

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO TECNOLÓGICO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA AMBIENTAL**

**DISSEMINAÇÃO AMBIENTAL E PREVALÊNCIA DE VÍRUS
ENTÉRICOS EM CASOS DE GASTROENTERITE AGUDA NA
POPULAÇÃO INFANTIL DA REGIÃO DE SÃO PEDRO, VITÓRIA, ES**

RODRIGO PRATTE-SANTOS

VITÓRIA, 2014

RODRIGO PRATTE-SANTOS

**DISSEMINAÇÃO AMBIENTAL E PREVALÊNCIA DE VÍRUS
ENTÉRICOS EM CASOS DE GASTROENTERITE AGUDA NA
POPULAÇÃO INFANTIL DA REGIÃO DE SÃO PEDRO, VITÓRIA, ES**

Tese apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental do Centro Tecnológico da Universidade Federal do Espírito Santo como requisito para obtenção do título de Doutor em Engenharia Ambiental.

Orientador(a): Prof^a. Dr^a. Regina de Pinho Keller.

VITÓRIA, 2014

RODRIGO PRATTE-SANTOS

DISSEMINAÇÃO AMBIENTAL E PREVALÊNCIA DE VÍRUS ENTÉRICOS EM CASOS DE GASTROENTERITE AGUDA NA POPULAÇÃO INFANTIL DA REGIÃO DE SÃO PEDRO, VITÓRIA, ES. Tese apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental do Centro Tecnológico da Universidade Federal do Espírito Santo como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Engenharia Ambiental.

Aprovado em 21 de novembro de 2014.

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Regina de Pinho Keller
Universidade Federal do Espírito Santo
Orientadora

Prof. Dr. Sérgio Túlio A. Cassini
Universidade Federal do Espírito Santo
Examinador Interno

Prof^a. Dr^a. Ethel Leonor Noia Maciel
Universidade Federal do Espírito Santo
Examinador Interno

Prof^a. Dr^a. Marize Pereira Miagostovich
Fiocruz - Instituto Oswaldo Cruz
Examinador Externo

Prof^a. Dr^a. Celia Regina Barardi
Universidade Federal de Santa Catarina
Examinador Externo

Dados Internacionais de Catalogação-na-publicação (CIP)
(Biblioteca Setorial Tecnológica,
Universidade Federal do Espírito Santo, ES, Brasil)

S237d Santos, Rodrigo Pratte, 1986-
Disseminação ambiental e prevalência de vírus entéricos em
casos de gastroenterite aguda na população infantil da região de
São Pedro, Vitória, ES / Rodrigo Pratte Santos. – 2014.
140 f. : il.

Orientador: Regina de Pinho Keller.
Tese (Doutorado em Engenharia Ambiental) – Universidade
Federal do Espírito Santo, Centro Tecnológico.

1. Águas superficiais. 2. Gastroenterite. 3. Rotavírus. 4.
Adenovirus. 5. Norovirus. 6. Vírus entéricos. I. Keller, Regina de
Pinho. II. Universidade Federal do Espírito Santo. Centro
Tecnológico. III. Título.

CDU: 628

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Dr^a. Regina Keller, pela oportunidade que me foi cedida profissionalmente neste doutorado, pelo exemplo de pesquisadora com incessante busca pelo conhecimento, além das contribuições e o direcionamento científico ao longo da pesquisa. Atribuo a ela todo o meu respeito e admiração.

Ao Dr. Sérgio Túlio Cassini por sua capacidade visionária e por todo o apoio e consideração para as devidas melhorias do estudo. Um muito obrigado.

À Dr^a. Marize Miagostovich, por me receber no Laboratório de Virologia Comparada e Ambiental do Instituto Oswaldo Cruz (IOC), FIOCRUZ diversas vezes para ensinamentos pertinentes à construção desta tese.

À Dr^a. Ethel Leonor pela colaboração durante o delineamento experimental do estudo e pelas discussões sobre as análises estatísticas.

Às amigas e companheiras do Laboratório de Saneamento (LABSAN) da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES) Karolina Scarpati, Susanne Mariani e Sara Martins, que compartilharam comigo as angústias e prazeres decorrentes de uma investigação científica de alto nível.

À Juliana Justino, pelos ensinamentos com os equipamentos e procedimentos do laboratório para as análises moleculares, bem como pelo auxílio durante as reações de sequenciamento, juntamente com a colaboração do Dr. Yuri Leite.

Aos amigos do LABSAN, funcionários e técnicos administrativos da UFES, os meus mais sinceros agradecimentos.

Aos enfermeiros, médicos, agentes comunitários e funcionários da Policlínica de São Pedro e da Unidade de Saúde da Ilha das Caieiras pela dedicação, força de vontade, generosidade e auxílio durante os meses de coleta de amostras para as análises laboratoriais.

À Ana Lucia da Vigilância Epidemiológica da Prefeitura Municipal de Vitória pela contribuição com os dados epidemiológicos do estudo.

Ao barqueiro Renne Oliveira e sua família pela ajuda nos momentos de coleta de água no manguezal da Baía de Vitória.

Aos alunos de pós-graduação da Fundação Oswaldo Cruz-RJ Adriana de Abreu, Matías Victoria, Tulio Fumian, Carmen Baur e Julia Fioretti pelo auxílio durante os cursos e treinamentos.

Ao programa de pós-graduação em Engenharia Ambiental da UFES e seu corpo docente pelos ensinamentos e construção do conhecimento durante as aulas ministradas.

Ao CNPq e a Capes pelo financiamento do projeto e recursos para manutenção da bolsa de doutorado, respectivamente.

À Applied Biosystems da Life Technologies pelo treinamento da metodologia de detecção molecular de vírus.

À comissão avaliadora pela disponibilidade em aceitar participar e compartilhar comigo este momento tão importante em minha carreira acadêmica.

E, especialmente, aos familiares, meus pais (Cleir Santos e Rosangela Pratte), irmã (Cynthia Pratte), sobrinho (Victor Pratte), esposa (Gabrielle Fonseca), madrinha (Dilcemar Ribeiro), cunhado (Fabrício Borges) e cunhada (Michelle Fonseca), além de estender a todos que me sustentaram das mais diversas formas possíveis ao longo de todo esse difícil trajeto que chega ao seu término.

“Na natureza, nada se perde, nada se cria,
tudo se transforma”.

LAVOISIER, Antoine Laurent.

RESUMO

A Baía de Vitória no Espírito Santo recebe contínuo descarte de esgoto sem tratamento. A população local faz uso constante do ambiente aquático para recreação e atividades pesqueiras. Nessa região, surtos de gastroenterite têm sido frequentemente registrados, possivelmente, em virtude dos hábitos higiênico-sanitários não adequados e da estreita relação da população com a água contaminada. Dessa forma, o presente estudo objetivou avaliar o fluxo de vírus entéricos das águas superficiais da Baía de Vitória para a população infantil da região. As amostras de águas superficiais (n=48) foram coletadas no período de setembro de 2011 a agosto de 2012. Foram avaliados os parâmetros físico-químicos (temperatura, pH, salinidade, condutividade e turbidez) e microbiológicos (coliformes termotolerantes, *Enterococci* e vírus entéricos – rotavírus A, norovírus GII e adenovírus humano) da água. As amostras de fezes de crianças com gastroenterite (n=134) foram coletadas em duas Unidades de Saúde, no mesmo período das coletas de água. A detecção de vírus foi realizada por amplificação gênica. Em seguida, os ácidos nucleicos dos vírus detectados nas amostras de água e fezes foram sequenciados para a realização de análises filogenéticas. As análises físico-químicas da água indicaram que os resultados de oxigênio dissolvido estiveram em desconformidade com a resolução CONAMA nº 357, de 2005. Os dados das análises microbiológicas da água mostraram concentrações de *Enterococci* e coliformes termotolerantes variando entre $1,9 \times 10^1$ a $3,9 \times 10^3$ UFC 100 mL⁻¹ e $1,2 \times 10^2$ a $6,5 \times 10^3$ UFC 100 mL⁻¹, respectivamente. Os três vírus foram detectados em praticamente todo o monitoramento (34/48; 70,8%). A concentração de vírus na água variou entre $1,6 \times 10^0$ - $1,5 \times 10^4$ cópias genômicas 100 mL⁻¹. O contato direto da população com a água contaminada pode explicar a alta prevalência dos vírus entéricos encontrados na população infantil (93,3; IC95% 87,7 - 96,4). As análises dos genomas virais revelaram a formação de grupos filogenéticos contendo os vírus detectados na água e na população, indicando uma co-circulação desses patógenos nas duas matrizes. Em conclusão, o monitoramento forneceu informações valiosas para futuros projetos de saúde pública com objetivos de reduzir os coeficientes de morbidade e mortalidade infantil, decorrentes de doenças diarreicas.

Palavras-chave: rotavírus; norovírus; adenovírus; águas superficiais; gastroenterite.

ABSTRACT

The Vitoria Bay has an extensive mangrove receiving continuous sewage discharge. The local population does use this environment for recreational and fishing purposes. Outbreaks of gastroenteritis have been frequently recorded in this region, possibly due to the lack of hygienic and sanitary behaviors and the close relationship between the population and the contaminated water. Thus, the present study aimed to evaluate the flow of enteric viruses from surface waters of Vitoria Bay to the child population of the region. Samples of surface waters (n=48) were collected from September 2011 to August 2012. Physico-chemical parameters (temperature, pH, salinity, conductivity and turbidity) and microbiological (thermotolerant coliforms, *Enterococci* and enteric viruses) of water were evaluated. Stool samples from children with gastroenteritis (n=134) were collected from two Health Units, in the same period of water samples collection. The detection of enteric viruses (rotavirus, norovirus GII and adenovirus) was performed by PCR. The viral nucleic acids detected were sequenced for phylogenetic analysis. The physico-chemical analysis of the water indicated that the dissolved oxygen measurements were in disagreement with the CONAMA Resolution n ° 357, 2005. The data of the microbiological analysis of the water showed average concentrations of *Enterococci* and thermotolerant coliforms ranging from 1.9×10^1 to 3.9×10^3 CFU 100 mL⁻¹ and 1.2×10^2 to 6.5×10^3 CFU 100 mL⁻¹, respectively. The three enteric viruses were detected in almost all the monitoring period (34/48, 70.8%). The average concentration these viruses in the water ranged from 1.6×10^0 - 1.5×10^4 genomic copies of 100 mL⁻¹. The close relationship of the population of this region with contaminated water may explain the high prevalence of enteric viruses found in the pediatric population (93.3, 95% CI 87.7 to 96.4). The analysis of viral genomes demonstrated the formation of phylogenetic groups containing enteric viruses detected in water and in the population, indicating a co-circulation of these pathogens in the two matrices. In conclusion, the monitoring provided important data for future studies of public health to reduce morbidity rates and child mortality due to diarrheal diseases.

Keywords: rotavirus; norovirus; adenovirus; surface water; gastroenteritis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Rotas de transmissão de vírus entéricos no ambiente até o contato com o ser humano (BOSCH, 1998, modificado)	35
Figura 2. Destino dos vírus em sistemas aquáticos costeiros, após descarte de esgoto na água (Fonte: MELNICK; GERBA, 1980, modificado)	36
Figura 3. A - Esquema da estrutura morfológica e proteica do adenovírus e B - partícula de adenovírus isolado de amostra de fezes (Fonte: http://www.ictvdb.org/ICTVdB/index.htm)	40
Figura 4. Partículas de rotavírus humano isoladas de amostras de fezes de crianças com gastroenterite aguda (Fonte: http://www.ictvdb.org/ICTVdB/index.htm ; PARASHAR, <i>et al.</i> , 2005, modificado)	44
Figura 5. (a) Representação esquemática dos três capsídeos do rotavírus (Fonte: SHAW, 2006, modificado); (b) Diagrama dos três capsídeos do rotavírus, indicando as proteínas estruturais no nucleocapsídeo, capsídeo interno e externo, bem como o RNA fita dupla (PALOMBO; BISHOP, 2011, modificado)	44
Figura 6. Partículas de norovírus extraídas de amostras de fezes (Fonte: http://www.qub.ac.uk , modificado)	48
Figura 7. Organização genômica das ORFs 1, 2 e 3 de norovírus (Fonte: KARST, 2010, modificado)	48
Figura 8. Regiões do genoma de norovírus utilizadas para detecção para ensaios moleculares de amplificação do ácido nucleico viral (Fonte: VINJE, <i>et al.</i> , 2004, modificado)	54
Figura 9. Distribuição dos biomas ao longo da costa brasileira (Fonte: http://educar.sc.usp.br/ciencias/ecologia/ecologia.html)	56
Figura 10. Localização do sistema estuarino da Baía de Vitória, ES, Brasil (Fonte: VERONEZ, <i>et al.</i> , 2009)	57
Figura 11. Imagem de satélite dos sítios de coleta de água no manguezal da Baía de Vitória, destacando a região de São Pedro, Vitória, ES (Fonte: Google Earth, 2012, modificado)	59
Figura 12. Mapa do município de Vitória subdividido em regiões (I a VIII),	60

destacando a região VII (Fonte: http://www.vitoria.es.gov.br/regionais/principal/reg7.asp)	
Figura 13. Fluxograma das etapas realizadas na quantificação de coliformes termotolerantes e <i>Enterococci</i> nas amostras de águas superficiais	62
Figura 14. Vista frontal dos locais de atendimento da população infantil da região de São Pedro, Vitória-ES. A) Policlínica de São Pedro; B) Unidade de Saúde da Ilha das Caieiras	63
Figura 15. Esquema geral das etapas para detecção de partículas virais em amostras de águas superficiais e fezes humanas (a- concentração e suspensão; b- extração de ácido nucleicos; c- transcrição reversa; d- ensaios moleculares para detecção e quantificação do ácido nucleico viral)	65
Figura 16. Esquema para concentração de partículas virais em amostras de água (KATAYAMA, <i>et al.</i> , 2002, modificado)	66
Figura 17. Sistema de filtração a vácuo (<i>Millipore</i>), constituído por uma (a) bomba a vácuo, (b) recipiente para acondicionamento do volume de água da amostra e (c) local para inserção da membrana. Também é possível visualizar a amostra após filtração (d)	67
Figura 18. Eletroforese em gel de agarose 1,8% dos produtos da nested-PCR para detecção de rotavírus, norovírus e adenovírus (M=marcador; C ⁺ =controle positivo; C ⁻ =controle negativo; A=amostra)	71
Figura 19. Resultado médio dos quatro sítios de coleta agrupados do monitoramento mensal de coliformes termotolerantes e <i>Enterococci</i> (UFC 100 mL ⁻¹), nas amostras de águas superficiais da Baía de Vitória, ES, bem como seus limites preconizados pela resolução n° 357, de 2005, do CONAMA	79
Figura 20. Box plot (n= 24) das análises de coliformes termotolerantes e <i>Enterococci</i> (UFC 100 mL ⁻¹) das amostras de águas superficiais do manguezal da Baía de Vitória, nos períodos seco e chuvoso (Letras diferentes no gráfico indicam diferença significativa a 5% pelo teste de Wilcoxon)	80
Figura 21. Monitoramento de vírus entéricos em águas superficiais e	81

valores acumulados de precipitação, estratificados nos períodos seco e chuvoso de setembro/2011 a agosto/2012

Figura 22. Resultado do número de cópias genômicas dos vírus entéricos avaliados em amostras de águas superficiais da Baía de Vitória, ES, durante 12 meses de monitoramento 82

Figura 23. Fluxograma de inclusão de pacientes no estudo de prevalência de vírus entéricos na população infantil da região de São Pedro, Vitória-ES 86

Figura 24. Distribuição das amostras de fezes positivas para os vírus entéricos analisados nos casos de gastroenterite aguda, conforme os meses do período estudado (setembro/2011 a agosto/2012) 88

Figura 25. Monitoramento de vírus entéricos na população infantil e valores acumulados mensais de chuva, estratificados nos períodos seco e chuvoso de setembro/2011 a agosto/2012 89

Figura 26. Proporção relativa das análises de detecção de rotavírus (RVA), norovírus (NoVGII) e adenovírus (HAdV) nas amostras de fezes (n= 134) 90

Figura 27. Box plot do número de cópias genômicas por grama de fezes dos vírus entéricos em infecções simples e mistas avaliadas em crianças com gastroenterite aguda 91

Figura 28. Árvore filogenética construída a partir de sequência de cDNA amplificada na região do gene VP7 de cepas de rotavírus grupo A coletadas a partir de amostras de águas superficiais e fezes de crianças com diarreia na cidade de Vitória no período de setembro de 2011 e agosto de 2012. As sequências protótipos de referência foram obtidas no *GenBank*. Amostras de referência são indicadas com o genogrupo / genótipo seguido pelo número de acesso do *GenBank*. A árvore filogenética foi construída usando o método *neighbor-joining* com um *bootstrap* de 2000 repetições. Cepas sequenciadas no estudo estão destacadas com ♦ (amostras clínicas) e ■ (amostras ambientais) 96

Figura 29. Árvore filogenética construída a partir de sequência de DNA amplificada na região do gene hexon de adenovírus humano, coletado a 97

partir de amostras de águas superficiais e fezes de crianças com diarreia na cidade de Vitória, no período de setembro de 2011 a agosto de 2012. As sequências protótipos de referência foram obtidas no *GenBank*. Amostras de referência são indicadas com o genogrupo / genótipo seguido pelo número de acesso do *GenBank*. A árvore filogenética foi construída usando o método *neighbor-joining*, com um *bootstrap* de 2000 repetições. Cepas sequenciadas no estudo estão destacadas com ♦ (amostras clínicas) e ■ (amostras ambientais)

Figura 30. Árvore filogenética construída a partir de sequência de cDNA amplificada na região da polimerase (ORF1) de cepas de norovírus genogrupo II, coletadas a partir de amostras de águas superficiais e fezes de crianças com diarreia na cidade de Vitória, no período de setembro de 2011 a agosto de 2012. As sequências protótipos de referência foram obtidas no *GenBank*. Amostras de referência são indicadas com o genogrupo / genótipo seguido pelo número de acesso do *GenBank*. A árvore filogenética foi construída usando o método *neighbor-joining*, com um *bootstrap* de 2000 repetições. Cepas sequenciadas no estudo estão destacadas com ♦ (amostras clínicas) e ■ (amostras ambientais)

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Doenças e microrganismos patogênicos veiculados com águas de consumo e recreacionais (FUNASA, 2007, modificado)	26
Quadro 2. Padrões microbiológicos adotados pela Resolução nº 274, de 2000, para balneabilidade das águas costeiras brasileiras (UFC/ 100 mL)	27
Quadro 3. Parâmetros microbiológicos analisados em estudos de qualidade de águas recreacionais	28
Quadro 4. Limites para algumas variáveis físico-químicas em ambientes aquáticos de águas salobras, doces e salinas (BRASIL, 2005, modificado)	30
Quadro 5. Classificação dos corpos hídricos em classes de águas, segundo a qualidade requerida para os seus usos preponderantes (Fonte: BRASIL, 2005, modificado)	31
Quadro 6. Vírus entéricos humanos que podem ser transmitidos pela água contaminada (Fonte: BOSCH, 1998)	34
Quadro 7. Fatores que afetam a sobrevivência de vírus entéricos em ambientes aquáticos (Fonte: BOSCH, 2007, modificado)	38
Quadro 8. Vírus patogênicos mais frequentemente pesquisados em águas ambientais na América Latina	38
Quadro 9. Classificação de adenovírus em seus respectivos gêneros e grupo de animais infectados (Fonte: GHEBREMEDHIN, 2014)	39
Quadro 10. Classificação dos subgrupos de adenovírus com seus sorotipos e suas respectivas infecções (Fonte: GHEBREMEDHIN, 2014)	41
Quadro 11. Segmentos de RNA dos rotavírus, proteínas e suas funções (Fonte: PALOMBO; BISHOP, 2011, modificado)	45
Quadro 12. Principais técnicas para concentração de vírus em amostras ambientais (Fonte: MATTISON; BIDAVID, 2009, modificado)	51
Quadro 13. Caracterização dos sítios de coleta de águas superficiais da Baía de Vitória, Espírito Santo, Brasil	60
Quadro 14. Análises físico-químicas e seus respectivos métodos analíticos	61
Quadro 15. Programa de ciclos para reações de 1ª PCR de adenovírus humano (HAdV), rotavírus grupo A (RVA) e norovírus genogrupo II	69

(NoVGII)	
Quadro 16. Programa de ciclos para reações de nested-PCR de adenovírus humano (HAdV), rotavírus grupo A (RVA) e norovírus genogrupo II (NoVGII)	69
Quadro 17. Concentrações finais dos reagentes da PCR convencional em cada reação de amplificação do ácido nucleico viral	70
Quadro 18. Sequências dos oligonucleotídeos iniciadores em cada reação de PCR para detecção de vírus entéricos	70
Quadro 19. Tamanho esperado dos fragmentos amplificados por reações de nested-PCR em número de pares de bases (pb)	70
Quadro 20. Sequências dos oligonucleotídeos iniciadores e sondas utilizadas nas reações de PCR quantitativa (qPCR) para detecção de adenovírus humano (HAdV), rotavírus grupo A (RVA) e norovírus genogrupo II (NoVGII)	72
Quadro 21. Programa de ciclos para reações de qPCR de adenovírus humano (HAdV), rotavírus grupo A (RVA) e norovírus genogrupo II (NoVGII)	73
Quadro 22. Interpretação dos níveis de concordância através do teste de Kappa para escalas de dados categóricos (LANDIS; KOCH, 1997, modificado)	76

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Pluviosidade mensal e parâmetros físico-químicos das amostras de águas superficiais durante 12 meses de monitoramento (média dos 4 sítios de coleta, n= 4)	78
Tabela 2. Número de amostras positivas de vírus entéricos detectados em amostras de águas superficiais (n= 48) em 4 sítios de coleta da Baía de Vitória	80
Tabela 3. Detecção de vírus entéricos por técnicas moleculares (qPCR e n-PCR) em amostras de águas superficiais, durante um ano de monitoramento (n=4)	83
Tabela 4. Análise comparativa entre as técnicas moleculares de PCR convencional (nested-PCR) e quantitativa (qPCR), para detecção de rotavírus A em amostras de águas superficiais	84
Tabela 5. Análise comparativa entre as técnicas moleculares de PCR convencional (nested-PCR) e quantitativa (qPCR), para detecção de adenovírus humano em amostras de águas superficiais	84
Tabela 6. Análise comparativa entre as técnicas moleculares de PCR convencional (nested-PCR) e quantitativa (qPCR), para detecção de norovírus GII em amostras de águas superficiais	84
Tabela 7. Matriz de correlação de Spearman, avaliando-se os resultados positivos para vírus entéricos, as variáveis físico-químicas e os indicadores bacteriológicos de águas superficiais de setembro/2011 a agosto/2012 (n= 48)	85
Tabela 8. Características demográficas e clínicas das 134 crianças com gastroenterite que foram arroladas no estudo	87
Tabela 9. Número de amostras positivas de vírus entéricos detectados em amostras de fezes (n= 134) de crianças com gastroenterite aguda, em Vitória, ES	88
Tabela 10. Análise comparativa entre as técnicas moleculares de PCR convencional (nested-PCR) e quantitativa (qPCR), para detecção de rotavírus A em amostras de fezes	90
Tabela 11. Análise comparativa entre as técnicas moleculares de PCR convencional (nested-PCR) e quantitativa (qPCR), para detecção de	91

adenovírus humano em amostras de fezes	
Tabela 12. Análise comparativa entre as técnicas moleculares de PCR convencional (nested-PCR) e quantitativa (qPCR), para detecção de norovírus GII em amostras de fezes	91
Tabela 13. Distribuição das infecções virais nos diferentes grupos etários das crianças com gastroenterite	92
Tabela 14. Associação entre a ocorrência de vírus entéricos e as características demográficas dos pacientes infantis com diarreia aguda.....	93
Tabela 15. Associação entre a ocorrência de vírus entéricos e as características clínicas dos pacientes infantis com gastroenterite aguda.....	93

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

AdV – adenovírus
AV – astrovírus
cDNA – DNA complementar
cm – centímetro
CONAMA – Conselho Nacional do Meio Ambiente
CT – Ciclo do limiar de detecção, do inglês “Cycle Threshold”
CV – coxsackievírus
DNA – ácido desoxirribonucleico, do inglês “deoxyribonucleic acid”
dsDNA – DNA fita dupla, do inglês “double strand DNA”
dsRNA – RNA dupla fita, do inglês “double strand RNA”
E. coli – *Escherichia coli*
ES – Espírito Santo
ETSUS – Escola Técnica e Formação Profissional de Saúde
EV – echovírus
G – genogrupo
g – força da gravidade
HAdV – adenovírus humano
HAV – vírus da hepatite A
HEV – vírus da hepatite E
IC 95% – intervalo de confiança 95%
ICTV – Comitê Internacional de Taxonomia Viral, do inglês “International on Taxonomy of Viruses”
ITR – repetições terminais invertidas, do inglês “Inverted Terminal Repetitions”
Km – quilômetro
km² – quilômetro quadrado
L – litro
LABSAN – Laboratório de Saneamento
m – metro
MF – método da membrana filtrante
mL – mililitro
mM – milimolar
mm – milímetro
MS – Ministério da Saúde
N – normalidade
nm – nanômetro
NoV – norovírus
NoVGII – norovírus genogrupo II
nt – nucleotídeo
OD – oxigênio dissolvido
OR – razão de chances, do inglês “odds ratio”
ORF – região aberta de leitura, do inglês “open read frame”
pb – pares de base
PCR – reação em cadeia da polimerase, do inglês “polymerase chain reaction”
pH – potencial hidrogeniônico

PMV – Prefeitura Municipal de Vitória
PV – poliovírus
qPCR – Reação em Cadeia da Polimerase Quantitativa
RNA – ácido ribonucleico, do inglês “ribonucleic acid”
rpm – rotações por minuto
RT – transcrição reversa, do inglês “reverse transcription”
RV – rotavírus
RVA – rotavírus grupo A
SAV – saporovírus
SEMUS – Secretaria Municipal de Saúde
ssRNA – RNA fita simples, do inglês “single strand RNA”
SUS – Sistema Único de Saúde
UFES – Universidade Federal do Espírito Santo
USEPA – Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos, do inglês “United States Environmental Protection Agency”
VMP – valor máximo permitido
(-) – polaridade negativa
(+) – polaridade positiva
µm – micrômetro
°C – grau Celsius

SUMÁRIO

Resumo	vii
Abstract	viii
Lista de Figuras	ix
Lista de Quadros	xiii
Lista de Tabelas	xv
Lista de Símbolos e Abreviaturas	xvii
1 INTRODUÇÃO	22
2 OBJETIVOS	23
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	24
3.1 Poluição da água, saúde e padrões de qualidade da água	24
3.2 Bactérias indicadoras de contaminação fecal	32
3.3 Vírus entéricos	33
3.3.1 Adenovírus (AdV)	39
3.3.1.1 Classificação	39
3.3.1.2 Estruturas morfológica, proteica e genômica	39
3.3.1.3 Patologia e sintomatologia	40
3.3.1.4 Epidemiologia	42
3.3.2 Rotavírus (RV)	42
3.3.2.1 Classificação	42
3.3.2.2 Estruturas morfológica, proteica e genômica	43
3.3.2.3 Patologia e sintomatologia	45
3.3.2.4 Epidemiologia	47
3.3.3 Norovírus (NoV)	47
3.3.3.1 Classificação	47
3.3.3.2 Estruturas morfológica, proteica e genômica	48
3.3.3.3 Patologia e sintomatologia	49
3.3.3.4 Epidemiologia	49
3.4 Métodos para detecção de vírus	50
3.5 O sistema estuarino e o manguezal da Baía de Vitória	55
4 MATERIAL E MÉTODOS	59
4.1 Área de estudo	59
4.2 Coleta das amostras de águas superficiais	60
4.3 Análises dos parâmetros físico-químicos da água	61

4.4 Análises de coliformes termotolerantes e <i>Enterococci</i> da água	62
4.5 Amostras clínicas e população de estudo	63
4.5.1 Definição de caso	63
4.5.2 Tamanho da amostra	64
4.5.3 Critérios de inclusão e exclusão	64
4.5.4 Aspectos éticos da pesquisa	64
4.6 Análise de vírus entéricos em águas superficiais e fezes humanas	65
4.6.1 Preparação das amostras para os ensaios moleculares de detecção do ácido nucleico viral	66
4.6.2 Análises qualitativas por ensaios de PCR	69
4.6.2.1 Eletroforese para visualização dos produtos de PCR	70
4.6.3 Análises quantitativas por ensaios de PCR em Tempo Real (qPCR) .	71
4.6.3.1 Construção da curva padrão de quantificação absoluta	73
4.6.3.2 Conversão do número de cópias genômicas (cg) por ciclo de qPCR em número de cópias genômicas por 100 mL de água ou por grama de fezes	74
4.6.4 Sequenciamento de DNA e análises filogenéticas	75
4.7 Análises estatísticas	76
5 RESULTADOS	77
5.1 Avaliação da qualidade da água da Baía de Vitória	77
5.1.1 Caracterização físico-química	77
5.1.2 Avaliação microbiológica	79
5.1.2.1 Bactérias indicadoras de poluição fecal	79
5.1.2.2 Vírus entéricos	80
5.2 Prevalência de vírus entéricos na população infantil	85
5.3 Análises filogenéticas	94
6 DISCUSSÃO	99
6.1 Qualidade da água da Baía de Vitória, ES	99
6.1.1 Caracterização físico-química	99
6.1.2 Avaliação microbiológica	101
6.1.2.1 Bactérias indicadoras de poluição fecal	101
6.1.2.2 Vírus entéricos	102
6.2 Prevalência de vírus entéricos na população infantil	106
6.3 Análises filogenéticas	109
7 CONCLUSÕES	112

8 RECOMENDAÇÕES	113
9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	114
10 APÊNDICES	132

1 INTRODUÇÃO

A água contaminada por esgoto sanitário é uma das principais fontes de contaminação por vírus entéricos e os surtos de gastroenterite são frequentemente associados a eles. Esses patógenos podem permanecer infecciosos por vários meses na água, resistindo a condições adversas, mantendo-se íntegros até mesmo após tratamento de esgoto.

