



REVISÃO

Análise virológica da qualidade da água: uma revisão das metodologias de concentração e detecção viral

Hugo Delleon Silva^{1,2}, Carlos Eduardo Anunciação²,
Sônia de Fátima Oliveira Santos^{1,2} e Marco Tulio Antonio García-Zapata^{1*}

Recebido: 23 de julho de 2010 Recebido após revisão: 04 de janeiro de 2011 Aceito: 15 de março de 2011
Disponível on-line em <http://www.ufrgs.br/seerbio/ojs/index.php/rbb/article/view/1674>

RESUMO: (Análise virológica da qualidade da água: uma revisão das metodologias de concentração e detecção viral). Muitos vírus patogênicos são excretados em fezes humanas e urina, e a água é um dos possíveis veículos de transmissão destes agentes, representando riscos para a saúde pública. Em alguns países, estes patógenos já são incorporados em rotinas de monitoramento ambiental. Todavia, ainda não há consenso em relação à escolha de um agente viral indicador, e nem em relação a um método padrão de detecção, o que muitas vezes gera divergências e confusões entre os próprios pesquisadores. Neste sentido, o objetivo deste estudo foi de realizar uma revisão atualizada dos principais métodos que compõem a análise virológica (concentração e detecção) da água. Apesar das divergências, constata-se que a metodologia de concentração é baseada sobretudo nos métodos de microfiltração em membranas polarizadas, ultrafiltração e ultracentrifugação, com variações de acordo com o tipo de amostra. Em relação aos métodos de detecção, estes baseiam-se sobretudo no uso da PCR e suas variações.

Palavras-chave: água, concentração, detecção, vírus.

ABSTRACT: (Virological analysis of water quality: a review of the methodologies of concentration and viral detection). Many pathogenic viruses are excreted in human feces and urine, and water is one possible vehicle of transmission, representing a risk for public health. In some countries, these pathogens are already embedded in routine environmental monitoring. However, there is no consensus yet on the choice of an indicator viral agent, and about choosing a method to diagnose them, which often generate confusion and disagreement among the researchers themselves. The objective of this study was to conduct an updated review of the main methods that comprise the virological analysis (concentration and detection) of water. Despite the differences, we observe that the method of virus concentration is mainly based on the methods of microfiltration in polarized membrane, ultrafiltration and ultracentrifugation, with variations according to the type of water sample. Regarding the methods of detection, these are based mainly on the use of PCR and its variations.

Key words: water, concentration, detection, virus.

INTRODUÇÃO

Indicadores empregados para avaliar a qualidade da água têm sido itens de controvérsia há mais de 50 anos (Rose *et al.* 2006). As bactérias geralmente são utilizadas como microrganismos de escolha no monitoramento microbiológico da água (Hsu *et al.* 2007), para tal, normalmente utilizam-se às bactérias heterotróficas e coliformes (Lee & Kim 2002). Entretanto, os métodos tradicionais de detecção de coliformes fecais e *Escherichia coli* possuem valor preditivo limitado para avaliar a ocorrência de vírus entéricos (Le Guyader *et al.* 2000). Diversos estudos relatam a não associação entre a presença de certos vírus encontrados no meio ambiente e indicadores bacterianos (Grabow *et al.* 2001, Rose *et al.* 2006, Hsu *et al.* 2007).

Vírus entéricos são importantes patógenos que geralmente estão dispersos no meio ambiente e são transmitidos pela via fecal-oral (Chapron *et al.* 2000, Haramoto *et al.* 2008). Até o momento, foram identificados mais de 140 tipos diferentes de vírus que causam uma variedade

de doenças em humanos e que podem ser encontrados em águas (Hurst 1991, Hamaza *et al.* 2009). A presença destes patógenos em águas é um sério problema de saúde pública (Chen *et al.* 2006), pois a ingestão de partículas virais infecciosas, mesmo em baixas concentrações, pode acarretar diversos agravos à saúde (Ward & Akin 1984) e, em alguns casos, a ingestão de uma única partícula é o suficiente para desencadear uma infecção (Tavares *et al.* 2005).

Por outro lado, os métodos tradicionais de tratamento de água não são totalmente eficientes para a eliminação dos vírus (Koopmans *et al.* 2002). Assim como os microsporídios, protozoários esporuláveis de difícil remoção por filtração, sua remoção e/ou inativação requer o uso de luz ultravioleta (U.V.) no reator, metodologia onerosa, disponível apenas em alguns países desenvolvidos, e que nem sempre tem ação efetiva sobre todos os agentes virais, já que muitos são altamente resistentes ao tratamento com luz U.V. (Mamane-Gravetz *et al.* 2004).

Inúmeros estudos relatam a detecção de tipos diferenciados de vírus entéricos em águas tratadas e não-

1. Núcleo de Pesquisas em Agentes Emergentes e Re-emergentes, Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, Universidade Federal de Goiás. Caixa Postal 12911, Setor Leste Vila Nova, CEP 74643-970, Goiânia, GO, Brasil.

2. Laboratório de Diagnóstico Genético e Molecular, Instituto de Ciências Biológicas II, Universidade Federal de Goiás. Campus Samambaia, Caixa Postal 131, CEP 74001-970, Goiânia, GO, Brasil.

* Autor para contato. E-mail: nupere@gmail.com

-tratadas, como o rotavírus (Mehnert 1993, Soule *et al.* 2000), enterovírus (Abbaszadegan *et al.* 1993, Soule *et al.* 2000), vírus da hepatite A (Rose *et al.* 2006, Albinana-Gimenez *et al.* 2006, Barrella *et al.* 2009), adenovírus (Barrella *et al.* 2009, Silva *et al.* 2010a), etc. A *United States Environmental Protection Agency* (USEPA) possui uma lista com os agentes virais que representam perigo à saúde pública e que devem ser monitorados: vírus da hepatite A, adenovírus, calcivírus e enterovírus (Usepa 2009). Esta lista de candidatos contaminantes (CCL) é modificada continuamente pela USEPA, em conformidade com pesquisas realizadas na área.

Dentre os vírus listados na CCL, os enterovírus e adenovírus são conhecidos por serem prevalentes em esgotos e águas poluídas (Vantarakis & Papapetropoulou 1998), sendo sugeridos por muitos autores como indicadores de contaminação viral (Pina *et al.* 1998). Mais recentemente, uma atenção especial tem sido dedicada aos adenovírus (AdVs), pois são considerados indicadores de contaminação humana (Hundesda *et al.* 2006, Carducci *et al.* 2008, Katayama *et al.* 2008), são os patógenos aquático mais resistente à inativação pelo U.V. (Linden *et al.* 2007), não apresentam correlação com as bactérias coliforme (Jiang & Chu 2004, Hara-moto *et al.* 2005, Mena & Gerba 2008), e possuem o genoma constituído por DNA fita dupla, o que possibilita o diagnóstico molecular mais rápido e com menor custo (Silva *et al.* 2010a).

Apesar desta indicação, ainda não há um indicador virológico padrão para análise de águas, não existindo sequer consenso entre os pesquisadores em relação ao volume requerido e ao método de análise virológica a ser empregado. Entretanto, de forma sistematizada, essas análises geralmente obedecem a duas etapas: a concentração e a detecção viral.

Neste sentido, o objetivo deste estudo foi de realizar uma revisão atualizada dos principais métodos que compõem a análise virológica (concentração e detecção) da água.

CONCENTRAÇÃO VIRAL

A concentração é a primeira etapa na realização da análise virológica da água, objetiva recuperar e concentrar o maior número possível de partículas virais, ou mesmo reter material genético em suspensão. Em geral, os vírus estão presentes em baixas concentrações nas águas (Griffin *et al.* 1999, Soule *et al.* 2000, Chen *et al.* 2006, Hamaza *et al.* 2009). Dessa forma, a concentração é uma etapa crítica, trabalhosa e onerosa, que utiliza um grande volume de água (Tavares *et al.* 2005), podendo inviabilizar a aplicação em rotina de monitoramento ambiental.

Existe uma grande variedade de métodos de concentração e a escolha de um ou outro depende do tipo de amostra, do vírus a ser isolado e mesmo de recursos financeiros do laboratório. Assim, a utilização de um bom método de concentração é crucial para a posterior

fase de detecção viral. Um método adequado de concentração viral deve cumprir uma série de exigências: (i) ser tecnicamente fácil de conclusão em curto espaço de tempo; (ii) prover alto índice de recuperação viral; (iii) concentrar grande variedade de vírus; (iv) fornecer um pequeno volume de concentrado; (v) não ser caro; (vi) ser capaz de processar grandes volumes de água e (vii) ser repetitivo e reproduzível (Wyn-Jones & Sellwood 2001). Entretanto, o alto custo ainda dificulta a utilização destes testes de forma rotineira.

Dentre os métodos de concentração, os mais amplamente utilizados são: ultracentrifugação (Formiga-Cruz *et al.* 2005, He & Jiang 2005, Albinana-Gimenez *et al.* 2006), adsorção-eluição em membranas de microfiltração polarizadas (Katayama *et al.* 2002, Rigotto *et al.* 2009, Silva *et al.* 2010a) e ultrafiltração (Soule *et al.* 2000, Rajal *et al.* 2007), ocorrendo combinações entre estes e alguns métodos de precipitação, ou mesmo outras metodologias afins.

