ; co-orientadora, Vanessa  
Moresco. - Florianópolis, SC, 2015.51 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) -  
Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas.  
Graduação em Ciências Biológicas.

Inclui referências

1. Ciências Biológicas. 2. Estabilidade viral. 3.  
Rotavírus. 4. Vacina. 5. Técnicas Celulares. I. Barardi,  
Célia. II. Moresco, Vanessa. III. Universidade Federal de  
Santa Catarina. Graduação em Ciências Biológicas. IV. Título.

Natália Alzira Damazo

**MÉTODOS PARA A ANÁLISE DA ESTABILIDADE E  
INFECCIOSIDADE DA CEPA VACINAL DE ROTAVÍRUS A EM  
DIFERENTES MATRIZES AQUÁTICAS E TEMPOS DE  
ESTOCAGEM**

Esta monografia foi julgada adequada para obtenção do grau de Bacharel em Biologia, e aprovado em sua forma final pelo Curso de Graduação de Biologia.

Florianópolis, 13 de Fevereiro de 2015

Banca Examidora:

---

Célia Regina Monte Barardi  
Orientadora  
Universidade Federal de Santa Catarina

---

Carlos Roberto Zanetti  
Universidade Federal de Santa Catarina

---

Caroline Rigotto  
Fevalle-Novo Hamburgo (RS)

---

Carlos José de Carvalho Pinto  
Universidade Federal de Santa Catarina





Dedico este trabalho à minha linda família.



## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por nos ter criado por liberdade, bondade e amor. Agradeço a minha família, meu pai Valdeno Manoel Damazo, minha mãe Alzira Verginia Damazo, por deixarem de realizar muitas vezes seus sonhos para realizarem os meus. Meu irmão Philipe Valdeno Damazo pelas ajudas nas madrugadas de estudos e ao meu noivo Geovane Romeu Ribeiro, por me acolher em seu coração, por ser esse grande amigo, um exemplo de amor, generosidade e humildade. Obrigada por terem sido instrumentos de amor nos momentos mais difíceis em minha vida e também nos momentos de maior alegria. Sou muito grata por todo incentivo, carinho, dedicação e zelo.

Aos meus familiares, avós, tios (as), primos (as) por toda preocupação e força. Aos amigos em especial, aqueles que acompanharam minha infância, adolescência e juventude, enfim todo desenvolvimento e contribuíram para minha formação pessoal. Gratidão aquelas também que foram minhas companheiras, por todo o apoio, amizade, carinho e conselhos, durante os 4 anos de estudo. Levarei vocês sempre em meu coração.

A todos os professores que contribuíram para o meu desenvolvimento nos estudos e aprendizado, aos professores convidados para a banca, professor Carlos Roberto Zanetti, professor Carlos José de Carvalho Pinto e professora Caroline Rigotto. Obrigada por aceitarem este convite e, em especial as professoras Cláudia Oliveira Simões, por me acolher no Laboratório e também a minha orientadora e professora, Célia Regina Monte Barardi, por toda orientação, dedicação e paciência. A Vanessa Moresco por me coorientar durante estes dois anos que estive no laboratório, por toda amizade, conselhos, dedicação e, principalmente pela confiança depositada em mim. Aos demais colegas de laboratório, muito obrigada pelas campanhas nos finais de semana, nas manhãs (madrugadas) e noites intermináveis de experimentos.



## RESUMO

Os Rotavírus (RVA) estão envolvidos com muitos surtos de diarreia em crianças menores de 5 anos de idade, principalmente devido às más condições sanitárias. Hoje em dia, duas vacinas estão disponíveis e seus impactos na melhoria da saúde pública já foram apresentados. No entanto, não existem estudos avaliando o impacto destas cepas vacinais no ambiente aquático. Já que são vacinas atenuadas, o objetivo do estudo foi avaliar a estabilidade de uma cepa vacinal do Rotavírus (RotaTeq) em diferentes matrizes aquáticas em função do tempo e da temperatura de estocagem. O RVA foi propagado em células MA104 e o título do estoque viral foi obtido por ensaio de placa de lise (UFP) padronizado neste trabalho. A quantidade de  $2,2 \times 10^7$  UFP/mL do estoque viral foi semeada em diferentes matrizes de água: **P** (Lagoa do Peri, Água de manancial); **C** (Água de consumo, tratada não clorada); e **L** (Lagoa da Conceição, Água de recreação). Alíquotas foram armazenadas nas temperaturas de 22 e 4°C para simular temperatura ambiental e de armazenamento de amostra em laboratório/Posto de Saúde respectivamente. A estabilidade foi avaliada por UFP e por RT-qPCR em diferentes tempos mensurados em "dias de armazenamento" por até 180 dias. A redução do título viral foi expressa em valores de redução de logarítmica ( $\log_{10}$ ). Em todos os casos, os valores mais elevados de redução  $\log_{10}$  por UFP foram observados nas amostras de água estocadas a 22°C diferentemente do que ocorreu com o RT-qPCR onde as maiores reduções de cópias genômicas foram observadas nas amostras estocadas a 4°C. A presença de outros micro-organismos, assim como as propriedades físico-químicas intrínsecas das amostras podem explicar a diferença nos valores de redução observados, podendo ter afetado a estabilidade viral e/ou promovido a agregação destes.

**Palavras-chave:** estabilidade viral, rotavírus cepa vacinal, cultivo celulares, infeciosidade viral, RT-qPCR, contaminação ambiental.

## ABSTRACT

Rotavirus (RVA) is involved with many outbreaks of diarrhea in children under 5 years of age, mainly due to poor sanitation conditions. Nowadays, two vaccines are available and their impact on improving public health was already presented. However, there are no studies evaluating the impact of the presence and stability of these vaccine strains in the aquatic environment. Since they are attenuated vaccines, the objective of this study was to evaluate the influence of the time and temperature on the stability of the RVA vaccine strain (RotaTeq) in environmental waters. The RVA was propagated in MA104 cells and the titer of the viral stock was measured by plaque assay (UFP) standardized in the present study. An amount of  $2.2 \times 10^7$  UFP/mL of the viral stock was seeded in three different surface water matrices: P (Lagoa do Peri, surface water lagoon); C (surface unchlorinated drinking water); and L (Lagoa da Conceição, backish water lagoon from recreational area). Aliquots (1,0 mL) were stored at temperatures of 22 and 4°C to simulate, respectively, environmental and laboratory/Health Clinics storage temperatures. The stability was evaluated by UFP and RT-qPCR over 180 day's period. The viral titre reduction was expressed as log reduction values ( $\log_{10} = N_t/N_0$ ). In all cases, the highest values of  $\log_{10}$  reduction by UFP was observed in the water samples stored at 22 °C. By the other hand, the RT-qPCR showed the largest genome copies reductions on samples stored at 4°C. The presence of other microorganisms, as well as the intrinsically physicochemical properties of the samples may explain the difference in the observed reduction values, which may affect the survival of the virus and/or promote the aggregation.

**Keywords:** Viral stability, rotavirus strain-vaccine, cell cultivation, viral infectivity, RT-qPCR, environmental contamination.

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Representação esquemática do capsídeo do Rotavírus composto por três camadas proteicas, bem como suas determinadas proteínas. Os 11 segmentos de material genético (RNA) são demonstrados em gel de eletroforese e constituem as diferentes proteínas expressas pelo vírus Adaptado de: HU, et al., 2012. ....	20
Figura 2 - Fluxograma dos passos realizados na técnica de placa de lise para rotavírus padronizada neste trabalho. ....	27
Figura 3 - Representação esquemática das diluições feitas e do estoque das alíquotas nos diferentes tempos estabelecidos neste trabalho. ....	28
Figura 4 – Imagens do ensaio de Imunofluorescência indireta para titulação do Rotavírus, onde os aglomerados verdes fluorescentes indicam células MA104 que foram infectadas pelo vírus .....	30
Figura 5 - Ensaio de Placa de lise onde a presença de halos brancos correspondem aos locais onde ocorreu lise celular pela infecção pelo rotavírus.....	31
Figura 6 - Valores de redução logarítmica ( $\log_{10}$ ) da infecciosidade da cepa vacinal do RV avaliada por placa de lise nas diferentes matrizes e na temperatura de 22°C. Estes valores representam a média de triplicatas e $\pm$ desvio padrão. ....	33
Figura 7 - Valores de redução logarítmica ( $\log_{10}$ ) da infecciosidade do RV cepa vacinal avaliada por placa de lise nas diferentes matrizes e na temperatura de 4°C. Estes valores representam a média de triplicatas e $\pm$ desvio padrão. ....	33
Figura 8 - Estabilidade do genoma da cepa vacinal do RV em diferentes matrizes aquáticas na temperatura de 22°C determinado por RT-qPCR. ....	34
Figura 9 - Estabilidade do genoma da cepa vacinal do RV em diferentes matrizes aquáticas na temperatura de 4°C determinado por RT-qPCR. ....	35

## ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 – Valores do decaimento da infecciosidade da cepa vacinal do Rotavírus em relação as temperaturas 22 e 4°C, obtido pela metodologia de Placa de Lise. ....	32
Tabela 2 - Valores de redução logarítmica ( $\log_{10}$ ) obtidos na avaliação da estabilidade genômica da cepa vacinal do RV pelo ensaio da RT-qPCR . ....	36
Tabela 3 - Comparação entre os resultados obtidos entre a temperatura sobre o tempo de estocagem na redução da cepa vacinal de RV. ....	37

## **LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

**CDC** Center for Disease Control and Prevention

**CG** Cópias Genômicas

**CONAMA** Conselho Nacional do Meio Ambiente

**DMEM** Dulbecco's modified Eagle médium

**EUA** Estados Unidos da América

**Feevale** Federação de Estabelecimento de Ensino Superior de Novo Hamburgo

**FITC** Isotiocianato de fluoresceína

**IBGE** Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

**ICC-PCR** Cultura Celular Integrada a Reação da Cadeia da Polimerase em Tempo Real precedida de tratamento enzimático

**IFI** Imunofluorescência Indireta

**MEM** Meio Mínimo Essencial com sais de Eagle's

**NaCl** Cloreto de Sódio

**OMS** Organização Mundial de Saúde

**PCR** Reação em Cadeia da Polimerase

**PSA** Penicilina, Streptomicina, Anfotericina

**qPCR** Reação em cadeia da Polimerase em Tempo Real

**RT-qPCR** Reação da Cadeia da Polimerase em Tempo Real precedida de Transcrição Reversa

**UFC** Unidades Formadoras de Colônias

**UFF** Unidade Formadora de Foco

**UFP** Unidade Formadora de Placa

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO .....	16
1.1 CONTAMINAÇÃO DO AMBIENTE AQUÁTICO ....	17
1.2 OS VÍRUS ENTÉRICOS .....	18
1.2.1 Rotavírus .....	19
1.2.2 Rotavírus A.....	20
1.2.3 Cepas Vacinais De Rotavírus A.....	21
1.2.4 Metodologias Disponíveis para A Avaliação da Infecciosidade e Estabilidade Viral em Amostras Ambientais .....	23
2 OBJETIVOS.....	24
2.1 OBJETIVO GERAL .....	24
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	24
3 MATERIAIS E MÉTODOS .....	24
3.1 PRODUÇÃO E TITULAÇÃO DO ESTOQUE VIRAL DE RVA UTILIZADO NAS SEMEADURAS DAS ÁGUAS .....	24
3.2 DETERMINAÇÃO DO TÍTULO INFECCIOSO DO ESTOQUE VIRAL PRODUZIDO POR IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA (IFI) .....	25
3.3 OTMIZAÇÃO DO ENSAIO DE FORMAÇÃO DE PLACA DE LISE E TITULAÇÃO DOS ESTOQUES VIRAIIS PRODUZIDOS .....	26
3.4 DESENHO EXPERIMENTAL DOS ESTUDOS DE ESTABILIDADE E INFECCIOSIDADE VIRAL.....	27
3.5 AVALIAÇÕES DA ESTABILIDADE GENÔMICA DE RVA POR RT-QPCR .....	28
3.6 ANÁLISES ESTATÍSTICAS .....	29