Os vírus são considerados importantes contaminantes das águas superficiais, embora ainda não estejam contemplados na legislação brasileira que avalia a exposição humana às águas superficiais com fins recreativos. Pesquisas têm contribuído com informações importantes para a elaboração e a adoção de medidas preventivas, a fim de minimizar o risco de surtos de gastroenterite, transmitida por veiculação hídrica associada a agentes virais.

A Baía de Vitória, no Espírito Santo, possui um extenso estuário, que recebe descarte de esgoto proveniente de estações de tratamento e da população local. Pesquisas recentes, que avaliaram a qualidade das águas superficiais, sedimentos e moluscos da região, mostraram elevadas concentrações de bactérias indicadoras de poluição fecal e a presença de vírus entéricos (JESUS, *et al.*, 2004; KELLER, *et al.*, 2013). A região de São Pedro, no entorno da Baía de Vitória, é composta por uma população de baixa renda, que faz uso constante das águas superficiais da baía para fins recreativos e atividades pesqueiras. Nas Unidades de Saúde de Vitória, podem ser observadas altas prevalências de crianças com gastroenterite (37.376,89 casos nos últimos 4 anos), provavelmente em virtude dos hábitos higiênico-sanitários não adequados e à estreita relação com o ambiente aquático contaminado (Ministério da Saúde, 2014).

O impacto ambiental causado pelo descarte inadequado de esgoto em ambientes aquáticos tem sido reportado por vários pesquisadores; contudo, pouca atenção tem sido dada às consequências dessas contaminações sobre a saúde da população. Dessa forma, essa investigação científica teve por objetivo fornecer dados epidemiológicos a serem utilizados por gestores da saúde e do meio ambiente, com a finalidade melhorar as condições de saúde das populações humanas.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar a disseminação ambiental e prevalência de vírus entéricos em casos de gastroenterite aguda na população infantil da região de São Pedro, Vitória, ES.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar os parâmetros físico-químicos e microbiológicos de qualidade das águas superficiais em quatro sítios da Baía de Vitória, ES;
- Determinar a prevalência dos seguintes vírus entéricos humanos: rotavírus A, norovírus genogrupo II e adenovírus humano, nas amostras de águas superficiais e em amostras de fezes de crianças com gastroenterite aguda, utilizando ensaios moleculares para detecção e quantificação do ácido nucleico viral;
- Verificar a presença de homologias filogenéticas entre os vírus entéricos detectados nas águas superficiais e nas fezes das crianças, com base nas sequências dos genomas virais.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Poluição aquática, saúde e padrões de qualidade da água

A água é um recurso considerado essencial para garantir o desenvolvimento sustentável. Quando em boa qualidade, passa a ser um bem disponibilizado a bilhões de seres vivos, que a utilizam para os mais diversos fins. Em contrapartida, quando disponível em baixa qualidade, torna-se um potencial veículo para diversas doenças, por conter patógenos que podem proporcionar severos danos à saúde da população (GALDEAN, *et al.*, 2000; PALACIO, *et al.*, 2009).

A poluição dos ecossistemas aquáticos tem se tornado um problema ambiental cada vez mais frequente, em virtude principalmente da ocupação humana desestruturada que tem como consequência direta, tem-se o descarte de esgoto sanitário sem tratamento adequado em rios, praias, baías e manguezais (RUFINO, 2002).

No Brasil, a preocupação com a qualidade da água, por parte do governo e da iniciativa privada, é relativamente recente. No estado do Espírito Santo ainda está em fase de formação dos comitês das bacias hidrográficas, no qual cada bacia receberá gestão direta e individual de seu comitê organizador (MACHADO, *et al.*, 2009). É imprescindível que a água a ser disponibilizada para a população apresente condições de qualidade físico-química e microbiológica adequada, estando isenta de substâncias e microrganismos que possam causar efeitos prejudiciais à saúde dos organismos (BRAGA, *et al.*, 2003).

Para avaliação da qualidade de um corpo d'água, as características mensuradas podem ser físicas, químicas ou biológicas, considerando: cor, turbidez, sabor, odor, temperatura, salinidade, condutividade, pH, dureza, cloretos, nitrogênio, fósforo, oxigênio dissolvido, matéria orgânica, micropoluentes orgânicos e inorgânicos, bactérias, insetos aquáticos, vírus, entre outros (ODUM, 2001).

A associação de parâmetros físico-químicos às variáveis microbiológicas presentes nos ecossistemas pode servir de diagnóstico para inferir sobre a qualidade de um determinado ambiente. As espécies são adaptadas a viver em gradientes

específicos dos parâmetros físico-químicos, ocupando apenas um espaço físico determinado no ambiente (ODUM, 2001; RICKLEFS, 1996). Os ecossistemas aquáticos vêm sendo constantemente impactados, afetando diretamente a saúde das populações (PEREIRA; FREIRE, 2005). Sabe-se que alterações na qualidade da água reduzem significativamente a biodiversidade, abundância e equitabilidade das espécies, como consequência da desestruturação do meio ambiente. É relatado que o uso de bioindicadores permite uma avaliação detalhada dos efeitos ecológicos causados por múltiplas fontes de poluição (PIEDRAS, *et al.*, 2006).

O desenvolvimento urbano e industrial é necessário e produtivo economicamente. Entretanto, tal avanço traz consigo inúmeras consequências ambientais desarmônicas, e os ecossistemas têm sido impactados de maneira a alarmar os gestores de saúde e de meio ambiente (STEWART, 2000).

Conservar a água é fundamental para assegurar o desenvolvimento sustentável de todas as espécies. Muitas vezes, dejetos são lançados indiscriminadamente no corpo d'água, contaminando os manguezais, recifes de corais, peixes, frutos do mar e os demais usuários desses recursos (HENRICKSON, *et al.*, 2001; ARNONE; WALLING, 2007).

O uso da água contaminada pelo homem pode resultar em enfermidades decorrentes da exposição aos patógenos ali presentes. Indivíduos que utilizam águas recreacionais com baixa qualidade microbiológica são mais susceptíveis a contrair enfermidades. A forma mais usual para verificar a qualidade sanitária em corpos d'água é utilizar microrganismos bioindicadores (BOTTING, *et al.*, 2010).

As doenças veiculadas por meio da água podem ser adquiridas principalmente após a ingestão de água ou alimentos contaminados, incluindo os peixes e moluscos bivalves comestíveis de ambientes marinhos e os frutos e vegetais cultivados em solos irrigados com águas de esgoto. Os microrganismos patogênicos também podem ser transmitidos através de águas de recreação poluídas, após contato direto por meio da pele ou por ingestão (WYN-JONES; SELLWOOD, 2001). No Quadro 1, são apresentadas algumas doenças e microrganismos relacionados às águas de consumo e recreacionais.

Quadro 1. Doenças e microrganismos patogênicos veiculados por águas de consumo e recreacionais (FUNASA, 2007, modificado).

Doença	Agente etiológico
Giardíase	<i>Giardia lamblia</i> ;
Amebíase	<i>Entamoeba histolytica</i> ;
Hepatite infecciosa	Vírus da hepatite A e E;
Gastroenterite aguda	<i>Balantidium coli</i> , <i>Cryptosporidium</i> , <i>Bacillus cereus</i> , <i>S. aureus</i> , <i>Campylobacter</i> , <i>E. coli</i> enterotoxogênica, enteropatogênica e enterohemolítica, <i>Shigella</i> , <i>Yersinia enterocolitica</i> , Astrovírus, Adenovírus, Calicivírus, Rotavírus A e B;
Salmonelose	<i>Salmonella typhimurium</i> , <i>S. enteritides</i> ;
Tricuríase	<i>Trichuris trichiura</i> ;
Enterobiase	<i>Enterobius vermiculares</i> ;
Ancilostomíase	<i>Ancylostoma duodenale</i> ;
Ascaridíase	<i>Ascaris lumbricoides</i> ;

A Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (USEPA-*United States Environmental Protection Agency*) recomenda usar *Escherichia coli* e *Enterococci* para avaliar a qualidade da água doce e salina, respectivamente (USEPA, 2011). No Brasil, a qualidade microbiológica da água de consumo humano é de responsabilidade do Ministério da Saúde (MS), tendo como principal ferramenta a Portaria nº 518, de 2004, atualizada pela Portaria nº 2.914, de 2011, que estabelece os procedimentos e responsabilidades relativos ao controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade (BRASIL, 2004; BRASIL, 2011a). Ambientalmente, duas resoluções do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) foram criadas para garantir a saúde e o bem-estar humano. A resolução nº 357, de 2005, e sua complementação e atualização nº 430, de 2011, dispõem sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelecem as condições e padrões de lançamento de efluentes (BRASIL, 2005; BRASIL, 2011b). Já a resolução nº 274, de 2000, faz menção aos níveis estabelecidos para a balneabilidade, de forma a assegurar as condições necessárias à recreação de contato primário (BRASIL, 2000). As regulamentações citadas acima possuem valores máximos permitidos (VMP) para coliformes termotolerantes. De acordo com a resolução ambiental, pode-se utilizar a

Escherichia coli em substituição ao parâmetro coliforme termotolerante, seguindo limites estabelecidos pelo órgão competente. A portaria do MS supracitada somente recomenda que vírus entéricos sejam monitorados, porém não define parâmetros aplicáveis a esses patógenos; já as resoluções do CONAMA não citam os vírus em suas regulamentações (LUZ, *et al.*, 2012).

Segundo a Resolução nº 274, de 2000, a água doce é aquela com salinidade igual ou inferior a 0,50‰; água salobra possui salinidade entre 0,50‰ e 30‰; e salina tem salinidade igual ou superior a 30‰. Quanto à balneabilidade, conforme disposto na resolução, as águas costeiras são classificadas utilizando como referência a concentração de microrganismos indicadores de contaminação fecal, de acordo com valores de referência apresentados no Quadro 2.

Quadro 2. Padrões microbiológicos adotados pela Resolução nº 274, de 2000, para balneabilidade das águas costeiras brasileiras (UFC/ 100 mL).

Indicador	Própria			Imprópria
	Excelente	Muito boa	Satisfatória	
Coliformes termotolerantes	$< 2,5 \times 10^2$	$< 5,0 \times 10^2$	$< 1,0 \times 10^3$	$> 2,5 \times 10^3$
<i>Escherichia coli</i>	$< 2,0 \times 10^2$	$< 4,0 \times 10^2$	$< 8,0 \times 10^2$	$> 2,0 \times 10^2$
<i>Enterococci</i>	$< 2,5 \times 10^1$	$< 5,0 \times 10^1$	$< 1,0 \times 10^2$	$> 4,0 \times 10^2$

Os valores estabelecidos acima se referem a monitoramentos de periodicidade semanal ou frequência superior, sendo considerado um conjunto de 80% do total das amostras obtidas em cinco semanas consecutivas, e à densidade de microrganismos em 100 mL da amostra. $> 1,0 \times 10^2$ ou $4,0 \times 10^2$ UFC de Enterococos por 100 mL da amostra.

Para classificação das águas costeiras como impróprias para atividades de contato primário, a Resolução nº 274, de 2000, adota também os seguintes critérios:

- Valor da última amostragem superior a $2,5 \times 10^3$ UFC de coliformes termotolerantes, ou $2,0 \times 10^3$ UFC de *Escherichia coli* ou $4,0 \times 10^2$ UFC de Enterococos por 100 mL da amostra;

- Incidência elevada ou anormal de enfermidades relacionadas à qualidade hídrica na região;
- Presença de resíduos e efluentes, como esgoto sanitário, óleos, graxas e outras substâncias que tragam risco à saúde dos usuários;
- Floração de algas ou outros organismos que ofereçam risco aos usuários.

O monitoramento da água mediante padrões adotados pelas legislações ainda não é suficiente para eliminar completamente o risco à saúde dos frequentadores de ambientes aquáticos recreacionais. Faz-se necessário, também, o monitoramento de outros patógenos que não estão contemplados nas legislações. O Quadro 3 mostra um levantamento de estudos recentes sobre a qualidade de águas recreacionais, apresentando outros parâmetros microbiológicos, bem o tipo de água analisada.

Quadro 3. Parâmetros microbiológicos analisados em estudos de qualidade de águas recreacionais.

Tipo de água	Coliformes totais	Coliformes termotolerantes	<i>Escherichia coli</i>	<i>Enterococci</i>	Vírus entéricos	Outros	País	Referência
Salina		X	X		X		Brasil	Moresco, <i>et al.</i> , 2012
Doce			X		X		Brasil	Vieira, <i>et al.</i> , 2012
Salobra				X		X	EUA	Mote, <i>et al.</i> , 2012
Salina	X	X		X			EUA	Arnold, <i>et al.</i> , 2013
Salobra			X		X		Brasil	Keller, <i>et al.</i> , 2013
Doce					X		Nova Zelândia	Hewitt, <i>et al.</i> , 2013
Salina	X		X				Malásia	Praveena, <i>et al.</i> , 2013
Doce			X				EUA	Przybyla-Kelly, <i>et al.</i> , 2013
Salina				X		X	Malásia	Ahmad, <i>et al.</i> , 2014
Salina			X		X	X	EUA	Lee, <i>et al.</i> , 2014
Salina	X	X		X		X	India	Vignesh, <i>et al.</i> , 2014
Doce	X		X		X		Brasil	Miagostovich, <i>et al.</i> , 2014

A resolução CONAMA nº 357, de 2005, bem como sua atualização, a resolução nº 430, de 2011, atuam como principais ferramentas destinadas ao gerenciamento da qualidade sanitária da água, e dispõem sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelecem as condições e padrões de lançamento de efluentes. Essa legislação determina que a qualidade das águas esteja associada ao uso pretendido.

Para avaliar a qualidade sanitária de um corpo d'água, deve-se realizar a classificação utilizando o sistema de classes de qualidade previsto na legislação. Por definição da resolução CONAMA em questão, capítulo 1, artigo 2º, essas classes são um conjunto de condições e padrões necessários ao atendimento dos usos preponderantes, atuais ou futuros.

A resolução nº 357, de 2005, do CONAMA, estabelece limites individuais para as substâncias em cada classe, a fim de se determinar os padrões de qualidade das águas (Quadro 4). A classificação utilizando os padrões compreendidos na legislação possibilita atingir níveis de indicadores consistentes com os respectivos usos desejados dos corpos de água. No capítulo II, artigo 3º desta resolução, está disposta a classificação dos corpos de água em águas doces, salobras e salinas, segundo a qualidade requerida para os seus usos preponderantes, em treze classes de qualidade. As águas de melhor qualidade podem ser aproveitadas em uso menos exigente, desde que isso não prejudique a qualidade da água, atendidos outros requisitos pertinentes (BRASIL, 2005).

Quadro 4. Limites para algumas variáveis físico-químicas em ambientes aquáticos de águas salobras, doces e salinas (BRASIL, 2005, modificado).

Tipo de água	Variável	Natureza do limite	Classe			
			1	2	3	4
Salobra	pH	Faixa	6,5 - 8,5	6,0 - 9,0	5,0 - 9,0	-
	OD (mg/L)	Inferior	>5,0	>4,0	>3,0	-
	Substâncias que produzam cor, odor e turbidez	Presença / Ausência	Ausência	Ausência	Ausência	-
Doce	pH	Faixa	6,0 - 9,0	6,0 - 9,0	6,0 - 9,0	6,0 - 9,0
	OD (mg/L)	Inferior	>6,0	>5,0	>4,0	>2,0
	Substâncias que produzam cor, odor e turbidez	Presença / Ausência	Ausência	Ausência	Ausência	Não objetáveis
Salina	pH	Faixa	6,5 - 8,5	6,5 - 8,5	6,5 - 8,5	-
	OD (mg/L)	Inferior	>6,0	>5,0	>4,0	-
	Substâncias que produzam cor, odor e turbidez	Presença / Ausência	Ausência	Ausência	Ausência	-

Os corpos hídricos são classificados em classes, como pode ser visualizado no Quadro 5.

Quadro 5. Classificação dos corpos hídricos em classes de águas, segundo a qualidade requerida para os seus usos preponderantes (Fonte: BRASIL, 2005, modificado).

Tipo de água	Classe de qualidade	Usos preponderantes
Salobra	I - classe especial	a) preservação dos ambientes aquáticos em unidades de conservação de proteção integral; b) preservação das comunidades aquáticas.
	II - classe 1	a) recreação de contato primário; b) proteção das comunidades aquáticas; c) aquicultura e atividade de pesca; d) abastecimento para consumo humano após tratamento convencional; e) irrigação de hortaliças que são consumidas cruas.
	III - classe 2	a) pesca amadora; b) recreação de contato secundário.
	IV - classe 3	a) navegação; b) harmonia paisagística.
Doce	I - classe especial	a) abastecimento para consumo humano, com desinfecção; b) preservação das comunidades aquáticas; c) preservação dos ambientes aquáticos em unidades de conservação de proteção integral.
	II - classe 1	a) abastecimento para consumo humano, após tratamento simplificado; b) proteção das comunidades aquáticas; c) recreação de contato primário; d) irrigação de hortaliças que são consumidas cruas; e) proteção aquática em terras indígenas.
	III - classe 2	a) abastecimento para consumo humano, após tratamento convencional; b) proteção das comunidades aquáticas; c) recreação de contato primário; d) irrigação de hortaliças e plantas frutíferas com as quais o público possa vir a ter contato direto; e) aquicultura e atividade de pesca.
	IV - classe 3	a) abastecimento para consumo humano, após tratamento convencional ou avançado; b) irrigação de culturas arbóreas, cerealíferas e forrageiras; c) pesca amadora; d) recreação de contato secundário; e) dessedentação de animais.
Salina	I - classe especial	a) preservação dos ambientes aquáticos em unidades de conservação de proteção integral; b) preservação das comunidades aquáticas.
	II - classe 1	a) recreação de contato primário; b) proteção das comunidades aquáticas; c) aquicultura e atividade de pesca.
	III - classe 2	a) pesca amadora; b) recreação de contato secundário.
	IV - classe 3	a) navegação; b) harmonia paisagística.

Os problemas brasileiros relacionados à poluição de ambientes aquáticos, muitas vezes, acontecem pela falta de orientação e conscientização sobre o uso dos recursos ambientais, principalmente no que se refere à participação da sociedade interessada. Desde o surgimento das comunidades humanas, existe uma preferência por regiões costeiras, em locais que possuem abundância de água. No Brasil, a maior parte da população está distribuída numa faixa estreita próxima ao litoral (IBGE, 2010). É de se esperar que os biomas ali presentes estejam sujeitos a impactos ambientais mais intensos, devido à ação antrópica.

3.2 Bactérias indicadoras de contaminação fecal

A população microbiana aquática reflete as condições terrestres do entorno, mostrando os efeitos das atividades humanas que conduzem a uma degradação da qualidade da água. Algumas espécies microbianas são nativas em habitats específicos, enquanto outras são transitórias, provenientes de atividades humanas que geram impacto na biodiversidade. Em águas que recebem esgotos domésticos com grande quantidade de nutrientes orgânicos, pode ser encontrado um grupo de bactérias chamadas de indicadoras de poluição fecal. A presença desses microrganismos na água pode indicar risco potencial à saúde, uma vez que são provenientes do intestino humano e de animais, indicando contaminação fecal. Isso acontece também com outras bactérias, como os estreptococos fecais e também os vírus intestinais (GREENBERG, *et al.*, 1992).

Uma série de características classifica um microrganismo como bioindicador, entre elas estão: apresentar características estáveis nos vários tipos de ambientes; resistir às condições ambientais; demonstrar melhor sobrevivência que o agente patogênico, e por um período de tempo superior; estar presente sempre que haja o microrganismo patogênico, e ausente sempre que não seja detectada contaminação; além de que as concentrações do microrganismo indicador devem ser superiores aos patogênicos e não representar um perigo para a saúde humana (PRESCOTT, *et al.*, 1996).

Em ambientes aquáticos, para um microrganismo ser um bioindicador ideal de contaminação fecal, ainda existem outros requisitos além dos citados acima: ter

como habitat exclusivo o trato intestinal do homem e de outros animais; ocorrer em número elevado nas fezes; apresentar alta resistência ao ambiente aquático; ser detectado por técnicas rápidas, simples e precisas (FRANCO; LANDGRAF, 2003).

O *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (2005) define o grupo coliforme como bactérias indicadoras da família *Enterobacteriaceae*. A definição clássica desse grupo consiste no método baseado na fermentação da lactose. Consequentemente, quando a técnica de fermentação é utilizada, esse grupo é definido como bactérias anaeróbicas facultativas, gram-negativas, não formadoras de esporos e na forma de bastonete.

O termo coliforme fecal foi utilizado para descrever bactérias que fermentam a lactose, produzindo gás a 44,5 °C. *Escherichia coli*, *Klebsiella* e *Enterobacter* também apresentam esta particularidade, porém, *E. coli* tem como habitat primário o intestino de animais homeotérmicos. Cepas dos outros dois gêneros citados acima podem ser encontradas em outros ambientes, tais como vegetais e solo, onde inclusive persistem por mais tempo que as bactérias patogênicas de origem intestinal (DOYLE, 1993). Assim, não é correto afirmar que a presença de coliformes termotolerantes em alimentos e água é exclusiva de origem fecal, fato que levou à mudança do termo coliformes fecais para coliformes termotolerantes (SILVA, *et al.*, 2006).

3.3 Vírus entéricos

Os vírus entéricos são representados pelos grupos de vírus que podem infectar células do trato gastrointestinal humano e causar enfermidades em indivíduos susceptíveis. Sua transmissão direta se dá por via fecal-oral, entretanto esses patógenos também podem ser transmitidos indiretamente por águas recreacionais e alimentos que podem ter entrado em contato com água contaminada (BOSCH, 1998; LECLERC, *et al.*, 2002). No Quadro 6 estão listados alguns desses vírus e suas doenças relacionadas.

Quadro 6. Vírus entéricos humanos que podem ser transmitidos pela água contaminada (Fonte: BOSCH, 1998).

Gênero	Espécie	Doença causada
<i>Enterovirus</i>	Poliovírus	Paralisia, meningite, febre
	Coxsackievirus, A, B	Meningite, febre, doenças respiratórias, entre outras
	Ecovírus	Meningite, febre, doenças respiratórias, agitação, gastroenterite
<i>Hepatovirus</i>	Vírus da Hepatite A, E	Hepatite
<i>Rotavirus</i>	Rotavírus humano	Gastroenterite
<i>Mastadenovirus</i>	Adenovírus humano	Gastroenterite, doenças respiratórias, conjuntivites
<i>Calicivirus</i>	Calicivírus humano	Gastroenterite
	Norovírus	Gastroenterite, febre
<i>Astrovirus</i>	Astrovírus humano	Gastroenterite
<i>Parvovirus</i>	Parvovírus humano	Gastroenterite
<i>Coronavirus</i>	Coronavírus humano	Gastroenterite, doenças respiratórias
<i>Torovirus</i>	Torovírus humano	Gastroenterite

Os vírus entéricos podem estar associados desde infecções assintomáticas a quadros graves de saúde, como paralisias, anomalias cardíacas, meningite asséptica, encefalites, hepatites, diarreias e outras enfermidades, podendo levar até ao óbito (BOSCH, 1998; LECLERC, *et al.*, 2002).

Os vírus entéricos podem ser classificados em dois principais grupos, onde o primeiro inclui os enterovírus, como poliovírus (PV), coxsackievírus (CV) e echovírus (EV), que são permissivos ao cultivo *in vitro* e que, normalmente, não causam doenças gastrointestinais; e o segundo contempla os rotavírus (RV), astrovírus (AV), adenovírus entéricos 40/41 (AdV40, AdV41), calicivírus (norovírus-NoV e saporovírus-SaV) e vírus das hepatites A (HAV) e E (HEV), os quais causam gastroenterites ou hepatites, e são fastidiosos (WYN-JONES; SELLWOOD, 2001). Esses patógenos são excretados nas fezes, em quantidades extremamente elevadas - 10^8 a 10^{10} partículas/ grama de fezes (ABBASZADEGAN, *et al.*, 1999).

Os vírus entéricos entram em contato com os ecossistemas aquáticos principalmente através do descarte de esgoto, e seu destino pode ser extremamente variado, podendo chegar ao ser humano por diversas vias (Figura 1). Em locais mais distantes do despejo direto de esgoto não tratado, os vírus entéricos tendem a ser

encontrados em baixas concentrações na água. No esgoto sanitário bruto, esses patógenos estão presentes em altas concentrações e os processos de tratamento atuais não são eficientes para assegurar a remoção completa desses patógenos (FLANNERY, *et al.*, 2012).

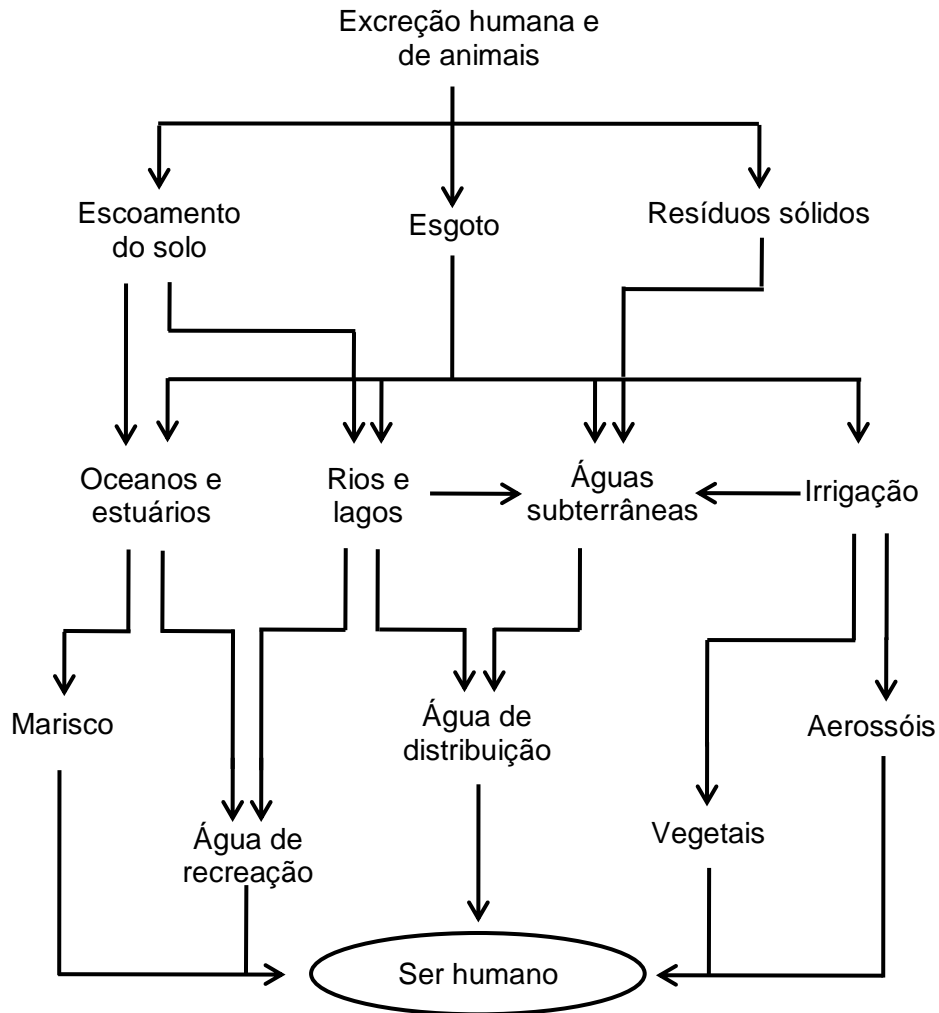


Figura 1. Rotas de transmissão de vírus entéricos no ambiente até o contato com o ser humano (BOSCH, 1998, modificado).

Uma vez em contato com o corpo d'água, os vírus entéricos podem se associar aos sólidos suspensos do ambiente aquático ou aos sólidos provenientes de efluentes domésticos e se acumular nos sedimentos, resistindo por um período de tempo maior (SANTAMARIA; TORANZOS, 2003). De acordo com Melnick e Gerba (1980), os sedimentos funcionam como reservatórios de vírus que são ressuspensos para a coluna d'água por diversos fatores: natural, como a hidrodinâmica local, ou

artificial, como uma dragagem. São também liberados pela formação de aerossóis e/ou bioacumulados por organismos aquáticos (Figura 2).

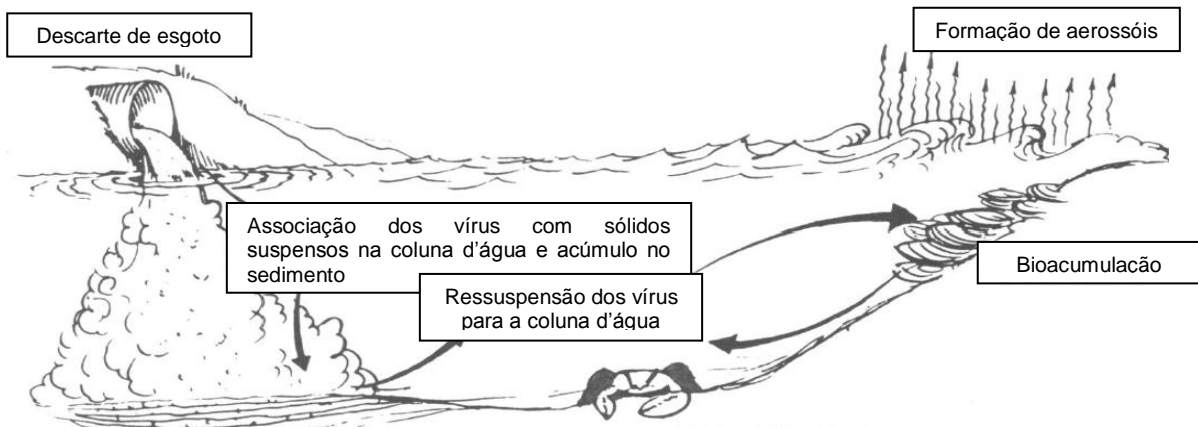


Figura 2. Destino dos vírus em sistemas aquáticos costeiros, após descarte de esgoto na água (Fonte: MELNICK; GERBA, 1980, modificado).