Microfiltração

É sabido que os vírus entéricos possuem ampla gama de ponto isoelétrico (Ferguson *et al.* 2003), possuindo carga eletrostática predominantemente negativa ou perto do nível de pH neutro quando em meio ambiente (Hamaza *et al.* 2009). Essa carga eletrostática pode ser modificada para positiva pela redução do pH da água para um valor abaixo do ponto isoelétrico das proteínas do capsídeo viral. Baseado nesta propriedade, os vírus podem ser eficientemente recuperados utilizando tanto membranas polarizadas negativamente quanto positivamente (Katayama *et al.* 2002, Silva *et al.* 2010a).

As membranas de microfiltração utilizadas (entre 0,2 a 0,45 μm de porosidade) são geralmente constituídas de nylon, celulose, nitrocelulose ou fibra de vidro, podendo ser simples (única membrana) ou dispostas em cartuchos de filtração, sendo neutras ou polarizadas negativamente ou positivamente, existindo diferenças significativas quanto à utilização destas. A filtração em cartucho utiliza grande volume de água, o que pode aumentar a eficácia da análise virológica. Entretanto, a metodologia se torna trabalhosa e onerosa, e não condiz com o uso rotineiro na análise virológica da água. Por outro lado, amostras ambientais são ricas em contaminantes de origem orgânica e inorgânica, que podem rapidamente saturar as membranas simples e impedir a correta filtração nestas. Esse problema foi solucionado por Silva *et al.* (2010a), que realizaram previamente à microfiltração uma pré-filtração com papel filtro qualitativo, reduzindo o número de contaminantes ambientais. Em outro estudo, Hsu *et al.* (2007) obtiveram uma taxa de recuperação viral de 100% utilizando uma pré-filtração quantitativa com os microfiltros de fibra de AP 15 e AP 20 (Millipore) seguindo de microfiltração em membrana de nitrocelulose com pequena carga eletro-negativa.

A *American Public Health Association* (APHA) e a USEPA recomendam o uso de adsorção-eluição em

membranas eletronegativas para concentrar vírus da água (Clesceri *et al.* 2005, Usepa 2001). Entretanto, o uso de membranas eletronegativas requer tratamentos prévios da água para propiciar a interação entre o vírus e a membrana. Estes tratamentos geralmente incluem acidificação da água com adição de sais catiônicos multivalentes ($AlCl_3$ ou $MgCl_2$), modificando a carga do vírus e propiciando interações eletrostáticas entre o capsídeo viral e a superfície eletronegativa das membranas (Chen *et al.* 2006, Victoria *et al.* 2009).

Um método de concentração viral utilizando filtro eletronegativo de 0,45 μm foi desenvolvido (Katayama *et al.* 2002) e recentemente reproduzido com sucesso em vários trabalhos correlatos que detecta vírus em águas ambientais (Haramoto *et al.* 2007a, Miagostovich *et al.* 2008, Katayama *et al.* 2008, Rigotto *et al.* 2009).

Adsorção-eluição de vírus com filtros eletropositivos (por ex. 1MDS Zetapor Viroorb [CUNO, Meriden, CN]) é um dos métodos comumente mais recomendados pela USEPA para recuperar vírus em águas tratadas (Usepa 1996, 2001). Além disso, estes filtros apresentam a vantagem de não requererem a modificação do pH das amostras (Fong *et al.* 2005) e o vírus se aderem diretamente à membrana eletropositiva. Todavia, filtros eletropositivos têm a desvantagem de oferecer uma baixa taxa de recuperação viral em águas salgadas, pois a presença do sal e a alcalinidade da água podem causar baixa adsorção dos vírus aos filtros (Lukasik *et al.* 2000).

No Brasil, desde 1988, trabalhos realizados têm utilizado filtração através de membrana eletropositiva Zeta Plus 60 S (ZP60S), seguida de ultracentrifugação na pesquisa de vírus em amostras ambientais (Mehnert & Stewien 1993, Schvoerer *et al.* 2000). Mais recentemente na cidade de Goiânia, GO, Silva *et al.* (2010a) encontraram 43% de amostras de água positivas para adenovírus concentrados por membrana eletropositiva e detectados por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).

Alternativamente ao uso de micromembranas polarizadas, tem sido testado o método de adsorção-eluição

em partículas de vidro para recuperar vírus de amostras ambientais (Lambertini *et al.* 2008). Este método utiliza eluição com óleo mineral e geralmente permite que se realize a adsorção-eluição de vírus sem a necessidade de modificação do pH da água (Lambertini *et al.* 2008, Wyn-Jones *et al.* 2001). Apesar de menos oneroso, o método apresenta uma taxa de recuperação viral muito variável, não apresentando ainda resultados satisfatórios.

Recentemente, Li *et al.* (2010) compararam o uso de um novo filtro composto por fibra eletropositiva de composição não têxtil chamado de “nanoalumina” (Ahlstrom Filtration, LLC, FL) com o uso do já comumente utilizado filtro HA-WP (Millipore, Inc.). Apesar do novo sistema oferecer algumas vantagens, tais como a capacidade para filtrar grandes volumes de água (acima de 10 litros), maior taxa de recuperação de partículas infecciosas (82-91% contra 78-90% pela filtração HA), sem a necessidade de pré-filtração, e ajuste de pH ou adição de cátions multivalentes, apresentou a desvantagem de oferecer menor taxa de recuperação do genoma viral (16-35% contra 29-66% pela filtração HA).

A Tabela 1 mostra as principais membranas e cartuchos de filtração usualmente empregados para realizar a concentração (pré-filtração / filtração) de vírus em águas ambientais.

Ultrafiltração

A ultrafiltração (UF) consiste em filtração em ultra-membranas que retêm macromoléculas (ácidos nucleicos e proteínas). Essas membranas contêm poros capazes de reter massas moleculares na ordem de 10.000 a 100.000 Da (Hill *et al.* 2007), sendo geralmente utilizadas em associação com a microfiltração (Haramoto *et al.* 2007a, Miagostovich *et al.* 2008). Os métodos de ultrafiltração têm sido reportados desde a década de 1970 na recuperação de microrganismos em água, com especial destaque para os vírus (Belfort *et al.* 1974). Hill *et al.* (2005) demonstraram que a UF pode ser utilizada de modo eficiente, utilizando um pequeno volume de

Tabela 1. Membranas e cartuchos de microfiltração utilizados para concentrar (pré-filtração/filtração) vírus em águas ambientais.

Tipo	Nome	Porosidade (μm)	Composição	Carga/ Hidrofobicidade
Membrana	Hybond N+ (Amersham pharma)	0,45	Nylon	+
Membrana	Zetapore (AMF Cuno)	0,45	Diatomácea/celulose	+
Membrana	PTFE-LCR (Millipore)	0,45	Teflon	Hidrofílico
Membrana	MF HAW (Millipore)	0,45	Nitrocelulose	-
Membrana	NM04701 020SP	0,22	Nitrocelulose	-
Membrana	HA (Millipore)	0,22-0,45	Mistura de ésteres de celulose	Hidrofílico
Membrana	Anodisc (Whatman)	0,2	Inorgânica (inorganic-alumina)	+
Membrana	Prefilter A1 15 (Millipore)	8,0	Microfibra de vidro	SI
Membrana	Prefilter GF/FC (Whatman)	12,0	Microfibra de vidro	SI
Membrana	AP 15 e AP 20	0,2-0,8	Microfibra de vidro	SI
Membrana	Metricel (Gelman Science)	0,8	Celulose	SI
Cartucho	Zeta-plus (AMF, Cuno)	0,5-1,0	Celulose com carga modificada	+
Cartucho	1-MDS Virozorb (AMF, Cuno)	0,2	Celulose com carga modificada	+
Cartucho	Duo-fine series (Blaston Corp.)	0,45	fibra de vidro com resina epóxi	SI
Cartucho	Filtering tubes (Balston Corp.)	5-8,0	Microfibra de Vidro e resina de epóxi-borsilicato	SI

SI: Sem informações precisas

água (10 L) em condições diferenciadas para recuperar simultaneamente vírus, bactérias e parasitos. Recentemente, Girones *et al.* (2010) constataram que a UF seria uma alternativa viável para o diagnóstico de vírus em águas salgadas (Girones *et al.* 2010).

Métodos de ultrafiltração como a filtração de fluxo por vórtex (VFF - vortex flow filtration) e a filtração de fluxo tangencial (TFF - flow filtration) têm sido utilizados como alternativas ao método de adsorção-eluição por microfiltração. VFF tem a vantagem de não requerer pré-filtração e ter maior taxa de recuperação viral do que TFF (Fong *et al.* 2005). Contudo, é aconselhável realizar uma etapa de pré-filtração qualitativa, pois a realização deste procedimento permite a retirada de matéria orgânica, como restos de algas que saturam as membranas (Silva *et al.* 2010a).

Ultracentrifugação

Na ultracentrifugação, as amostras de água são centrifugadas a uma velocidade superior a 100.000 x g, e isso faz com que os vírus precipitem e possam ser eficientemente eluídos. O método de ultracentrifugação apresenta a vantagem de usar amostras *in natura*. Todavia, sua utilização em amostras ambientais, tais como águas de rios ou lagos (onde a concentração de vírus é baixa), é limitada, pois as ultracentrífugas não possuem capacidade para processar grandes volumes de água. Assim, este método é muito empregado para detecção de vírus em amostras de esgoto (Albinana-Gimenez *et al.* 2006, Myrmel *et al.* 2006), onde a concentração destes patógenos é sabidamente elevada. O método em si é prático e de baixo custo. Todavia, a aquisição e a manutenção de uma ultracentrífuga exigem custos elevados.