4 RESULTADOS.....	30
4.1 TITULAÇÃO DO FLUIDO VIRAL DE ROTAVÍRUS CEPA VACINAL POR IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA (IFI) .....	30
4.2 TITULAÇÃO DO FLUIDO VIRAL DE ROTAVÍRUS CEPA VACINAL PELA TÉCNICA DE PLACA DE LISE (UFP).....	30
4.3 ANÁLISE DA INFECCIOSIDADE DE ROTAVIRUS CEPA VACINAL EM DIFERENTES MATRIZES AQUÁTICAS.....	31
4.4 ANÁLISE DA INFECCIOSIDADE DE ROTAVÍRUS CEPA VACINAL EM DIFERENTES MATRIZES AQUÁTICAS POR RT-qPCR.....	34
4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	36
5 DISCUSSÃO.....	37
6 CONCLUSÃO .....	42
7 REFERÊNCIAS: .....	44

## 1 INTRODUÇÃO

A avaliação da infecciosidade viral no meio ambiente tem sido pesquisada em diferentes estudos, como por exemplo, na avaliação da dose infecciosa mínima, em estudos de persistência e resistência do vírus no ambiente, na avaliação do nível de contaminação de águas e de outras matrizes ambientais e em estudos sobre a avaliação da eficácia da inativação viral frente a tratamentos de águas e efluentes.

Apesar de ser uma metodologia clássica, o uso do cultivo celular com o objetivo de verificar a infecciosidade dos vírus contaminantes de uma amostra ambiental apresenta certas desvantagens, como o fato de possuir custos mais elevados, requerer laboratórios mais equipados e, em alguns casos, não ser possível devido ao fato de alguns vírus contaminantes do ambiente aquático não serem adaptados ao cultivo celular *in vitro* (YEH et al., 2009).

Como alternativas à detecção dos vírus em amostras ambientais utilizando cultura celular, podem-se empregar técnicas moleculares como a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e suas variações.

Dentre esses vírus, os mais comumente disseminados são: enterovírus, norovírus, vírus da hepatite A, adenovírus, rotavírus e os astrovírus (WU, 2011) de transmissão fecal-oral. Esses são normalmente excretados em altas concentrações nas fezes e em outras secreções de humanos infectados (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, águas do mar que recebem esgoto e moluscos bivalves cultivados em águas oceânicas impactadas por esgoto doméstico. Podem resistir no ambiente com relativa estabilidade ocasionando surtos de doenças em indivíduos susceptíveis (WYN-JONES & SELLWOOD, 2001).

A pesquisa de vírus contaminantes em diferentes matrizes ambientais apresenta grande relevância atualmente e tem se destacado também no Brasil com grupos desenvolvendo projetos de pesquisa de vírus em águas de consumo, residuais, lodos, água do mar bem como na carne de moluscos bivalves produzidos nestas águas (MIAGOSTOVICH et al., 2008; VECCHIA et al., 2012; SOUZA et al 2013 ). Entretanto, poucos grupos de pesquisa tanto no Brasil quanto em outros países têm dedicado a devida atenção ao estudo da infecciosidade destes vírus.



## 1.1 CONTAMINAÇÃO DO AMBIENTE AQUÁTICO

Apesar dos progressos atuais acerca do tratamento de água e esgoto, doenças relacionadas com a contaminação do ambiente aquático por diferentes patógenos continuam a ser um problema de saúde pública, causando implicações socioeconômicas em países desenvolvidos ou em desenvolvimento. De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), 3 milhões de mortes por ano estão associadas ao uso de fontes de água não seguras e às questões de saneamento e higiene, sendo que milhões de pessoas ainda sofrem com episódios não fatais de doenças diarreicas (WHO, 2006).

Dentre estes agentes patogênicos, 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 (WYN-JONES & SELLWOOD, 2001).

Os vírus entéricos podem ser introduzidos nos diferentes ambientes aquáticos através de diferentes atividades humanas e animais, como despejo indireto ou direto de esgoto não tratado ou inadequadamente tratado, o uso incorreto de sistemas de fossas sépticas, pela presença de resíduos de atividades urbanas, industriais e agrícolas, pelo despejo de esgoto não tratado em águas estuarinas, através do uso de emissários marinhos ou pelo despejo em águas de rios (FONG & LIPP, 2005).

Em relação aos controles de qualidade da água utilizados atualmente no Brasil, a legislação nacional prevê a avaliação da água somente frente à presença de micro-organismos indicadores tais como coliformes totais e fecais. A Portaria Nº 2.914/2011 do Ministério da Saúde atualmente revisada recomenda a inclusão do monitoramento de vírus entéricos no(s) ponto(s) de captação de água proveniente(s) de manancial(is) superficial(is) de abastecimento, com o objetivo de subsidiar estudos de avaliação de risco microbiológico. Já a Resolução do CONAMA nº 274/2001, que dispõe sobre a qualidade das águas destinadas às atividades de natação e mergulho (contato primário), prevê que a presença de coliformes termotolerantes não poderá exceder 250 UFC/100 mL (Unidades Formadoras de Colônias) (CONAMA nº 274/2001). A pesquisa de vírus em águas de superfície tratadas ou não tratadas, bem como em amostras de águas subterrâneas, ou em outros tipos de amostras ambientais, como moluscos bivalves ou águas residuais, constitui uma relevante linha de investigação, visando à

garantia da qualidade da água de uso e consumo para a população. A inclusão da análise viral para atestar a qualidade das águas pode contribuir para que vírus entéricos sejam um requerimento obrigatório. Por avaliação da contaminação dos diferentes tipos de ambientes aquáticos.

Devido à diversidade de ambientes aquáticos no Brasil e tendo em vista que segundo a Fundação Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), o Brasil possui 168.870m<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).

A importância da avaliação da presença, e da infecciosidade dos patógenos virais presentes em amostras de águas ambientais, torna-se evidente. Isto poderia contribuir, em um segundo momento, para a tomada de decisões quanto à relevância em se avaliar de forma rotineira a presença destes micro-organismos nos diferentes tipos de águas, usadas para distintas finalidades, bem como na determinação de um tratamento adequado dos efluentes visando à eliminação destes patógenos.

## 1.2 OS VÍRUS ENTÉRICOS

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 principalmente surtos de gastroenterites, otites, doenças do trato respiratório, meningites virais, e hepatites (GRIFFIN et al., 2003). A maioria dos vírus entéricos é formada por capsídeo(s) proteico(s) e material genético, sendo desprovidos de envelope bilipídico. O capsídeo proteico possui a função tanto de promover a interação vírus-célula hospedeira, necessária para a infecção, como a de proteger o material genético de degradação por nucleases e outros fatores, tornando os vírus mais resistentes à inativação (RODRÍGUEZ; PEPPER & GERBA, 2009).

Os vírus entéricos 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 adversas e a processos de tratamento de água e esgoto normalmente destinado ao controle

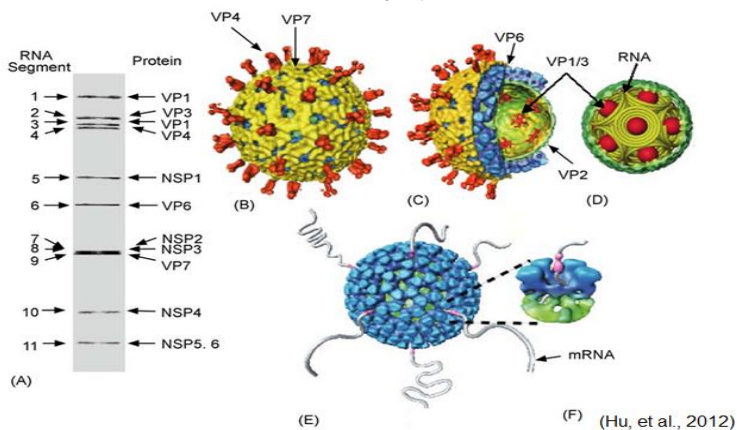
bacteriano. Além disso, podem agregar-se a partículas sólidas do meio aquático, ganhando maior estabilidade (TREE; ADAMS & LEES, 2003).

### 1.2.1 Rotavírus

Os rotavírus (RV) pertencem ao gênero *Rotavirus*, família Reoviridae. Medem cerca de 100nm de diâmetro, não possuem envelope, e apresentam capsídeo icosaédrico composto por tripla camada proteica sendo que a camada mais interna é denominada nucleocapsídeo, o qual envolve o genoma viral. Este é de natureza RNA dupla-fita segmentado (11 segmentos). A replicação ocorre através da RNA-polimerase dependente de RNA e por outras enzimas presentes no citoplasma das células infectadas (FIELDS, KNIPE & HOWLEY, 2007).

Classicamente os rotavírus estão divididos em sete grupos (A, B, C, D, E, F e G), sendo os últimos quatro encontrados apenas em animais (ESTES & KAPIKIAN, 2007). A identificação dos sorotipos/genótipos dos rotavírus é determinada através da antigenicidade das proteínas estruturais que compõem o capsídeo externo: VP7 e VP4 respectivamente. A classificação dos sorotipos é designada pela especificidade de anticorpos neutralizantes para ambas as proteínas. O sorotipo G é designado de acordo com as modificações antigênicas da glicoproteína VP7 (G é a letra inicial de glicoproteína). O sorotipo P dos rotavírus é devido à variabilidade genética do gene codificador da proteína VP4, que determina o genogrupos viral (P é a letra inicial de protease, pois essa proteína de capsídeo é susceptível à clivagem por proteases intestinais que promovem sua adsorção às microvilosidades intestinais). No intestino delgado a proteína VP4 é clivada pela enzima tripsina em VP5 e VP8 e esta clivagem possibilita a adsorção e penetração viral na célula (ESTES, 2007). Recentemente, para melhor classificar os RV, se propôs a pesquisa baseada na técnica molecular de RT-qPCR e na tentativa de elucidar completamente todos os 11 segmentos (VP7-VP4-VP6-VP1-VP2-VP3-NSP1-NSP2-NSP3-NSP4-SP5/6 V) (MATTHIJNSSENS, et al., 2008), como verificados na Figura 1.