As ostras e mexilhões se alimentam por filtração da água, sendo que as ostras geralmente são consumidas sem cozimento prévio. Esses organismos, quando cultivados em águas costeiras contaminadas, podem veicular doenças como gastroenterites e hepatites (MESQUITA, *et al.*, 2011). Os animais filtradores, desta forma, possuem maiores concentrações de vírus e bactérias que as águas ao seu redor (ABAD, *et al.*, 1997).

Existe uma incerteza sobre o período que esses vírus podem sobreviver no ambiente aquático e nos frutos do mar contaminados (ABAD, *et al.*, 1997); porém, sabe-se que as partículas virais sofrem influência das condições físico-químicas da água. Em estudo realizado por Phanuwan e colaboradores (2006), foi verificada correlação entre os parâmetros físico-químicos e os vírus presentes na água, sendo que a turbidez obteve correlação positiva, enquanto condutividade, temperatura e potencial de óxido-redução mostraram ter correlação negativa.

A detecção de vírus entéricos em águas poluídas por esgotos tem surgido como proposta a fim de avaliar o nível de contaminação da água. A tendência mundial é utilizar as bactérias como indicadores para determinar a qualidade microbiológica da água (MAYLA; AMR, 2010; NOGUEIRA, *et al.*, 2010; HUSSAIN, *et al.*, 2011); entretanto, foi provado que esses microrganismos não possuem correlação

significativa com o grau de contaminação virológica da água (GRABOW, 1996). Em estudos realizados no Brasil, foram detectados vírus entéricos em ambientes aquáticos onde existiam relativamente poucos coliformes termotolerantes (MIAGOSTOVICH, *et al.*, 2008; JUSTINO, 2009; MORESCO, *et al.*, 2012; SCARPATI, 2012). Nesses casos, o número de vírus entéricos não demonstrou ter associação com o número de indicadores bacterianos de contaminação fecal.

Atualmente, busca-se um indicador viral que complemente os indicadores bacterianos de poluição fecal nos estudos de qualidade de água. Várias análises sugerem o adenovírus como um bom indicador de contaminação para ambientes aquáticos (PINA, *et al.*, 1998; ALBINANA-GIMENEZ, *et al.*, 2006; SYMONDS, *et al.*, 2009). Porém, para realizar tal definição, faz-se necessária a compreensão da complexidade que envolve os diversos grupos de vírus entéricos presentes no ambiente (SYMONDS, *et al.*, 2009). Primeiramente, sabe-se que diversos vírus possuem distribuição sazonal e são encontrados no ambiente de acordo com o clima da região (TRABELSI, *et al.*, 2000; PANG, *et al.*, 2001). Quantidades diferentes desses vírus podem ser encontradas no ambiente em decorrência do estado de saúde da população da respectiva área. Isso pode refletir diretamente na ocorrência dos vírus entéricos na água. Secundariamente, diferenças estruturais entre os vírus têm sido registradas como características importantes de resistência a fatores ambientais e até mesmo a desinfetantes utilizados nos sistemas de tratamento de água e esgoto (ABAD, *et al.*, 1997; GERBA, *et al.*, 2002; BOSCH, 2007).

Alguns fatores que afetam a sobrevivência dos vírus entéricos em ambientes aquáticos podem ser visualizados no Quadro 7.

Quadro 7. Fatores que afetam a sobrevivência de vírus entéricos em ambientes aquáticos (Fonte: BOSCH, 2007, modificado).

Fatores	Descrição
Temperatura	longa sobrevivência a baixas temperaturas
Luz	luz ultravioleta solar pode danificar o ácido nucleico viral
pH	estáveis em valores próximos à neutralidade
Sais	a presença de cátions protege certos vírus de inativação por calor
Sólidos suspensos ou sedimentos	aumenta a sobrevivência
Fatores biológicos	microbiota aquática é usualmente antagonista

Estudos desenvolvidos em vários países da América Latina têm identificado vírus patogênicos em amostras ambientais. O Quadro 8 apresenta uma relação dos vírus mais estudados e detectados em águas ambientais na América Latina.

Quadro 8. Vírus patogênicos mais frequentemente pesquisados em águas ambientais na América Latina.

Vírus	Referência
Rotavírus	Miagostovich, <i>et al.</i> , 2008 e 2014; Fumian, <i>et al.</i> , 2009; Fumian, <i>et al.</i> , 2010; Vieira, <i>et al.</i> , 2012; Victoria, <i>et al.</i> , 2014.
Norovírus	Miagostovich, <i>et al.</i> , 2008; Victoria, <i>et al.</i> , 2009; Leal, <i>et al.</i> , 2011; Fernández, <i>et al.</i> , 2012; Moresco, <i>et al.</i> , 2012; Vieira, <i>et al.</i> , 2012; Victoria, <i>et al.</i> , 2014.
Adenovírus	Rigotto, <i>et al.</i> , 2005; Miagostovich, <i>et al.</i> , 2008; Albinana-Gimenez, <i>et al.</i> , 2009; Leal, <i>et al.</i> , 2011; Moresco, <i>et al.</i> , 2012; Oliveira, <i>et al.</i> , 2012; Vieira <i>et al.</i> , 2012; Victoria, <i>et al.</i> , 2014.
Vírus da Hepatite A	Sincero, <i>et al.</i> , 2006; Rigotto, <i>et al.</i> , 2010; Moresco, <i>et al.</i> , 2012; Fongaro, <i>et al.</i> , 2012.

Serão caracterizados neste capítulo três vírus entéricos (adenovírus, rotavírus e norovírus) que foram avaliados no monitoramento da água e dos casos de gastroenterite infantil.

3.3.1 Adenovírus (AdV)

3.3.1.1 Classificação

Os adenovírus (AdV) pertencem à família *Adenoviridae*, sendo subdivididos filogeneticamente em cinco gêneros (Quadro 9) (JIANG, 2006; GHEBREMEDHIN, 2014).

Quadro 9. Classificação de adenovírus em seus respectivos gêneros e grupo de animais infectados (Fonte: GHEBREMEDHIN, 2014).

Gênero	Grupos de animais infectados
<i>Mastadenovirus</i>	Bovinos, equinos, humanos, roedores, caninos, ovinos, suínos, morcegos e macacos
<i>Aviadenovirus</i>	Galinhas
<i>Siadenovirus</i>	Aves, rã e tartaruga
<i>Atadenovirus</i>	Répteis, pássaros e mamíferos
<i>Ichadenovirus</i>	Peixes

Os adenovírus humanos (HAdV) são classificados no gênero *Mastadenovirus*, que contém sete espécies conhecidas (A-G). Essas espécies compreendem cerca de 52 sorotipos de AdV. Em 2007, um novo sorotipo (AdV-52) foi descrito e, por causa de suas características distintas, foi sugerida sua classificação em uma nova espécie de adenovírus, G (JONES, 2007).

3.3.1.2 Estruturas morfológica, proteica e genômica

Os vírus da família *Adenoviridae* são formados por um capsídeo, fibras, um núcleo e proteínas associadas. Seu capsídeo não é envelopado, possui aspecto arredondado com simetria icosaédrica, um diâmetro de 80 - 110 nm e são compostos de uma única camada protéica. A Figura 3 revela que sua estrutura de superfície possui um padrão regular com características distintivas e o arranjo do capsômero é claramente visível (RUX; BURNETT, 2004).

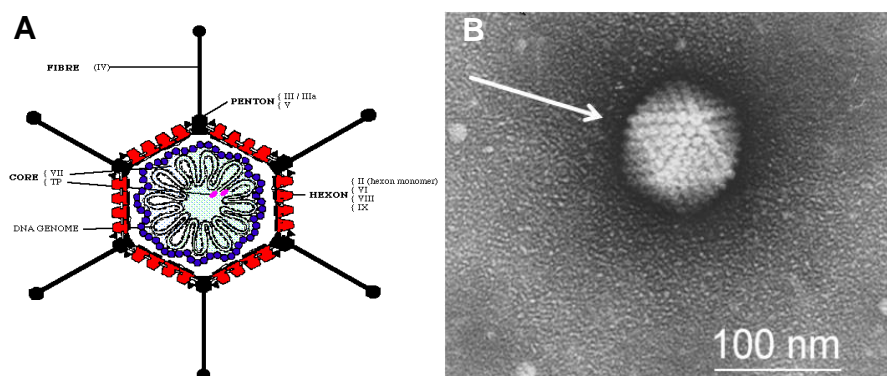


Figura 3. A - Esquema da estrutura morfológica e proteica do adenovírus e B - partícula de adenovírus isolado de amostra de fezes (Fonte: <http://www.ictvdb.org/ICTVdB/index.htm>).

O capsídeo dos AdV é constituído por 252 capsômeros, dos quais 12 são pentons e 240 são hexons. Os hexons consistem em um hexágono com uma cavidade central e os pentons estão firmemente associados a uma ou duas fibras. Cada capsômero mede 8-10 nm de diâmetro. As projeções da superfície são distintas, com um ou dois filamentos. As proteínas da fibra interagem para formar uma seta de comprimento característico. O comprimento das fibras está entre 9-77,5 nm e o núcleo consiste em uma nucleoproteína complexa (ICTVdB, 2006; BERK, 2007; ENGLER; HONG, 2007).

O genoma dos AdV não é segmentado e é composto de uma única molécula de DNA fita dupla (dsDNA), de 35 kb. O genoma possui sequências terminantemente redundantes, do tipo repetições terminais invertidas (ITR-*Inverted Terminal Repetitions*) (103 pb para adenovírus humano-HAdV). O genoma tem uma proteína terminal codificada que é covalentemente ligada à extremidade 5'- terminal de cada fita de DNA (ICTVdB, 2006).

3.3.1.3 Patologia e sintomatologia

A gastroenterite aguda é a maior causa de morbidade de crianças em todo o mundo e a primeira causa de morte entre jovens nos países em desenvolvimento (EBNER, *et al.*, 2005). Os principais AdV causadores de gastroenterite integram a família *Adenoviridae*, gênero *Mastadenovirus*, subgênero F, compreendendo os sorotipos

40 e 41. Porém, também é reportado por ghebremedhin (2014) que outros sorotipos de AdV podem causar infecções no trato gastrointestinal (Quadro 10). Os AdV possuem um espectro variado de infecções nos seres humanos, podendo acometer as vias respiratórias, além de causarem conjuntivites, gastroenterites e até hemorragias. Entretanto, cada patologia é acometida por tipos específicos de adenovírus. Seu período de incubação pode variar de 3 a 10 dias e os sintomas podem incluir febre, diarreia, vômitos e dor abdominal, durando aproximadamente 10 dias. A doença normalmente é autolimitante em indivíduos imunocompetentes, porém fatalidades podem acontecer em indivíduos imunocomprometidos (ROBINSON; ECHAVARRIA, 2007). Infecções assintomáticas são comuns em crianças (WOLD; HORWITZ, 2007).

Quadro 10. Classificação dos subgrupos de adenovírus com seus sorotipos e suas respectivas infecções (Fonte: GHEBREMEDHIN, 2014).

Espécie	Sorotipo	Infecção
A	12, 18, 31	gastrointestinal, respiratório e urinário
B	3, 7, 16, 21 (tipo 1)	conjuntivite, gastrointestinal, respiratório e urinário
	11, 14, 34, 35, (tipo 2)	gastrointestinal, respiratório e urinário
C	1, 2, 5, 6	respiratório, gastrointestinal incluindo hepatite e urinário
D	8-10, 13, 15, 17, 19, 22-30, 32, 33, 36-39, 42-49	conjuntivite e gastrointestinal
E	4	conjuntivite e respiratório
F	40, 41	gastrointestinal
G	52	gastrointestinal

As infecções causadas por AdV são consideradas variáveis e sua incidência em países industrializados possui uma amplitude de 1 a 8%, enquanto em países em desenvolvimento essa amplitude aumenta para 2 a 31% (WILHELMI, *et al.*, 2003).

Uma importante defesa imunológica contra reinfecção por AdV é a imunidade mediada por anticorpos, que é considerada sorotipo-específica (ENGLER; HONG, 2007). Até o momento, não existe terapia específica para infecções causadas por AdV; sendo assim, os sintomas da doença e as possíveis complicações devem ser tratados (CDC, 2012).

3.3.1.4 Epidemiologia

Os AdV entéricos podem causar infecções em pessoas de todas as idades, principalmente em períodos de surtos, havendo também evidências de infecções nosocomiais (WRIGHT; BIELUCH, 1993). Gómara e colaboradores (2008) citam que esses vírus são a terceira maior causa de gastroenterite infantil, ficando atrás apenas dos rotavírus e norovírus. Muitas amostras positivas para AdV têm sido encontradas em fezes de crianças assintomáticas, demonstrando que durante surtos e epidemias as crianças acabam atuando como reservatórios, excretando o vírus e transmitindo a doença, embora não a desenvolvam (SHIMIZU, *et al.*, 2007; GOMES, 2011).

O mecanismo básico de transmissão dos AdV ocorre de pessoa para pessoa pela via fecal-oral e pelas secreções respiratórias, infectando as células epiteliais do trato gastrointestinal e trato respiratório, considerando-se, ainda, outras vias mucosas podem ser infectadas (BLACKLOW; GREENBERG, 1991). Várias medidas podem ser listadas como meio de prevenir infecções por vírus entéricos, entre elas está lavar as mãos frequentemente com água e sabão, principalmente após usar o sanitário, manipular fraldas (mesmo usando luvas) e limpar um paciente sintomático, além de desinfetar rotineiramente superfícies de banheiros, como pias, chãos e mesas, ou quaisquer áreas onde estejam pessoas doentes. Para os sorotipos que causam doenças respiratórias, a maior prevenção é orientar os adultos e crianças a espirrarem ou tossirem em um tecido descartável para evitar contaminação de outros indivíduos (SRCHD, 2008).

3.3.2 Rotavírus (RV)

3.3.2.1 Classificação

O RV é representante da família *Reoviridae* e é um dos mais importantes agentes causadores de diarreia severa no mundo, especialmente em crianças. Existem sete grupos de rotavírus, designados como A, B, C, D, E, F e G. Os humanos são infetados principalmente pelos grupos A, B e C, sendo que o grupo A é

significativamente o mais prevalente (GRAFF, *et al.*, 2007). Grupos D - G têm sido reportados somente em animais e pássaros (PALOMBO; BISHOP, 2011).

No grupo A, vários sorotipos já foram caracterizados utilizando anticorpos para as proteínas externas do capsídeo VP7 e VP4. Esse grupo inclui 14 sorotipos de VP7, denominados tipo G, e pelo menos 15 sorotipos de VP4, chamados de tipo P. Embora uma extensa gama de combinações G - P seja possível, somente um número limitado de combinações de G1, G2, G3, G4, G5, G8, G9, ou G12 com P4, P6, P8 ou P9 foram identificadas em crianças com gastroenterite. A cepa mais prevalente em crianças nos últimos 35 anos tem sido a G1P8 (PALOMBO; BISHOP, 2011). Entretanto, após o início da vacinação dirigida para esse sorotipo, um novo genótipo tem emergido (G2P4), na última década, nas populações (DESSELBERGER, *et al.*, 2006; ANTUNES, *et al.*, 2009).

3.3.2.2 Estruturas morfológica, proteica e genômica

Os vírions maduros de RV (Figura 4) não possuem envelope externo em seu capsídeo, podendo apresentar envelope lipídico em suas partículas virais imaturas, ainda no retículo endoplasmático, antes de deixar a célula hospedeira. O capsídeo/nucleocapsídeo é circular, composto por duas camadas com simetria icosaédrica e diâmetro com cerca de 80 a 100 nm. O capsídeo interno é liso e o externo é frequentemente perdido durante a maturação viral, assim como suas projeções. Dessa forma, a estrutura final de superfície revela um padrão regular com características distintas que lembram uma roda. O arranjo do capsômero é claramente visível em microscopia crioeletrônica. O capsídeo é formado por 132 capsômeros em ambos os capsídeos, que são sobrepostos. O capsídeo interno consiste em uma estrutura com diâmetro de cerca de 50 nm e seu nucleocapsídeo é esférico com um diâmetro de 35 nm (ICTVdB, 2006).



Figura 4. Partículas de rotavírus humano isoladas de amostras de fezes de crianças com gastroenterite aguda (Fonte: <http://www.ictvdb.org/ICTVdB/index.htm>; PARASHAR, *et al.*, 2005, modificado).

O tamanho do genoma do RV é de 16,5 a 21 kb. As regiões 5' e 3' terminais são conservadas. A Figura 5 representa a estrutura do RV com seus três capsídeos proteicos. Os RVs são compostos por 16% de ácidos nucleicos, representados por 11 segmentos lineares de RNA dupla fita (dsRNA), 6 proteínas estruturais e 5 proteínas não estruturais (Quadro 11). Internamente estão dispostas as proteínas VP1, VP2 e VP3. O capsídeo mediano é constituído pela proteína VP6, enquanto o capsídeo externo é constituído pelas proteínas VP7 e VP4 (SHAW, 2006).

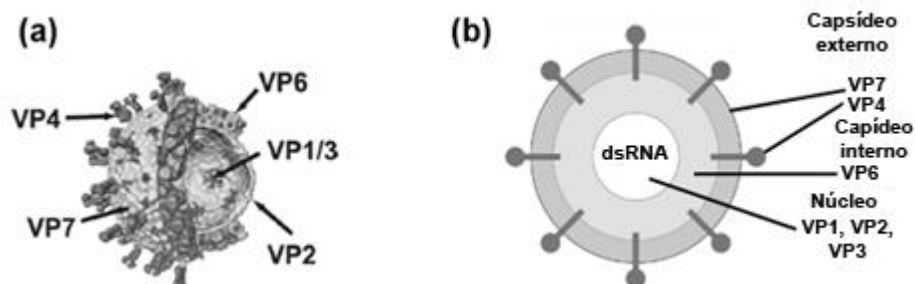


Figura 5. (a) Representação esquemática dos três capsídeos do rotavírus (Fonte: SHAW, 2006, modificado); (b) Diagrama dos três capsídeos do rotavírus, indicando as proteínas estruturais no núcleocapsídeo, capsídeo interno e externo, bem como o RNA fita dupla (PALOMBO; BISHOP, 2011, modificado).

Quadro 11. Segmentos de RNA dos rotavírus, proteínas e suas funções (Fonte: PALOMBO; BISHOP, 2011, modificado).

Segmento de RNA	Tamanho (pb)	Proteína	Função principal
1	3302	VP1	RNA polimerase
2	2690	VP2	estrutura do nucleocapsídeo
3	2591	VP3	guanilil transferase
4	2362	VP4	capsídeo externo (interação com a célula hospedeira)
5	1581	NSP1	ligação no RNA viral
6	1356	VP6	capsídeo mediano (antigenicidade)
7	1104	NSP3	ligação no RNA viral
8	1059	NSP2	ligação no RNA viral
9	1062	VP7	capsídeo externo
10	751	NSP4	proteína transmembrana (enterotoxina viral)
11	667	NSP5 NSP6	proteína quinase

3.3.2.3 Patologia e sintomatologia

Os RV são os maiores agentes causadores de infecções gastrointestinais em crianças no mundo e são considerados patógenos que infectam enterócitos maduros das vilosidades intestinais. Em hospedeiros imunologicamente comprometidos, as infecções são agudas, com diarreias graves. A duração dos episódios pode variar de 2 a 5 dias, se o hospedeiro tiver hidratação adequada. Em hospedeiros imunocomprometidos, as infecções persistem por mais tempo, podendo chegar a meses (ESTES, *et al.*, 2001).

As gastroenterites causadas por RV são caracterizadas por fezes aquosas, vômitos e febre. A consequência mais grave desse tipo de infecção é a desidratação, uma vez que as perdas de fluidos e eletrólitos devido à diarreia e vômitos podem levar ao colapso fisiológico se não tratada corretamente (LEVINE, EDELMAN, 1979). O tratamento é o mesmo instituído para as doenças diarreicas agudas, sendo importante a reidratação para evitar possíveis complicações, como a desidratação

grave e distúrbios hidroeletrolíticos. O uso de antimicrobianos e antidiarreicos não é recomendado (BRASIL, 2006). A administração oral de preparações contendo anticorpos anti-RV tem apresentado sucesso no tratamento de infecções crônicas e diarreia em crianças imunocromprometidas (GURGEL, *et al.*, 2008).

Por ser uma importante causa de morte em crianças ao redor do mundo, com cerca de 611.000 casos por ano (PARASHAR, *et al.*, 2006), o desenvolvimento de vacinas que conferem proteção ao rotavírus tornou-se prioridade para agentes de saúde pública. Atualmente, existem duas vacinas licenciadas disponíveis contra o RV, a Rotateq da empresa Merck, que possui um espectro pentavalente de origem humano-bovino (G1, G2, G3, G4, e P8) e a Rotarix[®] da *Glaxo Smith Kline Biologicals*, que é monovalente (G1P8).

O Brasil foi um dos primeiros países da América Latina a incluir a vacina monovalente Rotarix[®] no programa de imunização em março de 2006. A vacina tem mostrado ser eficiente contra cepas não G2 (ANTUNES, *et al.*, 2009), sendo mais eficaz principalmente contra a G1P8 (MADHI, *et al.*, 2010). Em estudo realizado no Brasil, dozes meses após a introdução da vacina, foi observada uma redução significativa no número de hospitalizações por gastroenterite em crianças com menos de 1 ano de idade (GURGEL, *et al.*, 2009).

Lanzieri e colaboradores (2011) observaram um aumento no número de crianças vacinadas no Brasil, no qual cerca de 80 % das crianças foram vacinadas com a primeira dose da vacina anti-RV em 2008, demonstrando uma boa eficácia do programa de imunização nacional. No entanto, a cobertura da segunda dose permanece abaixo da ideal nas regiões Nordeste e Norte, onde são observadas as maiores prevalências de gastroenterite no país. No Espírito Santo, cerca de 87,1% das crianças foram vacinadas com a vacina Rotarix[®]. A recomendação para vacinar as crianças consiste em aplicar duas doses, a primeira pode ser administrada a partir da sexta semana de vida, sendo que um intervalo de pelo menos 4 semanas deve ser respeitado para aplicação da segunda dose. O esquema de vacinação deve ser realizado antes das 16 semanas de idade e finalizado por volta das 24 semanas de idade (Ministério da Saúde, 2009).

3.3.2.4 Epidemiologia

É possível que praticamente todas as crianças ao completarem cinco anos de idade já tenham sido infectadas pelo menos uma vez por RV. Normalmente, os sintomas mais evidentes da infecção aparecem quando a criança possui entre seis a vinte e quatro meses de idade (BISHOP, *et al.*, 1996).

Pelo fato do vírus ser estável no ambiente, sua transmissão pode acontecer por ingestão da água ou comida, além do contato direto com superfícies e objetos contaminados. Em países de clima temperado, o vírus possui um padrão sazonal, aparecendo com maior frequência no inverno, com epidemias anuais acontecendo principalmente de junho a dezembro. As taxas mais altas de enfermidade acontecem em crianças com até cinco anos de idade. Os adultos também podem ser infectados, entretanto, a doença em faixas etárias maiores tende a ser mais branda (CDC, 2012).

3.3.3 *Norovírus (NoV)*

3.3.3.1 Classificação

Originalmente, o NoV era conhecido como *Norwalk virus*. Essa denominação foi adotada depois de uma epidemia de gastroenterite aguda em crianças de uma escola em Norwalk, Ohio, EUA, em novembro de 1968 (DOLIN, *et al.*, 1972).

Sua taxonomia era confusa, em função desses vírus serem fastidiosos e ainda não passíveis de serem cultivados em laboratório. Somente a partir da clonagem e sequenciamento foi possível estabelecer uma classificação mais precisa. Baseado nas informações moleculares de filogenia, os vírus de Norwalk e seus “parentes” genéticos mais próximos se tornaram um novo gênero, o *Norovírus (NoV)*, da família *Caliciviridae* (KARST, 2010).

Cepas de NoV foram classificadas em seis genogrupos (GI-GVI) baseados na sequência de aminoácidos do capsídeo. Um sétimo genogrupo NoV (GVII) foi

proposto recentemente, mas sua classificação ainda é mantida inicialmente em GVI. Somente os genogrupos GI, GII e GIV podem infectar seres humanos, com o GII sendo o mais prevalente (> 95% das infecções por NoV) (GREEN, *et al.*, 2007; KRONEMAN, *et al.*, 2013 WHITE, 2014).

3.3.3.2 Estruturas morfológica, proteica e genômica

A partícula viral de NoV não possui envelope no capsídeo e é dotada de uma estrutura circular com simetria icosaédrica. O capsídeo tem um diâmetro de 27 a 30 nm, com 32 depressões em forma de cálice. O capsômero é claramente visível (Figura 6) (GLASS, *et al.*, 2000).

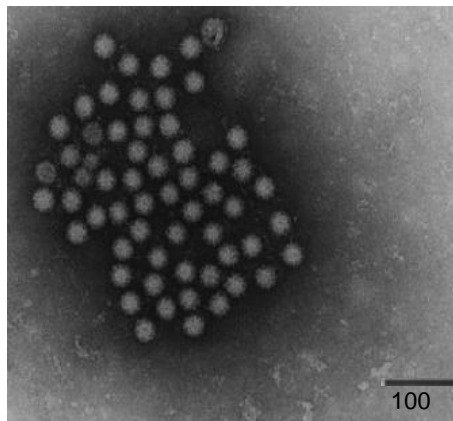


Figura 6. Partículas de norovírus extraídas de amostras de fezes (Fonte: <http://www.qub.ac.uk>, modificado).

O genoma do NoV contém aproximadamente 7.400 - 7.700 nt e é composto por 45 a 56% de citosina/guanina (C/G). Os NoV têm como material genético uma molécula linear de RNA fita simples (ssRNA) de polaridade positiva (+) (GLASS, *et al.*, 2000). As três Fases Abertas de Leitura (ORF - *Open Read Frame*) do genoma viral do NoV podem ser visualizadas na Figura 7.



Figura 7. Organização genômica das ORFs 1, 2 e 3 de norovírus (Fonte: KARST, 2010, modificado).

A primeira ORF codifica proteínas não estruturais denominadas NS (NS1-NS7), já os ORFs 2 e 3 são responsáveis por codificar proteínas estruturais do capsídeo (KARST, 2010).

3.3.3.3 Patologia e sintomatologia

Os NoV representam o grupo dos principais agentes causadores de gastroenterite e estão envolvidos em surtos que acometem crianças e adultos. Os sintomas mais comuns para esse tipo de infecção são náuseas, dores abdominais, vômito e diarreia não sanguinolenta. Geralmente, o período de incubação do NoV é de 24 a 48 horas, e os episódios duram cerca de 12 a 60 horas (BORCHARDT, *et al.*, 2003). Esses patógenos são altamente contagiosos, em decorrência da baixa dose infectante, e grande número de partículas são liberadas durante a infecção (cerca de até 10^{10} cópias de genoma por grama de fezes) e a excreção é continuada mesmo após o alívio dos sintomas clínicos (LEE; KIM, 2002). Diferentemente de outros vírus entéricos, há indícios de que os NoV podem ser transmitidos por via aérea em episódios de vômitos durante a infecção (CAUL, 1994). Grande parcela das infecções por NoV são assintomáticas, mas esses indivíduos são capazes de transmitir o vírus, embora com títulos mais baixos que os sintomáticos (HALL, *et al.*, 2011).

3.3.3.4 Epidemiologia

Surtos de diarreia têm sido associados à ingestão de NoV em água potável e em moluscos contaminados (HAFLIGER, *et al.*, 1999; APPLETON, 2000). Existem também evidências de surtos de infecções causados por calicivírus relacionados com a exposição a águas de fins recreacionais (JUSTINO, 2009), piscinas e lagos (FROST, *et al.*, 2002), infecções em cruzeiros (WIKSWO, *et al.*, 2011), hospitais (LOPMAN, *et al.*, 2004), entre outros. Dados epidemiológicos demonstram uma predominância da doença por NoV durante o inverno (APPLETON, 2000; BORCHARDT, *et al.*, 2003). Os NoV mostram ter boa sobrevivência e estabilidade em baixas temperaturas e a 60°C (GLASS, *et al.*, 2000).

O norovírus GII.4 tem sido documentado como o genótipo mais prevalente em surtos de gastroenterites associados a NoV em todo o mundo (MOTOMURA, *et al.*, 2008). Sabe-se que esses vírus acumulam mutações na região do genoma que codifica a proteína VP1, o que modifica os seus antígenos e causa uma variação antigênica gradual (SIEBENGA, *et al.*, 2007).

3.4 Métodos para detecção de vírus

Em casos de poluição ambiental, diversos métodos de detecção de microrganismos foram desenvolvidos, alguns deles utilizam a bioquímica ou genética dos microrganismos para identificá-los (STOECKEL; HARWOOD, 2007). Métodos baseados na amplificação do genoma se tornaram muito frequentes nas últimas décadas devido a sua praticidade e automatização (USEPA, 2005). Embora tenham as técnicas moleculares sejam muito úteis nas investigações microbiológicas, muito esforço ainda é dispensado para aprimorá-las. No início de sua utilização, a técnica de amplificação gênica (PCR) era apenas qualitativa e se limitava a determinar presença ou ausência dos genomas dos microrganismos nas amostras. Entre outras desvantagens, a técnica possuía baixa especificidade e elevado custo. Porém, o advento da PCR quantitativa permitiu quantificar o genoma dos microrganismos detectados (SHANNON, *et al.*, 2009).