Eluição e extração de ácidos nucléicos

A próxima etapa pós-concentração é realizar a eluição das partículas virais adsorvidas em membrana ou no concentrado, normalmente utiliza-se uma solução proteínica alcalina contendo glicina (~0,5 M) e extrato de carne (1-3%, pH 9-11), também chamada de floculação orgânica (Puig *et al.* 1994, Lambertini *et al.* 2008), a qual promove a recuperação de partículas virais adsorvidas em sólidos (El-Senousy *et al.* 2007). A eluição com extrato de carne é o método mais utilizado. Todavia, diversos pesquisadores têm utilizado eluições diferenciadas, como soluções contendo Tween 80 (Rajal *et al.* 2007), e associação de Tween 20 com Tris-EDTA (Silva *et al.* 2010a), pois o extrato de carne pode inibir as reações de PCR (Abbaszadegan *et al.* 1993). Em razão disso, para a detecção via PCR, alguns pesquisadores têm proposto, como alternativa mais eficaz, a eluição dos vírus em solução de NaOH (pH 10,8) (Haramoto *et al.* 2005, Haramoto *et al.* 2007b), ou mesmo uma associação de H₂SO₄ 0,5 mM e NaOH 1 mM (Hsu *et al.* 2007).

Em associação ou não com a etapa de eluição, pode-se utilizar diversas metodologias, denominadas de

métodos secundários de concentração, usualmente métodos de precipitação, destacando-se a já mencionada floculação orgânica com extrato de carne (Xagorarakis *et al.* 2007), floculação com alumínio (Farrah *et al.* 1976), floculação com leite em pó desnatado (0,01% w/v) (Calgua *et al.* 2008), precipitação com polietilenoglicol (PEG) (Greening *et al.* 2002), ou precipitação com sais multivalentes (Chang *et al.* 1981). O precipitado é então centrifugado para aumentar a eficiência de sedimentação e, posteriormente, dissolvido em tampões apropriados e submetido à extração do material genético, para diagnóstico molecular, ou segue diretamente para isolamento em cultura celular.

Recentemente, Hamaza *et al.* (2009), comparando vários métodos de eluição, demonstraram que a eluição das membranas com glicina e extrato de carne não apresenta grande eficiência quando em associação com a precipitação com PEG. A concentração com PEG possui a vantagem de obter precipitação em pH neutro ou em altas concentrações iônicas, bem como na ausência de compostos iônicos (Lewis & Metcalf, 1988). Por outro lado, a precipitação com PEG pode não ser muito eficiente para algumas amostras ambientais, pois pode ocasionar concomitante concentração de inibidores da PCR (ácidos húmicos, compostos fenólicos, etc.) (Schvoerer *et al.* 2000). Alguns métodos secundários de concentração também podem ser utilizados para promover uma purificação ou mesmo re-concentração das amostras, diminuindo a concentração de contaminantes orgânicos e inorgânicos.

Alternativamente, um bom método de extração de ácidos nucléicos pode amenizar/solucionar os problemas decorrentes da presença de inibidores das enzimas utilizadas na PCR. Existem diferentes protocolos, que usualmente incluem extração pelo método de fenol-clorofórmio (Sambrook & Russel 2001), extração pelo método da sílica (Boom *et al.* 1990), ou demais variações vigentes, já que os kits sofrem modificações entre laboratórios e podem ser utilizados tanto kits comerciais quanto os chamados “kits caseiros”, estes últimos muito comuns em análises virológicas de amostras ambientais. Para minimizar os efeitos de compostos inibidores da polimerase pós-extração de DNA, como à ação de ácido húmico, Abbaszadegan *et al.* (1993) utilizaram com sucesso um pré-tratamento de purificação do material genético através de passagem em coluna de cromatografia utilizando Sephadex G-100 e resina do tipo Chelex-100. Isso denota o cuidado que se deve ter na escolha de um bom método de extração de ácidos nucléicos.

DETECÇÃO, ENUMERAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO VIRAL

Culturas celulares

Existem diversos métodos de identificação de vírus em águas baseados na detecção molecular ou na capa-

cidade de replicação ou não dos vírus em culturas celulares (CC) (Wyn-Jones & Sellwood 2001). As culturas celulares são metodologias tradicionais, comumente utilizadas para isolar vírus em águas desde a década de 1990 (Havellar *et al.* 1993). O método consiste em inocular amostras de vírus em uma linhagem celular de escolha e avaliar as células quanto à presença de danos, estes chamados de efeito citopático, um sinal característico da evidência de infecção viral (Fong *et al.* 2005).

A cultura celular, apesar de ser um método muito sensível (Tavares *et al.* 2005) em detectar partículas virais infecciosas, apresenta a desvantagem de ser trabalhosa (Hot *et al.* 2003, Formiga-Cruz *et al.* 2005) e onerosa (Formiga-Cruz *et al.* 2005). Além disso, alguns grupos virais são fastidiosos, como os adenovírus (sorotipo 40/41) e norovírus (Ko *et al.* 2005, Haramoto *et al.* 2004, Mena & Gerba, 2008). Outra desvantagem da metodologia é a necessidade da utilização de uma segunda metodologia, acoplada à cultura celular, para realizar identificação viral específica. Dentre essas se destacam os métodos imunológicos, como imunofluorescência e imunoperoxidase (Mehnert *et al.* 1999), quimioluminescência (Greening *et al.* 1999), ensaio imunoenzimático (ELISA) (Jinag *et al.* 1995) e métodos moleculares como a PCR (Greening *et al.* 2002).

Reação em cadeia da polimerase e variações

Com o a expansão do uso de técnicas moleculares, a partir da década de 1990, e a conseqüente incorporação de metodologias que agregam maior especificidade e sensibilidade, como a PCR, vem sendo crescente o aumento no número de investigações na área da virologia aquática (Castignolles *et al.* 1998, Soule *et al.* 2000, Lee & Kim 2002, Fout *et al.* 2003, Formiga-Cruz *et al.* 2005, Karamoko *et al.* 2005, Rose *et al.* 2006, Lee & Kim 2008, Silva *et al.* 2010a).

Técnicas moleculares como a PCR fornecem alta especificidade, sensibilidade e rápida detecção de patógenos virais em amostras ambientais (Rigotto *et al.* 2005) quando comparada à cultura celular (Fong *et al.* 2005). Porém, em rotina laboratorial, o seu uso em amostras aquáticas pode ser limitado, devido à presença de inibidores da polimerase. Por exemplo, substâncias orgânicas oriundas de ácido húmico podem adsorver proteínas ou enzimas e interferir quimicamente em seus sítios de atividade ou quelar cátions bivalentes, tais como Ca^{2+} e Mg^{2+} , impedindo que estes íons sirvam como cofatores das enzimas utilizadas na PCR (Muller-Wegener, 1988). Alguns métodos têm sido desenvolvidos para sobrepor esses obstáculos, entre eles a Nested-PCR (utilização de um segundo par de iniciadores flanqueando uma região previamente amplificada pela primeira PCR), técnica que tem sido proposta para assegurar detecção específica, eliminar resultados falso-negativos e incrementar a reação (Rigotto *et al.* 2005).

As Nested-PCRs apresentam maior nível de sensibilidade, em comparação com as PCRs, permitindo a detecção de um menor número de partículas virais nas

amostras (Puig *et al.* 1994), além de ter a vantagem de concentrar menor quantidade de inibidores da enzima Taq DNA polimerase (Rigotto *et al.* 2005). Alternativamente, tem sido utilizada a semi-Nested PCR para aumentar a sensibilidade das análises (Silva *et al.* 2010a). A Semi-Nested PCR é uma segunda reação de PCR, mas que utiliza um dos *primers* utilizados na primeira PCR em associação com outro *primer* diferente flanqueando uma região já amplificada. Dubois *et al.* (1997), ao detectar rotavírus em amostras de esgoto, constataram que a realização de ensaios Nested-PCR aumenta a sensibilidade da reação em $1,83 \times 10^3$, quando comparado com ensaios PCR.

A desvantagem da PCR é que não é capaz de indicar infecciosidade viral (Schvoerer *et al.* 2001). Todavia, em ensaios de reação em cadeia da polimerase com transcrição reversa (RT-PCR), isso é passível de ser analisado pela detecção de cópias de mRNA obtidas de replicação viral em cultura celular (Greening *et al.* 2002). Segundo Metcalf *et al.* (1995), para a detecção de certos vírus em amostras ambientais, RT-PCR é o método de escolha em comparação ao uso dos antígenos utilizados em ensaios ELISA, que não são tão específicos. Mesmo assim, o que se tem observado é a crescente detecção destes patógenos utilizando apenas detecção molecular direta, sem auxílio de cultura celular, haja vista que alguns grupos de vírus monitorados são altamente resistentes a condições ambientais adversas.

Outro método molecular utilizado para detecção viral em amostras hídricas é a PCR quantitativa em tempo real (Q-PCR/qPCR - Real time PCR) (Bofill-Mas *et al.* 2006, Xagorarakis *et al.* 2007, Haramoto *et al.* 2007a). É uma variação da PCR pela utilização de compostos fluorescentes (fluoróforos) que, simultaneamente amplifica, quantifica e analisa a expressão gênica (He & Jiang 2005). Os compostos fluorescentes mais utilizados para detecção de vírus em água por qPCR são o *SYBR Green* e a *TaqMan*.