Figura 1 - Representação esquemática do capsídeo do Rotavírus composto por três camadas proteicas, bem como suas determinadas proteínas. Os 11 segmentos de material genético (RNA) são demonstrados em gel de eletroforese e constituem as diferentes proteínas expressas pelo vírus Adaptado de: HU, et al., 2012.



Os RV possuem tropismo específico pelos enterócitos, localizados nas extremidades das microvilosidades intestinais, causando gastroenterites agudas e sendo liberados em altas concentrações nas fezes de indivíduos infectados (RAMIG, 2004).

### 1.2.2 Rotavírus A

Os rotavírus do genogrupo A (RVA) são os principais agentes etiológicos causadores de gastroenterites agudas, sendo anualmente responsáveis por mais de 100 milhões de episódios de diarreia, 30% dos casos são graves o suficiente para exigir visitas aos ambulatórios e hospitais e 600 mil mortes associadas à desnutrição de crianças entre zero e cinco anos de idade (principalmente na África, América Latina e Ásia) (MALEK, et al., 2006; PARASHAR, et al., 2006; LIU, et al., 2012). Nos EUA, antes da implementação da vacinação, doenças relacionadas a esses vírus causaram 3 milhões de episódios por ano, requerendo 500 mil visitas a ambulatórios e 60 mil hospitalizações, causando 20 a 40 mortes (FISCHER, et al., 2007; ESPOSITO, et al., 2011). Números semelhantes foram encontrados na Europa (SORIANO-

GABARRÓ, et al., 2006; VAN DAMME, et al., 2007), na África subsaariana e no Sul da Ásia (PARASHAR, et al., 2009; TATE, et al., 2012).

A maioria dos estudos epidemiológicos tem demonstrado que amostras de RVA, de genótipos P[8]G1, P[4]G2, P[8]G3, P[8]G4 e P[8]G9 são responsáveis pela maioria das infecções em humanos, sendo suscetíveis a recombinações genéticas (SANTOS & HOSHINO, 2005). No entanto, o genótipo P[8]G1 é o mais prevalente mundialmente, sendo responsável por mais de 70% das infecções por RVA na América do Norte, Europa e Austrália, embora esteja envolvido em apenas 30% das infecções por RVA na América do Sul, Ásia e 23% na África (TATE et al., 2010).

### **1.2.3 Cepas Vacinais De Rotavírus A**

Devido ao grande número de óbitos e hospitalizações por gastroenterites causadas pelos rotavírus, intensificaram-se os trabalhos para obtenção de uma vacina. A primeira vacina foi lançada no ano de 1998 e denominada Rotashield® (RRV-TV) (Wyeth Lederle Vacinas e Pediatria, Marietta, Pensilvânia, EUA), sendo uma vacina tetravalente, administrada em três doses aos 2, 4, e 6 meses de idade. No entanto, após um ano, em 1999, a RRV-TV foi retirada do mercado dos EUA devido à associação com uma grave enfermidade intestinal (Intussuscepção Intestinal) que pode levar a óbito, pois logo após o início das campanhas de vacinação, os casos desta enfermidade elevaram-se 20 vezes (CDC, 2009). Estudos recentes relataram que as infecções por norovírus tornaram-se mais prevalentes, devido à alta eficácia dos programas de vacinação contra RV (HEMMING et al., 2013; KOO et al., 2013; PAYNE et al., 2013 & BUCARDO et al., 2014).

Encontram-se atualmente disponíveis duas vacinas em diversos países, sendo a primeira delas a RotaTeq®, licenciada em 2006 para o uso nos EUA pela “Food and Drug Administration” (FDA) (Merck, North Wales, PE, EUA) e a segunda a Rotarix®, licenciada pelo FDA no ano de 2008 (GlaxoSmithKline [GSK], Rixensart, Bélgica). A vacina Rotateq® é uma vacina oral, pentavalente (G1, G2, G3, G4 e P1A[8]) de vírus reestruturado (WC3 - bovino). A vacina Rotarix®, também oral, é monovalente (G1P1A[8]) atenuada, e de origem humana (VESIKARI et al., 2006). Esta última está inserida desde 2006 no Plano Nacional de Imunização (PNI) do Brasil. O impacto positivo da introdução destas

vacinas já foi demonstrado em alguns países europeus, africanos, americanos. (CARVALHO-COSTA et al., 2011). E até no Brasil com dados preliminares (BRASIL, 2005). Contudo não se têm estudos ainda sobre o impacto negativo da vacinação frente à problemática de recombinações e rearranjos do RV vacinal no ambiente, já que o RVA vacinal é também liberado nas fezes de indivíduos vacinados (FONG & LIPP, 2005; FUMIAN et al., 2011). Este processo deve ser levado em consideração no que se refere ao desenvolvimento e implantação de imunizantes seguros e eficazes, estratégia esta extremamente necessária, sobretudo nos países em desenvolvimento (SANTOS & HOSHINO, 2005).

Estudos de pós-implantação da vacina em países onde a Rotarix® foi adotada, como o Brasil, observaram um aumento significativo na detecção dos genótipos G2 e G9. Vale ressaltar que tal imunizante é do tipo G1P[8], o qual, apesar de promover proteção cruzada contra os demais tipos usuais de RVA, não possui os tipos G2 e G9 na sua composição (BOOM, 2010).

A transmissão dos RV, especialmente os RVA, se dá principalmente pela ingestão de alimentos e água contaminados por dejetos humanos que acometem o meio ambiente (SANTOS & HOSHINO, 2005). A veiculação de RVA pela água tem sido evidenciada durante todas as estações do ano, porém com uma maior frequência no inverno (BORCHARDT et al., 2003).

Quanto à estabilidade deste patógeno no ambiente, estudos demonstram sua persistência e infecciosidade, sendo que em águas de superfície, devido ao conteúdo de matéria orgânica, a estabilidade viral é mantida pela agregação viral em partículas sólidas (ESPINOSA, et al., 2008). Devido à relevância em torno da estabilidade dos vírus entéricos no meio ambiente aquático e da importância dos mesmos no desenvolvimento de doenças ligadas ao consumo de água contaminada, o presente trabalho de conclusão de curso teve por objetivo avaliar a estabilidade do rotavírus vacinal humano (RVA) em diferentes amostras de águas de superfície submetidas à estocagem em diferentes temperaturas.

### **1.2.4 Metodologias Disponíveis para A Avaliação da Infeciosidade e Estabilidade Viral em Amostras Ambientais**

Existem diferentes metodologias que podem ser empregadas na avaliação da viabilidade viral em amostras ambientais sendo divididas em dois grandes grupos: ensaios que utilizam somente cultura de células e ensaios que utilizam cultura de células acoplada a outros métodos de detecção, como a PCR ou ensaios imunológicos. Todos os ensaios descritos na atualidade possuem vantagens como alta sensibilidade, especificidade; rapidez e também desvantagens, como o custo elevado, toxicidade dos componentes presentes na matriz ambiental, componentes inibitórios das reações enzimáticas e tempo elevado para a detecção (RODRÍGUEZ, PEPPER & YERBA, 2009). Dentre as diversas metodologias que permitem verificar se os vírus estão com capacidade infecciosa, pode-se citar: (1) PCR Integrada a Cultura Celular (ICC-PCR), na qual inicialmente tem-se a passagem das amostras por cultura de células e posteriormente a detecção por reação da PCR, denotando assim uma maior sensibilidade à reação e detectando apenas vírus viáveis; (2) tratamento enzimático da amostra previamente à reação de PCR, na qual pode-se tratar a amostras com DNase ou RNase de modo a eliminar ácidos nucleicos desprovidos de capsídeo (vírions não íntegros), permitindo assim a detecção de vírus intactos; (3) Imunofluorescência na qual a infecção de células permissivas com a amostra, pode-se determinar a viabilidade viral através da utilização de anticorpos específicos marcados, quantificando desta forma células infectadas por vírus viáveis e que ficarão fluorescentes; (4) Reação da PCR amplificando uma grande região gênica alvo, permitindo assim que possíveis genomas degradados e menores não sejam amplificados durante a reação enzimática; (5) Ensaio de formação de placas de lise (UFP) na qual a partir da inoculação de uma monocamada celular com diferentes diluições do vírus, a infecção é monitorada pela imobilização parcial da dispersão viral por meio do emprego de meio espesso ou semi-sólido para delimitar a replicação viral e lise celular.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a influência da temperatura e do tempo de estocagem na estabilidade da cepa vacinal de rotavírus humano (RVA) semeado em matrizes aquáticas ambientais.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Produzir estoque viral (Rotavírus humano cepa vacinal)
- Padroniza no laboratório a técnica de placa de lise para rotavírus.
- Comparar a técnica celular mais eficiente
- Através da metodologia de Placa de Lise (UFP) e metodologia molecular (RT-qPCR), estudar o comportamento do Rotavírus A (cepa vacinal) quanto a sua estabilidade termal e temporal em diferentes matrizes aquáticas.

## 3 MATERIAIS E MÉTODOS

### 3.1 PRODUÇÃO E TITULAÇÃO DO ESTOQUE VIRAL DE RVA UTILIZADO NAS SEMEADURAS DAS ÁGUAS

Células MA104 (rim embrionário de macaco verde da África), permissivas à replicação *in vitro* do RVA foram utilizadas para a produção dos estoques virais.

O crescimento e manutenção das células foram realizados em garrafas de cultura celular utilizando como meio de crescimento, meio essencial mínimo com sais de Eagle (MEM) suplementado com 5% de soro fetal bovino (SFB) (Gibco). O cultivo celular se deu em estufa a 37°C, sob atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> até a observação de uma monocamada confluenta. Após a obtenção da confluência, foi adicionado à garrafa 1,0 mL do estoque viral inicial. O vírus utilizado no presente trabalho, foi isolado da cepa vacinal (Rotateq, G1;G2;G3;G4;P1A[8], vírus atenuado) gentilmente cedido pelo Professor Dr. Fernando Rosado Spilki (Feevale, RS). Em seguida



manteve-se por um período de 1 h a 37°C, para que a adsorção viral ocorresse.

Após a adsorção, o inóculo viral foi retirado e adicionado o meio de manutenção (MEM) suplementado, sem a adição de SFB (Soro Fetal Bovino). As células foram mantidas em estufa a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub> e observadas diariamente em microscópio invertido (Olympus IT75) para o monitoramento da replicação viral, observada através do efeito citopático sobre a monocamada celular. Como controle negativo a cultura destas mesmas células não infectadas, eram observadas em todos os experimentos.

Quando observada a destruição total da monocamada celular, as células foram congeladas a -80°C e descongeladas, por três vezes, induzindo assim o rompimento das células que ainda estivessem íntegras e liberando os vírus que se encontravam no citoplasma. A suspensão foi transferida para os tubos e centrifugada por 350xg por 5 min a 27°C graus, para retirar os restos celulares. O sobrenadante foi retirado e o processo de infecção celular iniciado novamente até se obter vírus em títulos que permitissem a sua utilização nos ensaios subsequentes.

### 3.2 DETERMINAÇÃO DO TÍTULO INFECCIOSO DO ESTOQUE VIRAL PRODUZIDO POR IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA (IFI)

A determinação do título infeccioso de rotavírus A foi realizado primeiramente utilizando o ensaio de imunofluorescência indireta (IFI) com pequenas alterações (BARARDI, et al.,1998).