A PCR convencional ainda é muito utilizada na identificação de patógenos virais. Essa técnica possui variações tais como: Nested-PCR, PCR Multiplex, PCR em Tempo Real (qPCR) e/ou *microarrays* (OLOFSSON, *et al.*, 2011). A confirmação do vírus requer passos adicionais, como o sequenciamento do ácido nucleico detectado e construção de relações filogenéticas (TCHÍJKOV, *et al.*, 2002). Também são relatadas desvantagens na utilização dos métodos moleculares, uma delas é a possibilidade de resultados falsos negativos na PCR, gerados pela presença de inibidores da atividade enzimática nas amostras ambientais. Isso acontece porque esses inibidores não são totalmente removidos durante o processo de extração do ácido nucleico viral (SYRMIS, *et al.*, 2004).

As etapas básicas de uma análise molecular para detecção de vírus em amostras ambientais são: amostragem, concentração, extração dos ácidos nucleicos e a

detecção do genoma viral. A concentração é um passo crucial, pois os vírus podem estar presentes em números relativamente reduzidos, de modo que é necessário concentrá-lo, reduzindo o volume da amostra para posterior detecção (BOSCH, 1998). Atualmente existem várias estratégias utilizadas para se concentrar vírus em amostras da água, que são principalmente baseadas em técnicas de adsorção/eluição, floculação, ultrafiltração e ultracentrifugação (Quadro 12).

Quadro 12. Principais técnicas para concentração de vírus em amostras ambientais
(Fonte: MATTISON; BIDAVID, 2009, modificado).

Preparação da amostra	Vantagens	Desvantagens
Adsorção/Eluição	Amplo espectro	Presença de inibidores Somente para amostras com baixa turbidez
Floculação	Simple Baixo custo Amplo espectro	Lento Presença de inibidores Necessita de etapas adicionais
Ultrafiltração	Rápido Amplo espectro	Presença de inibidores Somente para amostras com baixa turbidez
Ultracentrifugação	Rápido Amplo espectro	Presença de inibidores Alto custo de equipamento Somente para amostras com baixa turbidez

Ainda não existe um método único que garanta uma concentração eficiente de todos os vírus. Um bom método de concentração deve obedecer a vários critérios, como ser tecnicamente simples, rápido, ter um custo de moderado a baixo, permitir uma recuperação viral alta, ser adequado para uma grande variedade de vírus e fornecer um pequeno volume do concentrado (BOSCH, 1998). Atualmente, diversos estudos têm mostrado que os métodos de floculação e adsorção/eluição combinados com ultracentrifugação ou ultrafiltração costumam ser os mais utilizados para se concentrar vírus em amostras ambientais (FERNANDÉZ, *et al.*, 2012; KISHIDA, *et al.*, 2012; MORESCO, *et al.*, 2012; OLIVEIRA, *et al.*, 2012).

Esses métodos são baseados na interação eletrostática entre os vírus e a superfície dos floculos/membranas e dependem de alguns fatores para que essa interação seja

estabelecida, tais como os pontos isoelétricos das proteínas virais e os parâmetros de qualidade da água, como pH e concentração salina, em faixas específicas. A interação eletrostática faz com que as partículas virais sejam adsorvidas aos flocos/membranas em pH ácido. Um dos problemas é que além de concentrar os vírus, substâncias inibidoras da PCR também podem ser concentradas (CALGUA, *et al.*, 2008).

Diversas técnicas têm sido utilizadas para detecção de vírus em amostras ambientais. A PCR vem sendo escolhida preferencialmente por conferir várias vantagens quando comparada a técnicas como cultura de células. O tempo exigido para o ensaio pode ser reduzido de dias ou semanas para horas. Em análises rotineiras, os custos da PCR são substancialmente menores que os custos de técnicas de cultura de células, além da PCR já estar amplamente padronizada. A técnica de PCR é utilizada para identificação de patógenos específicos na água, porém não pode ser usada para determinar o estado infeccioso de um organismo (FONG; LIPP, 2005), podendo somente determinar a presença, ausência ou quantificar a sequência específica do ácido nucleico do patógeno (PILLAI, *et al.*, 1991; ABBASZADEGAN, *et al.*, 1993).

A Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (qPCR) possui o mesmo princípio da PCR convencional, porém um dos maiores avanços desse aprimoramento é a capacidade de quantificar os produtos gênicos da amostra, além do processo poder ser monitorado em tempo real. Os dados são coletados ao longo dos ciclos da PCR, ao invés de o serem apenas no final da reação. Isso revolucionou completamente o modo de abordagem da quantificação pela PCR (KWOK; HIGUCHI, 1989).

O ponto que detecta o ciclo na qual a reação atinge o limiar da fase exponencial é denominado *Cycle Threshold* (C_T) e permite a quantificação exata e reprodutível baseado na fluorescência referênciada a uma curva padrão (NOVAIS, *et al.*, 2004). A qPCR utiliza o momento durante o ciclo da reação no qual a amplificação de um alvo é detectada pela primeira vez, ao invés da quantidade de alvo acumulado após um número fixo de ciclos. Quanto mais alto o número de cópias iniciais do ácido nucleico alvo, mais rápido será observado o aumento significativo na fluorescência,

que é à base da quantificação da técnica (MACHAYI, *et al.*, 2002). A emissão dos compostos fluorescentes gera um sinal que aumenta proporcionalmente a quantidade de produto de PCR. Sendo assim, os valores da fluorescência são gravados durante cada ciclo e representam a quantidade de produto amplificado.

Existem vários sistemas para detecção de sequências de ácidos nucleicos na técnica de qPCR, os dois mais utilizados pelos pesquisadores pertencem à Applied Biosystems: o sistema TaqMan[®] (também conhecido como “ensaio para nuclease 5’ fluorescente”) e o sistema do corante SYBR[®] Green I.

O sistema TaqMan[®] utiliza uma sonda fluorescente para possibilitar a detecção de um produto específico da qPCR, conforme esse se acumula durante os ciclos da reação. O método consiste na atividade exonucleásica da DNA polimerase. Já o sistema do corante SYBR Green I utiliza um fluoróforo que possui ligação específica à dupla fita de DNA para detectar o produto da qPCR, conforme ele se acumula durante os ciclos da reação. A diferença mais importante entre os dois sistemas é que o SYBR Green I detectará todo o DNA dupla-fita da reação, inclusive produtos de reação não específicos, por isso deve ser bem padronizado antes da análise. Portanto, uma reação bem otimizada é essencial para resultados precisos (WALKER, 2000).

A maioria dos laboratórios de virologia clínica utiliza ensaios de RT-PCR (transcrição reversa seguida de PCR convencional) para detecção de vírus entéricos de genoma RNA em casos de doenças diarreicas (LYSÉN, *et al.*, 2009). A RT-qPCR (transcrição reversa seguida de PCR em Tempo Real), especificamente baseada em sondas Taqman[®], tem sido vastamente utilizada para detecção de NoV (KAGEYAMA, *et al.*, 2003). As amostras positivas obtidas na qPCR podem ser subsequentemente avaliadas por ensaios de PCR convencional e sequenciadas para confirmação dos resultados (LYSÉN, *et al.*, 2009).

Para caracterização dos genótipos de NoV, a região de junção da ORF1-ORF2 é a área mais conservada do genoma, apresentando um alto grau de homologia na sequência de nucleotídeos (Figura 8). Essa característica faz dessa região o local

ideal para a síntese de iniciadores nos ensaios utilizando sondas TaqMan[®] para RT-qPCR. A região mencionada demonstra ser mais sensível que a região da RNA polimerase (RdRp) utilizada nos ensaios qualitativos da RT-PCR (KAGEYAMA, *et al.*, 2003). Além de detectar RNA de NoV em amostras clínicas, otimizações dos iniciadores resultaram em ensaios sensíveis capazes de detectar NoV em amostras ambientais (FROST, *et al.*, 2002). A sensibilidade analítica da RT-qPCR permite a detecção de pequenas concentrações de vírus que podem estar presentes em amostras de indivíduos com infecções assintomáticas. Por essa razão, resultados de infecções mistas com baixas cargas virais, ou seja, altos valores de CT (*cycle threshold* - ciclo do limiar de detecção) devem ser avaliados com precaução.

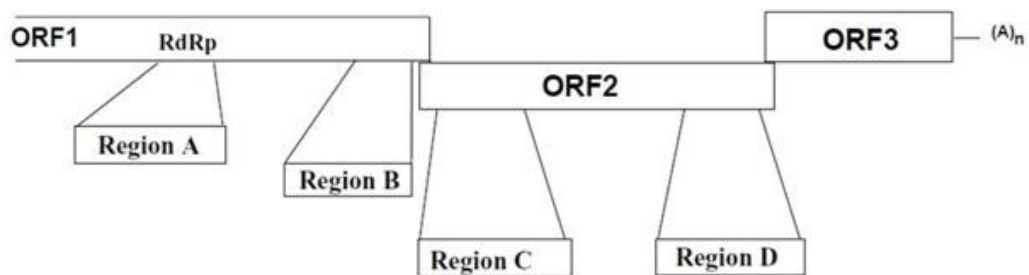


Figura 8. Regiões do genoma de norovírus utilizadas para detecção para ensaios moleculares de amplificação do ácido nucleico viral (Fonte: VINJE, *et al.*, 2004, modificado).

O diagnóstico das infecções causadas por AdV era laborioso e demorado, realizado principalmente por cultura de células. Com a evolução da técnica de PCR, abriu-se um novo campo para identificação mais sensível e específica de AdV. A maior parte das análises é feita por iniciadores que hibridizam com a região do gene hexon, o mais altamente conservado no genoma de adenovírus (HERNROTH, *et al.*, 2002).

A RT-nested-PCR tem sido empregada para a detecção do genoma viral de RV e exibe sensibilidade e especificidade altas, fundamentando-se na amplificação enzimática dos genes VP7 (tipo G) e VP4 (tipo P), utilizando iniciadores consensuais específicos (GOUVEA, *et al.*, 1990; GENTSCH, *et al.*, 1992; DAS, *et al.*, 1994). Uma variação dessa técnica reside na RT-qPCR, que é mais sensível e que permite quantificar a carga viral nas amostras. A região do genoma que tem sido utilizada

para detecção e quantificação de rotavírus para ensaios de RT-qPCR é a do gene NSP3 (ZENG, *et al.*, 2008).

De fato, ainda não existe um protocolo único para detecção de todos os vírus. É necessário que as pesquisas tenham continuidade e busquem o desenvolvimento de protocolos para ensaios moleculares eficientes e acessíveis para serem utilizados na rotina da avaliação virológica. Em se tratando de monitoramento ambiental, é importante também estabelecer um indicador viral “universal” que seja capaz de monitorar a presença de todos os vírus patogênicos e de garantir uma boa qualidade da água destinada ao consumo humano em termos de segurança virológica (BOSCH, 1998).

3.5 O sistema estuarino e o manguezal da Baía de Vitória

Os estuários são considerados ambientes aquáticos costeiros onde há fluxo de água doce com efeito diluidor das águas marinhas. Esses ambientes possuem conexão com o mar aberto, apresentam grande diversidade fisiográfica e condições hidrodinâmicas variáveis (CAMERON; PRITCHARD, 1963 apud SCHETTINI, *et al.*, 2000). Sua geomorfologia está associada às marés e à descarga fluvial, que geram padrões de circulação específicos para cada estuário. Em consequência, os estuários podem atuar como filtros ou como exportadores de nutrientes para a zona costeira adjacente. Mudanças nas condições hidrodinâmicas estuarinas podem acarretar em alterações severas no comportamento de um determinado estuário em relação ao aporte de matéria recebida (SCHETTINI, *et al.*, 2000).

Em regiões abrigadas, como estuários, baías e lagunas, se desenvolvem ecossistemas tipicamente costeiros, chamados de manguezais. Esses ecossistemas apresentam condições propícias para alimentação, proteção e reprodução de muitas espécies animais, sendo considerados importantes transformadores de nutrientes em matéria orgânica. Em todo o planeta, os ecossistemas manguezais ocupam cerca de 70% da região costeira tropical e subtropical (CÍNTRON, *et al.*, 1985).

Diversas características foram descritas como determinantes para distribuição dos manguezais, tais como a temperatura média do mês mais frio superior a 20 °C,

substrato lamoso, ambiente costeiro abrigado, presença de água salgada, grande amplitude de marés, costa rasa e presença de correntes oceânicas com temperaturas favoráveis (WALSH, 1974).

Esse ecossistema é utilizado como local de desova e abrigo de grande parte da população de peixes. Durante a maré cheia, o manguezal retém água e nutrientes, devolvendo os recursos durante a maré baixa. Também podem armazená-la nas épocas de elevada pluviosidade, além de possuir fontes de alimentação para populações ribeirinhas (BRAZ; FILHO, 2001).

Ao longo da costa brasileira, a maior parte dos manguezais está associada a regiões estuarinas (HERZ, 1991). O Brasil possui de 10.000 a 25.000 km² de manguezais, (YOKOYA, 1995). Do Amapá até Santa Catarina são encontrados ao longo de todo o litoral, margeando estuários, baías, lagunas e enseadas (Figura 9). Os estados do Maranhão, Pará, Amapá e Bahia, nessa ordem, são os que possuem maiores áreas de manguezais, e juntos somam mais de 80% do total brasileiro; sendo que somente o Maranhão apresenta cerca de 40% dessa extensão (KJERFVE; LACERDA, 1993).

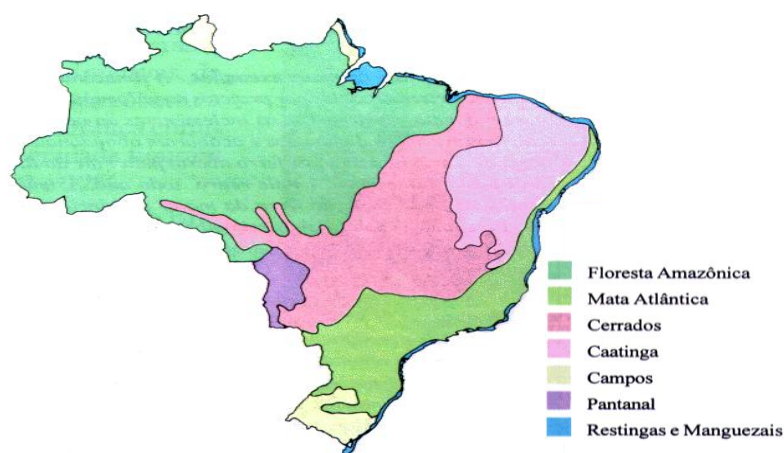


Figura 9. Distribuição dos biomas ao longo da costa brasileira (Fonte: <http://educar.sc.usp.br/ciencias/ecologia/ecologia.html>).

No estado do Espírito Santo, os manguezais mais extensos são encontrados no estuário da Baía de Vitória e nos rios Piraqueçu, São Mateus, Benevente e Itabapoana (VALE; FERREIRA, 1998). A Ilha de Vitória (Figura 10) está situada em uma região estuarina, formada pela desembocadura dos rios Santa Maria da Vitória,

Jucu, Bubu, Itanguá, Marinho e Aribiri (SÁ, 1995). A Baía de Vitória é a parte principal desse complexo sistema estuarino tropical e apresenta dois canais de comunicação com o mar: o Canal da Passagem e o Canal do Porto (BASTOS; QUARESMA, 2007). Em quase todo seu entorno é encontrada região de manguezal. O maior manguezal urbano do Estado está localizado nessa região, ao lado do bairro Ilha das Caieiras, com uma área de aproximadamente 891 hectares (PMV, 2009), onde a largura da baía chega a 1,60 km, com cerca de 4 m de profundidade (RIGO, 2004).

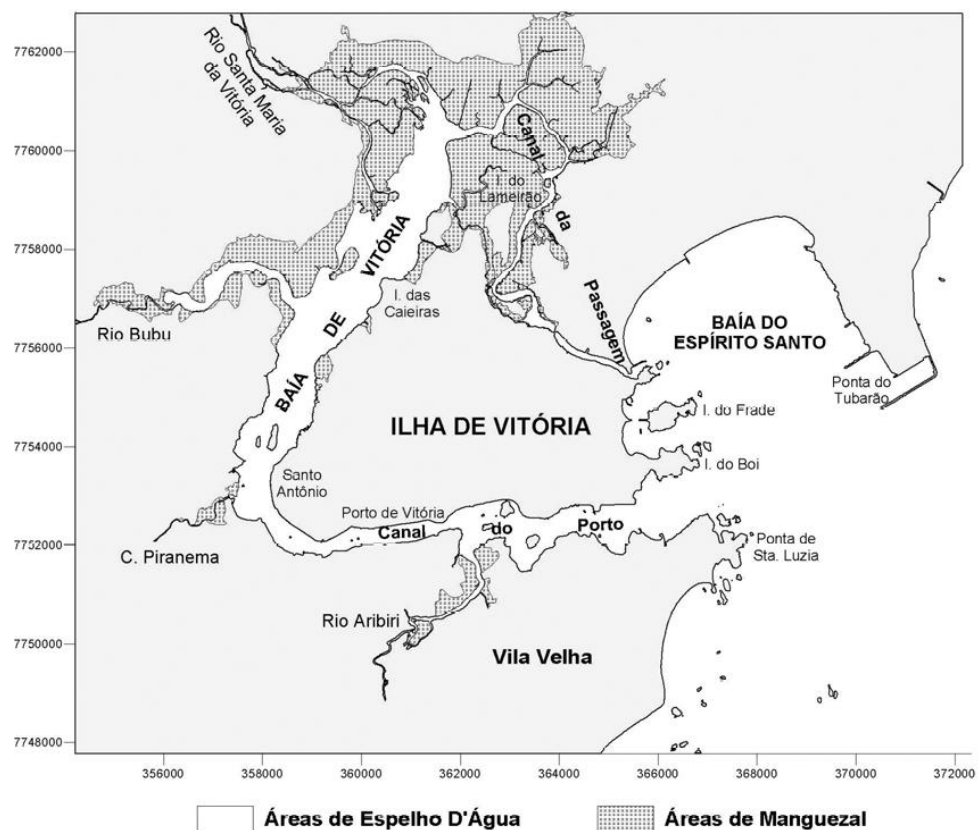


Figura 10. Localização do sistema estuarino da Baía de Vitória, ES, Brasil (Fonte: VERONEZ, *et al.*, 2009).

O ecossistema manguezal da Ilha de Vitória vem sendo intensamente impactado, principalmente em virtude do crescimento populacional desordenado. As comunidades são formadas no interior das regiões de manguezal, como observado nos bairros São Pedro, Santo Antônio, Maria Ortiz e Aribiri.

Em estudo realizado por Jesus e colaboradores (2004), alguns locais da Baía de Vitória foram classificados como contendo baixo teor de oxigênio dissolvido na água, em consequência do descarte de esgoto orgânico sem tratamento. Nos manguezais de Vitória, várias espécies são utilizadas pela população local para alimentação (SÁ, 1995). Existem diversos restaurantes que ficam à margem da baía e são conhecidos por servirem pratos tipicamente capixabas, como a moqueca, ostra e sururu, além de outros frutos do mar e utilizam também os animais desse ecossistema.

A faixa urbana da região ocupa uma área aproximada de 3.600.782 m² (PMV, 2009), com uma população de aproximadamente 33.746 habitantes (IBGE, 2010). O ambiente local recebe um aporte de efluente sanitário sem tratamento, além de esgotos tratados por duas grandes Estações de Tratamento de Esgotos (ETE), situadas em Vitória, no vale de Mulembá e em Jardim Camburi. Somente o Canal dos Escravos recebe esgoto tratado proveniente da ETE de Camburi. Segundo a Companhia Espírito Santense de Saneamento (CESAN), 14.990 ligações (40,54% do total dos pontos disponíveis) ainda precisam ser efetuadas pelos moradores da capital. Se as quase 15 mil ligações forem feitas, 6.907.382 litros de esgoto por dia deixarão de ser lançados diretamente na natureza. Além de minimizar o problema gerado pelo esgoto produzido no município de Vitória, a ação possibilitaria diminuir o impacto sofrido pelo meio ambiente. Contudo, seria necessário que isso também ocorresse nas cidades vizinhas, como Vila Velha, Cariacica e Serra, para que o mar e a Baía de Vitória deixem de receber esse aporte constante de esgoto não tratado. Nos demais municípios da Região Metropolitana da Grande Vitória, grande parte do esgoto produzido ainda é lançado no mar. Atualmente um projeto de instalação de uma ETE na região da Ilha das Caieiras encontra-se em fase final de aprovação pela prefeitura de Vitória, o que poderá reduzir a carga de esgoto doméstico despejada no ecossistema aquático da região (PMV, 2013).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Área de estudo

O presente estudo foi realizado na área estuarina situada adjacente à região de São Pedro (Figura 11 e 12), que ocupa uma área de cerca de 3.600.782 m² (PMV, 2009), com uma população de aproximadamente 33.746 habitantes (IBGE, 2010), estando a 4 km do centro da cidade. Esse estuário está localizado na Baía de Vitória, que fica entre os municípios de Vitória, Vila Velha, Cariacica e Serra, nas coordenadas 20°15'S – 40°22'W e 20°20'S – 40°16'W. Os principais rios que deságuam no local são os rios Bubu e Santa Maria da Vitória, sendo que o último é o principal contribuinte de água doce para a Baía de Vitória (FERREIRA, 1989).



Figura 11. Imagem de satélite dos sítios de coleta de água no manguezal da Baía de Vitória, destacando a região de São Pedro, Vitória, ES (Fonte: Google Earth, 2012, modificado).



Figura 12. Mapa do município de Vitória subdividido em regiões (I a VIII), destacando a região VII (Fonte: <http://www.vitoria.es.gov.br/regionais/principal/reg7.asp>).

4.2 Coleta das amostras de águas superficiais

As coletas de águas superficiais foram realizadas mensalmente em 4 sítios georreferenciados (Quadro 13, Figura 17), utilizando aparelho GPS (GPSMAP[®]76, Garmin), no período de setembro de 2011 a agosto de 2012. O critério para seleção dos pontos de coleta de água foi obtido com base em informações disponibilizadas pelos pescadores da região sobre os locais de pesca e de emissão de esgoto sanitário não tratado no ambiente, além de resultados de pesquisas realizadas anteriormente na mesma área de estudo (JUSTINO, 2009).

Quadro 13. Caracterização dos sítios de coleta de águas superficiais da Baía de Vitória, Espírito Santo, Brasil.

Sítio de coleta	Descrição	Coordenadas geográficas
1	Foz do rio Santa Maria da Vitória	S 20°15'64 W 40°19'96
2	Entre a foz dos rios Santa Maria da Vitória e Bubu	S 20°16'26 W40°20'63
3	Cais do bairro Ilha das Caieiras	S 20°16'59 W 40°20'21
4	Foz do rio Bubu	S 20°16'52 W 40°21'08

As amostras de água foram coletadas de forma manual em aproximadamente 10 cm de profundidade da coluna d'água. As coletas foram feitas em período matutino, com a maré de 0,8 m enchente, previamente calculada pela consulta à tábua de maré obtida no Banco Nacional de Dados Oceanográficos (BNDO, 2012). Essa altura foi adotada para viabilizar também a coleta de espécies de bivalves de um projeto que foi desenvolvido na mesma época. A partir do mês de outubro de 2011, a maré adotada foi de 0,3 m enchente, para auxílio nas coletas de outro projeto, desta vez para coletas de sedimento nos mesmos pontos georreferenciados.

4.3 Análises dos parâmetros físico-químicos da água

Para todas as análises realizadas no LABSAN/UFES, as amostras de água foram coletadas em frascos de vidro âmbar estéreis e armazenadas em caixas de isopor contendo gelo para conservação do material.

A fim de se caracterizar a qualidade da água superficial do manguezal estudado, foram realizadas as seguintes análises físico-químicas: pH, oxigênio dissolvido (OD), temperatura, salinidade, condutividade e turbidez (Quadro 14).

Quadro 14. Análises físico-químicas e seus respectivos métodos analíticos.

Variável	Equipamento	Método Analítico	Referência
pH	pHmetro de bancada <i>DM-22 Digimed</i>	Eletrométrico	APHA (2005)
OD (mg L ⁻¹)	----	Titulométrico (Winkler)	APHA (2005)
Temperatura (°C)	Termômetro	Termometria	APHA (2005)
Salinidade (‰)	Salinômetro <i>Bioprix</i>	Refratometria	APHA (2005)
Condutividade (µS/cm ²)	Condutivímetro Jenco electronics, 1671	Potenciométrico	APHA (2005)
Turbidez (UNT)	Turbidímetro microprocessado <i>Alfakit</i>	Nefelométrico	APHA (2005)

4.4 Análises de coliformes termotolerantes e *Enterococci* da água

As quantificações de coliformes termotolerantes e *Enterococci* foram realizadas através da metodologia da Membrana Filtrante (MF), conforme estabelecido pelo APHA (2005) para análises de água (Figura 13).

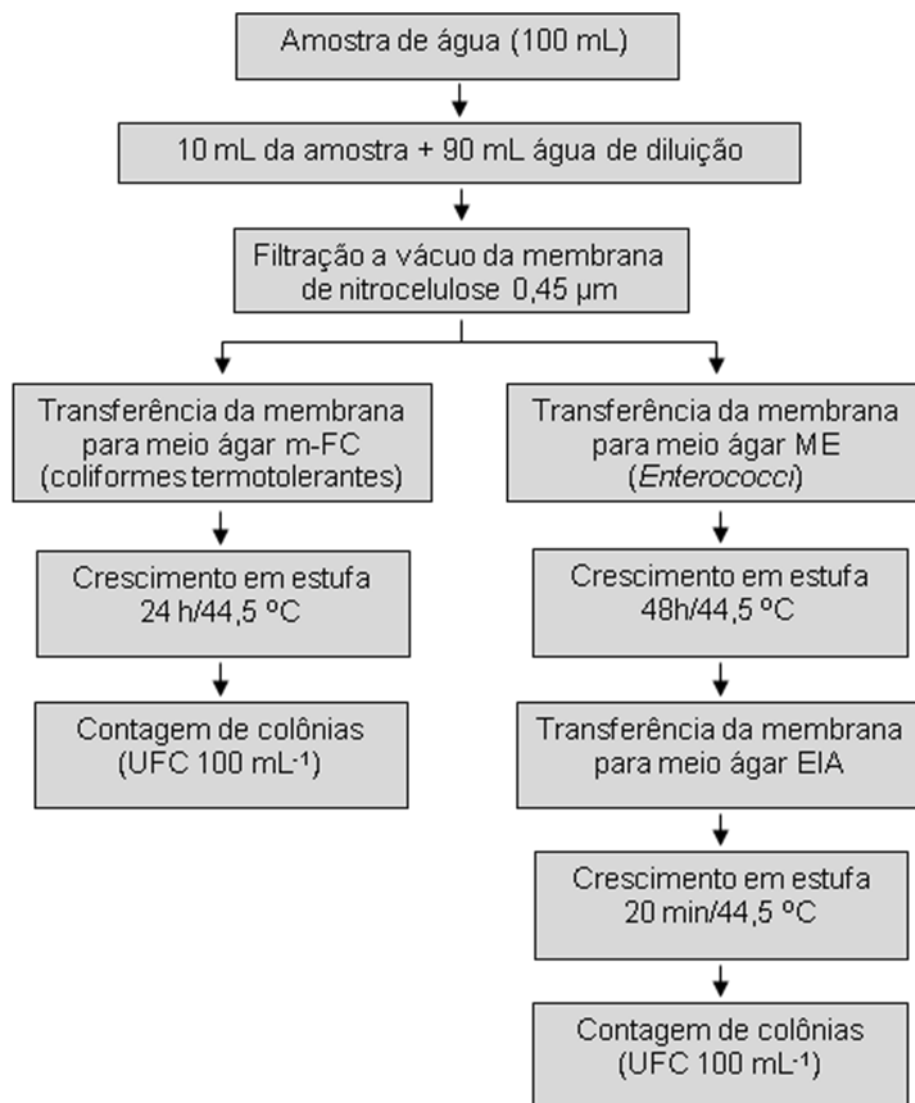


Figura 13. Fluxograma das etapas realizadas na quantificação de coliformes termotolerantes e *Enterococci* nas amostras de águas superficiais.

4.5 Amostras clínicas e população de estudo

4.6.1 Definição de caso

Na presente pesquisa, foi realizado um estudo descritivo dos casos de gastroenterite infantil. Adotou-se como diarreia a ocorrência de três ou mais dejeções líquidas ou amolecidas, com ou sem sangue, num período de 24 horas. Considerava-se terminado o episódio quando eram constatados três ou mais dias sem diarreia (CDC, 2003). O grupo participante do estudo foi constituído por crianças¹ residentes na região de São Pedro e atendidas na Policlínica de São Pedro ou na Unidade de Saúde da Ilha das Caieiras (Figura 14).



Figura 14. Vista frontal dos locais de atendimento da população infantil da região de São Pedro, Vitória-ES. A) Policlínica de São Pedro; B) Unidade de Saúde da Ilha das Caieiras.

O convite à pesquisa se deu através do termo de consentimento (Apêndice 3) aos pais ou responsáveis pelo menor, onde foi explicado o objetivo do estudo, bem como sua importância e necessidade. Na abordagem, os responsáveis pela criança foram questionados sobre a ocorrência da diarreia, além de outros sintomas associados (Apêndice 4).

¹segundo o Estatuto da Criança e do Adolescente, lei nº 8.069, de 13 de julho de 1990, artigo 2º, “considera-se criança, para os efeitos desta Lei, qualquer pessoa até doze anos de idade incompletos (...)”.

