



ARTIGO

Presença de partículas virais infecciosas em amostras de água de diferentes tipos e localidades do Rio Grande do Sul, Brasil

Roger Bordin da Luz¹, Mariana Kluge¹, Rafael Bandeira Fabres¹, Thaís Fontana¹, Aline Pacheco¹, Rodrigo Staggemaier¹, Manoela Tressoldi Rodrigues¹, Juliane Deise Fleck¹ e Fernando Rosado Spilki^{1*}

Recebido: 11 de julho de 2011 Recebido após revisão: 21 de setembro de 2011 Aceito: 01 de fevereiro de 2012
Disponível on-line em <http://www.ufrgs.br/seerbio/ojs/index.php/rbb/article/view/1962>

RESUMO: (Presença de partículas virais infecciosas em amostras de água de diferentes tipos e localidades do Rio Grande do Sul, Brasil). Os parâmetros de potabilidade da água atualmente baseiam-se apenas na análise de bactérias; porém a ausência de coliformes não exclui a contaminação viral. Vírus entéricos podem resistir aos métodos convencionais de tratamento de água e esgoto, devido à suas características de estabilidade físico-química. Apesar de laboriosa e demorada, a análise virológica por isolamento em cultivo celular permite avaliar a viabilidade das partículas virais presentes, aspecto vantajoso quando comparado a técnicas de biologia molecular. Sessenta e quatro amostras de água superficial e de torneira de diversas localidades do Rio Grande do Sul foram coletadas e inoculadas em microplacas de 24 poços, contendo células da linhagem CER. As microplacas foram armazenadas em estufa 37°C, 5% de CO₂ por sete dias, sendo observadas diariamente para possível detecção de efeito citopático (ECP) em microscópio invertido. Foi observado ECP condizente com presença viral em 12 (21,8%) das 55 amostras analisadas, com maior prevalência em águas de torneira, indicando a necessidade de revisar a legislação vigente sobre potabilidade da água.

Palavras-chave: isolamento viral, análise virológica da água, linhagem celular CER.

ABSTRACT: (The presence of infectious viral particles in water samples of different types and locations of Rio Grande do Sul, Brazil). The parameters for drinking water currently are based only on the analysis of bacteria; nevertheless the absence of coliforms does not exclude viral contamination. Enteric viruses may resist conventional water and sewage treatment methods, due to its physical and chemical stability. Although laborious and time consuming, analysis by viral isolation in cell culture allows to evaluate the viability of viral particles, advantageous feature when compared to molecular biology techniques. Sixty-four water samples from surface and tap water from various Rio Grande do Sul's locations were collected and inoculated into 24-well microplates containing CER cell line cells. The microplates were stored in 37°C oven, 5% CO₂ for seven days and observed daily for possible detection of cytopathic effect (CPE) in inverted microscope. CPE consistent with viral presence was observed in 12 (21.8%) of 55 samples, with higher prevalence in tap water, indicating the need to revise our current legislation on drinking water.

Key words: viral isolation, viral analysis of water, CER cell line.

INTRODUÇÃO

No Brasil, os parâmetros microbiológicos de potabilidade da água seguem a Portaria MS nº518/2004, segundo a qual a conformidade se estabelece por valores máximos permitidos (VMP) pré-determinados de coliformes totais e fecais (Ministério da Saúde 2004). A referida portaria apenas sugere que vírus sejam monitorados, mas não define parâmetros ou metodologias aplicáveis. Vírus entéricos podem constituir indicadores microbiológicos de contaminação fecal por diversas características. Parasitas intracelulares obrigatórios e, em sua maioria, não envelopados, tais vírus não se replicam fora do organismo hospedeiro, têm elevada resistência à degradação ambiental, alterações de pH e temperatura, além de resistência aos métodos convencionais de tratamento de água e esgoto (Rose *et al.* 1991, Gerba *et al.* 2002, Ley *et al.* 2002, Sobsey & Meschke 2003, Bofill-Mas *et al.* 2006, Bosch *et al.* 2006, Jiang *et al.* 2007, Griffin *et al.* 2008). Vários estudos apontam que a ausência de coliformes fecais não exclui a contaminação viral (Teixeira & Leal 2002, Tavares *et al.* 2005,