Este método consiste em utilizar células permissivas ao vírus, cultivadas em meio de crescimento durante 24h em câmaras de 8 poços (Lab Tek, NUNC), na densidade de  $2,5 \times 10^5$  células/mL. O fluido viral foi diluído seriadamente de  $10^{-2}$  a  $10^{-7}$  em MEM e foram utilizadas destas diluições 100µL para serem inoculadas nos poços, que já continham uma monocamada celular, em duplicata. Para o controle negativo foram utilizados somente a inoculação do meio de manutenção.

Após o período de incubação de 1 h para a adsorção viral, o inóculo foi removido e foi adicionado o meio de manutenção, contendo 1% de solução de Penicilina, Streptomomicina, Anfotericina (PSA); MEM; Tripsina (10µg/mL), sem a adição de soro fetal bovino (SBF).

Após o período de incubação de 1h, o meio foi removido e as células foram lavadas duas vezes com solução salina (PBS) e fixadas com metanol gelado a -20°C duas vezes por 5 min. As células foram reidratadas pela adição de 300µL de PBS e mantidas à temperatura

ambiente por 5 min. Em seguida, removeu-se o PBS e adicionou-se 300µL de solução bloqueadora (BSA, Tween-20 a 0,05%), (Bio-Rad) com a finalidade de inibir reações inespecíficas com os anticorpos a serem incubados. Esta incubação foi mantida por 30 min à temperatura ambiente e sob agitação.

Para a visualização da infecção viral foi utilizado sobrenadante de cultura de tecidos contendo Mab M60 (SHAW et al., 1986), dirigido contra a proteína VP7 de capsídeo interno, diluído a 1:100 em solução bloqueadora. Foi adicionado 100 µL de anticorpo por poço, seguido de incubação por 1 h à 37°C sob agitação.

As células foram lavadas três vezes com 300µL de solução bloqueadora por 5min sob agitação. Em seguida, o anticorpo secundário (anti-IgG) de camundongo conjugado com o isotiocianato de fluoresceína (FITC, Sigma), diluído 1:100 em solução bloqueadora, adicionado nos poços das placas e a incubação foi mantida por 15 min. à temperatura ambiente no escuro e sob agitação. As câmaras foram então lavadas três vezes com solução bloqueadora e secas à temperatura ambiente. Para a montagem das lâminas, as paredes da câmara foram removidas restando somente a lâmina, sendo utilizada uma solução contendo formalina 5%, NaCl 0,25M, DABCO (1-,diazabicyclo [2.2.2]octano) pH 8,6 a 25%, colocada entre a lâmina e a lamínula. A análise foi realizada em microscópio de epifluorescência (Olympus BX 40). O título viral foi determinado através da contagem do número de focos de células fluorescentes na maior diluição. Onde fosse possível a visualização de células fluorescentes (diluição  $10^{-5}$ ), sendo expresso em unidades formadoras de foco (UFF/mL).

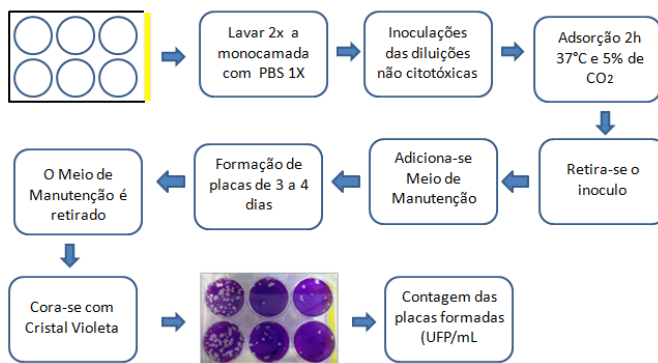
### 3.3 OTMIZAÇÃO DO ENSAIO DE FORMAÇÃO DE PLACA DE LISE E TITULAÇÃO DOS ESTOQUES VIRAIS PRODUZIDOS

Para a realização deste ensaio, as células MA104 foram cultivadas em placas com seis cavidades na concentração de  $2,5 \times 10^5$  células/mL para a obtenção de uma monocamada confluenta. Foram então inoculadas diluições seriadas do RVA (450µL), nas diluições  $10^5, 10^6, 10^7$  em duplicatas pré-ativados com tripsina (10mg/mL) por 30 min a 37°C. Após o período para a adsorção viral (2 h), o inóculo foi removido e adicionou-se às células o meio de manutenção consistindo de bacto-ágar (1,5%) diluído em meio DMEM alta glicose 2X suplementado com piruvato de sódio 2%, L-glutamina 2%, aminoácidos

não essenciais 2%, PSA 2%, Tripsina (10mg/mL), DEAE-DEXTRAN (100mg/mL) 1%.

Após o período de incubação (3 a 4 dias), a camada de bacto-ágar foi removida e a monocamada celular infectada foi corada com corante cristal violeta (1%), permitindo assim a visualização de halos que caracterizam os locais da monocamada celular onde houve replicação do vírus e lise celular. Os valores foram expressos em Unidades Formadoras de Placas (UFP/mL) (Figura 2).

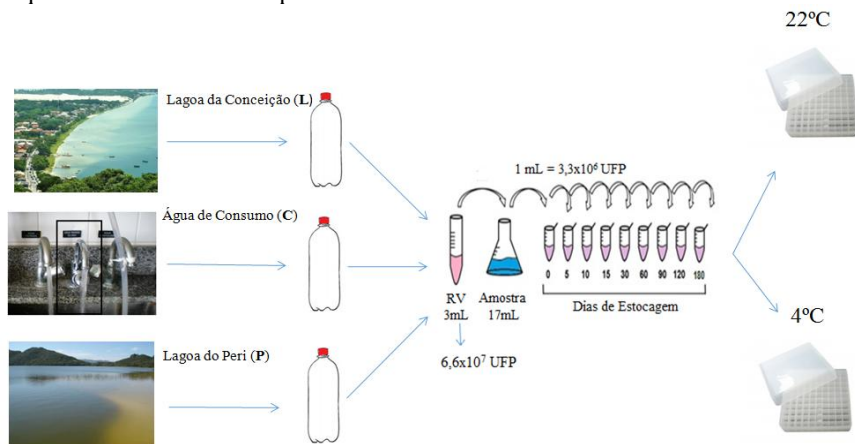
Figura 2 - Fluxograma dos passos realizados na técnica de placa de lise para rotavírus padronizada neste trabalho.



### 3.4 DESENHO EXPERIMENTAL DOS ESTUDOS DE ESTABILIDADE E INFECCIOSIDADE VIRAL

A quantidade de  $2,2 \times 10^7$  UFP/mL do estoque viral produzido foi semeado nas matrizes aquáticas selecionadas: **P** (Lagoa do Peri, Água de manancial); **C** (Água de consumo, tratada não clorada); e **L** (Lagoa da Conceição, Água de recreação). Estas amostras foram divididas em alíquotas de 1,0 mL e avaliadas pelo ensaio de placa de lise (infecciosidade) como descrito no item 3.3 e RT-qPCR descrito no item 3.5, imediatamente após a semeadura (tempo zero) e após 5, 10, 15, 30, 60, 90, 120 e 180 dias de armazenamento nas temperaturas de 22 e 4°C sob o abrigo da luz (Figura 3).

Figura 3 - Representação esquemática das diluições feitas e do estoque das alíquotas nos diferentes tempos estabelecidos neste trabalho.



### 3.5 AVALIAÇÕES DA ESTABILIDADE GENÔMICA DE RVA POR RT-QPCR

A estabilidade do genoma do rotavírus nos diferentes tipos de água foi determinada utilizando-se o ensaio de RT-qPCR, como descrito abaixo. A extração do material genético (RNA) foi realizada utilizando kit comercial Vírus DNA/RNA mini Kit (Invitex-Invisorb, Alemanha) que baseia-se no princípio da extração por sílica. Partiu-se de  $200 \mu\text{L}$  das amostras, ou seja, tomando as triplicatas restantes do experimento anterior e utilizando-as conjuntamente (*pool*), obtendo-se ao final da extração um volume de  $60 \mu\text{L}$  de RNA.

Para a reação de RT-qPCR foi utilizado o kit QuantiTect Probe RT-PCR (Qiagen), que contém, além da transcriptase reversa (RT), necessária para que ocorra a transcrição do RNA das amostras para cDNA, uma mistura dos reativos: HotStartTaq DNA Polimerase, oligonucleotídeos (dNTPs), e condições salinas adequadas. Este kit permite a realização da amplificação em apenas um passo (*one step*), ou seja, primeiramente as amostras são submetidas a uma temperatura específica, quando ocorre a ativação da enzima RT e realização do processo de transcrição reversa e após esse processo, as amostras, já constituídas de cDNA, seguem com o ciclo normal de amplificação

gênica.

A reação de RT-qPCR para o RVA consistiu basicamente da adição de 12,5µL da mistura dos reativos do kit (2X concentrado), mais a adição dos iniciadores NSP3F (ACCATCTWCACRTRACCCTCTATGAG) e NSP3R (GGTCACATAACGCCCTATAGC) na concentração final de 0,2µM e sonda TaqMan NSP3P (VIC-AGTTAAAAGCTAACACTGTCAA-MGB). (ZENG et al. 2008). Em uma concentração final de 0,2µM e, adição da amostra de RNA (10µL), totalizando um volume final de 25µL.

O perfil de temperaturas utilizado na reação de RT-qPCR foi de uma temperatura inicial de 50°C por 30 min para a realização da RT, seguido de ativação da enzima DNA polimerase (HotStart) a 95°C por 10min e 45 ciclos de amplificação iniciando a 95°C por 15s para desnaturação do DNA e 56°C por 1min para anelamento e 72°C de extensão dos iniciadores ( FUMIAN et al., 2010 )

A reação foi realizada em placa de 96 cavidades RNA (MicroAmp Applied Biosystems), manipuladas em salas livres de DNA e em outra sala adicionaram-se as amostras de RNA. Transportou-se a placa até uma sala própria para a manipulação de plasmídeos (realização da curva padrão de quantificação) que possuem uma sequência gênica clonada do RVA e já haviam sido preparados e utilizados anteriormente no Laboratório de Virologia Aplicada, e estes foram adicionados (10µL em distintas diluições) contendo quantidades conhecidas de cópias de genomas.

Os valores obtidos nas reações de RT-qPCR foram expressos em cópias genômicas por mL (CG/mL).