O *SYBR Green* se liga entre a fita dupla de DNA e, com a excitação da luz emitida pelo sistema ótico do termociclador de qPCR, emite uma fluorescência verde. São (i) vantagens e (ii) desvantagens do *SYBR Green*: (i) baixo custo, facilidade no uso e sensibilidade; (ii) se liga em todo o DNA fita dupla (incluindo dímeros), podendo superestimar a concentração alvo (Novais & Alves 2004). A *TaqMan* é uma sonda de DNA marcada que, durante a PCR, hibridiza com a seqüência da fita simples de DNA complementar alvo, agregando conseqüentemente maior especificidade e sensibilidade à reação. Dessa forma, o uso da sonda *TaqMan* permite que se realize a quantificação de vírus em ambientes aquáticos (La Rosa *et al.* 2010).

Apesar da alta sensibilidade e especificidade dos ensaios de PCR, há divergências quanto a utilização das variações RT, qPCR e Nested-PCR para a detecção de vírus em águas. Van Heerden *et al.* (2005) demonstraram que para a detecção de adenovírus humano, o isolamento em cultura e identificação por RT-PCR fornece alta

sensibilidade e especificidade. Em estudo realizado por Chapron *et al.* (2000), que compara a utilização de cultura celular em associação com Nested-PCR com apenas a utilização de Nested-PCR, foi demonstrada maior sensibilidade na detecção de adenovírus em amostras semeadas em cultura celular. Dado semelhante foi obtido por Xagoraki *et al.* (2007), ao analisarem a detecção de AdVs em amostras ambientais pela associação ou não de cultura celular com ensaio qPCR, ficando evidente a maior sensibilidade da associação cultura celular e qPCR (qPCR-CC). Contraditoriamente, Chapron *et al.* (2000), ao analisarem a integração cultura celular com RT-PCR e Nested-PCR (CC-RT-PCR), obtiveram um aumento da sensibilidade de detecção viral quando comparado ao uso da cultura celular unicamente. Já He & Jiang (2005) relatam que a realização de PCR quantitativo em etapa única permitiu a detecção de 3-4 vezes mais AdVs do que o encontrado por isolamento em linhagens HEK-293 em associação com a qPCR.

A realização de um segundo ensaio de PCR aumenta a sensibilidade e especificidade das reações de detecção de AdVs em águas poluídas (Castignolles *et al.* 1998) e esse fato é inegável. Esse dado é corroborado por estudos realizados por Puig *et al.* (1994) e Vantarakis & Papapetropoulou (1999) em que, respectivamente, 11 e 9 amostras ambientais foram negativas na primeira PCR e confirmadas positivamente após segunda PCR (Nested-PCR). Mas há divergências na comparação do Nested-PCR com o qPCR. Estudo realizado por Noble *et al.* (2003) demonstra que Nested-PCR é mais sensível do que qPCR na detecção de adenovírus. Por outro lado, Jiang *et al.* (2005), assim como Romanova *et al.* (2009), demonstraram que a qPCR foi mais sensível para a detecção de adenovírus em águas ambientais. Beuret *et al.* (2004), detectando norovírus e enterovírus, demonstraram que RT-Real time PCR apresentou um aumento de sensibilidade de uma a duas ordens de magnitude, respectivamente, quando comparada com o protocolo RT-PCR. O mesmo foi observado por De Paula *et al.* (2007), em que qPCR detectou vírus da hepatite A (HAV) em 92% das amostras, comparado com 23% quando utilizado o ensaio de RT-PCR. Isso possivelmente ocorreu porque a qPCR é menos sensível aos inibidores enzimáticos, quando comparada com a PCR qualitativa. Além disso, para a detecção de HAV, a qPCR mostra-se mais eficiente pois combina a amplificação da PCR com o uso de sondas internas (*TaqMan*) para confirmar a especificidade do *amplicon* (Mackay 2004). Ensaio qPCR baseado no uso de sondas *TaqMan* é uma das técnicas mais confiáveis para avaliar a abundância de sorotipos de AdVs na água, pois oferece alta sensibilidade e baixa possibilidade de contaminação cruzada (Haramoto *et al.* 2007). Dessa forma, é notório o aumento no uso da qPCR para o monitoramento microbiológico ambiental e alimentar (Girones *et al.* 2010).

Apesar da inegável sensibilidade e especificidade dos ensaios baseados na amplificação gênica (PCR)

confirmar especificidade de amostras positivas por visualização de bandas em gel agarose, mesmo após uma segunda PCR, não é suficiente para a análise virológica de amostras ambientais (Silva *et al.* 2010a). Isso porque os microrganismos de forma geral são mais susceptíveis quando em meio ambiente às mudanças em sua constituição genética, podendo induzir não somente a casos de falso-negativo, mas também de falso-positivo. Desta forma, o sequenciamento de nucleotídeos vem sendo empregado para agregar maior especificidade às amostras positivas. Nesse quesito, a PCR quantitativa pode conseguir mais sucesso, pois juntamente com os *primers forward e reverse*, pode-se empregar uma sonda interna, agregando maior especificidade ao teste.

Nas reações de PCR, deve-se ressaltar o uso de um controle interno de amplificação para todas as reações (Silva *et al.* 2010a, Girones *et al.* 2010). Além disso, a presença de potenciais inibidores, que podem afetar a acurácia da quantificação, pode ser avaliada através de amplificações advindas de amostras ambientais puras e diluídas (Girones *et al.* 2010).

A PCR e suas variações é o método mais empregado para detectar ácidos nucléicos virais em amostras ambientais, mas outros métodos estão disponíveis como, por exemplo, o NASBA (*Nucleic Acid Sequence-Based Amplification* - amplificação de ácidos nucléicos baseada em sequência). O NASBA é um método utilizado para amplificar RNA de outras cópias de RNA ou DNA em temperatura única, sendo mais comumente empregado para amplificar RNA (Goodwin & Litaker, 2008).

Citometria de fluxo

Recentemente, uma nova frente em microbiologia ambiental vem sendo desenvolvida com a utilização de metodologias robustas, baseadas na utilização da citometria de fluxo. A citometria é uma técnica utilizada para contar, examinar e classificar partículas microscópicas suspensas em meio líquido em fluxo, permitindo a análise de vários parâmetros (Vives-Rego *et al.* 2000). A citometria utiliza sondas fluorescentes específicas que se ligam ao seu alvo-ligante e emite uma fluorescência padrão após excitação por lasers. As sondas podem ser utilizadas para examinar características estruturais, como conteúdo lipídico, anticorpos ou ácidos nucléicos (DNA ou RNA), sondas de oligonucleotídeos marcadas com fluorescência (Katisuragi & Tani 2000). No caso específico dos AdVs, a detecção desses já é realizada com sucesso através do monitoramento intracelular da taxa de expressão da proteína hexon do capsídeo viral, que é abundantemente expressa entre 18 a 24 h pós-infecção celular (Weaver & Kadan 2000). Todavia, essa metodologia ainda não foi testada em amostras ambientais.

As limitações no uso da citometria de fluxo em virologia ambiental estão relacionadas à pequena dimensão e reduzido conteúdo das moléculas estruturais dos vírus, especialmente DNA e RNA. Apesar dos corantes celulares atualmente utilizados serem bem conhecidos

e aplicados na marcação de células animais, as interações com as células virais são pouco conhecidas (Vives-Rego *et al.* 2000). Embora o método seja promissor no campo da virologia ambiental e haver trabalhos correlatos (Barardi *et al.* 1998, Nebe-Von-Caron *et al.* 2000), esses ainda são incipientes e isso se deve sobretudo porque o aparelho possui um custo elevado e a metodologia exige pessoal altamente qualificado (Vives-Rego *et al.* 2000), o que pode inviabilizar seu uso.

Alternativamente à citometria de fluxo, alguns estudos indicam a utilização do Luminex em trabalhos de microbiologia ambiental (Spiro & Lowe 2002, Peters *et al.* 2007). O Luminex é um pequeno citômetro de fluxo com o propósito de detectar microesferas internamente coradas com uma composição de fluorocromos vermelho e infravermelho (Peters *et al.* 2007). Dentro do analisador Luminex, um laser excita os corantes internos das microesferas e outro laser indica a faixa de

fluorocromo capturado pelos antígenos. Há uma variedade de 100 microesferas disponíveis e cada uma com uma composição antigênica diferente. O Luminex pode, assim como o citômetro de fluxo, detectar proteínas, lipídios, ácidos nucleicos e demais biomoléculas pertinentes de detecção.

Na figura 1, é mostrado um fluxograma esquemático das principais etapas a serem realizadas no diagnóstico virológico de amostras de água.

CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os órgãos incumbidos de monitorar a qualidade da água devem ter ciência de que as bactérias do grupo dos coliformes, usualmente empregadas para monitorar a qualidade microbiológica da água, não atestam a qualidade virológica desta. Quando muito, estes testes podem prover algum nível de indicação de vírus enté-

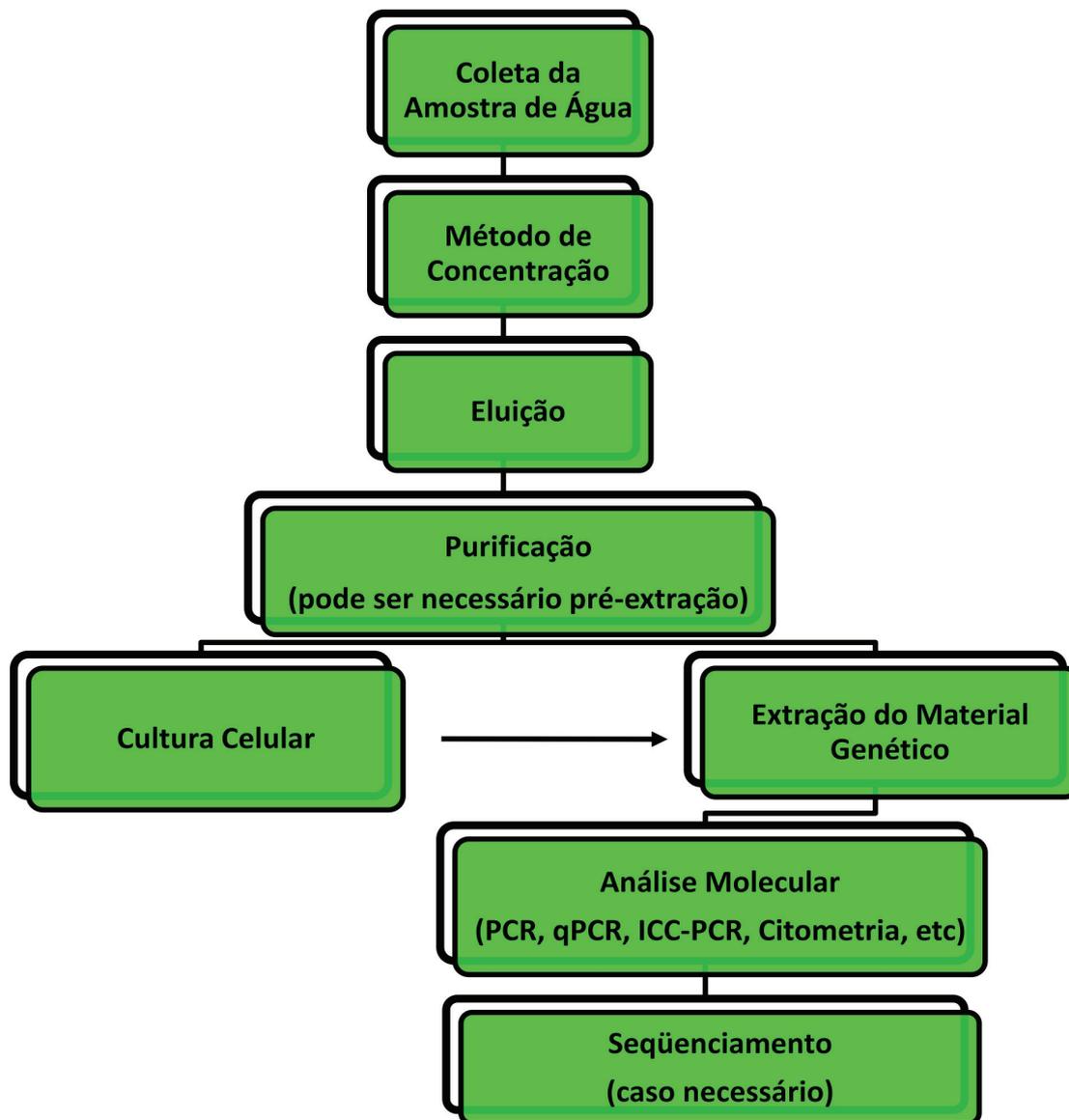


Figura 1. Fluxograma demonstrativo da sequência de eventos necessários para se realizar o diagnóstico virológico em amostras de água.

ricos quando a fonte de contaminação é sumariamente de origem humana (Jurzik *et al.* 2010), o que é uma medida totalmente subjetiva.

Os vírus possuem grande impacto em saúde pública. Nos países industrializados estes patógenos são os principais causadores das gastroenterites (Lopman *et al.* 2003). Nos EUA, entre o período de 1999 e 2002, estes patógenos foram responsáveis por 14% dos surtos e 38% das doenças associadas com águas de consumo humano (Lee *et al.* 2002, Lambertini *et al.* 2008). Possivelmente, nos países pobres e em desenvolvimento, onde é notória a precariedade das condições de saneamento básico, é muito provável que os índices de infecções por vírus entéricos sejam maiores do que os índices estabelecidos nos países desenvolvidos. Nesses, as pesquisas de detecção de vírus em águas encontram-se bem adiantadas, com tendência para a incorporação dos adenovírus como possíveis indicadores virológicos de qualidade da água na Europa (Wyn-Jones *et al.* 2010). Pina *et al.* (1998) e Castignolles *et al.* (1998) já indicavam estes patógenos como bons indicadores de contaminação ambiental. No Japão, estes patógenos são propostos como indicadores preferenciais para certificar a qualidade virológica da água (Katayama *et al.* 2008).

Assim, em alguns países da Europa e no Japão, o monitoramento de vírus em águas já é uma realidade mas, como exposto acima, constata-se a falta de um método padrão para diagnosticá-los. Possivelmente não irá ocorrer para um único tipo de amostra hídrica, pois as taxas de recuperação viral para os vários tipos de águas (águas tratadas, efluentes, águas de rios, dentre outras) não é similar, e a adsorção dos vírus às membranas polarizadas pode ser influenciada por sais, cátions multivalentes, condições ácidas (Haramoto *et al.* 2005, 2006), e compostos orgânicos diversos, que exigem metodologias diferenciadas. Portanto, um mesmo método pode ser mais ou menos sensível do que outro para amostras diferenciadas. Ademais, a sensibilidade e mesmo a especificidade são seriamente influenciadas pelos mecanismos de eluição, métodos secundários de concentração e purificação, assim como pela técnica de detecção, e mesmo pelo agente viral a ser diagnosticado.

Recentemente, Hsu *et al.* (2007) compararam a eficiência de recuperação de enterovírus em água não tratada utilizando três membranas de concentração (membranas de nitrocelulose, eletronegativa e eletropositiva) e dois métodos de eluição [H_2SO_4 0,5 M + NaOH 1mM (*acid rinse*) e Glicina 0,05M pH 9,5 + extrato de carne 1,5% (*glycine rinse*)], totalizando seis combinações diferentes, que foram avaliadas quanto à detecção pelos métodos do número-mais-provável (MPN - *Most probable number*)-RT-PCR e Real time PCR. O procedimento, utilizando membrana de nitrocelulose e eluição com H_2SO_4 0,5 M + NaOH 1 mM, foi o método mais eficiente para concentração de enterovírus. Em relação ao método de detecção, não foi observado diferença significativa entre o uso de MPN-RT-PCR e qPCR. En-

tretanto, MPN-RT-PCR é economicamente mais viável.

Gassilloud *et al.* (2007) avaliaram a utilização de 8 tipos de membranas em combinação com diferentes tratamentos de eluição para recuperar poliovírus 1 adsorvidos em garrafas de água mineral previamente contaminadas, seguindo detecção molecular. Ao todo foram realizados 13 tratamentos e foi demonstrado que, para vírus RNA, a membrana de nylon carregada positivamente (Hybond N+ - Amersham pharma) obteve os melhores resultados de recuperação e que o melhor método de eluição das garrafas consiste de uma mistura de dodecil sulfato de sódio (SDS) e um detergente não aniônico (Triton X-100 ou Tween 80) com isotiocianato de guanidina, aquecida a 60°C.

Mais recentemente, Silva *et al.* (2010b) realizaram uma metanálise avaliando a eficácia do uso de três metodologias de concentração viral associadas à detecção molecular de AdVs em amostras de águas não tratadas. Ao todo foram selecionados 33 estudos e concluiu-se que: a) PCR não deve ser o método de escolha para detectar AdVs em amostras ambientais, devendo-se priorizar qPCR ou Nested-PCR; b) para detectar AdVs em amostras de rios ou lagos a metodologia de escolha deve ser uma associação entre ultracentrifugação e Nested-PCR; c) é aconselhável utilizar associação entre microfiltração em membrana, ultrafiltração e qPCR para detectar AdVs em amostras de esgotos tratados e não tratados.

Os estudos de Hsu *et al.* (2007), Gassilloud *et al.* (2007) e Silva *et al.* (2010b) ofereceram grandes contribuições para as pesquisas na área de virologia aquática. Entretanto, como Silva *et al.* (2010b) afirmam, ainda faz-se necessário a agregação de novos estudos na avaliação dos métodos empregados.

Apesar das divergências, muitos métodos para diagnosticar vírus em amostras ambientais ainda estão sendo padronizados ou desenvolvidos, o que muitas vezes gera confusões em relação a qual método utilizar. Espera-se que, com essa revisão atualizada dos métodos de diagnóstico virológico em águas, estes sejam mais bem compreendidos e sirvam como uma orientação para pesquisas acadêmico-científicas na área.

Atualmente, existe uma gama de trabalhos na área, e espera-se que em um futuro próximo o diagnóstico virológico da qualidade da água seja incorporado aos testes rotineiros de qualidade da mesma. Além disso, a detecção destes patógenos permitirá uma melhor definição das políticas de saúde pública e de saneamento público, uma vez que as doenças virais de veiculação hídrica, e até outras de rotas desconhecidas poderão ser identificadas e melhor estudadas em um contexto eco-epidemiológico.