Griffin *et al.* 2008). Embora a utilização de coliformes como marcadores de poluição fecal permaneça como uma bioindicação clássica da presença de contaminação fecal da água, é latente a necessidade da utilização de indicadores complementares, sendo os vírus entéricos excelentes candidatos (Tavares *et al.* 2005, Fong & Lipp 2005). Dentre os principais vírus entéricos que vem sendo estudados como marcadores de contaminação estão os Adenovírus (AdV), Enterovírus (EV), Rotavírus (RV), o vírus da Hepatite A (HAV) e os Norovírus (NoV).

A análise virológica da água pode ser realizada tanto pelo isolamento em cultivo celular quanto por métodos moleculares. O isolamento é laborioso e métodos complementares são necessários para identificar os agentes virais envolvidos. Os métodos moleculares, em especial a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), permitem uma maior sensibilidade e rápida determinação da espécie viral. Todavia, a inoculação em cultivos de células *in vitro* tem uma inequívoca vantagem em comparação à PCR, qual seja permitir avaliar a viabilidade das partí-

1. Universidade Feevale. Av. Dr. Maurício Cardoso 510, Bairro Hamburgo Velho, CEP 93510-250, Novo Hamburgo, RS, Brasil.

*Autor para contato. E-mail: fernandors@feevale.br

culas virais presentes nas amostras e deste modo fornece uma melhor visão do risco envolvido no consumo e no descarte desta água ao ambiente (Reynolds *et al.* 1996, Spinner & Di Giovanni 2001, Cho & Lee 2002).

O presente estudo foi realizado com o intuito de analisar a presença e viabilidade de partículas virais em amostras de água superficial e de torneira, coletadas de diversas localidades do RS, por meio de inoculação em cultivos celulares da linhagem CER (Chicken embryo related). A linhagem celular contínua CER foi escolhida para o estudo, por se tratar de uma linhagem suscetível a uma grande variedade de agentes virais, incluindo o vírus da Raiva, vírus da doença de Gumboro, vírus da Bronquite infecciosa das galinhas, Vírus respiratório sincicial bovino, Metapneumovírus aviário, dentre outros (El Karamany *et al.* 1979, Sinibaldi *et al.* 1990, Arns & Hafez 1995, Dani *et al.* 1999, Simoni *et al.* 1999, Cardoso *et al.* 2000, Ferreira *et al.* 2003, Cardoso *et al.* 2004, Spilki *et al.* 2005, Coswig *et al.* 2010). A CER é classificada como uma linhagem híbrida, derivada de fibroblastos embrionários de frango e células de rim de hamster (BHK-21). Apesar do nome, a maior parte das características desta linhagem foi adquirida a partir das células de hamster (Urmanova *et al.* 1989, Urmanova & Tsareva 1996a,b,c).

Neste trabalho objetivou-se uma busca de partículas virais infecciosas em água coletada no Rio Grande do Sul (RS), de forma irrespectiva a uma única espécie viral, como forma de averiguar se há vírus viável em amostras de água do estado e subsidiar estudos futuros sobre virologia ambiental. Todas as amostras haviam sido previamente analisadas para a presença de genomas virais de enterovírus (EV) e adenovírus (AdV) por reação em cadeia da polimerase.

MATERIAIS E MÉTODOS

Ao todo, 64 amostras de 500 mL de água foram asepticamente coletadas de diversas fontes, nos municípios de Porto Alegre (22 amostras, água superficial, Arroio Dilúvio e Estação de Tratamento de Esgoto São João-Navegantes), Osório (4 amostras, água superficial, Lagoa Peixoto e Rio Maquiné), Tenente Portela (15 amostras, água superficial, arroios de áreas rurais do município), Santa Cruz do Sul (7 amostras, água de torneira) e Pelotas (16 amostras, água de torneira). As amostras foram concentradas por um protocolo de adsorção-eluição modificado de Katayama *et al.* (2002). Brevemente, 600 mg de MgCl₂ hexahidratado foram adicionados a cada amostra, cujo pH foi ajustado para cinco com soluções de NaOH e HCl 10%. Em seguida, as amostras foram filtradas através de uma membrana de ésteres de celulose HA com poros de 0,45 µm e 47 mm de diâmetro (Millipore). Após a eluição de 87,5 mL de H₂SO₄ 0,5 mM, 2,5 mL de NaOH 1 mM foram filtrados pela membrana. O filtrado final foi neutralizado com 12,5 µL de H₂SO₄ 50 mM e 12,5 µL de tampão TE (Tris EDTA) 100 vezes concentrado. O eluído re-