### 3.6 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

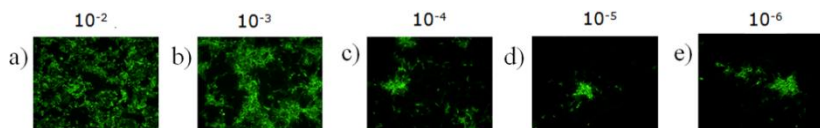
Os valores obtidos nas diferentes metodologias realizadas na avaliação da estabilidade do RVA nas amostras de água e nas diferentes temperaturas foram analisados em valores de redução logarítmica e comparados com amostras do tempo zero (após semeadura viral) através da fórmula:  $\log_{10}(N_t/N_0)$ , onde  $N_t$  = concentração viral após estocagem/tempo e  $N_0$  = concentração do inóculo inicial. Foi utilizado um programa de estatística (Graph Pad Prism) capaz de realizar testes de regressão linear, (ANOVA) para comparar a estabilidade e as inativações obtidas nas diferentes matrizes aquáticas e nas técnicas de placa de lise e RT-qPCR usando um nível de confiança de 0,05.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 TITULAÇÃO DO FLUIDO VIRAL DE ROTAVÍRUS CEPA VACINAL POR IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA (IFI)

O título do fluido infeccioso do rotavírus A cepa vacinal foi obtido primeiramente através do ensaio de imunofluorescência indireta, no qual foi determinado através da contagem do número de células com fluorescência citoplasmática na maior diluição viral. Tal procedimento permitiu determinar o título viral de  $2,1 \times 10^8$  FFU/mL. (Figura 4)

Figura 4 – Imagens do ensaio de Imunofluorescência indireta para titulação do Rotavírus, onde os aglomerados verdes fluorescentes indicam células MA104 que foram infectadas pelo vírus

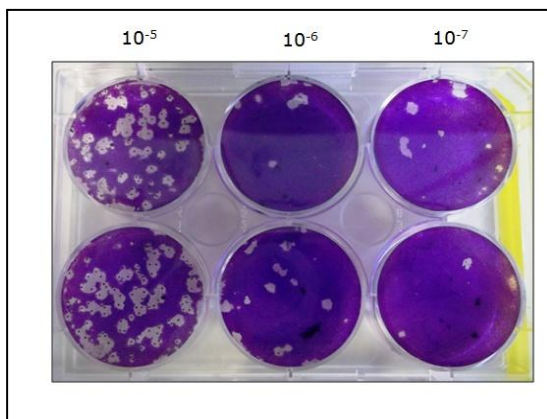


### 4.2 TITULAÇÃO DO FLUIDO VIRAL DE ROTAVÍRUS CEPA VACINAL PELA TÉCNICA DE PLACA DE LISE (UFP)

O método de ensaio de placa de lise, otimizados no presente trabalho permitiu a titulação do fluido infeccioso do rotavírus A cepa vacinal, com valor de  $2,2 \times 10^7$  UFP/mL.

A Figura 5 ilustra as placas de lise formadas devido a replicação viral e consequente lise das células (halos brancos não corados).

Figura 5 - Ensaio de Placa de lise onde a presença de halos brancos correspondem aos locais onde ocorreu lise celular pela infecção pelo rotavírus.



#### 4.3 ANÁLISE DA INFECCIOSIDADE DE ROTAVIRUS CEPA VACINAL EM DIFERENTES MATRIZES AQUÁTICAS

A estabilidade termal e temporal do RV cepa vacinal foi avaliada em diferentes matrizes de água assim denominadas: **P** (Lagoa do Peri, Água de manancial); **C** (Água de consumo, tratada não clorada); e **L** (Lagoa da Conceição, Água de recreação). Estas foram estocadas nas temperaturas de 22 e 4°C para simular temperaturas ambientais e de armazenamento em geladeira, respectivamente. A estabilidade viral foi avaliada por UFP nos tempos 0, 5, 10, 15, 30, 60, 90, 120 e 180 dias de armazenamento. Os valores mais elevados de inativação viral foram observados nas amostras de água expostas à temperatura ambiente (22°C). Para a matriz P, as amostras apresentaram uma redução viral de  $3,42\log_{10}$  ao final de 180 dias de armazenamento e  $1,40\log_{10}$  em 120 dias de armazenamento, nas temperaturas 22 e 4°C, respectivamente (Figuras 6 e 7). A matriz C apresentou redução viral de 2,76 e  $0,79\log_{10}$ , quando submetidas a 22°C por 120 dias e à 4°C em 180 dias, respectivamente (Figuras 6 e 7). A matriz L quando armazenada à 22°C, após o tempo 90 dias não foi mais detectado o RV vacinal, já quando esta foi armazenada à 4°C obteve-se redução de  $2,55\log_{10}$  após 180 dias de ar-

mazenamento. Esses dados estão apresentados na Tabela 1 e nas Figuras 6 e 7.

Tabela 1 – Valores do decaimento da infecciosidade da cepa vacinal do Rotavírus em relação as temperaturas 22 e 4°C, obtido pela metodologia de Placa de Lise.

<b>Matriz</b>	<b>Água de consumo</b>		<b>Lagoa do Peri</b>		<b>Lagoa da Conceição</b>	
	<b>22°C</b>	<b>4°C</b>	<b>22°C</b>	<b>4°C</b>	<b>22°C</b>	<b>4°C</b>
<b>Tempo (dias)</b>						
5	-0,21	-0,04	-0,1	0,1	-1,17	-0,2
10	-0,28	-0,14	-0,35	0,18	-1,86	-0,16
15	-0,42	-0,11	-0,67	0,08	-2,05	-0,28
30	-0,4	-0,04	-0,79	-0,04	-2,05	-0,52
60	-0,24	-0,4	-0,94	-0,29	-4,38	-1,21
90	-1,48	-0,64	-2,09	-0,53	-4,89	-1,79
120	-2,76	-0,78	-2,99	-1,4	ND	-2,44
180	-2,38	-0,79	-3,42	ND	ND	-2,55



Figura 6 - Valores de redução logarítmica ( $\log_{10}$ ) da infecciosidade da cepa vacinal do RV avaliada por placa de lise nas diferentes matrizes e na temperatura de 22°C. Estes valores representam a média de triplicatas e  $\pm$  desvio padrão.

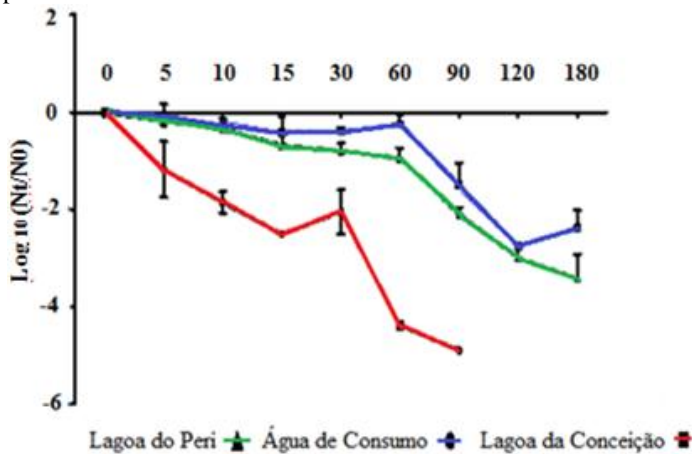
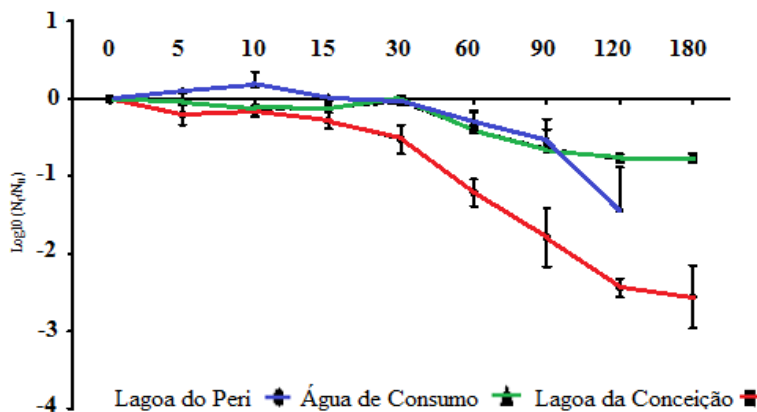


Figura 7 - Valores de redução logarítmica ( $\log_{10}$ ) da infecciosidade do RV cepa vacinal avaliada por placa de lise nas diferentes matrizes e na temperatura de 4°C. Estes valores representam a média de triplicatas e  $\pm$  desvio padrão.



#### 4.4 ANÁLISE DA INFECCIOSIDADE DE ROTAVÍRUS CEPA VACINAL EM DIFERENTES MATRIZES AQUÁTICAS POR RT-qPCR

A avaliação da estabilidade genômica foi realizada por RT-qPCR. As amostras da Água de Consumo, estocadas a 22°C demonstraram baixo decaimento no tempo 15 dias ( $0,05\log_{10}$ ). Para as amostras da Lagoa da Conceição não foi observado decaimento até o final do tempo de armazenamento 180 dias (Figura 8). Para as amostras Lagoa do Peri houve um pequeno decaimento de  $0,83\log_{10}$ , no tempo 10 dias. (Figura 8).

Figura 8 - Estabilidade do genoma da cepa vacinal do RV em diferentes matrizes aquáticas na temperatura de 22°C determinado por RT-qPCR.

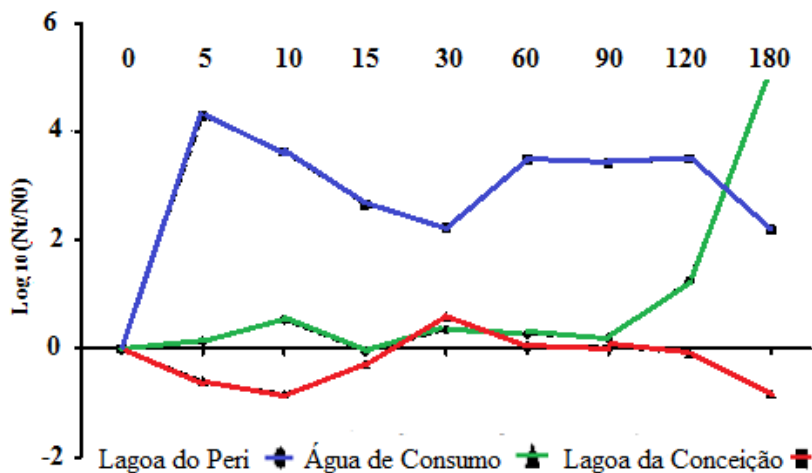
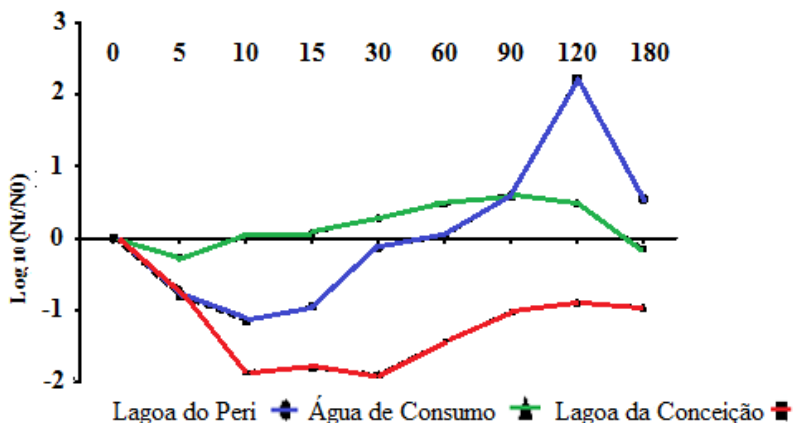


Figura 9 - Estabilidade do genoma da cepa vacinal do RV em diferentes matrizes aquáticas na temperatura de 4°C determinado por RT-qPCR.