REFERÊNCIAS

- ABBASZADEGAN, M., HUBER, M.S., GERBA, C.P. & PEPPER, I.L. 1993. Detection of enteroviruses in ground water by PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, 59: 1318-1324.

- ALBINANA-GIMENEZ, N., CLEMENTE-CASARES, P., BOFILL-MASS, S., HUNDESA, A., RIBAS, F. & GIRONES, R. 2006. Distribution of Human Polyoma-viruses, Adenoviruses, and Hepatitis E Virus in the Environment and in a Drinking-Water Treatment Plant. *Environmental Science & Technology*, 40: 7416-7422.
- BARARDI, C.R.M., EMSLIE, K.R., VESEY, G. & WILLIAMS, K.L. 1998. Development of a rapid and sensitive quantitative assay for rotavirus based on flow cytometry. *Journal of Virological Methods*, 74: 31-38.
- BARRELLA, K.M., GARRAFA, P., MONEZI, T.A.L., HÁRSI, C.M., SALVI, C., VIOLANTE, P.A.B.C. & MEHNERT, D.U. 2009. Longitudinal study on occurrence of adenoviruses and hepatitis A virus in raw domestic sewage in the city of Limeira, São Paulo. *Brazilian Journal of Microbiology*, 40: 102-107.
- BELFORT, G., ROTEM, Y. & KATZENESLSON, E. 1974. Virus concentration using hollow fiber membranes. *Water Research*, 9: 79-85.
- BEURET, C. 2004. Simultaneous detection of enteric viruses by multiplex real-time RE-PCR. *Journal of Virological Methods*, 37: 909-913.
- BOFILL-MAS, S., ALBINANA-GIMENEZ, N., CLEMENTE-CASARES, P., HUNDESA, A., RODRIGUEZ-MANZANO, J., ALLARD, A., CALVO, M. & GIRONES, R. 2006. Quantification and Stability of Human Adenoviruses and Polyomavirus JCyV in Wastewater Matrices. *Applied and Environmental Microbiology*, 72: 7894-7896.
- BOOM, R., SOL, C.J.A., SALIMANS, M.M.M., JANSEN, C.J., WERTHEIMVAN- DILLEN, P.M.E. & VAN DER NOORDA, J. 1990. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *Journal of Clinical Microbiology*, 28: 495-503.
- CALGUA, B., MENGEWEIN, A., GRUNERT, A., BOFILL-MAS, S., CLEMENTE-CASARES, P., HUNDESA, A., WYN-JONES, A. P., LÓPEZ-PILA, J.M., GIRONES, R. 2008. Development and application of a one-step low cost procedure to concentrate viruses from seawater samples. *Journal of Virological Methods*, 153: 79-83.
- CASTIGNOLLES, N., PETIT, F., MENDEL, I., SIMON, L., CATTOLICO, L. & BUFFET-JANVRESSE, C. 1998. Detection of adenovirus in the waters of the Seine river estuary by nested-PCR. *Molecular and Cellular Probes*, 12: 175-180, 1998.
- CARDUCCI, A., MORICI, P., PIZZI, F., BATTISTINI, R., ROVINI, E. & VERANI, M. 2008. Study of the viral removal efficiency in a urban wastewater treatment plant. *Science and Technology*, 58: 893-897.
- CHANG, L.T., FARRAH, S.R. & BITTON, G. 1981. Positively charged filters for virus recovery from wastewater treatment plant e effluents. *Applied and Environmental Microbiology*, 42: 921-924.
- CHAPRON, C.D., BALLESTER, N.A., FONTAINE, J.H., FRADES, C.N. & MARGONLIN, A.B. 2000. Detection of astroviruses, enteroviruses, and adenovirus types 40 and 41 in surface waters collected and evaluated by the information collection rule and an integrated cell culture-nested PCR procedure. *Applied and Environmental Microbiology*, 66: 2520-2525.
- CHEN, Z., HSU, F.C., BATTIGELLI, D. & CHANG, H.C. 2006. Capture and release of viruses using amino-functionalized silica particles. *Analytica Chimica Acta*, 569: 76-82.
- CLESCERI, S.L., GREENBERG, A.E. & EATON, A.D. 2005. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (APHA)*. 21 ed. Washington: American Public Health Association.
- EL-SENOUSY, W.M., GUIX, S., ABID, I., PINTÓ, R.M. & BOSCH, A. 2007. Removal of Astrovirus from Water and Sewage Treatment Plants, Evaluated by a Competitive Reverse Transcription-PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, 73: 164-167.
- DE PAULA, V.S., DINIZ-MENDES, L., VILLAR, L.M., LUZ, S.L. B., SILVA, L.A., JESUS, M.S., DA SILVA, N.M.V.S. & GASPAS, A.M.C. 2007. Hepatitis A virus in environmental water samples from the Amazon Basin. *Water Research*, 41: 1169-1176.
- DUBOIS, E., LE GUYADER, F., HAUGARREAU, L., KOPECKA, H., CORMIER, M. & POMMEPUY, M. 1997. Molecular epidemiological survey rotaviruses in sewage by reverse transcriptase seminested pcr and restriction fragment length polymorphism assay. *Applied and Environmental Microbiology*, 63: 1794-1800.
- FARRAH, S.R., GERBA, C.P., WALLIS, C. & MELNICK, J.L. 1976. Concentration of viruses from large volumes of tap water using pleated membrane filters. *Applied and Environmental Microbiology*, 31: 221-226.
- FERGUSON, C., HUSMAN, A.M.D., ALTAVILLA, N., DEERE, D. & ASHBOLT, N. 2003. Fate and transport of surface water pathogens in watersheds. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 33: 299-361.
- FONG, T.T., GRIFFIN, D.W. & LIPP, E.K. 2005. Molecular Assays for Targeting Human and Bovine Enteric Viruses in Coastal Waters and Their Application for Library-Independent Source Tracking. *Applied and Environmental Microbiology*, 71: 2070-2078.
- FORMIGA-CRUZ, M., HUNDESA, A., CLEMENTE-CASARES, P., ALBIÑANA-GIMENEZ N., ALLARD, A. & GIRONES, R. 2005. Nested Multiplex PCR assay detection of human enteric viruses in shellfish and sewage. *Journal of Virological Methods*, 125: 111-118.
- FOUT, S., MARTINSON, B.C., MOYER, M.W. & DAHLING, D.R. 2003. A Multiplex Reverse Transcription-PCR Method for Detection of Human Enteric Viruses in Groundwater. *Applied and Environmental Microbiology*, 69: 3158-3164.
- GASSILLOUD, B., HUGUET, L., MAUL, A. & GANTZER, C. Development of a viral concentration method for bottled water stored in hydrophobic support. *Journal of Virological Methods*, 142: 98-104.
- GIRONES, R., FERRÚS, M.A., ALONSO, J.L., RODRIGUEZ-MANZANO, J., CALGUA, B., CORRÊA, A.A., HUNDESA, A., CARRATALA, A. & BOFILL-MAS, S. 2010. Molecular detection of pathogens in water - the pros and cons of molecular techniques. *Water Research*, 44: 4325-4339.
- GOODWIN, K.D. & LITAKER, R.W. 2008. Emerging technologies for monitoring recreational waters for bacteria and viruses. In: WALSH, P.J., SMITH, S.L., FLEMING, L. E., SOLO-GABRIELE, H.M. & GERWICK, W.H. (eds.). *Oceans and Human Health*. Amsterdam: Elsevier, Academic Press. p. 381-404.
- GRABOW, W.O., TAYLOR, M.B. & DE VILLIERS, J.C. 2001. New methods for the detection of viruses: call for review of drinking water quality guidelines. *Water Science and Technology*, 43: 1-8.
- GREENING, G.E., HEWIT, J. & LEWIS, G.D. 2002. Evaluation of integrated cell culture-PCR (C-PCR) for virological analysis of environmental samples. *Journal of Applied Microbiology*, 93: 745-750.
- GREENING, G.E., WOODFIELD, L. & LEWIS, G.D. 1999. RT-PCR and chemiluminescent ELISA for detection of enteroviruses. *Journal of Virological Methods*, 82: 157-166.
- GRIFFIN, D.W., GIBSON, C.J., LIPP, E.K., RILEY, K., PAUL, J.H. & ROSE, J.B. 1999. Detection of viral pathogens by reverse transcriptase PCR and of microbial indicators by standard methods in the canals of the Florida Keys. *Applied and Environmental Microbiology*, 65: 4118-4125.
- HAMAZA, I.A., JURZIK, L., STANG, L., SURE, K., ÜBERLA, K. & WILHELM, M. 2009. 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*, 43: 2657-2668.
- HARAMOTO, E., KATAYAMA, H. & OHGAKI, S. 2004. Detection of noroviruses in tap water in Japan by means of a new method for concentrating enteric viruses in large volumes of freshwater. *Applied and Environmental Microbiology*, 70: 2154-2160.
- HARAMOTO, E., KATAYAMA, H., OGUMA, K., YAMASHITA, H., TAJIMA, A., NAKAJIMA, H. & OHGAKI, S. 2006. Seasonal profiles of human noroviruses and indicator bacteria in wastewater treatment plant in Tokyo, Japan. *Water Science and Technology*, 54: 301-308.
- HARAMOTO, E., KATAYAMA, H., OGUMA, K. & OHGAKI, S. 2005. Application of cation-coated filter method to detection of noroviruses, enteroviruses, adenoviruses, and torque teno viruses in the Tamagawa River in Japan. *Applied and Environmental Microbiology*, 71: 2403-2411.
- HARAMOTO, E., KATAYAMA, H., OGUMA, K. & OHGAKI, S. 2007a. Quantitative analysis of human enteric adenoviruses in aquatic