sultante da concentração foi alíquotado e armazenado no banco de amostras do Laboratório de Microbiologia Molecular (LMM) da Universidade Feevale, a -80 °C.

Os cultivos de células da linhagem CER foram mantidos em frascos de cultivo de 25 cm² em sistema fechado, com Meio Essencial Mínimo Eagle (E-MEM; Cultilab, Campinas, SP) em estufa 37 °C, acrescido de Soro Fetal Bovino a 10% (SFB, Nutricell, Campinas, SP). Para a análise da viabilidade viral, as células foram transferidas para microplacas de 24 poços, 1 mL por poço, contendo aproximadamente 3x10⁵ células da linhagem CER, Soro Fetal Bovino 10% (SFB) e antibióticos. Após 24 horas, 100 µL de cada amostra foram adicionados, em quadruplicata, e deixados para adsorção por uma hora em estufa 37 °C, com movimentação das placas a cada 15 minutos. Por fim, 1mL de E-MEM sem adição de SFB foi adicionado em cada poço. As microplacas, mantidas em sistema semi-aberto, foram armazenadas em estufa a 37 °C e 5% de CO₂. As placas permaneceram sob estas condições por sete dias consecutivos. Durante esse período, foram avaliadas diariamente em microscópio invertido (Zeiss Axiovert 40 CFL) para a presença de efeito citopático (ECP) condizente com presença de vírus. Cada amostra foi submetida a três passagens celulares, de modo a aumentar a titulação viral e possibilidade do isolamento viral (Lee & Jeong 2004).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Das 64 amostras analisadas, foi observado ECP condizente com a presença de vírus em 14 amostras (21,8%). Dentre as 22 amostras de Porto Alegre, quatro (18,1%) apresentaram ECP; das quatro amostras de Osório, uma (25%) apresentou ECP; das 15 amostras de Tenente Portela, cinco (33,3%) apresentaram ECP; das sete amostras de Santa Cruz do Sul, não foi evidenciado ECP em nenhuma amostra; das 16 amostras de Pelotas, quatro (25%) apresentaram ECP. A presença de ECP foi observada com maior frequência em amostras de água de propriedades rurais.

Quando comparados com dados de PCR convencional prévia às tentativas de isolamento, buscando genomas de EV e AdV realizados nas mesmas amostras, 14 das 55 amostras analisadas para este agente (25,4%) amostras apresentaram resultado positivo para EV e 19 (34,5%) para AdV. Na amostra para a qual foi detectado ECP em água do Arroio Dilúvio, a PCR atestou a presença de genoma de EV. Todavia, genomas de EV foram detectados em 11 das 13 amostras do Arroio e AdV em uma amostra deste curso d'água.

Dentre as amostras coletadas na estação de tratamento de esgoto (ETE) São João, Porto Alegre, resultaram duas amostras positivas para ECP, sendo uma em afluente, outra em efluente, Porto Alegre, a primeira além do ECP foi positiva para genoma de EV. Por outro lado, a amostra de efluente positiva para ECP não teve resultado positivo na PCR, e o efeito encontrado nas

células deve ser devido à outra espécie viral. Ainda sobre as amostras desta estação de tratamento de esgoto, outras cinco amostras apresentavam genomas de EV e/ou AdV, mas não foi possível detectar partículas virais viáveis nestas amostras.