Na temperatura de 4°C as amostras ambientais da água de consumo não apresentaram decaimentos consideráveis até o tempo 180 dias. Para as amostras da Lagoa do Peri, foi observado um decaimento de  $1,88\log_{10}$  no tempo 30 dias seguido de um aumento no número de cópias genômicas detectados nos tempo de análise seguintes. Para a amostra Lagoa da Conceição não foi diferente, houve um decaimento no tempo 10 dias ( $1,15\log_{10}$ ) seguido de aumento, como pode ser observado na Figura 9 e Tabela 2.

Tabela 2 - Valores de redução logarítmica ( $\log_{10}$ ) obtidos na avaliação da estabilidade genômica da cepa vacinal do RV pelo ensaio da RT-qPCR .

<b>Matriz</b>	<b>Água de consumo</b>		<b>Lagoa do Peri</b>		<b>Lagoa da Conceição</b>	
	<b>22°C</b>	<b>4°C</b>	<b>22°C</b>	<b>4°C</b>	<b>22°C</b>	<b>4°C</b>
<b>Tempo (dias)</b>						
5	0,14	-0,27	4,28	-0,86	-0,59	-0,70
10	0,53	0,01	3,62	-1,15	-0,83	-1,85
15	-0,05	0,06	2,65	-0,94	-0,29	-1,80
30	0,35	0,27	2,22	-0,12	0,58	-1,88
60	0,27	0,47	3,47	0,02	0,05	-1,44
90	0,19	0,60	3,42	0,57	0,05	-1,01
120	1,25	0,48	3,50	2,22	-0,09	-0,89
180	5,16	-0,14	2,19	0,54	-0,82	-0,95

#### 4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Usando um programa estatístico capaz de avaliar regressão linear, foi possível comparar a estabilidade e a inativação, obtidas nas diferentes matrizes aquáticas, usando um nível de confiança de 0,05 obtidos nas temperaturas de 22 e 4°C para cada matriz do experimento realizado. A metodologia RT-qPCR apresentou para as duas temperaturas, 22°C e 4°C, valores de  $P < 0,0001$  e  $P = 0,0009$ , respectivamente. Para a metodologia de placa de lise para a temperatura de 22°C, o cálculo feito apresentou o valor de  $P = 0,0947$  e para a temperatura de 4°C apresentou um valor de  $P = 0,0546$ .

Tabela 3 - Comparação entre os resultados obtidos entre a temperatura sobre o tempo de estocagem na redução da cepa vacinal de RV.

<b>Método Experimental</b>		<b>RT-qPCR</b>		<b>UFP</b>	
<b>Método Estatístico</b>	<b>Valor de P</b>	<b>R<sup>2</sup></b>	<b>Valor de P</b>	<b>R<sup>2</sup></b>	
22°C	<0.0001	0.5389	0.0947	0.1929	
4°C	0.0009	0.4421	0.0546	0.2234	

## 5 DISCUSSÃO

O risco potencial para a população humana em adquirir infecções virais associadas à contaminação ambiental de diferentes fontes de água é uma preocupação relevante de saúde pública (CRUZ, 1992; KOOPMANS et al., 2002; PARASHAR et al., 2006; GREEN, 2007; MÉNDEZ & ARIAS, 2007 ). O risco de transmissão de doenças virais através de águas contaminadas depende da capacidade dos vírus em sobreviver por um período de tempo suficiente para infectar um hospedeiro susceptível. Por este motivo, há a necessidade de estudar os fatores envolvidos e o modo pelo qual estes exercem um efeito sobre a persistência dos vírus infecciosos em diferentes tipos de matrizes ambientais.

No presente trabalho duas técnicas foram utilizadas para a titulação do estoque viral de RVA produzido (IFI e UFP). Ambas demonstraram bons resultados, permitindo a titulação do rotavírus vacinal. Apesar da obtenção de 1log de diferença na titulação viral pelas duas técnicas, não foi permitida uma comparação direta entre os resultados obtidos por ambas as técnicas, uma vez que estas apresentam diferenças na avaliação da infecção viral. Por este motivo foi escolhida a técnica de Placa de Lise, devido a sua maior robustez, reprodutibilidade e economia, para dar seguimento ao trabalho.

Existem poucos trabalhos descritos na literatura que utilizam a técnica de placa de lise tanto para a titulação quanto para a avaliação da estabilidade do rotavírus em amostras ambientais. Isso ocorre principalmente por ser uma técnica que dificilmente apresenta bons resultados com rotavírus, sendo que, dessa forma, parte desse trabalho

consistiu na padronização dessa metodologia. Foram introduzidas algumas modificações que permitiram uma melhor reprodutibilidade do ensaio:

- Tempo de adsorção viral que foi estendido de 1h para 2 h;
- Foi utilizado o DEAE-DEXTRAN, que auxiliou na formação de halos mais definidos (SMITH, et al., 1978);
- Foi mantida a tripsina no meio de manutenção, facilitando a adsorção viral;
- Foram mantidos os outros componentes no meio que foram adicionados com o objetivo de facilitar a sobrevivência das células durante o tempo de incubação que durou de 3 a 4 dias.

Neste trabalho, verificou-se que a infecciosidade do rotavírus foi mais bem preservada nas amostras de água de consumo do que nas águas superficiais (Lagoa da Conceição e Lagoa do Peri). A diferença entre estes tipos de água (Tabela 1) foi provavelmente devido à presença de micro-organismos nas águas de superfície, em comparação com a matriz água de consumo, que se trata de uma água pré-tratada pronta para o consumo. Sendo assim, a inativação mais rápida do RVA que foi observada nas águas de superfície pode estar associada, ainda que parcialmente, ao elevado teor bacteriano neste tipo de água, como foi reportado anteriormente (RAPHAEL & SATTAR, 1985, WARD, KNOWLTON & WINSTON, 1986; PANCORBO et al., 1987).

Raphael et al. (1985), constataram que os rotavírus permanecem mais infecciosos em águas não poluídas, por longos períodos, do que em águas poluídas. Já em outro estudo mais detalhado, Ward et al. (1986), demonstrou que podem existir componentes com atividades antivirais nas águas, correlacionando com a presença destes micro-organismos, sendo que a inativação do vírus pode estar ligada com a clivagem das proteínas virais por enzimas proteolíticas de bactérias, seguido pela degradação do RNA viral.

No presente trabalho foi possível encontrar uma correlação com trabalhos citados acima onde ocorreu uma maior estabilidade do RV nas águas mais limpas da água de consumo, que são águas pré-tratadas, em comparação com as outras matrizes com maiores concentrações de micro-organismos.

As amostras foram mantidas a 22 e 4°C na ausência de luz. A temperatura de estocagem que apresentou inativação mais pronunciada nas diversas amostras foi a temperatura de 22°C corroborando os

resultados do trabalho de John & Rose et al. (2005) no qual os RVA apresentam uma inativação mais acentuada nas temperaturas mais altas. A temperatura é um dos fatores que mais afeta a estabilidade viral no ambiente aquático (BERTRAND et al. 2012). As propriedades intrínsecas da água contribuem claramente para a inativação do vírus, uma vez que a diminuição do título viral foi mais percebida para as matrizes Lagoa da Conceição e Lagoa do Peri, do que para a matriz Água de Consumo. Para a matriz Lagoa do Peri foi encontrado um decaimento de  $3,42 \log_{10}$  durante 180 dias de armazenamento a  $22^{\circ}\text{C}$ , e  $1,4 \log_{10}$  quando armazenadas durante 120 dias a  $4^{\circ}\text{C}$ . Ward et al. (1986) avaliaram a estabilidade do vírus pertencente a quatro gêneros diferentes e descobriu-se que o rotavírus foi mais estável corroborando com os resultados deste trabalho principalmente para a matriz água de consumo que apresentou um decaimento pouco significativo. Segundo Pancorbo et al. (1987) a incubação durante nove dias em água não poluída e água poluída, reduziu a infecciosidade do rotavírus de 0,5 e  $2 \log_{10}$ , respectivamente. É possível correlacionar que o pH da amostra pode influenciar na redução do título viral, pois qualquer pH abaixo ou acima de 8 (sendo que o ponto isoelétrico do RV é 8), pode causar a agregação das partículas virais e subestimar os valores de decaimento viral.

Em outros estudos, foi observado uma maior resistência do RV em água destilada e de água residual sob condições laboratoriais. Na ausência de luz a  $26^{\circ}\text{C}$  foram necessários de 7 a 13 dias para que ocorresse redução de  $1 \log_{10}$ , já a  $8^{\circ}\text{C}$  foram necessários 80 dias para se obter a mesma redução (MCDANIELS et al. 1983; CABALLERO et al. 2004).

Em outras condições experimentais Raphael et al. (1985) verificaram a redução de menos de  $2 \log_{10}$  em água doce filtrada após 30 dias de estocagem a  $20^{\circ}\text{C}$ . Verificou-se que a infecciosidade em água bruta filtrada, permaneceu inalterada após 64 dias de incubação a  $20^{\circ}\text{C}$ , se aproximando dos resultados obtidos neste trabalho, no qual o decaimento para a matriz Lagoa da Conceição foi de  $4 \log_{10}$ , no tempo 60 dias a  $22^{\circ}\text{C}$  e para as matrizes Água de Consumo e Lagoa do Peri, no mesmo tempo e temperatura, os decaimentos foram inferiores a  $1 \log_{10}$ .

A diferença reportada nos tempos de maior resistência do vírus pode ser devido a vários fatores, incluindo o tipo de água, as condições ambientais externas ao experimento, agregação viral, e a adsorção do vírus a partículas sólidas ou com as paredes dos recipientes no qual foram estocados e manipulados. Além disto, o volume das amostras e o material dos recipientes utilizados, podem também influenciar os

resultados e contribuir para a variabilidade das taxas de inativação observadas na literatura (GASSILLOUD & GANTZER 2005, LANGLET, GABORIAUD & GANTZER 2007).

Vários desses fatores também podem afetar a quantificação de vírus infeccioso em análises moleculares. A aplicação de técnicas moleculares, como RT-qPCR tem favorecido a detecção relativamente rápida, sensível e específica. A avaliação da estabilidade do rotavírus por RT-qPCR mostrou que o genoma permanece presente em todas as matrizes, em comparação com a metodologia de cultura celular (UFP). As amostras estocadas a de 4°C apresentaram maior decaimento comparado com as amostras estocadas a 22°C, fato este que difere do que era esperado frente aos decaimentos apresentados na metodologia anterior .

Em relação à amostra água de consumo a 4°C e no tempo de 180 dias, os valores de cópias genômicas detectados foi de 0,14 log, sendo que o valor detectado variou até o fim do experimento com um decaimento pouco significativo. Para a temperatura 22°C não houve decaimento.

Para a amostra Lagoa da Conceição na temperatura de 22°C não houve decaimento, contudo para a temperatura 4°C houve um decaimento nos primeiro dias  $1\log_{10}$ , mas este decaimento não foi constante.