- environments. *Journal of Applied Microbiology*, 103: 2153-2159.
- HARAMOTO, E., KATAYAMA, H., OGUMA, K. & OHGAKI, S. 2007b. Recovery of naked viral genomes in water by virus concentration methods. *Journal of Virological Methods*, 142: 169-173.
- HARAMOTO, E., KATAYAMA, H., UTAGAWA, E. & OHGAKI, S. 2008. Development of sample storage methods for detecting enteric viruses in environmental water. *Journal of Virological Methods*, 151: 1-6.
- HAVELLAR, A.H., VAN OLPHEN, V. & DROST, Y. C. 1993. F-specific RNA bacteriophages are adequate model organism for enteric viruses in fresh-water. *Applied and Environmental Microbiology*, 59: 2956-2962.
- HE, J.-W. & JIANG, S. 2005. Quantification of enterococci and human adenoviruses in environmental samples by Real-Time PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, 71: 2250-2255.
- HILL, V.R., KAHLER, A.M., JOTHIKUMAR, N., JOHNSON, T.B., HAHN, D. & CROMEANS, T.L. 2007. Multistate evaluation of an ultra-filtration-based procedure for simultaneous recovery of enteric microbes in 100-liter tap water samples. *Applied and Environmental Microbiology*, 73: 4218-4225.
- HILL, V. A., POLACZYK, A., HAHN, D., JOTHIKUMAR, N., CROMEANS, T., ROBERTS, J. & AMBURGEY, J. 2005. Development of a rapid method for simultaneously recovering microbes in drinking water using ultrafiltration with sodium polyphosphate and surfactants. *Applied and Environmental Microbiology*, 71: 6878-6884.
- HOT, D., LEGEAY, O., JACQUES, J., GANTZER, C., CAUDRELIER, Y., GUYARD, K., LANGE, M. & ANDREOLETTI, L. 2003. Detection of somatic phages, infectious enteroviruses and enterovirus genomes as indicators of human enteric viral pollution in surface water. *Water Research*, 37: 4703-4710.
- HSU, B.M., CHEN, C.H., KUNG, C.M., WAN, M.T. & SHEN, S.M. 2007. Evaluation of enterovirus recovery in surface water by different adsorption and elution procedures. *Chemosphere*, 66: 964-969.
- HUNDESA, A., MALUQUER DE MOTES, C., BOFILL-MAS, S., ALBINANA-GIMENEZ, N. & GIRONES, R. 2006. Identification of human and animal adenoviruses and polyomaviruses for determination of sources of faecal contamination in the environment. *Applied and Environmental Microbiology*, 72: 7886-7893.
- HURST C.J. 1991. *Presence of enteric viruses in freshwater and their removal by the conventional drinking water treatment process*. WHO Bulletin, Switzerland, v. 69, 113-119 p.
- JIANG, S., DEZFULIAN, H. & CHU, W. 2005. Real-time quantitative PCR for enteric adenovirus serotype 40 in environmental waters. *Canadian Journal of Microbiology*, 51: 393-398.
- JIANG, S., NOBLE, R. & CHU, W. 2001. Human adenoviruses and coliphages in urban runoff-impacted coastal waters of Southern California. *Applied Environmental Microbiology*, 67: 179-184.
- JIANG, S., WANG, J. & ESTES, M.K. 1995. Characterization of SRSVs using RT-PCR and a new antigen ELISA—a short communication. *Archives of Virology*, 140: 363-374.
- JURZIK, L., HAMZA, I.A., PUCHERT, W., ÜBERLA, K. & WILHELM, M. 2010. Chemical and microbiological parameters as possible indicators for human enteric viruses in surface water. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 213: 210-216.
- KARAMOCO, Y., IBENYASSINE, K., AITMHAND, R., IDAOMAR, M. & ENNAJI, M. M. 2005. Adenovirus detection in shellfish and urban sewage in Morocco (Casablanca region) by the polymerase chain reaction. *Journal of Virological Methods*, 126: 135-137.
- KATAYAMA, H., HARAMOTO, E., OGUMA, K., YAMASHITA, H., TAJIMA, A., NAKAJIMA, H. & OHGAKI, S. 2008. One-year monthly quantitative survey of noroviruses, enteroviruses, and adenoviruses in wastewater collected from six plants in Japan. *Water Research*, 42: 1441-1448.
- KATAYAMA, H., SHIMASAKI, A. & OHGAKI, S. 2002. Development of a virus concentration method and its application to detection of enterovirus and Norwalk virus from coastal seawater. *Applied and Environmental Microbiology*, 68: 1033-1039.
- KATSURAGI, T. & TANI, Y. 2000. Screening for microorganisms with specific characteristics by flow cytometry and single-cell storing. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 89: 217-222.
- KO, G., JOTHIKUMAR, N., HILL, V.R., MARK, D. & SOBSEY, M.D. 2005. Rapid detection of infections adenoviruses by mRNA real-time RT-PCR. *Journal of Virological Methods*, 127: 148-153.
- KOOPMANS, M., BONDDORFF, C.H., VINJE, J., MEDICI, D. & MONROE, S. 2002. Foodborne viruses. *FEMS Microbiology Review*, 26: 87-205.
- LAMBERTINI, E., SPENCER, S.K., BERTZ, P.D., LOGE, F.J., KIEKE, B.A. & BORCHARDT, M.A. 2008. Concentration of enteroviruses, adenoviruses, and noroviruses from drinking water by use of glass wool filters. *Applied and Environmental Microbiology*, 74: 2990-2996.
- LA ROSA, G., POURSHABAN, M., IACONELLI, M. & MUSELLO, M. 2010. Quantitative real-time PCR of enteric viruses in influent and effluent samples from wastewater treatment plants in Italy. *Annali dell'Istituto Superiore di Sanità*, 46: 266-273.
- LEE, S.H., LEVY, D.A., GRAUN, G.F., BEACH, M.J. & CALDERON, R.L. 2002. Surveillance for waterborne-disease outbreaks—United States, 1999-2000. *MMWR Surveill. Summ.*, 51: 1-47.
- LIDEN, K.G., THURSTON, J., SCHAEFER, R. & JR. MALLEY, J.P. 2007. Enhanced UV inactivation of adenoviruses under polychromatic UV lamps. *Applied and Environmental Microbiology*, 73: 7571-7574.
- LEE, S.H. & KIM, S.J. 2002. Detection of infectious enteroviruses and adenoviruses in tap water in urban areas in Korea. *Water Research*, 36: 248-256.
- LEE, C. & KIM, S.J. 2008. Molecular Detection of Enteric Viruses in Urban Rivers in Korea. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 18: 1156-1163.
- LE GUYADER, F., HAUGARREAU, L., MIOSSEC, L., DUBOIS, E., POMMEPUY, M. 2000. Three-year study to assess human enteric viruses in shellfish. *Applied and Environmental Microbiology*, 66: 3241-3248.
- LEEWIS, G.D. & METCALF, T.G. 1988. Polyethylene glycol precipitation for recovery of pathogenic viruses, including hepatitis A virus and human rotavirus, from oyster, water, and sediment samples. *Applied and Environmental Microbiology*, 54: 1983-1988.
- LI, D., SHI, H.-C. & JIANG, S.C. 2010. Concentration of viruses from environmental waters using nanoalumina fiber filters. *Journal of Microbiological Methods*, 81: 33-38.
- LOPMAN, B.A., REACHER, M.H., VAN DUJINHOVEN, Y., HANON, F.X., BROWN, D. & KOOPMANS, M. 2003. Viral outbreaks in Europe, 1995-2000. *Emerging Infectious Diseases*, 9: 90-96.
- LUKASIK, J.T., SCOTT, T.M., ANDRYSHAK, D. & FARRAH, S.R. 2000. Influence of salts on virus adsorption to microporous filters. *Applied Environmental Microbiology*, 66: 2941-2920.
- MACKAY, I.M. 2004. Real-time PCR in the microbiology laboratory. *Clinical Microbiology and Infection*, 10: 2943-2952.
- MAMANE-GRAVETZ, H. & LINDEN, K.G. 2004. UV disinfection of indigenous aerobic spores: implication for UV validation in unfiltered waters. *Water Research*, 38: 2898-2906.
- MENA, K.D. & GERBA, C.P. 2008. Waterborne Adenovirus. *Review of Environmental Contamination and Toxicology*, 198: 133-167.
- METCALF, T.G., MELNICK, J.L. & ESTES, M.K. 1995. Environmental virology: from detection of virus in sewage and water by isolation to identification by molecular biology—a trip of over 50 years. *Annual Review of Microbiology*, 49: 461-487.
- MEHNERT, D.U., QUEIROZ, A.P.S., SANTOS, F.M., CANDEIAS, J.M.G. & HÁRSI, C.M. 1999. Occurrence of human enteric viruses in sewage and surface waters in the city of São Paulo. *Virus Reviews & Research*, 4: 27.
- MEHNERT, D.U. & STEWIEN, K.E. 1993. Detection and distribution of rotavirus in raw sewage and creeks in São Paulo, Brazil. *Applied and Environmental Microbiology*, 59: 140-143.