Após o término da entrevista, os responsáveis receberam um recipiente para coletar as fezes (potes plásticos para análise viral), com o número de identificação da criança e o número de telefone do LABSAN (Laboratório de Saneamento da UFES). As fezes coletadas foram entregues nas Unidades de Saúde, armazenadas a 4 °C e encaminhadas ao LABSAN da UFES.

4.5.2 Tamanho da amostra

O estudo foi desenvolvido na região de São Pedro, cuja população é de aproximadamente de 35.000 pessoas. Para a realização do cálculo amostral, foi utilizada a ocorrência de infecções intestinais notificadas ao Sistema Único de Saúde (SUS) em crianças da região. Assumindo-se um estudo descritivo, o cálculo do tamanho da amostra para um nível de confiança de 95% foi de 130 crianças.

4.5.3 Critérios de inclusão e exclusão

Os critérios de inclusão considerados no presente estudo foram os seguintes: ter no máximo 12 anos de idade, ser residente da região de São Pedro (localidade situada próximo ao manguezal), ter diarreia num prazo de até 24 horas anterior ao registro na Unidade de Saúde e ser cadastrado na Policlínica de São Pedro ou na Unidade de Saúde da Ilha das Caieiras. Foi excluída do estudo a criança que não teve autorização para participar da pesquisa ou não entregou a amostra fecal.

4.5.4 Aspectos éticos da pesquisa

Esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), sob o nº 41/2011 (Apêndice 1). A coleta de fezes da população infantil foi autorizada pela Escola Técnica e Formação Profissional de Saúde (ETSUS) (Apêndice 2), da Secretaria Municipal de Saúde (SEMUS), vinculada à Prefeitura Municipal de Vitória (PMV). O estudo foi desenvolvido com crianças de até 12 anos, porque as infecções intestinais são mais comuns e significativas na infância, principalmente a partir do desmame, devido aos prejuízos que essas infecções provocam no desenvolvimento da criança.

4.6 Análises de vírus entéricos em águas superficiais e fezes humanas

A detecção de vírus entéricos foi realizada por amplificação do ácido nucleico viral, de acordo com as seguintes etapas do fluxograma abaixo (Figura 15).

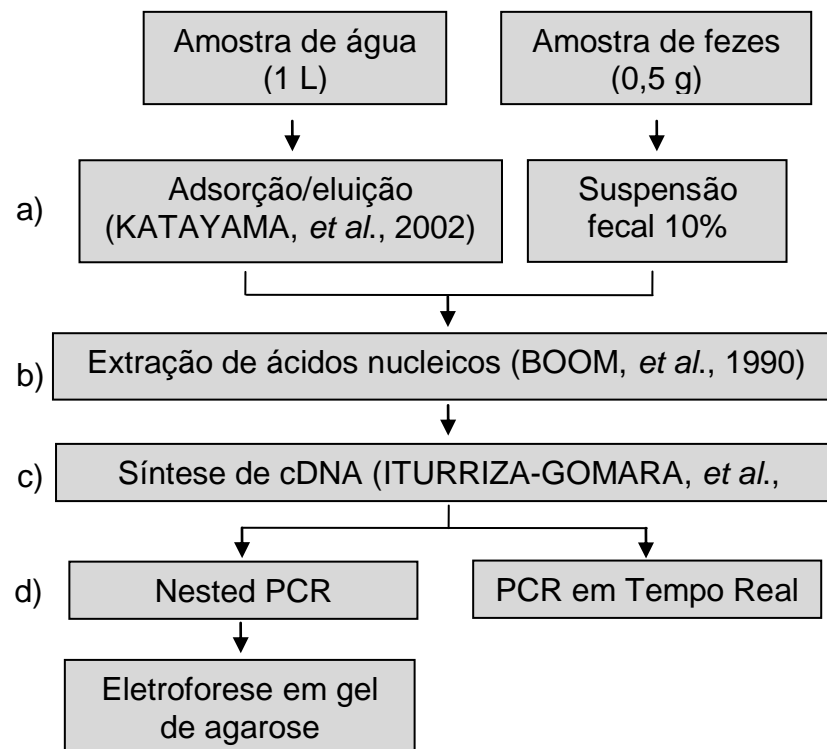


Figura 15. Esquema geral das etapas para detecção de partículas virais em amostras de águas superficiais e fezes humanas (a- concentração e suspensão; b- extração de ácido nucleicos; c- transcrição reversa; d- ensaios moleculares para detecção e quantificação do ácido nucleico viral).

4.6.1 Preparação das amostras para os ensaios moleculares de detecção do ácido nucleico viral

a) Concentração das amostras de água

Na Figura 16, são descritas as etapas realizadas para concentração das amostras de água, de acordo com o método proposto por Katayama *et al.* (2002). Considerando-se que as amostras de água deste estudo foram diferentes daquelas utilizadas por Katayama *et al.* (2002), foram introduzidas algumas modificações na metodologia para adequá-la às condições de águas não salinas.

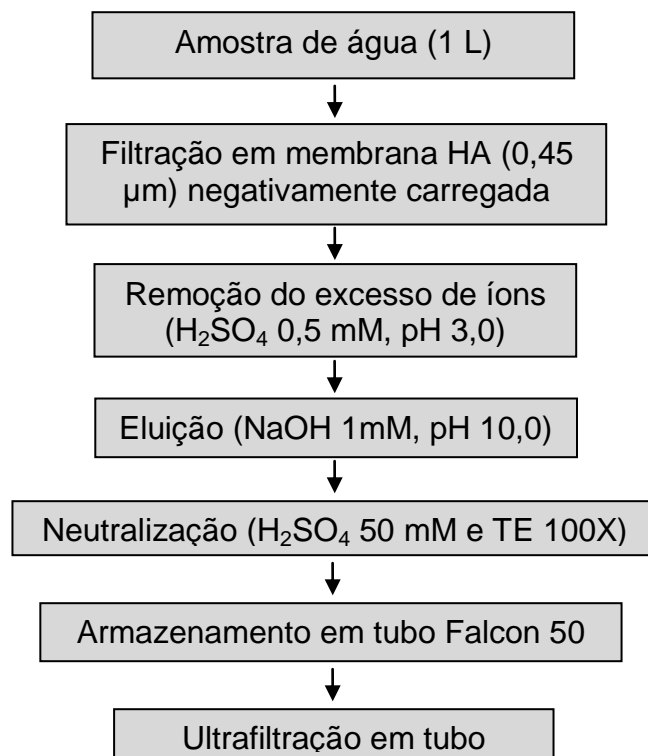


Figura 16. Esquema para concentração de partículas virais em amostras de água (KATAYAMA, *et al.*, 2002, modificado).

As amostras de 1 L foram filtradas através de um sistema a vácuo (Figura 17) com membrana carregada negativamente (*Millipore*) com 142 mm de diâmetro e 0,45 µm de porosidade. Foi adicionado a cada amostra 1000 mL de tampão Tris/Ca⁺²pH=7,2 e em seguida a solução foi filtrada em uma membrana de 1,2 µm para retirada dos sólidos com maior diâmetro. O pH foi ajustado para 3,0 e 3,5 com HCl 10N e a

amostra foi filtrada em membrana com porosidade de 0,45 μm . Após esse procedimento, o filtrado não foi mais utilizado. Em seguida, a membrana foi lavada com 200 mL de H_2SO_4 0,5 mM. Depois da lavagem, a membrana foi eluída com 12 mL de NaOH 1 mM. O eluato foi filtrado e coletado em um becker contendo 50 μL de H_2SO_4 50 mM e 50 μL de TE 100X para posterior armazenamento em tubo Falcon de 50 mL. Entre uma amostra e outra, o sistema de filtração foi descontaminado com 500 mL de solução de hipoclorito 10% por 15 minutos, 1 L de solução de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 50 mgL^{-1} e 1 L de água destilada.



Figura 17. Sistema de filtração a vácuo (*Millipore*), constituído por uma (a) bomba a vácuo, (b) recipiente para acondicionamento do volume de água da amostra e (c) local para inserção da membrana. Também é possível visualizar a amostra após filtração (d).

Após a eluição ser finalizada, o eluato foi transferido para tubos Amicon Ultra-15 (*Millipore*), para realização da técnica de ultrafiltração, que consiste em centrifugar a amostra a 6700 x g a 4 °C até que o volume da amostra alcançasse aproximadamente 400 μL . A amostra permaneceu em freezer a -80 °C até a extração de ácidos nucleicos.

b) Suspensão das amostras fecais (10%)

As suspensões foram preparadas em capela de fluxo laminar com sistema de exaustão destinada a este procedimento. Foi adicionado aproximadamente 0,5 g de

amostra de fezes em 5mL de Tris/HCl 0,01M com 0,0015M de CaCl₂, pH= 7,2 em tubo de centrífuga, seguido de homogeneização em vortex. A amostra foi centrifugada a 1500 x G a 4 °C por 20 min. Em seguida, o sobrenadante foi coletado e transferido (± 4 mL) para um frasco e o restante foi desprezado em hipoclorito de sódio 5%. O material foi mantido a -20 °C até o momento da análise.

c) Extração dos ácidos nucleicos

A extração de ácidos nucleicos foi realizada seguindo instruções do protocolo desenvolvido por Boom e colaboradores (1990). O método se baseia na adsorção dos ácidos nucleicos em micropartículas de sílica seguida de lise celular, utilizando-se o tiocianato de guanidina/EDTA para dissociação da ribonucleoproteína viral. Um volume de aproximadamente 30 µL foi obtido ao final de cada etapa de extração.

As moléculas de ácidos nucleicos extraídas foram submetidas à reação de transcrição reversa para a obtenção do DNA complementar (cDNA). Esse procedimento foi adotado, pois dois dos três vírus pesquisados possuem ácido nucleico de tipo RNA (rotavírus e norovírus).

d) Reação de transcrição reversa para síntese de cDNA

O DNA complementar (cDNA) foi sintetizado a partir de ácido nucleico extraído de todas as amostras, conforme protocolo proposto por Iturriza-Gomara e colaboradores (1999). Foi adicionado 1 µL do iniciador randômico hexanucleotídico pDN6™ (*Amersham*) a 5 µL de ácido nucleico extraído, desnaturado a 97 °C por 7 min com 1 µL DMSO. Em seguida, foi feita uma mistura de reação adicionando-se 2 µL de cada dNTP (2,5 mM), 1,25 µL de MgCl₂ (50 mM), 0,3 µL de *transcriptase reversa* (RT *superscript* II 200U/µL), 11,95 µL de H₂O Milli-Q e 2,5 µL 10X buffer a 42 °C por 1 hora, seguida de 95 °C por 10 min. Após reação, o cDNA foi armazenado em freezer à temperatura de -20 °C, para posteriores ensaios de PCR e qPCR.

4.6.2 Análises qualitativas por ensaios de PCR

Antes de cada etapa de amplificação do material genético por PCR, o DNA viral foi quantificado em um espectrofotômetro *Amersham Pharmacia modelo Ultrospec 1000*. Os programas das reações de PCR e nested-PCR para HAdV, RVA e NoVGII encontram-se detalhados nos Quadros 15 e 16, respectivamente. Todas as etapas foram realizadas em um termociclador *PTC-100, versão 7.0, MJ Research*.

Quadro 15. Programa de ciclos para reações de 1ª PCR de adenovírus humano (HAdV), rotavírus grupo A (RVA) e norovírus genogrupo II (NoVGII).

Etapa	HAdV	RVA	NoVGII
Desnaturação	94°C/ 5min	94°C/ 5min	94°C/5min
Anelamento e extensão	94°C/ 20s } 60°C/ 20s } 35x 72°C/ 30s }	94°C/ 20s } 60°C/20s } 35x 72°C/ 30s }	94°C/ 30s } 50°C/1min } 40x 72°C/ 30s }
Extensão final	72°C/ 7min	72°C/ 7min	72°C/ 7min

Quadro 16. Programa de ciclos para reações de nested-PCR de adenovírus humano (HAdV), rotavírus grupo A (RVA) e norovírus genogrupo II (NoVGII).

Etapa	HAdV	RVA	NoVGII
Desnaturação	94°C/ 5min	94°C/ 5min	94°C/5min
Anelamento e extensão	94°C/30s } 60°C/30s } 35x 72°C/1min }	94°C/30s } 60°C/30s } 35x 72°C/1min }	94°C/ 30s } 50°C/1min } 40x 72°C/ 30s }
Extensão final	72°C/ 5min	72°C/ 5min	72°C/ 7min

A amplificação dos fragmentos específicos de HAdV, RVA e NoVGII foi realizada com 1,0 µg de DNA ou cDNA (Quadro 17). Após a 1ª reação de PCR, 1 µL do produto dessa análise foi utilizado na reação de nested-PCR. Os iniciadores utilizados encontram-se no Quadro 18. Para detecção de NoV, somente o genogrupo II (GII) foi pesquisado, devido à prevalência mundial de GII frente ao GI (LEES, 2000).

Quadro 17. Concentrações finais dos reagentes da PCR convencional em cada reação de amplificação do ácido nucleico viral.

Vírus	PCR	Tampão10X	dNTP	MgCl ₂	Iniciadores	TAQ
HAdV	1ªPCR	1X	200 µM	1,5 mM	0,4 µM	1U
	nPCR	1X	200 µM	1,5 mM	0,4 µM	1U
RVA	1ªPCR	1X	200 µM	1,5 mM	0,24 µM	2U
	nPCR	1X	200 µM	3,5 mM	0,24 µM	2U
NoVGII	1ªPCR	1X	200 µM	2,5 mM	0,4 µM	1,25U
	nPCR	1X	200 µM	2,0 mM	0,4 µM	1,25U

HAdV=adenovírus humano; RVA=rotavírus grupo A; NoVGII=norovírus genogrupo II; nPCR=nested-PCR

Quadro 18. Sequências dos oligonucleotídeos iniciadores em cada reação de PCR para detecção de vírus entéricos.

Vírus	PCR	Iniciadores	Sequência* (5'→3')	Gene alvo	Referência
HAdV	1ªPCR	Hex1	GCCSCARTGGKWCWTACATGCACATC	Hexon	Allard <i>et al</i> (2001)
		Hex2	CAGCACSCCICGRATGTCAAA		
	nPCR	NeHex3	GCCCGYGC MACIGAIACSTACTTC		
		NeHex4	CCYACRGCCAGIGTRWAICGMRCYTTGTA		
RVA	1ªPCR	RV1	GTCACATCATAACAATTCTAATCTAAG	VP7	Hafliger <i>et al</i> (1997)
		RV2	CTTTAAAAGAGAGAATTTCCGTCTG		
	nPCR	RV3	TGTATGGTATTGAATATACCAC		
		RV4	ACTGATCCTGTTGGCCAWCC		
NoVGII	1ªPCR	SRII-1	CGCCATCTTCATTACAAAA	RNA Polimerase	Hafliger <i>et al</i> (1997)
		SRII-2	TWCTCYTTYTATGGTGATGATGA		
	nPCR	SRII-2	TWCTCYTTYTATGGTGATGATGA		
		SRII-3	TTWCCAAACCAACCWGCTG		

*Código universal de nucleotídeos degenerados (W=A ou T; Y=C ou T; K=G ou T; R=A ou G; S=C ou G; B= sem A e N= A, T, C ou G). HAdV=adenovírus humano; RVA=rotavírus grupo A; NoVGII=norovírus genogrupo II.

4.6.2.1 Eletroforese para visualização dos produtos de PCR

O tamanho dos fragmentos esperados após a PCR e nested-PCR podem ser visualizados no Quadro 19 e na Figura 18. Em todas as reações foram utilizados controles com amostras reconhecidamente positivas para todos os vírus estudados, e como controle negativo foi utilizada água Milli-Q estéril.

Quadro 19. Tamanho esperado dos fragmentos amplificados por reações de nested-PCR em número de pares de bases (pb).

Vírus	1ª PCR	Nested-PCR
HAdV	301	171
RVA	1059	346
NoVGII	514	203

HAdV=adenovírus humano; RVA=rotavírus grupo A; NoVGII=norovírus genogrupo II

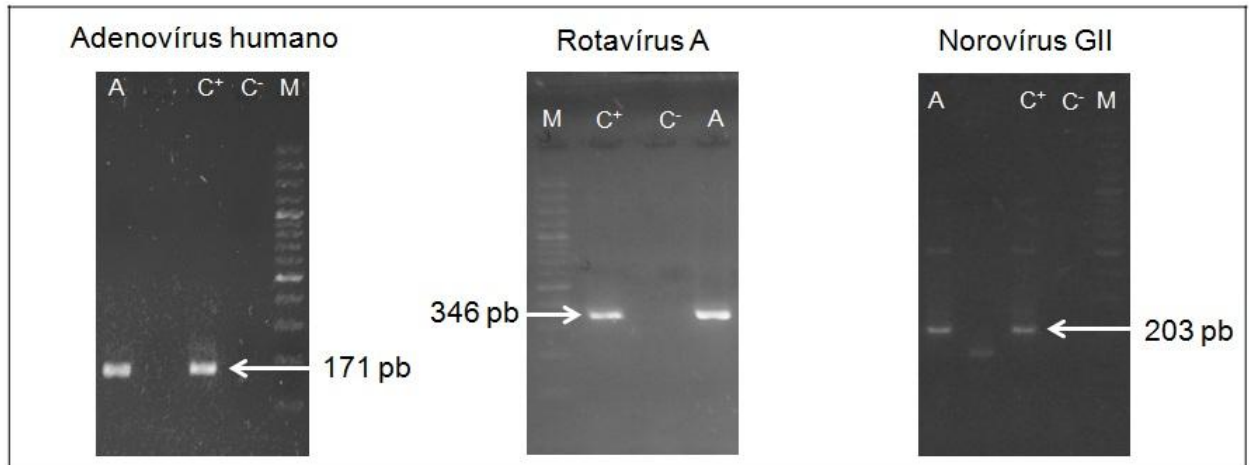


Figura 18. Eletroforese em gel de agarose 1,8% dos produtos da nested-PCR para detecção de rotavírus, norovírus e adenovírus (M=marcador; C⁺=controle positivo; C⁻=controle negativo; A=amostra).

4.6.3 Análises quantitativas por ensaios de PCR em Tempo Real (qPCR)

A quantificação do número de cópias genômicas dos vírus presentes nas amostras de águas superficiais e de fezes foi realizada por PCR quantitativa (qPCR). Essa etapa foi realizada em colaboração com o Laboratório de Virologia Comparada e Ambiental (LVCA) do Instituto Oswaldo Cruz (IOC), da Fundação Oswaldo Cruz, na cidade do Rio de Janeiro/RJ. Para essa análise, foi utilizado um sistema de PCR em Tempo Real *StepOne* (*Applied Biosystems*, CA, EUA). O conjunto de iniciadores e sondas, bem como o local de hibridização no genoma e seus respectivos genes alvos, estão descritos no Quadro 20. Os programas dos ciclos para as reações de qPCR podem ser observados no Quadro 21.

Quadro 20. Sequências dos oligonucleotídeos iniciadores e sondas utilizadas nas reações de PCR quantitativa (qPCR) para detecção de adenovírus humano (HAdV), rotavírus grupo A (RVA) e norovírus genogrupo II (NoVGII).

Vírus	Iniciadores e sondas* (5'→ 3')			Gene alvo	Referência
	Forward	Reverse	Sonda		
HAdV	CWTACATGCACATCKCSGG (AdF) 18.868 -18.887	CRCGGGCRAAYTGCACCAG (AdR) 18.919 -18.938	FAM-CCGGGCTCAGGTACTCCGAGGCGTCCT-TAMRA (AdP1) 18.890 -18.917	Hexon	Hernroth <i>et al.</i> (2002)
RVA	ACCATCTWCACRTRACCCTCTATGAG (NSP3-F) 963 - 988	GGTCACATAACGCCCTATAGC (NSP3-R) 1.028 -1.049	VIC – NONE AGTTAAAAGCTAACACTGTCAAA – MGB (NSP3-P) 995 -1.017	NSP3	Zeng <i>et al.</i> (2008)
NoV (GII)	CARGARBCNATGTTYAGRTGGATGAG (COG2F) 5.003	TCGACGCCATCTTCATTCACA (COG2R) 5.100	VIC-TGGGAGGGCGATCGCAATCT-TAMRA (RING2) 5.048	junção da ORF1- ORF2	Kageyama <i>et al.</i> (2003)

*Código universal de nucleotídeos degenerados (W=A ou T; Y=C ou T; K=G ou T; R=A ou G; S=C ou G; B= sem A e N=A, T, C ou G).

Quadro 21. Programa de ciclos para reações de qPCR de adenovírus humano (HAdV), rotavírus grupo A (RVA) e norovírus genogrupo II (NoVGII).

Etapa	HAdV	RVA	NoVGII
Ativação	50°C/ 2min	50°C/ 2min	50°C/2min
Desnaturação	95°C/ 10min	95°C/ 10min	95°C/10min
Anelamento/Extensão	95°C/ 15s 60°C/ 1min } 40x	95°C/ 15s 60°C/ 1min } 40x	95°C/ 15s 56°C/1min } 40x

HAdV=adenovírus humano; RVA=rotavírus grupo A; NoVGII =norovírus genogrupo II

4.6.3.1 Construção da curva padrão de quantificação absoluta

Para construção da curva padrão, fragmentos de interesse dos genomas dos vírus analisados foram clonados em vetores plasmidiais e inseridos em bactérias *Escherichia coli*. As bactérias transformadas, contendo os plasmídeos com fragmentos dos genes virais de interesse, foram gentilmente cedidas pelo Laboratório de Virologia Comparada e Ambiental (LVCA) do Instituto Oswaldo Cruz (IOC), da Fundação Oswaldo Cruz/RJ.

Para o procedimento de construção da curva padrão, 25 µL das bactérias previamente transformadas com os plasmídeos contendo os insertos de interesse foram cultivadas em 5 mL de meio LB (Luria-Bertani)/ampicilina (100 µg/mL) a 36 °C sob agitação, por aproximadamente 12 h. Em seguida, uma alíquota de 50 µL das bactérias foi transferida para um frasco com 10 mL de meio LB, acrescido de 20 µL de ampicilina (100 µg/mL), e mantida a 36 °C sob agitação, por aproximadamente 12 horas.

Quando o crescimento bacteriano encontrava-se em fase logarítmica (D.O.₆₀₀ entre 1,5 e 5,0), foi feita a extração dos plasmídeos com o kit de extração de plasmídeos *High Pure Plasmid Isolation Kit* (Roche). As bactérias foram armazenadas em glicerol, utilizando alíquotas de 2 mL, sendo 1,8 mL de meio LB contendo a bactéria transformada e 0,2 mL de glicerol.

Os plasmídeos foram quantificados em espectrofotômetro *Ultrospec 1000* (*Pharmacia Biotech*) aplicando-se a fórmula abaixo:

$$\text{N}^\circ \text{ de c\u00f3pias} = \frac{[\text{g}/\mu\text{L}] \times 6,023 \times 10^{23}}{\text{pb} \times 660} \quad \text{(Equa\u00e7\u00e3o 1)}$$

Sendo que:

pb = pares de base (tamanho do inserto)

$6,023 \times 10^{23}$ = constante de Avogadro

660 g/mol = peso molecular m\u00e9dio de 1 pb de DNA

Antes do c\u00e1lculo, a concentra\u00e7\u00e3o de DNA foi transformada de μg para g.

A partir do n\u00famero de c\u00f3pias de genoma obtido (Equa\u00e7\u00e3o 1), foi feito o c\u00e1lculo para a curva padr\u00e3o, utilizando a Equa\u00e7\u00e3o 2 abaixo:

$$C_1V_1 = C_2V_2 \quad \text{(Equa\u00e7\u00e3o 2)}$$

Ap\u00f3s realiza\u00e7\u00e3o dos c\u00e1lculos, a curva padr\u00e3o foi submetida a dilui\u00e7\u00f5es seriadas de raz\u00e3o constante igual a 10. Os valores de CT (*cycle threshold*; ciclo que ultrapassa o limiar de detec\u00e7\u00e3o), obtidos a partir da qPCR, foram usados para calcular a quantidade de c\u00f3pias gen\u00f4micas, interpolando as curvas padr\u00f5es para criar valores lineares nas an\u00e1lises quantitativas. A convers\u00e3o dos resultados quantitativos obtidos diretamente na qPCR, expressos em n\u00fameros de c\u00f3pias gen\u00f4micas por ciclo, est\u00e3o detalhados no pr\u00f3ximo t\u00f3pico.

4.6.3.2 Convers\u00e3o do n\u00famero de c\u00f3pias gen\u00f4micas (cg) por ciclo de qPCR em n\u00famero de c\u00f3pias gen\u00f4micas por 100mL de \u00e1gua ou por grama de fezes

Os resultados quantitativos obtidos diretamente na qPCR s\u00e3o expressos em n\u00fameros de c\u00f3pias gen\u00f4micas (cg) por ciclo. Para a convers\u00e3o desse valor em cg/100 mL de \u00e1gua ou cg/g de fezes, foi preciso seguir a Equa\u00e7\u00e3o 3 abaixo:

$$\text{N}^\circ \text{ de c\u00f3pias gen\u00f4micas} = (X * K) \quad \text{(Equa\u00e7\u00e3o 3)}$$

Sendo que:

X= número de cópias genômicas obtidas na reação de qPCR

K= constante (fator de multiplicação das etapas anteriores)

O valor das constantes foi diferente nas duas matrizes (Apêndices 5 e 6). As equações para os cálculos do número de cópias genômicas nas amostras de água e fezes são as seguintes:

$$\text{cg/100 mL de água} = (X * 60) / 10 \quad \text{(Equação 4)}$$

$$\text{cg/g de fezes} = (X * 600) \quad \text{(Equação 5)}$$

4.7.4 Sequenciamento de DNA e análises filogenéticas

Os produtos obtidos na nested-PCR foram purificados com a enzima ExoSAP® para remoção dos dNTPs indesejados e dos iniciadores de produtos de PCR, conforme instruções do fabricante (GE Healthcare LifeSciences, Pittsburgh, PA, EUA). As reações de sequenciamento foram realizadas com o uso do *BigDye*® *Kit* v.3.1 (*Applied Biosystems*™, Foster City, CA, EUA), em um único sentido, no sequenciador automático *ABI 3500 Genetic Analyzer*® (*Applied Biosystems, Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA*). As reações de sequenciamento foram realizadas em colaboração com o Núcleo de Genética Aplicada à Conservação da Biodiversidade (NGACB/UFES).

Após o sequenciamento, foi feito um alinhamento múltiplo das sequências de DNA viral obtidas com as sequências protótipos de referência disponíveis no banco de dados online GenBank, utilizando o programa BioEdit®. Em seguida, o alinhamento das sequências de DNA foi utilizado para construção das relações filogenéticas no programa MEGA 4.0 (*Molecular Evolutionary Genetics Analysis*), pelo método *neighbor-joining*. As árvores filogenéticas foram construídas com um *bootstrap* de 2.000 repetições.

4.7 Análises estatísticas

Foi utilizada a estatística descritiva para apresentação dos resultados das análises físico-químicas (média, mediana, desvio padrão, mínimo e máximo) e das análises microbiológicas (média geométrica, mediana, mínimo e máximo).

A fim de correlacionar os parâmetros físico-químicos com as variáveis microbiológicas da água (presença de vírus e de bactérias indicadoras de poluição fecal), foi aplicada a correlação de Spearman. Os casos positivos para os vírus entéricos na população infantil foram analisados conforme as características demográficas e clínicas do questionário. As prevalências foram calculadas para cada fator de risco de interesse, com a respectiva razão de chances (*Odds ratio*) e o correspondente intervalo de confiança (IC95%). Para avaliação comparativa das variáveis estudadas, foi empregado o teste qui-quadrado (χ^2) ou exato de Fisher, com um nível de significância de 0,05. A avaliação da intensidade de concordância entre os métodos de detecção do ácido nucleico viral foi medida pelo teste de Kappa, que tem por base o número de casos cujo resultado é o mesmo entre os métodos (Quadro 22; LANDIS; KOCH, 1997). As análises foram realizadas com auxílio do programa STATA 11 (*StataCorp LP, College Station, TX*).

Quadro 22. Interpretação dos níveis de concordância através do teste de Kappa para escalas de dados categóricos (LANDIS; KOCH, 1997, modificado).

Valores de Kappa	Concordância
0,00	Ausência
0,00 - 0,19	Muito fraca
0,20 - 0,39	Fraca
0,40 - 0,59	Moderada
0,60 - 0,79	Forte
0,80 - 1,00	Muito forte

5 RESULTADOS

Nesse capítulo serão apresentados os resultados obtidos das avaliações físico-químicas e microbiológicas das águas superficiais da Baía de Vitória e da prevalência dos vírus entéricos na população infantil da região de São Pedro, em Vitória, além da análise das relações filogenéticas entre as sequências genômicas dos vírus detectados em ambas matrizes, ambiental e clínica.

5.1 Avaliação da qualidade da água da Baía de Vitória

5.1.1 Caracterização físico-química

Amostras de águas superficiais foram coletadas mensalmente, por um período de 12 meses, em quatro sítios da Baía de Vitória. Essas amostras de água foram caracterizadas de acordo com os seguintes parâmetros físico-químicos: temperatura, pH, turbidez, salinidade, condutividade e oxigênio dissolvido. O resultado da estatística descritiva dos parâmetros analisados e da pluviosidade mensal acumulada na região está apresentado na Tabela 1.

Não foram observadas diferenças significativas individualmente entre os 4 pontos de coleta de água com relação aos parâmetros físico-químicos avaliados no presente estudo (dados não apresentados); dessa forma, optou-se por agrupar esses resultados ($n = 4$) estratificados nos respectivos meses de coleta.

Com exceção dos resultados obtidos para oxigênio dissolvido, os outros parâmetros avaliados praticamente não apresentaram diferenças em seus resultados ao longo do ano. As medidas de pluviosidade mensal foram utilizadas a fim de verificar se existia diferença entre os resultados nos períodos seco e chuvoso, e foi demonstrado que essa variável não interferiu significativamente ($p > 0,05$) nos valores dos parâmetros físico-químicos da água.