A amostra Lagoa do Peri não seguiu o comportamento das matrizes anteriores, pois na temperatura de 22°C, no fim do experimento, ou seja, no tempo 180 dias houve um decaimento de  $0,8\log_{10}$  e para a temperatura de 4°C houve um decaimento de  $0,9\log_{10}$ . Em trabalhos anteriores foram observados que em matrizes ambientais foram obtidos decaimentos de 4logs, apresentando também uma não lineariedade entre os tempos de experimentação (ESPINOSA et al. 2008).

A análise do decaimento viral por quantificação das cópias genômicas (RT-qPCR) nas amostras avaliadas em "pools" apresentou oscilações durante os tempos de estocagens (Figuras 7 e 8). Isto pode ter sido devido a vários fatores que podem ter influenciado a amplificação do RNA viral das amostras como, por exemplo:

- A adsorção de vírus nos materiais particulados
- A eficiência da extração de RNA a partir desse tipo de amostra.



Após as análises estatísticas e correlacionando às duas metodologias utilizadas neste trabalho, percebe-se que o RT-qPCR sobressaiu à metodologia celular, pois apresentou uma melhor significância obtendo valores de P menores do que 0,05 e apresentou dados mais próximos da curva linearizada, pois o  $R^2$  obtido foi de 0,54. Percebe-se que os resultados obtidos pelos cálculos estatísticos foram melhores observados para a metodologia RT-qPCR, pois este método é executado de forma mecânica, com pouca influência externa, comparado com o método celular que necessita de contagem manual.

Por causa da ausência na uniformidade do decaimento viral ao longo do tempo de estocagem quando o RT-qPCR foi empregado, não foi possível realizar-se uma análise de correlação entre o título do vírus infeccioso (por UFP) e a quantificação das cópias genômicas nas matrizes (por RT qPCR) e isso nos comprovou que o emprego de técnicas moleculares clássicas, mesmo tendo a vantagem de serem rápidas e sensíveis, não fornecem resultados referentes à infecciosidade dos patógenos virais contaminantes se estiverem dissociadas da cultura celular, não podendo predizer o risco do desenvolvimento de uma doença associada àquele ambiente contaminado.

## 6 CONCLUSÃO

Não foi possível a correlação entre o título infeccioso e a quantificação por cópias gênomicas, pois mesmo o emprego de técnicas moleculares, sendo mais sensíveis e rápidas, Não fornecem resultados referentes a infecciosidade, não podendo predizer o risco do desenvolvimento de doenças, por isso as técnicas baseadas na detecção de genomas não são indicadas para a avaliação de decaimento viral sendo que as técnicas baseadas na infecciosidade viral são mais fidedgnas.

Obtivemos sucesso na produção do estoque viral, obtendo também um bom título, para dar seguimento aos experimentos

A técnica de Placa de Lise para rotavírus foi padronizada com sucesso no presente trabalho, mostrando-se mais robusta e menos laboriosa e poderá ser utilizada em trabalhos futuros no Laboratório de Virologia Aplicada e em outros laboratórios.

As cepas vacinais atenuadas eliminadas nas fezes das crianças podem ficar por vários dias viáveis podendo infectar crianças imunocomprometidas ou co-infectar crianças com sorotipos vacinal mais os selvagens aumentando assim a possibilidade de rearranjos gênicos e de novas cepas virais.

Os resultados deste estudo fornecem evidências para a longa persistência dos rotavírus infecciosos em diversas matrizes aquáticas e isso deve ser levado em conta pelas autoridades sanitárias, pois esse estudo tratou da cepa vacinal atenuada, que, permanecendo no meio ambiente por longos períodos quando eliminada nas fezes de crianças vacinadas, pode favorecer a reversão do vírus para a forma selvagem e ainda a ocorrência de rearranjos gênicos, por tratar-se de vírus de genoma segmentado. Isto é importante porque as matrizes aquáticas oferecem um ambiente estável em termos de temperatura e exposição à luz, sem um efeito sazonal evidente. Vale ressaltar que uma das matrizes, a Lagoa do Peri, é um dos principais reservatórios para o fornecimento de água para consumo humano e este se tornando contaminado, acarreta em um risco para a saúde pública.

É necessário continuar a estudar o comportamento de vírus entéricos e outros micro-organismos no ambiente, particularmente na água, pois é composta por uma rota de distribuição rápida à população.

Por isso é necessário a conscientização da administração pública para que seja evitado o despejo sanitário em rios, lagos e seus

afluentes, pois este ato influencia a contaminação dos mananciais em questão. Portanto é de extrema importância que os responsáveis, no âmbito legislativo, revejam as leis para que sejam inseridas na atual legislação, referente ao monitoramento de água, novos patógenos contaminantes para que o monitoramento e tratamento das águas sejam mais rigorosos quanto aos vírus.

Finalmente, os resultados apresentados neste trabalho também contribuem para alertar que, ambientes aquáticos contaminados por vírus entéricos, se utilizados para irrigação, podem representar um risco potencial para a população, devido ao tempo desses vírus poderem permanecer ativo em tais condições. Vários fatores, tais como a agregação do vírus, a adsorção dos materiais particulados, o tipo de estirpe do vírus, a temperatura e pH têm influência direta na contaminação da água.

Este trabalho irá contribuir para a disseminação da técnica entre outros laboratórios.

## 7 REFERÊNCIAS:

ASANO, T.; COTRUVO, J.A. Groundwater recharge with reclaimed municipal wastewater health and regulatory considerations. **Water Research**, v. 38, p. 1941–1951, 2004.

BARARDI, C.R.M. Development of a rapid and sensitive quantitative assay for rotavirus based on flow cytometry. **Journal of Virological Methods**, v.74, p. 31-38, 1998.

BERTRAND, I.; SCHIJVEN, J.F.; SÁNCHEZ, G.; WYN-JONES, P.; OTTOSON, J.; MORIN, T.; MUSCILLO, M.; VERANI, M.; NASSER, A.; DE RODA HUSMAN, A.M.; MYRMEL, M.; SELLWOOD, J.; COOK, N.; GANTZER, C. The impact of temperature on the inactivation of enteric viruses in food and water: a review. **Journal of Applied Microbiology** v.112, p.1059-1074, 2012.

BOOM, J.A. Et al.. Effectiveness of pentavalent rotavirus vaccine in large urban population in the United States. **Pediatrics**. v.125,p. 199-207,2010.

BORCHARDT, M.A.; BERTZ, P.D.; SPENCER, S.K.; BATTIGELLI, D.A. Incidence of enteric viruses in groundwater from household wells in Wisconsin. **Appl Environ Microbiol**, v.69, p.1172-1180, 2003.

BRASIL - MINISTÉRIO DA SAÚDE. Informe Técnico Doença Diarréica por Rotavírus: Vigilância Epidemiológica e prevenção pela Vacina Oral de Rotavírus Humano- VORH -Versão preliminar Ministério da Saúde: Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Diário Oficial da União, 18 de novembro 2005.

BUCARDO, F. REYES, Y. SVENSSON, L. NORDGREN, J. Predominance of norovirus and sapovirus in Nicaragua after implementation of universal rotavirus vaccination. **PLoS ONE**, v.9, p. 98201, 2014.

CABALLERO, S.; ABAD, F.X.; LOISY, F.; LE GUYADER, F.S.; COHEN, J.; PINTO, R.M.; BOSCH, A. Rotavirus virus-like particles as surrogate in environmental persistence and inactivation studies. **Appl. Environ. Microbiol**. v.70,p. 3904–3909, 2004.

CARVALHO-COSTA, F.A.M.D.P.; VOLOTAO, E.D.M.P.; DE ASSIS, R.M.S.B.; FIALHO, A.M.B.; DE ANDRADE, J.D.S.R.B. Laboratory-based rotavirus surveillance during the introduction of vaccination program, Brazil, 2005-2009. **Pediatr. Infect. Dis. J.**, v.30, p.35-41, 2011.

CDC-CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Prevetion of Rotavirus Gastroenteritis Among Infants and Children Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP) **MMWR - Morbidity and mortality weekly report**, v.58,p.1-25,2009.

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, 2001.

CRUZ, J.R.; BARTLETT, A.V.; HERRMANN, J.E.; CACERES, P.; BLACKLOW, N.R.; CANO, F. Astrovirus-associated diarrhea among Guatemalan ambulatory rural children. **J. Clin. Microbiol.** v.30, p.1140-1144, 1992.

ESPINOSA, A.C.; MAZARI-HIRIART, M.; ESPINOSA, R.; MARURI-AVIDAL, L.; MÉNDEZ, E.; ARIAS, C.F. Infectivity and genome persistence of rotavirus and astrovirus in groundwater and surface water. **Water Research**, v. 42, p. 2618-2628, 2008.

ESPOSITO, D.H.; HOLMAN, R.C.; HABERLING, D.L.; TATE, J.E.; PODEWILS, L.J.; GLASS, R.I.; PARASHAR, U. Base line estimates of diarrhea-associated mortality among United States children before rotavirus vaccine introduction. **Pediatr. Infect. Dis. J.** v.11,p. 942-947, 2011.

ESTES, M.K.; KAPIKIAN, A.Z. Rotaviruses. In: **Fields Virology**, ed.DM Knipe, PM Howley, DE Griffin, MA Martin, RA Lamb, et al.,p. 1917-1974. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins, 2007.

FIELDS, B.N.; KNIPE, D.M.; HOWLEY, P.M. **Fields Virology**, Philadelphia: Lippicort-Williams & Wilkins, 5 ed, v.1, p. 3177, 2007.

FISCHER, T.K.; VIBOUD, C.; PARASHAR, U.; MALEK, M.; STEINER, C.; GLASS, R.; SIMONSEN, L. Hospitalizations and deaths from diarrhea and rotavirus among children of <5 years of age in the United States, 1993–2003. **J. Infect. Dis.** v.195,p. 1117–1125, 2007.

FONG, T.T.; LIPP, E.K. Enteric viruses of human 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.

FUMIAN, T.M.; GUIMARÃES, F.R.; PEREIRA, B.J.; DA SILVA, M.T.; MUYLEAERT, F.F.; BOFILL-MAS, S.; GIRONÉS, R.; LEITE, J.P.; MIAGOSTOVICH, M.P. Molecular detection, quantification and characterization of human polyomavirus JC from waste water in Rio de Janeiro, Brazil. **Journal Water Health**, v. 8, n. 3, p. 438-445, 2010.

FUMIAN, T.M.; LEITE, J.P.G.; ROSE, T.L.; PRADO, T.; MIAGOSTOVICH, M.P. One year environmental surveillance of rotavirus specie A (RVA) genotypes circulation after the introduction of the Rotarix. **Water Research**, v. 45, p. 5755–5763, 2011.

GASSILLOUD, B.; GANTZER, C. Adhesion-aggregation and inactivation of poliovirus 1 in groundwater stored in a hydrophobic container. **App. Environ.Microbiol.**, v.71, p.912-920, 2005.