- 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. 2008. Molecular detection and characterization of gastroenteritis viruses occurring naturally in the stream waters of Manaus, Central Amazônia, Brazil. *Applied and Environmental Microbiology*, 74: 375-382.
- MULLER-WEGENER, U. 1998. Interaction of humic substances with biota. In: FRIMMEL, F.H. & CHRISTMAN, R.F. (eds). *Humic substances and their role in the environment*. New York: John Wiley & Sons, Inc. p. 179-192.
- MYRMEL, M., BERG, E.M.M., GRINDE, B. & RIMSTAD, E. 2006. Enteric viruses in inlet and outlet samples from sewage treatment plants. *Journal of Water and Health*, 42: 197-209.
- NEBE-VON-CARON, G., STEPHENS, P. J., HEWIT, C.J., POWELL, J.R. & BADLEY, R.A. 2000. Analysis of bacterial function by multi-colour fluorescence flow cytometry and single cell sorting. *Journal of Microbiological Methods*, 42: 97-114.
- NOVAIS, C.M. & ALVES, M.P. 2004. PCR em tempo real. *Revista Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento*, 33: 10-13.
- NOBLE, R.T., ALLEN, S. M., BLACKWOOD, A.D, CHU, W., JIANG, S.C., LOVELACE, L., SOBSEY, M.D., STEWART, J.R. & WAIT, D.A. 2003. Use of viral pathogens and indicators to differentiate between human and non-human fecal contamination in a microbial source tracking comparison study. *Journal of Water and Health*, 1: 195-207.
- PETERS, L., SLEDZ, W., JAN, B.H.W. & VAN DER WOLF, J.M. 2007. An enrichment microsphere immunoassay for the detection of *Pectobacterium atrosepticum* and *Dickeya dianthicola* in potato tuber extracts. *European Journal of Plant Pathology*, 117: 97-107.
- PINA, S., PUIG, M.L.F., JOFRE, J. & GIRONES, R. 1998. Viral pollution in the environment and in shellfish: Human adenovirus detection by PCR as an index of human viruses. *Applied and Environmental Microbiology*, 64: 3376-3382.
- PUIG, M., JOFRE, J., LUCENA, F., ALLARD, A., WADELL, G. & GIRONES, R. 1994. Detection of Adenoviruses and Enteroviruses in Polluted Waters by Nested PCR Amplification. *Applied and Environmental Microbiology*, 60: 2963-2970.
- RAJAL, V.B., MCSWAIN, B.S., THOMPSON, D.E., LEUTENEGGER, C.M. & WUERTZ, S. 2007. Molecular quantitative analysis of human viruses in California stormwater. *Water Research*, 41: 4287-4298.
- RIGOTTO, C., SINCERO, T.C.M., SIMÕES, C.M.O. & BARARDI, C.R.M. 2005. Detection of adenoviruses in shellfish by means of conventional-PCR, nested-PCR, and integrated cell culture PCR (ICC/PCR). *Water Research*, 39: 297-304.
- RIGOTTO, C., KOLESNIKOVAS, C.K., MORESCO, V., SIMOES, C.M.O. & BARARDI, C.R.M. 2009. 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*, 104: 970-974.
- ROMANOVA, N., CORREDOR, J.C. & NAGY, E. 2009. Detection and quantification of fowl adenovirus genome by a real-time PCR assay. *Journal of Virological Methods*, 159: 58-63.
- ROSE, M.A., DHAR, A.K., BROOKS, H. A., ZECCHINI, F. & GERSBERG, R.M. 2006. Quantitation of hepatitis A virus and enterovirus levels in the lagoon canals and Lido beach of Venice, Italy, using real-time RT-PCR. *Water Research*, 40: 2387-2396.
- SAMBROOK, J. & RUSSEL, D. 2001. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 3 Ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press Section.
- SCHVOERER, E., VENTURA, M., DUBOS, O., CAZAUX, G., SERCEAU, R., GOURNIER, N., DUBOIS, V., CAMINADE, P., FLEURY, H.J.A. & LAFON, M.E. 2001. Qualitative and quantitative molecular detection of enteroviruses in water from bathing areas and from a sewage treatment plant. *Research in Microbiology*, 152: 179-186.
- SCHVOERER, E., BONNET, F., DUBOIS, V., CAZAUX, G., SERCEAU, R., FLEURY, H. J.A. & LAFON, M.E. 2000. PCR detection of human enteric viruses in bathing areas, waste Waters and human stools in southwestern France. *Research in Microbiology*, 151: 693-701.
- SILVA, H.D., WOSNJUK, L.A.C., SANTOS, S.F.O., VILANOVA-COSTA, C.A.S.T., PEREIRA, F.C., SILVEIRA-LACERDA, E.P., GARCÍAZAPATA, M.T.A & ANUNCIACÃO, C.E. 2010a. Molecular detection of adenoviruses in lakes and rivers of Goiânia, Goiás, Brazil. *Food and Environmental Virology*, 2: 35-40.
- SILVA, H.D., ANUNCIACÃO, C.E. & GARCÍAZAPATA, M.T.A. 2010b. Avaliação de métodos de concentração e detecção molecular de adenovírus em águas não tratadas - uma metanálise. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*, 30: 65-71.
- SOULE, H., GENOULZ, O., GRATACAP-CAVALLIER, B., CHEVALIER, P. & LIU, J.-X. 2000. Ultrafiltration and reverse transcription-polymerase chain reaction: an efficient process for poliovirus, rotavirus and hepatitis A virus detection in water. *Water Research*, 34: 1063-1067.
- SPIRO, A. & LOWE, M. 2002. Quantitation of DNA sequences in environmental PCR products by a multiplexed, bead-based method. *Applied and Environmental Microbiology*, 68: 1010-1013.
- TAVARES, T.M., CARDOSO, D. D. P. & DE BRITO, W. M. E. D. 2005. Vírus Entéricos Veiculados Por Água: Aspectos Microbiológicos e de Controle de Qualidade da Água. *Revista de Patologia Tropical*, 34: 85-104.
- USEPA. 1996. *ICR microbial laboratory manual*. EPA 600/R95/178. U.S. Environmental Protection Agency. Disponível em: <<http://www.epa.gov/nrlcwww/icrmicro.pdf>>. Acesso em: 13 jan. 2010.
- USEPA. 2001. *Concentration and processing of waterborne viruses by positive charge Imds cartridge filters and organic flocculation*. In: *Manual of Methods for Virology*. EPA/600/4-84/013 N9(14). Cincinnati: U.S. Environmental Protection Agency. Cap. 14.
- USEPA. 2009. *Drinking water contaminant candidate list 3; final notice*. Fed. Regist. 74, 51850-51862. Disponível em: <<http://www.epa.gov/EPA-WATER/2009/October/Day-08/w24287.htm>>. Acesso em: 15 jul. 2010.
- VAN HEERDEN, J., EHLERS, M. M., VIVIER, J. C. & GRABOW, W.O.K. 2005. Risk assessment of adenoviruses detected in treated drinking water and recreational water. *Journal of Applied Microbiology*, 99: 926-933.
- VANTARAKIS, A.C. & PAPAPETROPOULOU, M. 1998. Detection of enteroviruses and adenoviruses in coastal waters of SW Greece by nested polymerase chain reaction. *Water Research*, 32: 2327-56.
- VICTORIA, M., GUIMARAES, F., FUMIAN, T., FERREIRA, F., VIEIRA, C., LEITE, J.P. & MIAGOSTOVICH, M. 2009. Evaluation of an adsorption-elution method for detection of astrovirus and norovirus in environmental Waters. *Journal of Virological Methods*, 156: 73-76.
- VILLAR, L.M., DE PAULA, V.S., DINIZ-MENDES, L., LAMPE, B. & GASPAR, A.M. 2006. Evaluation of methods used to concentrate and detect hepatitis A virus in water samples. *Journal of Virological Methods*, 137: 169-176.
- VIVES-REGO, J., LEBARON, P. & CARON, G.N.V. 2000. Current and future applications of flow cytometry in aquatic microbiology. *FEMS Microbiology Reviews*, 24: 429-448.
- XAGORARAKI, I., KUO, D.H.W., WONG, K., WONG, M. & ROSE, J.B. 2007. Occurrence of Human Adenoviruses at Two Recreational Beaches of the Great Lakes. *Applied and Environmental Microbiology*, 73: 7874-7881.
- WARD, R.L. & AKIN, E.W. 1984. Minimum infective dose of animal viruses. *Critical Reviews in Environmental Control*, 14: 297-310.
- WEAVER, L.S. & KADAN, M.J. 2000. Evaluation of adenoviral vectors by flow cytometry. *Methods*, 21: 297-312.
- WYN-JONES, A.P., CARDUCCI, A., COOK, N., D'AGOTINO, M., DIVIZA, M., FLEISCHER, J., GANTZER, C., GAWLER, A., GIRONES, R., HÖLLER, C., HUSMAN, A.M.R., KAY, D., KOZYRA, I., LÓPEZ-PILA, J., MUSCILLO, M., NASCIMENTO, M.S. N., PAPAGEORGIOU, G., RUTJES, S., SELLWOOD, J., SZEZYK, R. & WYER, M. 2010. *Water Research (Article in Press)*: 1-14.
- WYN-JONES, A.P. & SELLWOOD, J. 2001. Enteric viruses in the aquatic environment. *Journal of Applied Microbiology*, 91: 945-962.