Tabela 1. Resultados de estatística descritiva da pluviosidade mensal e parâmetros físico-químicos das amostras de águas superficiais durante 12 meses de monitoramento (média dos 4 sítios de coleta, n= 4).

Mês	Pluvi. (mm)	Temp. (°C)	pH	Turbidez (UNT)	Salinid. (‰)	Condut. (µS/cm ²)	OD (mg L)
set/11	124,0	22,5	7,4	9,5	21,8	31,7	3,7
out/11	175,6	24,8	7,0	13,3	19,3	21,5	3,9
nov/11	256,6	24,0	7,0	n.a.	n.a.	25,1	5,1
dez/11	264,6	25,5	7,0	7,1	10,3	13,5	3,5
jan/12	406,0	26,0	7,2	26,4	0,8	3,1	2,8
fev/12	85,2	27,0	7,3	6,6	17,3	14,9	8,4
mar/12	33,0	26,0	6,7	8,9	19,5	15,7	8,0
abr/12	20,8	22,6	7,1	8,1	18,8	15,6	8,1
mai/12	323,4	22,6	6,9	6,9	11,8	12,9	8,5
jun/12	101,0	26,0	7,4	15,9	16,5	15,5	3,1
jul/12	45,2	22,6	6,6	9,4	19,8	16,8	3,9
ago/12	257,7	23,5	6,8	n.a.	8,0	11,4	7,8
Média	174,4	24,4	7,0	11,2	14,9	16,5	5,6
Mediana	149,8	24,4	7,0	9,1	17,3	15,6	4,5
D.P.	125,7	1,6	0,2	6,1	6,4	7,1	2,4
C.V. (%)	72,1	6,7	3,6	54,5	43,2	43,4	42,6
Máximo	406,0	27,0	7,4	26,4	21,8	31,7	8,5
Mínimo	20,8	22,5	6,6	6,6	0,8	3,1	2,8

Pluvi.= pluviosidade mensal; Temp.= temperatura; Salinid.= salinidade; Conduct.= condutividade; D.P.=desvio padrão; C.V.=coeficiente de variação; n.a.=não analisado

5.1.2 Avaliação microbiológica

5.1.2.1 Bactérias indicadoras de poluição fecal

As análises microbiológicas das amostras de águas superficiais coletadas na Baía de Vitória revelaram que o ambiente aquático estudado estava com valores médios elevados dos indicadores bacteriológicos de poluição fecal. A Figura 19 apresenta os resultados do monitoramento mensal das análises de coliformes termotolerantes e *Enterococci* das amostras de águas superficiais. As concentrações médias máximas de coliformes termotolerantes e *Enterococci* foram $3,6 \times 10^3$ e $7,1 \times 10^2$ UFC por 100 mL^{-1} de água, respectivamente. Em valores absolutos, as bactérias coliformes termotolerantes e *Enterococci* tiveram suas concentrações máximas na ordem de $2,4 \times 10^4$ e $1,5 \times 10^4$ UFC por 100 mL^{-1} de água, respectivamente.

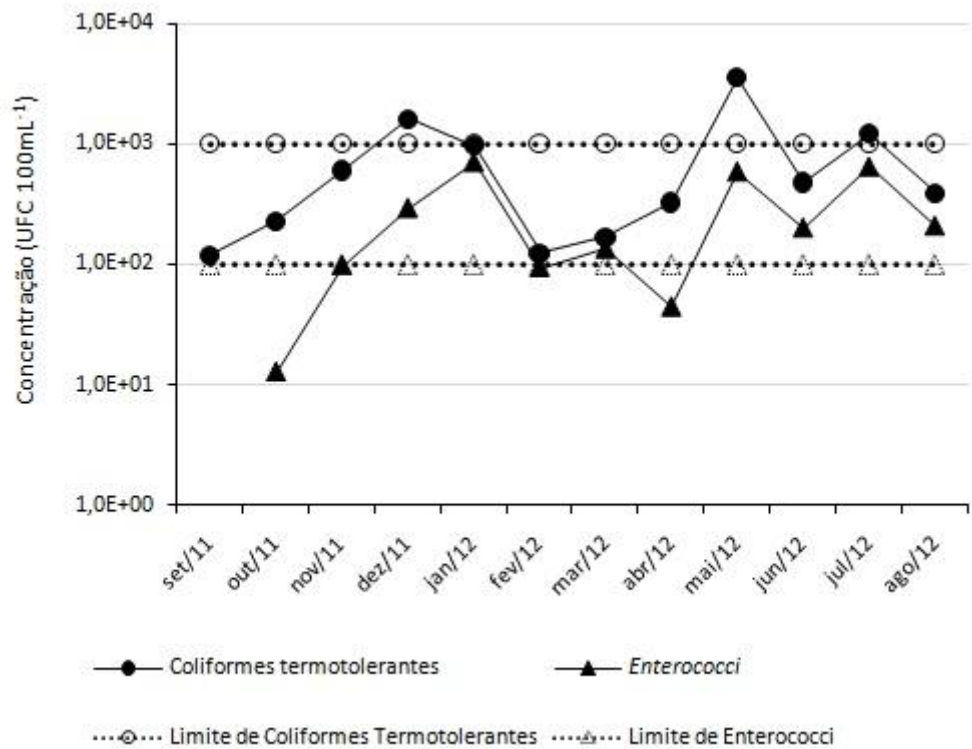


Figura 19. Resultado médio dos quatro sítios de coleta agrupados do monitoramento mensal de coliformes termotolerantes e *Enterococci* (UFC 100 mL⁻¹), nas amostras de águas superficiais da Baía de Vitória, ES, bem como seus limites preconizados pela resolução nº 357, de 2005, do CONAMA.

Os resultados das concentrações de coliformes termotolerantes e *Enterococci* nas amostras de águas superficiais foram estratificados para análise dos períodos seco e chuvoso (Figura 20). Foi possível identificar apenas pequenas diferenças entre as concentrações dos microrganismos nesses períodos, evidenciando que ambos indicadores bacteriológicos de poluição fecal não foram significativamente diferentes quando comparados nessas estações (coliformes termotolerantes, $p = 0,1766$ e *Enterococci*, $p = 0,0968$; teste de Wilcoxon).

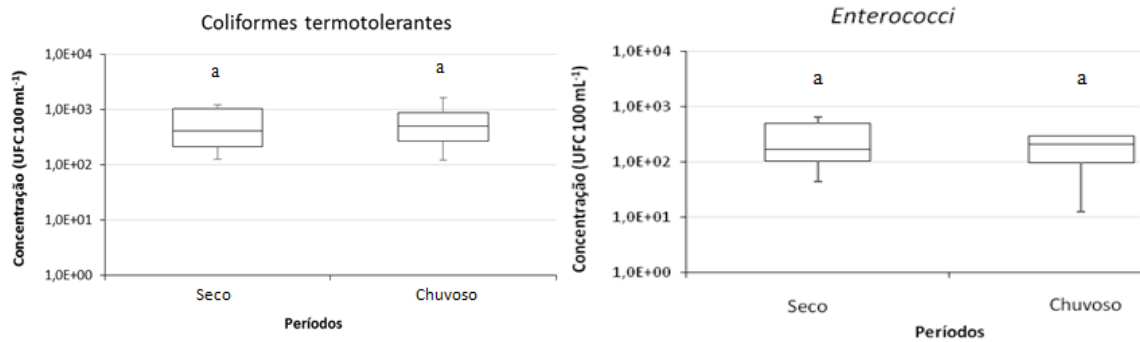


Figura 20. Box plot (n= 24) das análises de coliformes termotolerantes e *Enterococci* (UFC 100 mL⁻¹) das amostras de águas superficiais do manguezal da Baía de Vitória, nos períodos seco e chuvoso (Letras diferentes no gráfico indicam diferença significativa a 5% pelo teste de Wilcoxon).

Após o período de monitoramento realizado, verificou-se que existem densidades elevadas de bactérias indicadoras de contaminação fecal nas águas superficiais da Baía de Vitória, indicando uma baixa qualidade microbiológica desse ambiente.

5.1.2.2 Vírus entéricos

Quarenta e oito amostras de águas superficiais foram concentradas e analisadas para detecção e quantificação de vírus entéricos por ensaios de PCR convencional e PCR em Tempo Real. Foram realizadas análises dos genomas de RV A, NoV GII e AdV humano. Em 34 amostras de água (71%), foi detectado pelo menos um tipo de vírus. O vírus mais frequentemente detectado foi o RVA, com 56% das amostras positivas, seguido de NoV (31%) e HAdV (29%) (Tabela 2).

Tabela 2. Número de amostras positivas de vírus entéricos detectados em amostras de águas superficiais (n= 48) em 4 sítios de coleta da Baía de Vitória.

Vírus entéricos	n (%)	
	Positivo	Negativo
Pelo menos 1 vírus detectado	34 (71%)	14 (29%)
Rotavírus A	27 (56%)	21 (77%)
Norovírus GII	15 (31%)	33 (69%)
Adenovírus	14 (29%)	32 (71%)

As amostras positivas de vírus entéricos obtidas nas amostras de águas superficiais foram estratificadas entre os períodos seco e chuvoso. Os dados pluviométricos fornecidos pelo Instituto Capixaba de Pesquisa, Assistência Técnica e Extensão Rural (INCAPER) foram utilizados para definição dos períodos seco e chuvoso. Os meses de setembro de 2011 a janeiro de 2012 foram considerados períodos chuvosos (1484,5 mm de chuva), enquanto os meses de fevereiro a julho de 2012 compreenderam o período seco, com precipitação acumulada de 608,62 mm de chuva. O gráfico com os resultados da frequência (%) de detecção de vírus entéricos nas amostras de águas superficiais não demonstrou um padrão de sazonalidade. Contudo, há uma tendência maior de detecção de RV no período chuvoso e de NoV no período seco (Figura 21).

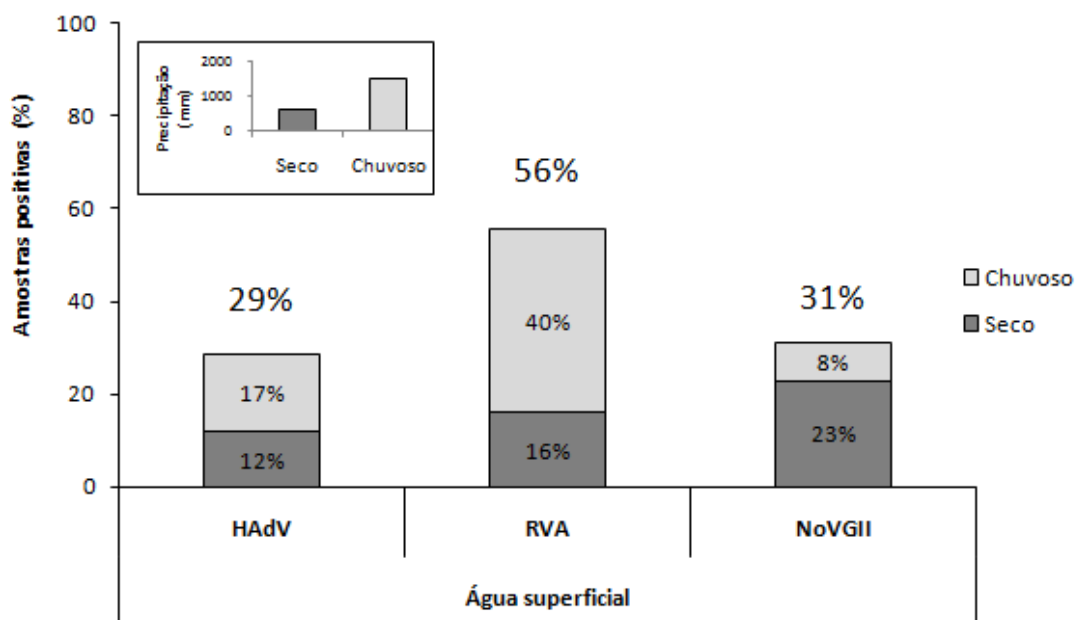


Figura 21. Monitoramento de vírus entéricos em águas superficiais e valores acumulados de precipitação, estratificados nos períodos seco e chuvoso de setembro/2011 a agosto/2012.

Os vírus entéricos foram detectados nas amostras de águas superficiais em praticamente todo o período de monitoramento (11/12 meses, 91,6%), mesmo nos meses em que os indicadores bacterianos de poluição fecal se encontravam em baixas concentrações ou dentro dos limites máximos preconizados pela legislação ambiental.

A Tabela 3 sumariza os resultados adquiridos da detecção do ácido nucleico viral, obtido pelas técnicas de PCR qualitativa e quantitativa nas amostras de águas superficiais. Os valores apresentados da quantificação absoluta pela técnica de qPCR correspondem à média geométrica do número de cópias genômicas (cg) virais por 100 mL de amostra de água analisada. Os dados de quantificação dos vírus entéricos obtidos mostram que o RVA, além ter sido o vírus detectado com maior frequência nas amostras de água, foi também encontrado em maior quantidade média no ambiente (Figura 22).

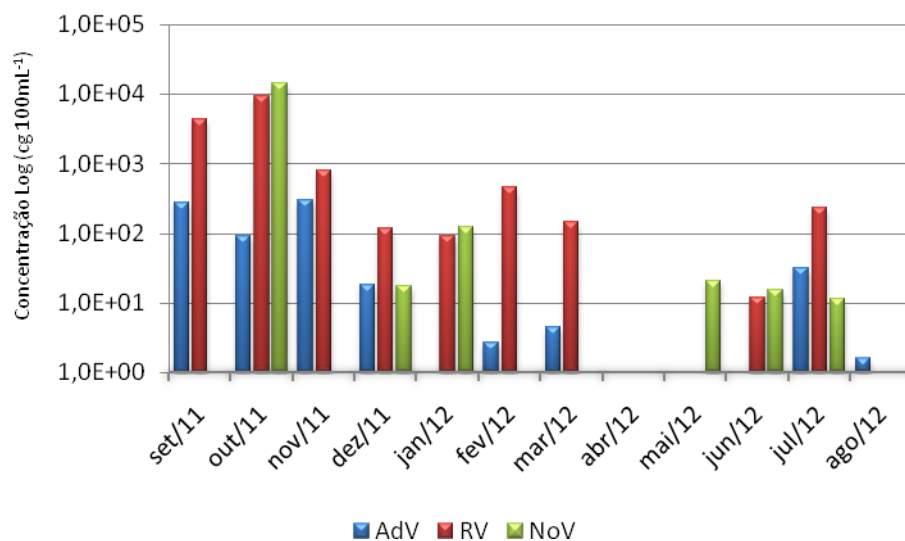


Figura 22. Resultado do número de cópias genômicas dos vírus entéricos avaliados em amostras de águas superficiais da Baía de Vitória, ES, durante 12 meses de monitoramento.

Tabela 3. Detecção de vírus entéricos por técnicas moleculares (qPCR e n-PCR) em amostras de águas superficiais, durante um ano de monitoramento (n=4).

Vírus	Mês	qPCR		n-PCR
		(média; cg 100mL ⁻¹)	(positivo/total)	(positivo/total)
HAdV	set/11	2,7 x 10 ²	1/4	0/4
	out/11	9,2 x 10 ¹	4/4	1/4
	nov/11	3,0 x 10 ²	1/4	0/4
	dez/11	1,8 x 10 ¹	1/4	0/4
	jan/12	0	0/4	0/4
	fev/12	2,7 x 10 ⁰	1/4	1/4
	mar/12	4,6 x 10 ⁰	1/4	1/4
	abr/12	0	0/4	0/4
	mai/12	0	0/4	0/4
	jun/12	0	0/4	1/4
	jul/12	3,2 x 10 ¹	2/4	2/4
	ago/12	1,6 x 10 ⁰	1/4	0/4
		Média 2,3 x 10¹	Total 12/48	Total 6/48
Vírus	Mês	RT-qPCR		RT-nPCR
		(média; cg 100mL ⁻¹)	(positivo/total)	(positivo/total)
RVA	set/11	4,3 x 10 ³	4/4	0/4
	out/11	9,3 x 10 ³	4/4	1/4
	nov/11	8,0 x 10 ²	4/4	2/4
	dez/11	1,2 x 10 ²	4/4	1/4
	jan/12	9,0 x 10 ¹	3/4	1/4
	fev/12	4,6 x 10 ²	1/4	0/4
	mar/12	1,4 x 10 ²	1/4	0/4
	abr/12	0	0/4	0/4
	mai/12	0	0/4	0/4
	jun/12	1,2 x 10 ¹	1/4	3/4
	jul/12	2,3 x 10 ²	3/4	3/4
	ago/12	0	0/4	0/4
		Média 3,4 x 10²	Total 25/48	Total 11/48
Vírus	Mês	RT-qPCR		RT-nPCR
		(média;cg 100mL ⁻¹)	(positivo/total)	(positivo/total)
NoVGII	set/11	0	0/4	0/4
	out/11	1,5 x 10 ⁴	1/4	0/4
	nov/11	0	0/4	2/4
	dez/11	1,7 x 10 ¹	1/4	0/4
	jan/12	1,2 x 10 ²	0/4	0/4
	fev/12	0	0/4	2/4
	mar/12	0	0/4	2/4
	abr/12	0	0/4	0/4
	mai/12	2,0 x 10 ¹	2/4	0/4
	jun/12	1,6 x 10 ¹	3/4	0/4
	jul/12	1,1 x 10 ¹	1/4	1/4
	ago/12	0	0/4	0/4
		Média 6,9 x 10¹	Total 8/48	Total 7/48

cg = cópias genômicas

Na análise comparativa entre as técnicas moleculares de detecção do ácido nucleico viral (PCR convencional e qPCR) nas amostras de águas superficiais, não foi possível observar concordância entre as técnicas para nenhum dos vírus estudados (RVA, Kappa = 0,2666; HAdV, Kappa = 0,3333; NoVGII, Kappa = -0,1842) (Tabelas 4, 5 e 6). O fato demonstra que essas técnicas são complementares e o mais indicado é que sejam utilizadas em conjunto quando o objetivo for a detecção de vírus em amostras ambientais.

Tabela 4. Análise de concordância pelo teste de Kappa entre as técnicas moleculares de PCR convencional (nested-PCR) e quantitativa (qPCR), para detecção de rotavírus A em amostras de águas superficiais.

Nested-PCR	qPCR		Total
	Positivo	Negativo	
Positivo	9	2	11
Negativo	16	21	37
Total	25	23	48
Kappa=0,2666			

Tabela 5. Análise de concordância pelo teste de Kappa entre as técnicas moleculares de PCR convencional (nested-PCR) e quantitativa (qPCR), para detecção de adenovírus humano em amostras de águas superficiais.

Nested-PCR	qPCR		Total
	Positivo	Negativo	
Positivo	4	2	6
Negativo	8	34	42
Total	12	36	48
Kappa = 0,3333			

Tabela 6. Análise de concordância pelo teste de Kappa entre as técnicas moleculares de PCR convencional (nested-PCR) e quantitativa (qPCR), para detecção de norovírus GII em amostras de águas superficiais.

Nested-PCR	qPCR		Total
	Positivo	Negativo	
Positivo	0	7	7
Negativo	8	33	41
Total	8	40	48
Kappa = -0,1842			

A fim de verificar se haveria correlação entre os dados obtidos nas análises físico-químicas e bacteriológicas com a presença de vírus entéricos na água, foi realizada uma análise de correlação utilizando o teste de correlação de Spearman (Tabela 7). Os resultados mostraram que não houve correlação entre os parâmetros estudados, embora, quando se avaliaram as bactérias do gênero *Enterococci*, observou-se uma tendência de correlação inversa com a presença de vírus entéricos nas amostras de água.

Tabela 7. Matriz de correlação de Spearman, avaliando-se os resultados positivos para vírus entéricos, as variáveis físico-químicas e os indicadores bacteriológicos de águas superficiais de setembro/2011 a agosto/2012 (n= 48).

	Temper.	pH	Turbid	Salinid.	Conductiv.	OD	Vírus	C.T.	Enter.
Temper.	1								
pH	-0,0047	1							
Turbidez	-0,0011	-0,2303	1						
Salinid.	0,0303	0,3089	-0,5653	1					
Conductiv.	-0,4786	0,2764	-0,0564	0,0912	1				
OD	-0,0885	-0,4925	-0,1985	0,1657	-0,1183	1			
Vírus	0,4485	0,0291	0,2305	0,1452	0,0909	-0,3477	1		
C.T.	-0,4715	-0,2990	0,0275	-0,3370	-0,3879	0,1815	-0,3462	1	
Enter.	-0,4486	-0,0291	-0,2303	-0,1456	-0,0912	0,3477	-1,000*	0,3468	1

*p<0,05

Temper, temperatura; salinid, salinidade; conductiv, condutividade; OD, oxigênio dissolvido; C.T., coliformes termotolerantes; Enter, *Enterococci*.

5.2 Prevalência de vírus entéricos na população infantil

Foram atendidas 276 crianças com queixa de diarreia nos serviços das Unidades de Saúde estudadas. Depois de avaliados os prontuários, foram excluídos 142 registros que não atendiam aos critérios de elegibilidade do estudo ou que não entregaram as amostras de fezes. A descrição das etapas da pesquisa e os motivos da exclusão são mostrados na Figura 23. Cento e trinta e quatro registros atenderam aos critérios pré-determinados e assim foram incluídos na pesquisa. Destes, 125 foram crianças com diagnóstico positivo para pelo menos um dos vírus analisados.

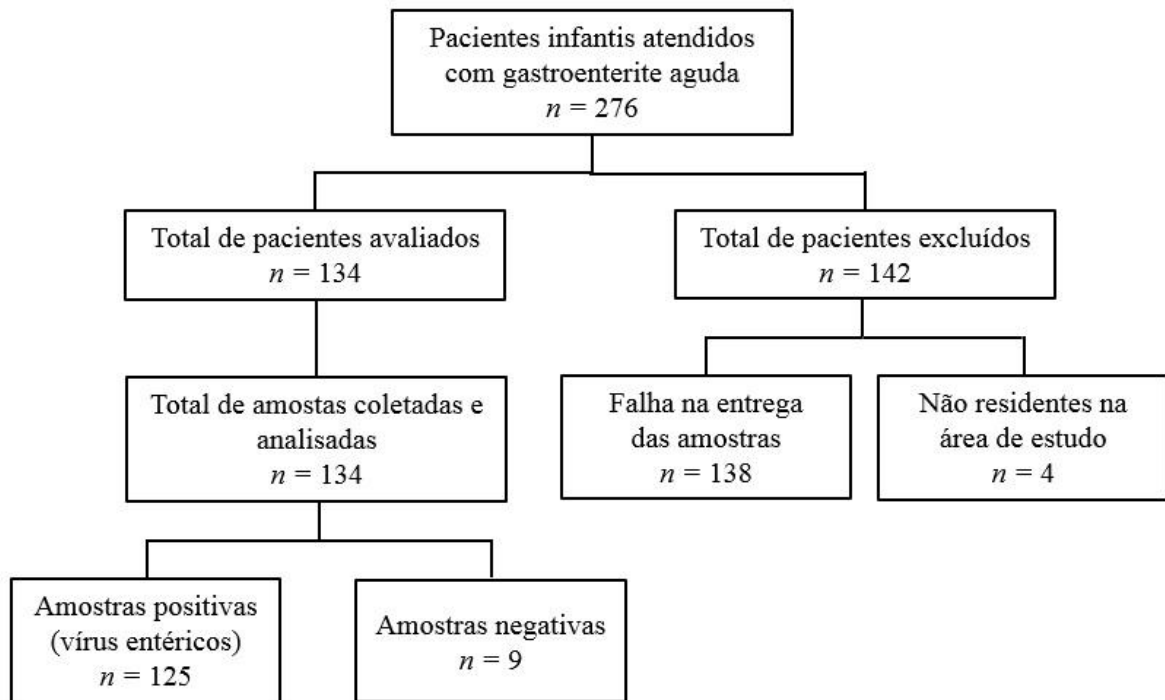


Figura 23. Fluxograma de inclusão de pacientes no estudo de prevalência de vírus entéricos na população infantil da região de São Pedro, Vitória-ES.

Os resultados do questionário referente as características demográficas das 134 crianças avaliadas nesse estudo estão apresentados na Tabela 8. A maioria das crianças estava na faixa etária com idade entre 1 a 8 anos (70%), sem escolaridade ou matriculadas em creches (66%), cujas famílias declararam possuir renda familiar de até um salário mínimo (66%). A proporção dos gêneros masculino e feminino nas crianças foi de aproximadamente 1:1.

Tabela 8. Características demográficas e clínicas das 134 crianças com gastroenterite que foram arroladas no estudo.

Características	N	(%)
<i>Sexo</i>		
Masculino	65	48
Feminino	69	52
<i>Idade</i>		
<6 meses	10	8
6 meses - 1 ano	10	8
1 - 3 anos	54	40
3 - 8 anos	41	30
8 - 12 anos	19	14
<i>Escolaridade</i>		
Não frequenta	41	31
Creche	47	35
Ensino fundamental I	38	28
Ensino fundamental II	8	6
<i>Renda Familiar</i>		
< 1 salário mínimo	89	66
2 - 4 salários mínimos	40	30
> 4 salários mínimos	5	4
<i>Vômitos</i>		
Sim	95	71
Não	39	29
<i>Febre</i>		
Sim	91	68
Não	43	32
<i>Vacinados por Rotarix</i>		
Sim	92	69
Não	42	31
<i>Intolerância alimentar</i>		
Sim	6	5
Não	128	95
<i>Tipo de alimentação</i>		
Mariscos	0	0
Aleitamento exclusivo	11	8
Aleitamento misto	20	15
Alimentação caseira	103	77
<i>Atividades no manguezal</i>		
Sim	2	2
Não	132	98
<i>Contato com casos de diarreia</i>		
Sim	31	23
Não	103	77
<i>Duração da diarreia</i>		
0-24 h	30	23
1-3 dias	41	30
> 3 dias	63	47

De todas as crianças investigadas, os resultados das análises de detecção do ácido nucleico viral (PCR e qPCR) revelaram que a prevalência dos vírus entéricos na população infantil foi de 93,3 (IC 95% 87,7 - 96,4). As prevalências observadas não foram significativamente diferentes ($p > 0,05$), entretanto AdV obteve maior valor numérico, 60,5 (IC 95% 52,0 - 68,3), seguido de RV, 56,7 (IC 95% 48,3 - 64,8), e NoV, 49,3 (IC 95% 40,9 - 56,6) (Tabela 9).

Tabela 9. Número de amostras positivas de vírus entéricos detectados em amostras de fezes (n= 134) de crianças com gastroenterite aguda, em Vitória, ES.

Vírus	Prevalência	IC95%
Pelo menos 1 vírus detectado	93,3	87,7 - 96,4
Adenovírus	60,5	52,0 - 68,3
Rotavírus A	56,7	48,3 - 64,8
Norovírus GII	49,3	40,9 - 56,6

As amostras de fezes das crianças com gastroenterite foram coletadas entre setembro de 2011 a agosto de 2012. Durante esse período, pôde-se observar três picos de prevalência distintos, sendo que em cada pico foi detectado um dos vírus isoladamente (setembro de 2011, RVA; janeiro de 2012, NoVGII; abril de 2012, HAdV) (Figura 24).

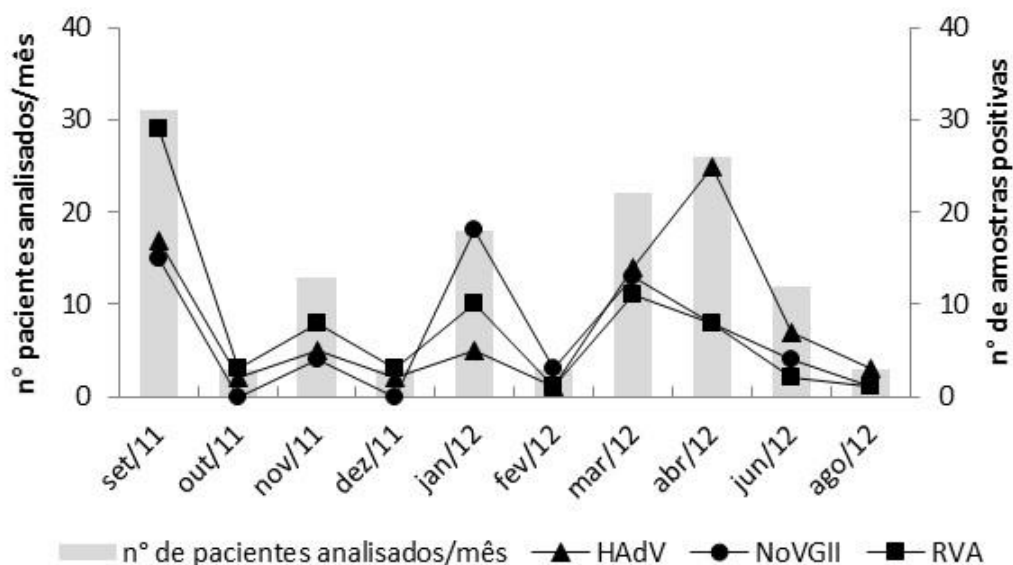


Figura 24. Distribuição das amostras de fezes positivas para os vírus entéricos analisados nos casos de gastroenterite aguda, conforme os meses do período estudado (setembro/2011 a agosto/2012).

A fim de verificar se os vírus entéricos patogênicos possuíam um padrão de sazonalidade na população infantil investigada, os dados referentes às frequências de amostras positivas foram estratificados conforme os períodos seco e chuvoso. De acordo com essa análise, não foi possível observar um padrão sazonal para compreender exatamente como estão distribuídos os vírus nos casos de gastroenterite infantil. Contudo, os resultados indicam uma maior ocorrência dos vírus entéricos na população durante a estação chuvosa (Figura 25).