Foram também analisadas quatro amostras de água superficial coletadas no litoral norte, município de Osório na Lagoa Peixoto e Rio Maquiné. Das quatro amostras, apesar de negativas para presença de genomas de EV e AdV, foi possível observar ECP em 1 amostra, provavelmente relacionada a outra espécie viral.

Analisando amostras de ambiente rural, coletadas em Tenente Portela, município do noroeste do RS, foi possível evidenciar ECP em cinco (5) das 15 amostras analisadas. Três destas amostras não tiveram o genoma viral identificado. Foi identificado genoma de EV em uma amostra. Em outra amostra, havia presença simultânea de genomas de EV e AdV.

Dentre as 15 amostras de água de torneira coletadas em Santa Cruz e Pelotas, foi possível detectar ECP a partir de três amostras e os resultados para PCR destas amostras para EV e AdV resultaram negativos. Neste grupo específico de amostras, foi feito ainda o reexame destas amostras para a presença de genomas de um terceiro grupo viral (rotavírus, RV) revelou a presença de genomas de RV em uma delas.

Embora os resultados do isolamento em cultivo celular possam subestimar a quantidade de amostras de água contaminadas, uma vez que alguns vírus entéricos, como os Norovírus, não podem ou são difíceis de serem cultivados, ou não produzem ECP durante seu ciclo de replicação, tais achados são mais fidedignos em caracterizar o risco associado ao uso destas águas. Outros vírus, ainda que possam ser cultivados, podem também exigir tempos de manutenção mais longos para o isolamento, como é o caso dos AdV entéricos dos tipos 40 e 41 (Chapron *et al.* 2000). Assim, tais diferenças nos resultados entre o isolamento viral e a PCR podem ocorrer, uma vez que partículas virais inativadas por luz ultravioleta, calor ou hipoclorito podem gerar resultados positivos quando analisados por PCR, ainda que possam não serem partículas virais viáveis (Blackmer *et al.* 2000, Gerba *et al.* 2002, Nuanalsuwan & Cliver 2002). A despeito das análises de caracterização dos vírus encontrados nestas amostras, que obviamente se fazem necessárias, é importante notar que, independentemente dos vírus encontrados, pode-se afirmar que há sim a possibilidade de encontrar-se partículas virais infecciosas em amostras de água no estado do RS, inclusive com expressiva quantidade em amostras destinadas ao consumo (torneira).

A presença de partículas virais infecciosas nessas amostras e a maior prevalência em águas superficiais indicam a necessidade de uma legislação que normatize também sobre a pesquisa de vírus entéricos na água potável. Além do benefício para o ambiente e saúde, esforços nessa área, também trarão benefícios econômicos, uma vez que os custos de tratamento das doenças

causadas por tais patógenos são superiores ao custo de prevenção das mesmas (WHO 2008).

Também seria recomendável um manejo adequado dos dejetos e resíduos orgânicos, uma vez que apenas uma minoria do esgoto produzido recebe tratamento. Assim como é necessário um programa de saneamento ambiental que englobe, principalmente, populações carentes e/ou rurais, uma vez que estas são as mais atingidas por este problema (WHO 2008).

Apesar de nenhuma linhagem celular poder ser usada para todos os vírus entéricos possíveis, neste trabalho foi possível alcançar um volume razoável de sucesso utilizando uma única linhagem que é comprovadamente sensível a inúmeros agentes virais. Apesar de o próprio cultivo celular ser uma técnica laboriosa que pode tomar alguns dias ou semanas, ainda assim, o isolamento viral em cultivo celular é mais informativo sobre o risco associado à contaminação da água por vírus por permitir verificar a viabilidade das partículas virais.

AGRADECIMENTOS

O trabalho foi desenvolvido com apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS), UFRGS, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Universidade Feevale. RBL é bolsista de Iniciação Científica (PIBIC-CNPq). FRS é bolsista de produtividade do CNPq.