GREEN, K.Y. CALICIVIRIDAE: The Noroviruses. In: Knipe, D.M. Howley, P.M. , Griffin, D.E. , Lamb, R.A. , Martin, M.A. , Roizman, B. , Straus, S.E. (Eds.), **Fields Virology**, fifth ed. Lipincott Willimas and Wilkins, Philadelphia PA, p. 949–980, 2007.

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.

HEMMING ,M.; RÄSÄNEN, S.; HUHTI, L.; PALONIEMI, M.; SALMINEN, M.; VESIKARI, T. Major reduction of rotavirus, but not norovirus, gastroenteritis in children seen in hospital after the introduction of RotaTeq vaccine into the National Immunization Programme in Finland. **Eur. J. Pediatr.**, v.172,p. 739–746, 2013.

HU, S.E.; CRAWFORD, CZAKO R.; CORTES-PENFIELD, N.W.; SMITH D.F.; LE PENDU, J.; ESTES, M.K.; PRASAD, B.V. Cell attachment protein VP8\* of a human rotavirus specifically interacts with A-type histo-blood group antigen. **Nature**, v.485,p. 256–259, 2012.

IBGE-INTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Pesquisa Nacional de esgotamento sanitário 2008. Disponível em <http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/27032002pnsb.shtm>. Acesso 10 de agosto de 2014,p.1-219, 2010.

JOHN, D.E.; ROSE, J.B. Review of factors affecting microbial survival in groundwater. **Environ. Sci. Technol.** v.39, p.7345–7356, 2005.

KOO, H. L.; NEILL, F.H.; ESTES, M.K.; MUNOZ, F.M.; CAMERON, A.; DUPONT, H.L.; ATMAR, R.L. Noroviruses: the most common pediatric viral enteric pathogen at a large university hospital after introduction of rotavirus vaccination. **J. Pediatric Infect. Dis. Soc.** v.2,p.57–60, 2013.

KOOPMANS, M.; VON BONSDORFF, C.H.; VINJE, J.; DE MEDICI, D.; MONROE, S. Food borne viruses. **FEMS Microbiol. Rev.** v.26, p. 187–205, 2002.

LANGLET, J.; GABORIAUD, F.; GANTZER, C. Effects of pH on plaque forming unit counts and aggregation of MS2 bacteriophage. **J. Appl. Microbiol.** v. 103,p.1632–1638, 2007.

LIU, L.; JOHNSON, H.L.; COUSENS, S.; PERIN, J.; SCOTT, S.; LAWN, J.E.; RUDAN, I.; CAMPBELL, H.; CIBULSKIS, R.; LI, M.; MATHERS, C.; BLACK, R.E. Child Health Epidemiology Reference Group of WHO and UNICEF. Global, regional, and national causes of child mortality: an up dated systematic analysis for 2010 with time trends since 2000.**Lancet** v.379,p. 2151–2161, 2012.

MALEK, M.A.; CURNS, A.T.; HOLMAN, R.C.; FISCHER, T.K.; BRESEE, J.S.; GLASS, R.I.; STEINER, C.A.; PARASHAR, U.D. Diarrhea- and rotavirus-associated hospitalizations among children less than 5 years of age: United States, 1997 and 2000. **Pediatrics.** v.117,p. 1887–1892, 2006.

MATTHIJNSSENS, J.; CIARLET, M.; RAHMAN, M.; ATTOUI, H.; BÁNYAI, K.; ESTES, M. K.; GENTSCH, J. R.; ITURRIZA GÓMARA, M.; KIRKWOOD, C. D.; MARTELLA, V.; MERTENS, P. P. C.; NAKAGOMI, O.; PATTON, J. T.; RUGGERI, F. M.; SAIF, L. J.; SANTOS, N. M.; STEYER, A.; TANIGUCHI, K.; DESSELBERGER, U.; VAN RANST, M. Recommendations for the classification of group A rotaviruses using all 11 genomic RNA segments. **Archives of Virology**, v.153, p.1621-1629, 2008.

MCDANIELS, A.E.; COCHRAN, K.W.; GANNON, J. J.; WILLIAMS, G.W. Rotavirus and reovirus stability in microorganism-free distilled and wastewaters. **Water Res.** v.17,p. 1349–1353, 1983.

MÉNDEZ, E.; ARIAS, C.F.; ASTROVIRUSES. In: Knipe, D.M., Howley, P.M., Griffin, D.E., Lamb, R.A., Martin, M.A., Roizman, B., Straus, S.E. (Eds.), **Fields Virology**, fifth ed. Lipincott Willimas and Wilkins, Philadelphia PA, p. 981–1000, 2007.

MIAGOSTOVICH, M.P.; FERREIRA, F.F.M.; GUIMARÃES, F.R.; FUMIAN, T.M.; DINIZ-MENDES, L.; LUZ, S.L.B.; SILVA, L.A.; LEITE, J.P.G. Molecular detection and characterization of gastroenteritis viruses occurring naturally in the stream waters of Manaus, Central Amazônia, Brazil. **Applied and Environmental Microbiology**, v.74, p.375-382, 2008.

PANCORBO, O.C.; EVANSHEN, B.G.; CAMPBELL, W.F.; LAMBERT, S.; CURTIS, S.K.; WOOLLEY, T.W. Infectivity and antigenicity reduction rates of human rotavirus strain in fresh waters. **Appl. Environ. Microbiol.** v.53,p. 1803–1811, 1987.

PARASHAR U.D.; GIBSON C.J.; BRESEE J.S.; GLASS R.I. Rotavirus and Severe Childhood Diarrhea. **Emergence Infectivity Disease** , v. 12, p. 304-306, 2006.

PARASHAR, U.D.; BURTON, A.; LANATA, C.; BOSCHI-PINTO, C.; SHIBUYA, K.; STEELE, D.; BIRMING-HAM, M.; GLASS, R.I. Global mortality associated with rotavirus disease among children in 2004. **J. Infect. Dis.** v.200,p.9–15, 2009.

PAYNE, D.C.; VINJÉ, J.; SZILAGYI, P.G.; EDWARDS, K.M.; STAAT, M.A.; WEINBERG, G.A.; HALL, C.B.; CHAPPELL, J.; BERNSTEIN,



D.I.; CURNS, A.T.; WIKSWO, M.; SHIRLEY, S.H.; HALL, A.J.; LOPMAN, B.; PARASHAR, U.D. Norovirus and medically attended gastroenteritis in U. S. children N. **Engl. J. Med.** , v.368,p. 1121–1130, 2013.

RAMIG, R.F. Pathogenesis of intestinal and systemic rotavirus infection. **Journal of Virology**, v.78, n. 19, p.10213-10220, 2004.

RAPHAEL, R.A.; SATTAR, S.A.; SPRINGTHORPE, V.S. Long-term survival of human rotavirus in raw and treated river water. **J. Microbiol.** v.31, p. 124–128, 1985.

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

SANTOS, N.; HOSHINO, Y. Global distribution of rotavirus serotypes/genotypes and its implication for the development and implementation of an effective rotavirus vaccine. **Journal of Medical Virology**, v. 15, p. 29-56, 2005.

SHAW, R.D., VO, P.T., OFFIT, P.A., COULSON, B.S., GREENBERG, H.B. Antigenic mapping of the surface proteins of Rhesus rotavirus. **Virology**. v155, 434–451. 1986.

SMITH, M.E.; ESTES M.K.; GRAHAM Y.D.; GERBA C.P. Plaque Assay for the Simian Rotavirus SA11. **J. gen. Virol.** v.43,p. 513-519, 1978.

SORIANO-GABARRÓ, M.; MRUKOWICZ, J.; VESIKARI, T.; VERSTRAETEN, T. Burden of rotavirus disease in European Union countries. **Pediatr. Infect. Dis. J.** v.25, p. 7–11, 2006.

SOUZA, S.M.D.; PIAZZA, R.S.; PILOTTO, R.M.; NASCIMENTO, A.M.; MORESCO, V.; TANIGUCHI, S.; LEAL, G.A.D.; SCHMIDT, C.E.; CARGIN-FERREIRA, E.; BÍCEGO, C.M.; SASAKI, T.S.; MONTONE, C.R.; ARAUJO, A.R.; FRANCO, B.M.R.; BOUZON, L.Z.; BAINY, D.C.A.; BARARDI, M.R.C. Virus, protozoa and organic compounds decay in depurated oysters. **International Journal of Food Microbiology**. v.167, p. 337–345, 2013.

TATE, J.E.; BURTON, A.H.; BOSCHI-PINTO, C.; STEELE, A. D.; DUQUE, J.; PARASHAR, U.D. WHO-coordinated Global Rotavirus Surveillance Network, 2008 estimate of worldwide rotavirus-associated mortality in children younger than 5 years before the introduction of universal rotavirus vaccination programmes: a systematic review and meta-analysis. **Lancet Infect. Dis.** v. 12, p. 136–141, 2012.

TATE, J.E.; PATEL, M.M.; STEELE, A.D.; GENTSCH, J.R.; PAYNE, D.C. Global impact of rotavirus vaccines. **Expert Review of Vaccines.** v. 9, p. 395-407, 2010.

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.

VAN DAMME, P.; GIAQUINTO, C.; HUET, F.; GOTHEFORS, L.; MAXWELL, M.; VAN DER WIELEN, M. Multicenter prospective study of the burden of rotavirus acute gastroenteritis in Europe, 2004–2005: the REVEAL study. **J.Infect. Dis.** v.195, p. 4–16, 2007.

VECCHIA, A.D.; FLECK, J.D.; COMERLATO, J.; KLUGE, M.; BERGAMASCHI, B.; DA SILVA, J.V.S.; DA LUZ, R.B.; TEIXEIRA, T.F.; GARBINATTO, G.N.; OLIVEIRA, D.V.; ZANIN, J.G.; VAN DER SAND, S.; FRAZZON, A.P.G.; FRANCO, A.C.; ROEHE, P.M.; SPILKI, F.R. First description of Adenovirus, Enterovirus, Rotavirus and Torque teno virus in water samples collected from the Arroio Dilúvio, Porto Alegre, Brazil. **Braz. J. Biol.** v.72, no.2, 2012.

VESIKARI, T.; MATSON, D.O.; DENNEHY, P.; VAN-DAMME. P.; SANTOSHAM, M. Safety and Efficacy of a Pentavalent Human-Bovine (WC3) Reassortant Rotavirus Vaccine. **New England Journal of Medicine**, v. 354, p. 23-33, 2006.

ZENG, S.Q.; HALKOSALO, A.; SALMINEN, M.; SZAKAL, E.D., PUUSTINEN, L.; VESIKARI, T. One-step quantitative RT-PCR for the detection of rotavirus in acute gastroenteritis. **Journal Virology Methods**, v. 153, p. 238-240, 2008.

WARD, R.L.; KNOWLTON, D.R.; WINSTON, P.E. Mechanism of inactivation of enteric viruses in fresh water. **Appl. Environ. Microbiol.** v.52, p.450–459, 1986.

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. Preventing disease through healthy environments: towards an estimate of the environmental burden of disease. Genève, 2006.

WU, J. A simple and novel method for recovering adenovirus 41 in small volumes of source water. **J Appl Microbiol**, v.110, no. 5, p. 1332-40, 2011.

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

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.