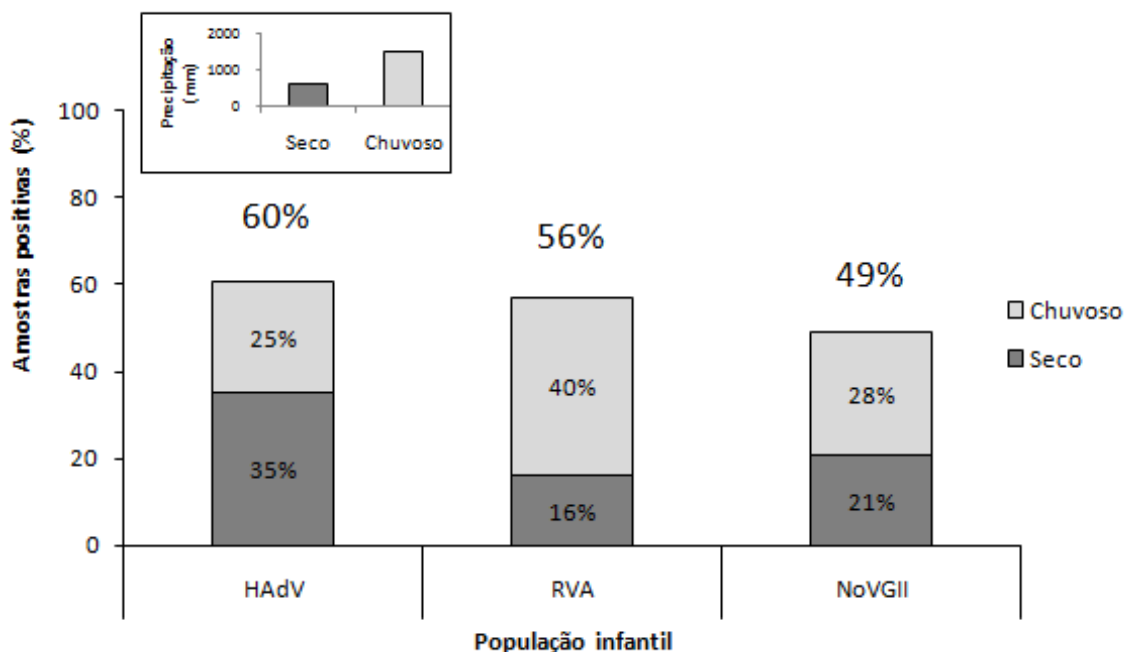


Figura 25. Monitoramento de vírus entéricos na população infantil e valores acumulados mensais de chuva, estratificados nos períodos seco e chuvoso de setembro/2011 a agosto/2012.

Dos 125 casos de gastroenterite infantil onde os vírus avaliados foram detectados nas amostras de fezes, 56 crianças (42%) foram positivas para apenas um vírus e 69 (51%) apresentaram dois ou mais vírus nas fezes. Dos casos com dois ou mais vírus detectados na mesma amostra, foi observado que em 29 (22%) amostras os três vírus foram detectados. A infecção mista dupla mais comum foi entre HAdV e RVA (18; 13%), seguida de RVA e NoVGII com 13 (10%) amostras positivas. A Figura 26 mostra a proporção relativa do resultado das análises de detecção de vírus entéricos nas crianças com gastroenterite.

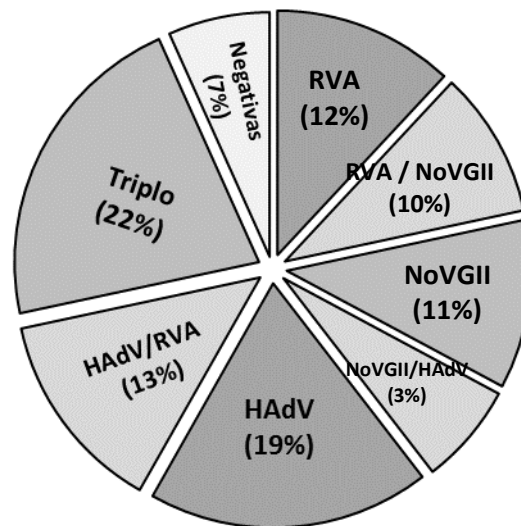


Figura 26. Proporção relativa das análises de detecção de rotavírus (RVA), norovírus (NoVGII) e adenovírus (HAdV) nas amostras de fezes (n= 134).

Nesse estudo, a detecção de vírus entéricos ocorreu por técnicas de biologia molecular. Na análise comparativa entre essas técnicas (PCR convencional, nested-PCR e PCR quantitativa, qPCR), foi possível observar concordância significativa entre as técnicas para detecção de rotavírus A e norovírus GII (RVA, Kappa = 0,6418; NoVGII, Kappa = -0,4531) (Tabelas 10, 11 e 12).

Tabela 10. Análise de concordância pelo teste de Kappa entre as técnicas moleculares de PCR convencional (nested-PCR) e quantitativa (qPCR), para detecção de rotavírus A em amostras de fezes.

Nested-PCR	qPCR		Total
	Positivo	Negativo	
Positivo	52	9	61
Negativo	15	58	73
Total	67	67	134
Kappa = 0,6418			

Tabela 11. Análise de concordância pelo teste de Kappa entre as técnicas moleculares de PCR convencional (nested-PCR) e quantitativa (qPCR), para detecção de adenovírus humano em amostras de fezes.

Nested-PCR	qPCR		Total
	Positivo	Negativo	
Positivo	30	11	41
Negativo	40	53	93
Total	70	64	134
Kappa = 0,2518			

Tabela 12. Análise de concordância pelo teste de Kappa entre as técnicas moleculares de PCR convencional (nested-PCR) e quantitativa (qPCR), para detecção de norovírus GII em amostras de fezes.

Nested-PCR	qPCR		Total
	Positivo	Negativo	
Positivo	32	17	49
Negativo	17	68	85
Total	49	85	134
Kappa = 0,4531			

A partir dos resultados da quantificação de vírus entéricos nas amostras de fezes de crianças com gastroenterite aguda, pôde-se observar que o RVA foi o patógeno viral detectado com maior número de cópias genômicas tanto em infecções simples quanto em infecções mistas, enquanto o HAdV foi o vírus com menor número de cópias genômicas nas amostras de fezes (Figura 27).

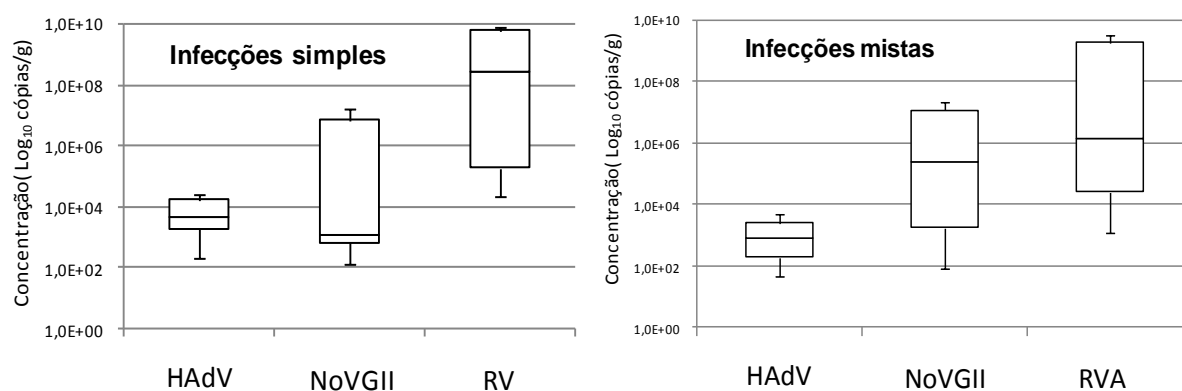


Figura 27. Box plot do número de cópias genômicas por grama de fezes dos vírus entéricos em infecções simples e mistas avaliadas em crianças com gastroenterite aguda.

A presença dos vírus entéricos na população infantil estudada foi estratificada de acordo com a faixa etária dos pacientes (Tabela 13). A faixa etária de 1 a 3 anos foi a mais acometida, concentrando grande parte dos resultados para os três vírus estudados em infecções simples e mistas. Os dois extremos dos grupos etários, crianças com até 6 meses de idade e crianças com mais de 8 anos, apresentaram menor prevalência.

Tabela 13. Distribuição das infecções virais nos diferentes grupos etários das crianças com gastroenterite.

Faixa etária	Infecções simples			Infecções mistas
	HAdV (n)	NoVGII (n)	RVA (n)	
<6 meses	8% (2)	7% (1)	0	10% (7)
6 meses - 1 ano	4% (1)	7% (1)	19% (3)	7% (5)
1 - 3 anos	20% (5)	60% (9)	37% (6)	47% (32)
3 - 8 anos	36% (9)	19% (3)	37% (6)	26% (18)
8 - 12 anos	32% (8)	7% (1)	7% (1)	10% (7)
Total	100% (25)	100% (15)	100% (16)	100% (69)

HAdV=adenovírus humano; RVA=rotavírus A; NoVGII=norovírus genogrupo II.

Com a finalidade de compreender a dinâmica das infecções associadas aos vírus entéricos nas crianças atendidas nas Unidades de Saúde neste estudo, foram comparados os dados obtidos no questionário com os resultados das análises de detecção viral nas amostras de fezes. As Tabelas 14 e 15 mostram os resultados das análises de associação entre as características demográficas e clínicas, além de trazer os casos de infecções por vírus entéricos nos pacientes infantis com doença diarreica aguda. Os resultados indicaram que nenhuma das variáveis analisadas foi considerada fator de risco significativo para as infecções causadas pelos vírus entéricos analisados neste estudo ($p > 0,05$).

Tabela 14. Associação entre a ocorrência de vírus entéricos e as características demográficas dos pacientes infantis com diarreia aguda.

Características demográficas	Positivo (n = 56)	Negativo (n = 78)	Odds ratio	IC (95%)	p-valor
<i>Gênero</i>			0,74	0,14-3,62	0,462 ^a
Masculino	60 (48%)	5 (56%)			
Feminino	65 (52%)	4 (44%)			
<i>Faixa etária</i>			---	---	0,347 ^a
< 6 meses	11 (9%)	0			
6 meses - 1ano	10 (8%)	0			
1 - 3 anos	53 (42%)	2 (22%)			
3 - 8 anos	34 (27%)	5 (56%)			
8 - 12 anos	17 (14%)	2 (22%)			
<i>Escolaridade</i>			---	---	0,212 ^a
Não frequenta	38 (30%)	3 (33%)			
Creche	45 (36%)	2 (22%)			
Ensino Fundamental I	36 (29%)	3 (22%)			
Ensino Fundamental II	6 (5%)	4 (22%)			
<i>Renda familiar (salário mínimo)</i>			---	---	0,792 ^a
< 2	74 (59%)	6 (67%)			
2 - 4	46 (37%)	3 (33%)			
> 2	5 (4%)	0			

OR, odds ratio; IC, intervalo de confiança; n, número de indivíduos na amostra; a Teste Exato de Fisher

Tabela 15. Associação entre a ocorrência de vírus entéricos e as características clínicas dos pacientes infantis com gastroenterite aguda.

Características clínicas	Positivo (n = 125)	Negativo (n = 9)	Odds ratio	IC (95%)	p-valor
<i>Contato com diarreia</i>			1,06	0,19-10,97	0,655 ^a
Sim	29 (23%)	2 (22%)			
Não	96 (77%)	7 (78%)			
<i>Duração da diarreia</i>			---	---	0,395 ^a
0 - 24 horas	27 (22%)	3 (33%)			
1 - 3 dias	40 (32%)	1 (11%)			
> 3 dias	58 (46%)	5 (56%)			
<i>Ocorrência de vômitos</i>			1,19	0,18-5,92	0,537 ^a
Sim	88 (70%)	6 (67%)			
Não	37 (30%)	3 (33%)			
<i>Ocorrência de febre</i>			1,06	0,16-5,28	0,597 ^a
Sim	85 (68%)	6 (67%)			
Não	40 (32%)	3 (33%)			
<i>Administração de Rotarix</i>			3,95	0,79-25,35	0,053 ^a
Sim	83 (66%)	3 (34%)			
Não	42 (34%)	6 (67%)			

OR, odds ratio; IC, intervalo de confiança; n, número de indivíduos na amostra; a Teste Exato de Fisher

Durante os 12 meses de monitoramento realizado nas águas superficiais da Baía de Vitória, os vírus entéricos foram detectados em praticamente todo o período, independente da variação encontrada na concentração das bactérias indicadoras de

poluição fecal. As frequências de detecção dos vírus entéricos tanto nas amostras de águas superficiais quanto nas amostras de fezes da população foram consideradas elevadas. As características dos indivíduos infectados nesse estudo foram crianças de ambos os sexos, com idade entre 1 - 3 anos (42%), que frequentam a creche escolar (36%) e que possuem renda familiar abaixo de 2 salários mínimos (59%). Os sintomas vômitos e febre foram observados em 88 (70%) e 85 (68%) crianças, respectivamente.

5.3 Análises Filogenéticas

Os genomas virais detectados nas amostras clínicas e nas águas superficiais foram submetidos a uma análise filogenética. As amostras de DNA de RVA (346pb, gene VP7), AdV (171pb, gene hexon) e NoVGII (203pb, gene RNA polimerase-ORF1) foram sequenciadas e comparadas com sequências protótipos de referência dos vírus disponíveis nos bancos de dados do *GenBank*. Os números de acesso das sequências de referência para rotavírus A, adenovírus humano e norovírus GII, bem como as árvores filogenéticas para esses vírus, podem ser visualizadas nas Figuras 28, 29 e 30, respectivamente.

A análise filogenética de RVA revelou a formação de 3 clados com genótipos para o gene VP7 (classificação G): os grupos G2 (EU839924), G3 (GU296430) e G9 (D38053). Os genomas dos vírus detectados nas amostras clínicas e ambientais estiveram relacionados nos grupos dos genótipos G3 e G9. Todos os grupos foram apoiados estatisticamente por valores de *bootstrap* acima de 84%. Nenhuma amostra conteve vírus com o genótipo vacinal G1. A vacina anti-RVA (Rotarix[®], GSK) foi administrada em 83 (66%) pacientes com vírus entéricos detectados nas fezes. Das 28 cepas de RVA que foram sequenciadas a partir de amostras de fezes, 21 foram obtidas de crianças que haviam sido vacinadas com Rotarix[®], enquanto 7 não haviam sido vacinadas. Cinquenta e três por cento das cepas de RVA sequenciadas, provenientes de crianças vacinadas, possuíam o genótipo G3.

A árvore filogenética de AdV humano revelou a formação de vários subgrupos considerando as amostras clínicas e ambientais, principalmente os subgrupos C e F. Os genomas virais detectados nas amostras clínicas e ambientais estiveram

relacionados no subgrupo F, que é conhecido como o mais prevalente nos casos de gastroenterite em humanos (sorotipos 40 [X51782] e 41 [X51783]).

Na análise filogenética de NoVGII, pode-se observar que norovírus GII.4 foi o genótipo predominante nas amostras clínicas. Analisando as sequências de nucleotídeos, dos 10 isolados que foram sequenciados a partir de amostras clínicas, todos mostraram níveis elevados de identidade da sequência de nucleotídeos (95%) com a sequência de referência (GII.4|2004|EF126961). No presente estudo, a maioria das sequências de nucleotídeos de norovírus GII das amostras ambientais não pôde ser identificada por sequenciamento direto de produtos de PCR recuperados a partir de amostras de águas superficiais.

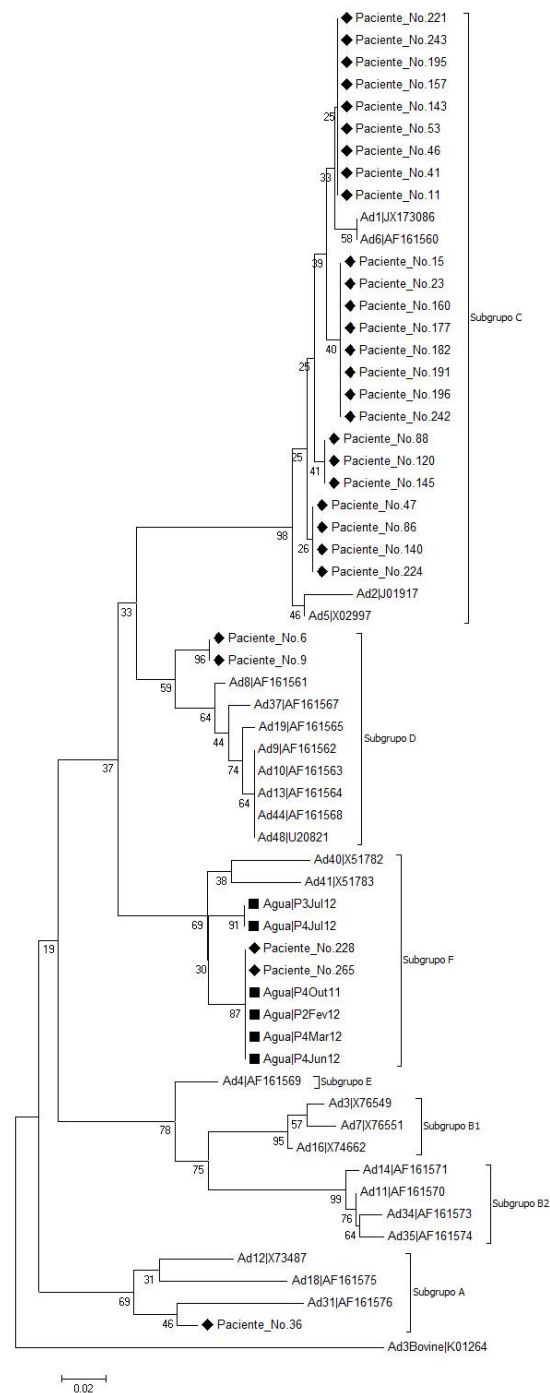


Figura 29. Árvore filogenética construída a partir de sequência de DNA amplificada na região do gene hexon de adenovírus humano, coletado a partir de amostras de águas superficiais e fezes de crianças com diarreia na cidade de Vitória, no período de setembro de 2011 a agosto de 2012. As sequências protótipos de referência foram obtidas no *GenBank*. Amostras de referência são indicadas com o genogrupo / genótipo seguido pelo número de acesso do *GenBank*. A árvore filogenética foi construída usando o método *neighbor-joining*, com um *bootstrap* de 2000 repetições. Cepas sequenciadas no estudo estão destacadas com ♦ (amostras clínicas) e ■ (amostras ambientais).

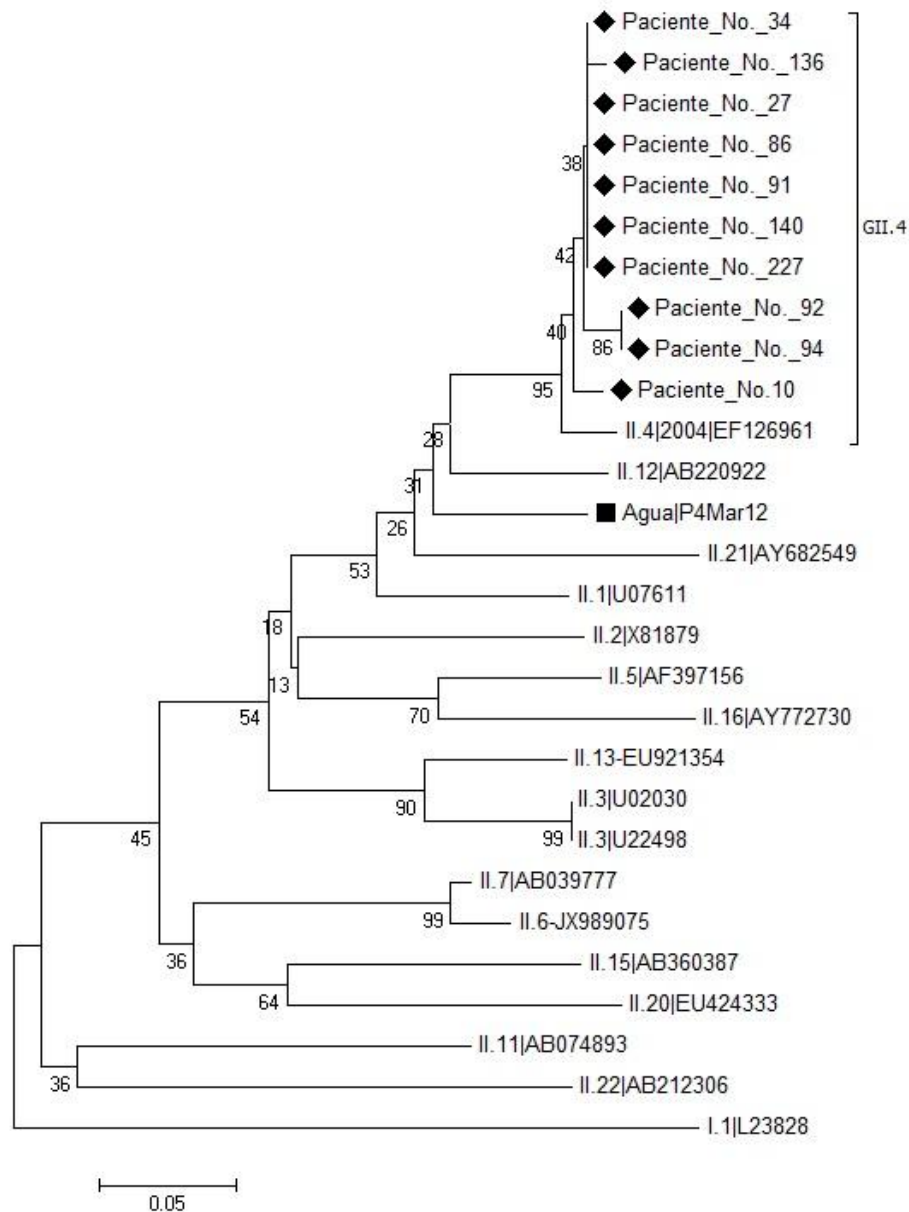


Figura 30. Árvore filogenética construída a partir de sequência de cDNA amplificada na região da polimerase (ORF1) de cepas de norovírus genogrupo II, coletadas a partir de amostras de águas superficiais e fezes de crianças com diarreia na cidade de Vitória, no período de setembro de 2011 a agosto de 2012. As sequências protótipos de referência foram obtidas no *GenBank*. Amostras de referência são indicadas com o genogrupo / genótipo seguido pelo número de acesso do *GenBank*. A árvore filogenética foi construída usando o método *neighbor-joining*, com um *bootstrap* de 2000 repetições. Cepas sequenciadas no estudo estão destacadas com ◆ (amostras clínicas) e ■ (amostras ambientais).

6 DISCUSSÃO

6.1 Qualidade da água da Baía de Vitória, ES

Em decorrência do despejo de esgoto sem o devido tratamento, microrganismos patogênicos podem entrar em contato com águas superficiais e causar sérias consequências à saúde da população (SINCLAIR, *et al.*, 2009; HEWITT, *et al.*, 2011; KAMEL, *et al.*, 2011). Alguns vírus persistem no ambiente aquático por um tempo superior à maioria das bactérias. Portanto, legislações baseadas em padrões bacterianos, como as adotadas no Brasil, não garantem ausência de risco de doenças virais veiculadas pela água (HEWITT, *et al.*, 2011). No presente estudo, amostras de águas superficiais foram analisadas a fim de avaliar o papel do ambiente aquático contaminado por esgoto sanitário como uma possível rota de transmissão de vírus entéricos à população. Os vírus encontrados no ambiente foram comparados àqueles detectados nos casos de gastroenterite infantil em Unidades de Saúde situadas no entorno do ambiente aquático estudado.

6.1.1 Caracterização físico-química

A qualidade da água é um termo que não se refere somente à pureza do recurso, é também relacionada legalmente aos seus diversos usos (BRASIL, 2005). Tanto as características físico-químicas quanto as microbiológicas da água podem ser alteradas por fontes poluidoras que descartam efluentes no ambiente aquático (BILICH; LACERDA, 2005). A resolução CONAMA nº 357, de 2005, juntamente com sua complementação nº 430, de 2011, é a mais completa ferramenta para se avaliar a qualidade de águas superficiais no país e apresenta mais de 50 parâmetros para análise das condições qualitativas dos recursos hídricos; porém, é inviável a utilização de todos os parâmetros em projetos de monitoramento, tendo em vista os custos e o tempo de execução das análises laboratoriais.

No presente estudo, o parâmetro oxigênio dissolvido foi o que esteve em maior desconformidade segundo a resolução CONAMA nº 357, de 2005. Quedas na concentração de oxigênio devem-se, principalmente, a entrada de efluentes, que possuem altas cargas de matéria orgânica e nutrientes, levando ao aumento da

atividade microbiana e conseqüentemente, o consumo do oxigênio disponível (SCHMALTZ, 2004). Com relação ao pH, verificou-se valores variando em torno da neutralidade, não sendo observadas diferenças estatísticas entre os sítios estudados e os meses de coleta. As medidas de pH obtidas estiveram de acordo com os valores preconizados pela resolução CONAMA n° 357, de 2005, que propõe valores entre 6 a 9. Num corpo d'água, o pH pode ser influenciado pela alteração da temperatura, atividade biológica e lançamentos de efluentes (FRANCA *et al.*, 2006). Diferentemente dos parâmetros OD e pH, a condutividade elétrica não possui valor padrão referenciado pelo CONAMA, porém, de acordo com Macedo (2004), as águas naturais possuem condutividade entre 10 e 100 $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$. Os valores obtidos nessa pesquisa para a variável condutividade estiveram dentro da faixa estipulada por Macedo (2004).

Analisando os resultados do parâmetro turbidez, o maior valor foi observado em janeiro de 2012, enquanto os menores valores de condutividade e salinidade também ocorreram neste mês. A relação inversa da turbidez com as variáveis condutividade e salinidade pode ter ocorrido por influência de uma alta precipitação (406 mm) ocorrida no período. Sabe-se que grandes volumes de chuva podem causar um efeito diluidor dos íons presentes em corpos d'água, reduzindo as medidas de condutividade e salinidade nos ambientes aquáticos (JENG *et al.*, 2005). A condutividade elétrica da água está diretamente relacionada com as características geoquímicas e as condições climáticas da região onde se localiza o manancial (DAVINO, 1984). De acordo com os dados obtidos, nota-se que nos períodos em que foram observados altos níveis de turbidez, as concentrações de oxigênio também eram menores. Isso pode ser reflexo do obstáculo que as partículas dispersas fazem na água, impedindo a penetração dos raios solares e a conseqüente fotossíntese, prejudicando a oxigenação do meio (SCHMALTZ, 2004).

Nesse estudo, com exceção dos resultados obtidos para oxigênio dissolvido da água, foi observada para os outros parâmetros das análises físico-químicas, uma pequena variação ao longo do período de monitoramento. Esses dados corroboram a teoria de que regiões tropicais tendem a ser homogêneas com relação às condições físico-químicas das águas superficiais (KRUPEK, *et al.*, 2010). Nossos resultados confirmaram o impacto antrópico na região, principalmente em função dos baixos

valores de oxigênio dissolvido encontrados. Entretanto, a avaliação de outros parâmetros de qualidade da água não realizados nesse estudo não pode ser negligenciada.

6.1.2 Avaliação microbiológica

6.1.2.1 Bactérias indicadoras de poluição fecal

Pesquisas anteriores realizadas na região haviam demonstrado elevadas concentrações de bactérias indicadoras de poluição fecal nas águas superficiais da Baía de Vitória, acima de $1,0 \times 10^3$ UFC 100 mL⁻¹ (JESUS, *et al.*, 2004; KELLER, *et al.*, 2013). Nesse estudo, também foram identificadas concentrações elevadas desses microrganismos, com valores máximos de $2,4 \times 10^4$ e $1,5 \times 10^4$ UFC por 100 mL⁻¹ de coliformes termotolerantes e *Enterococci*, respectivamente. Não foram observadas diferenças significativas entre as médias das concentrações obtidas nos períodos seco e chuvoso, tanto para coliformes termotolerantes quanto para *Enterococci*. Em outro estudo realizado no Sudeste do Brasil por Corrêa e colaboradores (2006), os índices de bactérias indicadoras de poluição fecal também se mostraram constantes entre as estações seca e chuvosa, principalmente em função do clima tropical da região.

Independente da estação do ano e do regime de chuvas, para avaliar as condições de balneabilidade em corpos d'água no Brasil, considera-se a Resolução CONAMA nº 274, de 2000, que avalia a concentração dos indicadores bacterianos de poluição fecal na água: coliformes termotolerantes, *E. coli* e/ou *Enterococci*. Essa legislação recomenda que, quando forem utilizados mais de um indicador microbiológico, as águas devem ter suas condições avaliadas de acordo com o critério mais restritivo. O valor mais restritivo para o tipo de água em questão, mencionado na legislação, é para *Enterococci*, que determina um limite máximo de $1,0 \times 10^2$ UFC por 100 mL⁻¹, enquanto para coliformes termotolerantes e *E. coli* os valores são $1,0 \times 10^3$ e $8,0 \times 10^2$ UFC por 100 mL⁻¹, respectivamente (BRASIL, 2000). As densidades médias dos indicadores bacterianos (coliformes termotolerantes, $3,6 \times 10^3$ UFC por 100 mL⁻¹; *Enterococci*, $7,1 \times 10^2$ UFC por 100 mL⁻¹) obtidos no presente estudo ultrapassaram os limites estipulados pela resolução CONAMA nº 274, de 2000. Dessa maneira,

infere-se que a constante presença desses indicadores bacterianos nas águas superficiais da Baía de Vitória seja proveniente do descarte contínuo de esgoto sem tratamento (CORREIA JUNIOR, 2003; MORAIS, 2008), o que caracteriza condições impróprias para a recreação humana, prejudicando o potencial turístico da região e outros usos.