REFERÊNCIAS

- ARNS, C.W. & HAFEZ, H.M. 1995. Isolation and identification of Avian pneumovirus from broiler breeder flocks in Brazil. In: JENSEN, M.M. (Ed.). *Proceeding of the 44th Western Poultry Diseases Conference*. p. 124-125.
- BLACKMER, F., REYNOLDS, K. A., GERBA, C. P. & PEPPER, I. L. 2000. Use of integrated cell culture PCR to evaluate the effectiveness of poliovirus inactivation by chlorine. *Appl. Environ. Microbiol.*, 66: 2267-2268.
- 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 adenovirus and polyomavirus JCPyV in wastewater matrices. *Appl. Environ. Microbiol.*, 72: 7894-7896.
- BOSCH, A., PINTÓ, R. & ABAD, F.X. 2006. Survival and transport of enteric viruses in the environmental. In: GOYAL, S.M. (Ed.). *Viruses in Food* (Food Microbiology and Food Safety Series). New York: Springer. p151-187. Disponível em: <<http://www.ub.edu/microbiologia/viruse/papers/GOY6.pdf>> Acesso em: 02 jul. 2011
- CARDOSO, T.C., RAHAL, P., PILZ, D., TEIXEIRA, M.C. & ARNS, C.W. 2000. Replication of classical infectious bursal disease virus in the chicken embryo related cell line. *Avian Pathology*, 29: 213-217.
- CARDOSO, T.C., SILVA, L.H., ALBAS, A., FERREIRA, H.L. & PERRI, S.H. 2004. Rabies neutralizing antibody detection by indirect immunoperoxidase serum neutralization assay performed on chicken embryo related cell line. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 99: 531-534.
- CHAPRON, C.D., BALLESTER, N.A. & FONTAINE, J.H. 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. *Appl. Environ.*

- Microbiol.*, 66: 2520-2525.
- CHO, Y.H. & LEE, C.H. 2002. Detection of poliovirus in water by cell culture and PCR methods. *Kor. J. Microbiol.*, 38: 198-204.
- COSWIG, L.T., SANTOS, M.B., HAFEZ, H.M., FERREIRA, H.L. & ARNS, C.W. 2010. Propagation of avian metapneumovirus subtypes A and B using chicken embryo related and other cell systems. *J. Virol. Methods*, 167: 1-4.
- DANI, M.A.C., ARNS, C.W. & DURIGON, E.L. 1999. Molecular characterization of Brazilian avian pneumovirus isolates using reverse transcription polymerase chain reaction, restriction enzyme endonuclease analysis and sequencing of a G gene fragment. *Avian pathology*, 28: 473-476.
- EL KARAMANY, R.M., IMAM, I.Z., FARID, A.H. & SABER, M.S. 1979. Susceptibility of CER cell lines to Rift Valley Fever virus. *J. Egypt Public Health Assoc.*, 54: 105-114.
- FERREIRA, H.L., PILZ, D., MESQUITA, L.G. & CARDOSO, T. 2003. Infectious bronchitis virus replication in the chicken embryo related cell line. *Avian pathology*, 32: 413-417.
- FONG, T.T. & LIPP, E.K. 2005. Enteric viruses of humans and animals in aquatic environments: health risks, detection, and potential water quality assessment tools. *Microbiol. and Molecular Rev.*, 69: 357-371.
- GERBA, C.P., GRAMOS, D.M. & NWACHUKU, N. 2002. Comparative inactivation of enterovirus and adenovirus 2 by UV light. *J. Appl. Microbiol.*, 68(10): 5167-5169.
- GRIFFIN, J.S., PLUMMER, J.D. & LONG, S.C. 2008. Torque teno virus: an improved indicator for viral pathogens in drinking water. *J. Virol.*, 5: 112.
- JIANG, S.C., CHU, W. & HE, J.W. 2007. Seasonal detection of human viruses and coliphage in Newport Bay, California. *Appl. Environ. Microbiol.*, 73: 6468-6474.
- 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. *Appl. Environ. Microbiol.*, 68: 1033-1039.
- LEE, H.K. & JEONG, Y.S. 2004. Comparison of total culturable virus assay and multiplex integrated cell culture-PCR for reliability of waterborne virus detection. *Appl. Environ. Microbiol.*, 70: 3632-3636.
- LEY, V., HIGGINS, J. & FAYER, R. 2002. Bovine Enteroviruses as indicators of fecal contamination. *Appl. Environ. Microbiol.*, 68: 3455-3461.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. 2004. Portaria/MS n.º 518, de 25 de março de 2004. Estabelece os procedimentos e responsabilidades relativos ao controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade, e dá outras providências. *Diário Oficial da União*, 26/03/2004(seção I): 266.
- NUANULSUWAN, S. & CLIVER, D.O. 2002. Pretreatment to avoid positive RT-PCR results with inactivated viruses. *J. Virol. Methods.*, 104: 217-225.
- REYNOLDS, K.A., GERBA, C.P. & PEPPER I.L. 1996. Detection of infectious enterovirus by an integrated cell culture-PCR procedure. *Appl. Environ. Microbiol.*, 62: 1424-1427.
- ROSE, J.B., SUN, G.S., GERBA, C.P. & SINCLAIR, N.A. 1991. Microbial quality and persistence of enteric pathogens in graywater from various sources household source. *Water Research*, 25(1): 37-42.
- SIMONI, I.C., FERNANDES, M.J.B., CUSTÓDIO, R.M., MADEIRA, A.M.B.N., ARNS, C.W. 1999. Susceptibility of cell lines to avian viruses. *Rev. Microbiol.*, 30(4): 373-376.
- SINIBALDI, L., GOLDONI, P., PIETROPAOLO, V., VITI, D. & ORSI, N. 1990. Extraction and purification of gangliosides from CER cells, a cell line suitable for rabies virus replication. *Microbiologica*, 13(4): 339-342.
- SOBSEY, M.D. & MESCHKE, J.S. 2003. Virus survival in the environment with special attention to survival in sewage droplets and other environmental media of fecal or respiratory origin. Geneva: World Health Organization. 70 p. Disponível em: <http://www.unc.edu/courses/2008spring/envr/421/WHO_VirusSurvivalReport_21Aug2003.pdf>. Acessado em: 02 de jul. 2011.
- SPIILKI, F.R., ALMEIDA, R.S., CAMPALANS, J., ARNS, C.W. 2005. Susceptibility of different cell lines to infection with bovine respiratory syncytial virus. *J. Virol. Methods*, 131: 130-133.
- SPINNER, M.L. & DI GIOVANNI, G.D. 2001. Detection and identification of mammalian reovirus in surface water by combined cell culture and reverse transcription-PCR. *Appl. Environ. Microbiol.*, 67: 3016-3020.
- TAVARES, T.M., CARDOSO, D.D.P. & 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(2): 85-104.
- TEIXEIRA, J.C. & LEAL, F.C.T. 2002. Desafios no controle de doenças de veiculação hídrica associadas ao tratamento e ao abastecimento de água para consumo humano. In: *Vi Simpósio Ítalo Brasileiro De Engenharia Sanitária e Ambiental*, Vitória.
- URMANOVA, M. A. & TSAREVA, A.A. 1996a. The cytogenetic study of established Syrian hamster cell lines. I. A comparative analysis of the karyotypes of the BHK-21 (C-13) sublines. *Tsilogiia*, 38: 630-638.
- URMANOVA, M. A. & TSAREVA, A.A. 1996b. The cytogenetic study of established Syrian hamster cell lines. II. A comparative analysis of the karyotypes of cell lines HaK, CER and BHK-21 (C-13). *Tsilogiia*, 38: 639-645.
- URMANOVA, M. A. & TSAREVA, A.A. 1996c. The cytogenetic study of established Syrian hamster cell lines. III. An analysis of the NOR-marker chromosomes in Syrian hamster cell cultures by using differential chromosome AgàG restaining. *Tsilogiia*, 38: 646-649.
- URMANOVA, M. A., TIKHONOV, V., BALZOVSKAIA, E. G., KISHCHENKO, G. P. 1989. Cytogenetic characteristics of the cell line BHK-21 (C-13) and three of its clones. *Tsilogiia*, 31: 799-806.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). 2008. *Guidelines for Drinking-water Quality*. Vol. 1. 3ed. Geneva: World Health Organization. 668 p.