6.1.2.2 Vírus entéricos

Várias pesquisas têm sido desenvolvidas a fim de avaliar a qualidade microbiológica da água, com ênfase na análise de bactérias indicadoras de poluição fecal (ARNOLD, *et al.*, 2013; KISHINHI, *et al.*, 2013; PRAVEENA, *et al.*, 2013). No Brasil, alguns grupos de pesquisa também utilizam em seus estudos a investigação de vírus entéricos humanos em águas ambientais (MIAGOSTOVICH, *et al.*, 2008; MORESCO, *et al.*, 2012; VECCHIA, *et al.*, 2012; VIEIRA, *et al.*, 2012; KELLER, *et al.*, 2013). Entretanto, poucos relacionam esses vírus àqueles detectados em casos de gastroenterite na população. Essa falta de correlação nos estudos que envolvem análises clínicas e ambientais é gerada pela dificuldade de elaborar um planejamento experimental para coleta das amostras no mesmo período de tempo e em um local que possua pouca influência de populações externas.

No presente estudo, os vírus entéricos foram detectados no ambiente aquático nas estações seca e chuvosa, não demonstrando padrão de sazonalidade. Semelhante a essa pesquisa, um estudo realizado em Barcelona na Espanha, demonstrou ausência de sazonalidade para a detecção de RV no ambiente (VILLENNA, *et al.*, 2003). Entretanto, alguns autores mostraram padrões sazonais de detecção de vírus entéricos em amostras ambientais (HEWITT, *et al.*, 2007; MORGA, *et al.*, 2009). Em uma região da Itália, por exemplo, RV foi mais prevalente nos meses chuvosos (GRASSI, *et al.*, 2009). A ausência de sazonalidade verificada no presente estudo coincide com os dados registrados para os países em desenvolvimento, que possuem a maioria dos casos de gastroenterite, principalmente de etiologia viral, durante todo o ano, enquanto nos países desenvolvidos, essas doenças predominam no inverno (WALDMAN, *et al.*, 1997). Durante o período de monitoramento, quando correlacionados os resultados dos parâmetros físico-químicos com a detecção de vírus entéricos na água, não foi possível verificar

correlação significativa entre as variáveis. Entretanto, Vieira, *et al.* (2012) observaram correlação positiva entre os vírus detectados na água e a turbidez. Phanuwat, *et al.* (2006) encontraram correlação negativa entre os vírus detectados na água e a condutividade. Poma, *et al.* (2012) encontraram correlação negativa entre os vírus e o oxigênio dissolvido. A relação inversa entre oxigênio dissolvido e as variáveis microbiológicas da água está relacionada às descargas de matéria orgânica nas águas superficiais. Este material é decomposto por bactérias aeróbias em um processo que consome o oxigênio (POMA, *et al.*, 2012). A partir dessas evidências, pode-se comprovar a influência dos fatores ambientais na ocorrência e na persistência dos vírus entéricos em águas superficiais. Esses fatores têm sido amplamente estudados e devem ser considerados quando se avalia a presença de patógenos virais no ambiente (FONG; LIPP, 2005).

A presença dos vírus entéricos nas amostras de água superficiais em que as condições bacteriológicas estiveram de acordo com as legislações ambientais brasileiras, fortalece o indício de que esse grupo de vírus é um potencial indicador de contaminação fecal. Diversos autores enfatizam que os vírus entéricos podem ser utilizados como ferramenta importante para o monitoramento ambiental, principalmente quando é demonstrada a presença de genomas virais em locais onde a contaminação fecal por indicadores bacterianos não é evidente (BOFILL-MAS, *et al.*, 2006; SERRACA, *et al.*, 2010; HE, *et al.*, 2012). Estudos mostraram não existir correlação direta entre a prevalência de vírus entéricos e os indicadores bacterianos de poluição fecal em águas ambientais (MIAGOSTOVICH, *et al.*, 2008; MORESCO, *et al.*, 2012; LEE, *et al.*, 2013). O presente monitoramento revelou que independente da variação observada dos indicadores bacterianos de poluição fecal, os vírus entéricos analisados estiveram sempre presentes nas amostras de água.

O percentual de detecção de vírus entéricos (RV, NoV, AdV) obtido nas águas superficiais foi de 71%, diferentemente de outras pesquisas realizadas por Fernandez, *et al.* (2012), Vieira, *et al.* (2012) e He, *et al.* (2012), que encontraram percentuais de detecção menores, 25,4%, 51,4% e 53,7%, respectivamente. Por outro lado, Kishida *et al.* (2012), Hernandez-Morga, *et al.* (2009) e Hewitt, *et al.* (2013) obtiveram maiores percentuais de detecção (77%, 92,5% e 100%) de vírus entéricos em amostras de águas superficiais. Na atual pesquisa, os três vírus foram

detectados em praticamente todo o período de monitoramento. Rotavírus foi o patógeno mais frequente, sendo detectado em 56% das amostras de água, enquanto NoV esteve presente em 31% e AdV em 29% das amostras. Em pesquisas realizadas por Miagostovich, *et al.* (2008) e He, *et al.*, (2012), todos os vírus avaliados foram encontrados, sendo que o RV também foi o mais frequente nas amostras de águas superficiais 44,2% e 48,1%, respectivamente. A presença dos três principais vírus causadores de gastroenterite aguda observada nas águas superficiais da Baía de Vitória fornecem evidências que esses vírus circulam na população da região.

Os resultados de detecção viral dessa pesquisa foram obtidos por métodos de biologia molecular. Sabe-se que esses métodos não são capazes de diferenciar os vírus infecciosos dos não infecciosos, porém a detecção do ácido nucleico viral em águas pode sugerir a existência de contaminação por esgoto doméstico (LAMBERTINI, *et al.*, 2008). Em um estudo realizado com amostras de águas superficiais, que comparou as proporções de partículas virais não infecciosas e infecciosas com os resultados obtidos pela PCR e cultura de células, foi observado que os resultados de detecção viral pela PCR podem ser extrapolados para os vírus infecciosos não cultiváveis (HUSMAN, *et al.*, 2009).

Quando se comparou as técnicas de PCR qualitativa e quantitativa para detecção viral nas amostras de água, observou-se que nos ensaios de qPCR utilizados nesse estudo foram obtidos 53,3% a mais de amostras positivas, permitindo a detecção de vírus em amostras que haviam sido consideradas negativas para ensaios de nested-PCR. Um resultado semelhante foi encontrado por De Paula, *et al.* (2007), que avaliou amostras de água de rio e mostrou praticamente 70% a mais de positividade pela técnica qPCR, confirmando a maior sensibilidade do ensaio quantitativo para detecção de ácidos nucleicos. A principal vantagem de utilizar a qPCR é a possibilidade de quantificação do genoma viral nas amostras, de modo que não é possível cultivar alguns vírus por técnicas de cultura celular (STRAUB, *et al.*, 2007). Recentemente, foi demonstrada a capacidade de cultura de NoV fazendo com que esses vírus infectem células B *in vitro* e *in vivo*. Além disso, a replicação de NoV murino foi reduzida *in vivo* quando a microbiota intestinal foi esgotado por meio de administração do antibiótico via oral. Assim, identificou-se as células B como um

alvo celular de NoV e bactérias entéricas como um fator estimulador de infecção por norovírus (JONES, *et al.*, 2014).

Comparando-se os estudos da quantificação de vírus entéricos em águas superficiais de rios, as pesquisas realizadas em águas estuarinas ainda são raras. Nessa pesquisa, os três vírus obtiveram médias de quantificação dos genomas virais semelhantes, não evidenciando diferenças significativas, com valores de cópias de genoma por litro variando entre $1,2 \times 10^1$ e $9,3 \times 10^3$ cg L⁻¹ para RV, $1,1 \times 10^1$ e $1,5 \times 10^4$ cg L⁻¹ para NoV e $1,6 \times 10^0$ e $2,7 \times 10^2$ cg L⁻¹ para AdV. Em um estudo de monitoramento realizado na lagoa Rodrigo de Freitas no Rio de Janeiro, Vieira, *et al.* (2012) obtiveram resultados similares de quantificação àqueles encontrados nesse monitoramento, com valores entre $3,0 \times 10^1$ e $5,6 \times 10^4$ cg L⁻¹ para RV, $1,4 \times 10^2$ e $3,2 \times 10^2$ cg L⁻¹ para NoV e $1,2 \times 10^1$ e $1,2 \times 10^3$ cg L⁻¹ para AdV. Entretanto, Haramoto, *et al.* (2010) e Moresco, *et al.* (2012) encontraram números de cópias genômicas maiores para AdV numa faixa de $1,9 \times 10^4$ e $2,2 \times 10^6$ cg L⁻¹ e $3,1 \times 10^3$ e $1,3 \times 10^5$ cg L⁻¹, respectivamente. Os diferentes valores de cópias genômicas virais encontrados nas amostras ambientais podem ser consequência dos diferentes métodos de concentração e da eficiência de recuperação viral de cada método empregado (GRASSI, *et al.*, 2010; PRATA, *et al.*, 2012).

As concentrações virais encontradas nas águas superficiais avaliadas nessa pesquisa são preocupantes, considerando que para muitos vírus entéricos, o número de partículas virais infecciosas necessárias para causar uma infecção é extremamente baixo (HEALTH CANADA, 2011). Teoricamente, uma única partícula viral infecciosa é capaz de causar uma infecção, embora mais de uma partícula viral seja necessária (HEALTH CANADA, 2011). Haas, *et al.* (1999) relataram que a dose infecciosa mediana para rotavírus é 5,597, enquanto NoV têm doses infecciosas que variam de 10 a 100 partículas virais (TAYLOR, 2011).

A ocorrência e a quantificação de vírus entéricos em águas superficiais da Baía de Vitória, no Espírito Santo, foram pesquisadas a fim de melhor compreender a distribuição desses patógenos no ambiente. Os três vírus pesquisados foram detectados em praticamente todo o período de monitoramento, indicando que existe uma considerável disseminação nas águas superficiais estudadas. A contaminação

ambiental pode representar um risco para as populações humanas, visto que esses patógenos são conhecidos agentes causadores de gastroenterite aguda viral.

6.2 Prevalência de vírus entéricos na população infantil

Os surtos de gastroenterite associados aos vírus entéricos veiculados pela água têm sido documentados no decorrer dos anos em todo o mundo (PARSHIONIKAR, *et al.*, 2003; DIVIZIA, *et al.*, 2004; HEERDEN, *et al.*, 2005; LIPRANDI, *et al.*, 2009; SDIRILOULIZI, *et al.*, 2010; BORCHARDT, *et al.*, 2012). Gastroenterite aguda é uma doença comum na infância, que causa altas taxas de internações e mortalidade, especialmente nas regiões menos desenvolvidas do mundo. A cada ano, a gastroenterite é responsável por cerca de 1,4 milhões de mortes, que ocorrem principalmente em países de baixa e média renda (WARDLAW, *et al.*, 2010). Apesar de existirem diferentes grupos de agentes patogênicos envolvidos na etiologia dessas doenças, os vírus entéricos desempenham um papel chave como agentes causadores de gastroenterite. Assim como observado nesse estudo, doenças diarreicas são mais comuns nos primeiros anos de vida, em locais onde a maioria da população vive em condições de falta de higiene, incluindo a água de má qualidade e ausência de saneamento (GLASS, *et al.*, 2001; VERNACCHIO, *et al.*, 2006). Como agravante para a disseminação desses vírus, populações de baixa renda geralmente possuem hábitos de higienização pessoal não adequados, o que facilita o surgimento de casos secundários, resultando na transmissão pessoa a pessoa, dentro das famílias e nos locais com aglomeração de pessoas, principalmente nas escolas e creches (ALFANO-SOBSEY, *et al.*, 2012; CHEN, *et al.*, 2013).

Nossos resultados mostraram uma prevalência de 93,3% de vírus entéricos na população estudada, e esses achados foram compatíveis àqueles observados em crianças com diarreia tanto em países em desenvolvimento, como Índia (CHITAMBAR, *et al.*, 2012) e Brasil (FERREIRA, *et al.*, 2012), quanto em países desenvolvidos, como a Espanha (SÁNCHEZ-FAUQUIER, *et al.*, 2011) e os Estados Unidos (GRANT, *et al.*, 2012). Portanto, independentemente do nível socioeconômico, a vigilância desses patógenos é um importante indicador a fim de fornecer informações sobre os vírus entéricos que circulam nas comunidades humanas. Essa informação é essencial para uma avaliação do risco à de saúde

pública associada à exposição a águas superficiais de baixa qualidade (HAAS, *et al.*, 1993; VAN HEERDEN, *et al.*, 2005; VENTER, *et al.*, 2007; ESPINOSA, *et al.*, 2008).

Analisando os dados da prevalência de vírus entéricos na população infantil com gastroenterite aguda, não foi observada diferença entre as frequências dos vírus entéricos detectados nas amostras de fezes. Entretanto, as prevalências de AdV e RV foram ligeiramente superiores aos NoV. Assim como nessa pesquisa, foi realizado na Tunísia, um estudo epidemiológico sobre a prevalência de vírus entéricos em amostras clínicas de crianças com gastroenterite aguda e em amostras ambientais de água (SDIRI-LOULIZI, *et al.*, 2010). Os resultados revelaram que RV foi o patógeno viral predominante, associado aos casos de gastroenterite aguda infantil. Dados obtidos de outros estudos clínicos indicaram prevalências semelhantes em amostras de fezes no Japão (YANG, *et al.*, 2010), Alemanha (WIEGERING, *et al.*, 2011), Venezuela (GONZALEZ, *et al.*, 2011), Brasil (FERREIRA, *et al.*, 2012), Estados Unidos (GRANT, *et al.*, 2012) e Índia (CHITAMBAR, *et al.*, 2012).

Variações na localização geográfica e as condições climáticas das áreas monitoradas são os principais fatores pela variabilidade dos resultados obtidos nos diferentes estudos de prevalência de vírus entéricos (CHEN, *et al.*, 2013). Em países de climas temperados, a maior prevalência da doença acontece durante os meses mais frios do ano (SDIRI-LOULIZI, *et al.*, 2008, KITTIGUL, *et al.*, 2009). Estudos realizados no Canadá (LEVETT, *et al.*, 1996), Japão, (DEY, *et al.*, 2010) e Tunísia (SDIRI-LOULIZI, *et al.*, 2008) mostraram infecções associadas aos NoV ocorrendo principalmente no inverno. No presente estudo, a maioria das infecções por rotavírus ocorreu durante o verão, enquanto as infecções por AdV e NoV não apresentaram tendências sazonais evidentes no período de monitoramento.

Além da alta prevalência dos vírus entéricos nas amostras, nossos dados revelaram uma alta frequência de co-infecções (51%) nos casos positivos, envolvendo os três vírus (22%) na mesma amostra. Resultados semelhantes foram publicados em outras pesquisas (SÁNCHEZ-FAUQUIER, *et al.*, 2011; CHITAMBAR, *et al.*, 2012; CHEN, *et al.*, 2013). Embora se imagine que mais de um patógeno possa potencializar os sintomas de uma infecção, mais pesquisas são necessárias para

entender os mecanismos biológicos específicos de patógenos entéricos em casos de infecções mistas (LIU, *et al.* 2006).

A análise dos indicadores demográficos dos pacientes entrevistados nessa pesquisa, não apontou associação significativa com a ocorrência de vírus entéricos na população estudada. Entretanto, sabe-se que a baixa renda familiar, a ausência de saneamento e a baixa cobertura vacinal são fatores importantes para o aumento da morbidade por gastroenterite. Dados sobre o efeito das medidas de intervenção para o controle das gastroenterites indicam a melhoria dos serviços de saneamento básico como a principal medida mitigadora para o controle das diarreias, sendo influenciada diretamente pelo grau de contaminação ambiental por esgotos e o comportamento da população quanto aos hábitos de higiene e nível de desenvolvimento socioeconômico (KOLSKY, 1993, WALDMAN, *et al.*, 1997). Dentre as crianças com gastroenterite aguda que tiveram diagnóstico positivo para os vírus entéricos analisados, a maior frequência dos casos (41,6%) ocorreu em crianças cuja faixa etária era de 1 a 3 anos no momento da infecção, sugerindo que as crianças a partir de 1 ano de idade têm mais oportunidades de exposição a ambientes infectados por vírus do que as mais jovens (VELAZQUEZ, *et al.*, 2000). Nessa faixa etária, a proporção de infecções por rotavírus e norovírus foi maior que aquela obtida por em infecções causadas por adenovírus.

Assim, dos 125 casos de gastroenterite aguda com diagnóstico positivo de vírus entéricos avaliados nesse estudo, a maior prevalência foi observada para infecções mistas, quando comparada com infecções simples. Semelhantemente ao estudo desenvolvido por Barreira, *et al.*, (2010), rotavírus foi o patógeno predominante em infecções mistas, sendo que o que apresentou os maiores números de cópias genômicas nas fezes dos pacientes. A partir desses dados, infere-se que o rotavírus tenha sido a principal causa dos sintomas de diarreia nos casos de infecções mistas avaliados. Em síntese, esse estudo contribuiu com informações para tentarmos esclarecer a etiologia dos casos de gastroenterite aguda na população infantil em duas Unidades de Saúde na cidade de Vitória, Espírito Santo.

6.3 Análises filogenéticas

Os vírus entéricos entram em contato com o ambiente aquático, principalmente, através da excreção humana de uma população infectada, em consequência do descarte de esgoto. A partir de maus hábitos higiênico-sanitários, esses mesmos vírus presentes no ambiente contaminado voltam a infectar a população (KIULIA, *et al.*, 2010). No presente estudo, os genomas dos vírus entéricos foram detectados nas águas superficiais formaram grupos filogenéticos com altas similaridades de sequências genômicas com aqueles dos vírus detectados nas fezes dos pacientes infantis avaliados. Um resultado semelhante também foi observado no estudo realizado por Kishida e colaboradores (2012), no qual se verificou que o número de casos de gastroenterite aguda infecciosa numa determinada região do Japão esteve claramente correlacionado às concentrações de vírus nas águas superficiais do rio estudado.

Em um estudo sobre a distribuição temporal e geográfica do rotavírus humano no mundo, foram analisadas 45.571 amostras, com dados coletados a partir de 124 estudos em 52 países, e ficou demonstrado que os genótipos G mais comuns são: G1, G2, G3, G4 e G9 (SANTOS; HOSHINO, 2005). Outro estudo realizado no Brasil por Soares e colaboradores (2014), demonstrou maior frequência para o genótipo G2, representando 41% dos casos, seguido de G3 (19%), G1 (8%), G9 (3%) e G12 (2%). Na atual pesquisa, o genótipo G3 (71,4%) foi predominante nas amostras clínicas e ambientais, sugerindo que ele possa ter desempenhado um papel importante nos casos de gastroenterite infantil associados aos RV. Os resultados da caracterização genotípica demonstraram que nenhum rotavírus possuía o genótipo vacinal (G1). Dessa forma, a emergência desses genótipos não vacinais pode ser explicada pelo uso da vacina com rotavírus humano atenuado (G1), que pode ter causado a seleção e reemergência de outras cepas do vírus (NORDGREN, *et al.*, 2012; ARAGÃO, *et al.*, 2013).

No Brasil, mesmo após a introdução da vacina anti-RV no calendário nacional de vacinação, em fevereiro de 2006, esse patógeno continua sendo um dos principais agentes virais causadores de gastroenterite infantil (CARVALHO-COSTA, *et al.*, 2009). Nossos dados demonstram que grande parte da população infantil (31%) da

região estudada não foi devidamente vacinada, reduzindo a cobertura vacinal para a doença. Sendo assim, a caracterização dos genótipos de rotavírus no ambiente e na população é útil para fornecer informações acerca da eficácia da vacina anti-RV e ainda contribui para que os gestores de políticas públicas possam utilizar estas informações nas tomadas de decisões sobre o gerenciamento do programa nacional de imunização (SOARES, *et al.*, 2014).

Em relação aos AdV, seus sorotipos são especificamente relacionados com os sintomas apresentados pela doença (JIANG, 2006). Por isso, há um crescente interesse clínico na determinação do sorotipo desse vírus em isolados clínicos. Os adenovírus do subgrupo F, sorotipos 40 e 41, são vírus de veiculação hídrica importantes, relativamente resistentes aos tratamentos convencionais de esgoto e são identificados como o segundo agente mais comum nos casos de gastroenterite em crianças depois de RV (KO, *et al.*, 2003). Essa pesquisa, embora limitada a um pequeno número de amostras clínicas sequenciadas, mostra uma alta diversidade entre as cepas de AdV associadas aos casos de gastroenterite infantil. Observa-se que o subgrupo C foi o mais comum, seguido pelo subgrupo F e D. No subgrupo F estão classificados os sorotipos 40 e 41, que são os principais adenovírus associados a infecções entéricas (SHINOZAKI, *et al.*, 1991; DE JONG, *et al.*, 1993). Variantes de adenovírus pertencentes ao subgrupo F foram encontradas tanto nas amostras ambientais quanto nas amostras clínicas, evidenciando também que elas possam ter desempenhado um papel importante nos casos de gastroenterite infantil associados aos adenovírus.

Ao contrário do observado para os AdV, onde se observou uma alta diversidade genotípica, somente o genótipo GII.4 foi encontrado para NoV. Esse dado corrobora com os resultados obtidos em outras pesquisas realizadas no Brasil e no mundo, onde o genótipo GII.4 foi o mais prevalente (FERREIRA, *et al.*, 2008; ARAGÃO, *et al.*, 2010; SIQUEIRA, *et al.*, 2011). Dados obtidos em outros estudos também mostram norovírus GII.4 sendo predominante, porém circulando concomitantemente com a presença de outros genótipos (FIORETTI, *et al.*, 2011; ARAGAO, *et al.*, 2013).

A tipagem dos subtipos do genótipo GII.4 de NoV identificou a circulação de 5 variantes diferentes nos últimos anos. Uma das variantes foi identificada em um caso muito grave de gastroenterite (BAERT, *et al.*, 2009). É relatado que as variantes GII.4 evoluem mais rápido do que os outros genótipos, numa taxa de mutação de 5 a 36 vezes mais elevada em comparação com os genótipos não GII.4 (BULL, *et al.*, 2010). Dessa forma, mais dados de vigilância de outros continentes são necessários para determinar a implicação das sublinhagens de GII.4 em epidemias globais.

É importante ressaltar a emergência de novas variantes GII.4 de NoV que coincide com os aumentos consideráveis de infecções e epidemias de gastroenterite causadas por NoV em todo o mundo (WHITE, 2004). Infecções por NoV associados aos óbitos foram mais comumente descritas em populações idosas e geralmente foram adquiridas em instalações de cuidados de saúde (TRIVEDI, *et al.*, 2013). Estudos anteriores também sugeriram norovírus como uma potencial causa de morte em populações vulneráveis. Uma revisão de focos do lar de idosos identificou 16 óbitos associados à norovírus, entre 1997 e 2007 (GRIEG, *et al.*, 2009).

Por fim, os vírus responsáveis por gastroenterite aguda foram detectados nas águas superficiais da Baía de Vitória que são utilizadas pela população para recreação e atividades pesqueiras e nas fezes de crianças que habitam a região. Esse estudo fornece evidências de que os vírus patogênicos possuem ampla disseminação ambiental e são altamente prevalentes nos casos de gastroenterite infantil da região de São Pedro, Vitória, ES. As informações obtidas nessa investigação epidemiológica mostram que estudos envolvendo o ambiente e a população, são de fundamental importância para compreendermos melhor a circulação de patógenos virais entéricos no ambiente e nas comunidades humanas. Essas informações poderão ser úteis para outros estudos de avaliação dos riscos à saúde pública, associados à exposição a fontes de água de qualidade comprometida (SINCLAIR, *et al.*, 2009; KAMEL, *et al.*, 2011). O monitoramento forneceu também informações valiosas para futuros projetos de saúde pública com objetivos de reduzir os coeficientes de morbidade e mortalidade infantil, decorrentes de doenças diarreicas.

7 CONCLUSÕES

- Os resultados das análises físico-químicas da água mostraram resultados de oxigênio dissolvido em desconformidade com os limites preconizados pela resolução CONAMA n° 357, de 2005, indicando que a região está sob impacto antropogênico resultante do descarte de esgoto sanitário;
- As concentrações de coliformes termotolerantes e *Enterococci* foram, em média, superiores aos limites estabelecidos para águas destinadas à recreação de contato primário conforme resolução que assegura níveis próprios de balneabilidade;
- Os vírus entéricos avaliados - adenovírus, rotavírus e norovírus – possuem ampla disseminação ambiental, sendo detectados em praticamente todo o monitoramento. Dessa forma, a contaminação ambiental representa um potencial risco à saúde das populações humanas;
- Esse estudo contribuiu com informações para tentarmos esclarecer a etiologia das doenças diarreicas infantis nas Unidades de Saúde avaliadas e evidenciou altas prevalências para os três vírus entéricos analisados – rotavírus, norovírus e adenovírus -, fornecendo dados epidemiológicos importantes sobre a circulação desses patógenos na população;
- O estudo realizado com as amostras clínicas demonstrou que o rotavírus foi predominante nas infecções mistas e obteve os maiores números de cópias genômicas nas fezes dos pacientes;
- A análise das sequências genômicas virais revelou que houve a formação de grupos filogenéticos com altas similaridades entre os vírus entéricos detectados no ambiente aquático contaminado e na população infantil da região, evidenciando que os vírus patogênicos podem circular concomitantemente entre as duas matrizes.

8 RECOMENDAÇÕES

- Utilizar técnicas de cultura celular para avaliar o potencial infeccioso dos adenovírus detectados nas amostras de águas superficiais, de forma a identificar o risco microbiológico e estimar a probabilidade de infecção humana após a exposição à água superficial contaminada;
- Monitorar as águas superficiais da Baía de Vitória antes e após a implantação do sistema de esgotamento sanitário na região;
- Assegurar a continuidade das atividades de pesquisa com vírus entéricos nas populações, com objetivo de manter a vigilância epidemiológica da circulação viral, considerando a necessidade de acompanhamento do proceso vacinal.

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ABAD, F.X.; PINTÓ, R.M.; GAJARDO, R.; BOSCH, A. Viruses in mussels: public health implications and depuration. **Journal of Food Protection**, v.60, p.677–681, 1997.
2. ABBASZADEGAN, M.; HUBER, M. S.; GERBA, C. P.; PEPPER I. L. Detection of enteroviruses in groundwater with the polymerase chain reaction. **Applied and Environmental Microbiology**, v.59, p.1318-1324, 1993.
3. ABBASZADEGAN, M.; STEWART, P.; LECHEVALLIER, M. A Strategy for Detection of Viruses in Groundwater by PCR. **Applied and Environmental Microbiology**, v.65, p. 444-449, 1999.
4. ABS, F.X.; PINTÓ, R.M.; BOSCH, A. Desinfection of human enteric viruses on fomites. **Microbiology Letters**, v.156, p.107-111, 1997.
5. AHMAD, A.; DADA, A.C.; USUP, G.; HENG, L.Y. Validation of the Enterococci indicator for bacteriological quality monitoring of beaches in Malaysia using a multivariate approach. **Springerplus**. v.2, n.425, 2013.
6. ALBINANA-GIMENEZ, N.; MIAGOSTOVICH, M.P.; CALGUA, B.; HUGUET, J.M.; MATIA,L.; GIRONES,R. Analysis of adenoviruses and polyomaviruses quantified by qPCR as indicators of water quality in source and drinking-water treatment plants. **Water Research**, v.43, p.2011-2019, 2009.
7. ALBINANA-GIMENEZ, N., CLEMENTE-CASARES, P., BOFILL-MAS, S., HUNDESA, A., RIBAS, F. AND GIRONES, R. Distribution of human polyomaviruses, adenoviruses, and hepatitis E virus in the environment and in a drinking-water treatment plant. **Environmental, Science and Technology**, v.40, p.7416–7422, 2006.
8. ALFANO-SOBSEY E, SWEAT D, HALL A. Norovirus outbreak associated with undercooked oysters and secondary household transmission. **Epidemiology and Infectious**, v. 140, p. 276-282, 2012.
9. ALLARD, A.; ALBINSSON, B.; WALDELL, G. Rapid typing adenoviruses by a general PCR combined with restriction endonucleases analysis. **Journal Clinical Microbiology**, v.39, n.2, p.498-505, 2001.
10. ANDERSON, J.M.; BAIRD-PARKER, A.C.A rapid and direct plate method for enumerating *Escherichia coli* biotype I in food. **Journal of Applied Bacteriology**, v.39, p.121–127, 1975.
11. APHA; AWWA; WEF. **Standard Methods for Examination of Water and Wastewater**. American Public Health Asssocation, ed. 21, 2005.
12. APPLETON, H. Control of food-borne viruses. **British Medical Bulletin**, v.56, p.172-183, 2000.
13. ARAGAO, G.C.; OLIVEIRA, D.S.; SANTOS, M.C.; MASCARENHAS, J.D.P.; OLIVEIRA, C.S.; LINHARES, A.C.; GABBAY, Y.B. Molecular characterization of norovirus, sapovirus and astrovirus in children with acute gastroenteritis from Belém, Pará, Brazil. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 1, p. 149-158, 2010.
14. ARNOLD, B.F.; SCHIFF, K.C.; GRIFFITH, J.F.; GRUBER, J.S.; YAU, V.; WRIGHT, C.C.; WADE, T.J.; BURNS, S. HAYES, J.M.; MCGEE, C.; GOLD, M.; CAO, Y.; WEISBERG, S.B.; COLFORD, J.M. JR. Swimmer illness associated with marine water exposure and water quality indicators: impact of widely used assumptions. **Epidemiology**, v.24, n.6, p.845-853, 2013.

15. ARNONE, R. D.; WALLING, J.P. Waterborne pathogens in urban watersheds. **Journal of Water and Health**, v.5, p.149-162, 2007.
16. ANTUNES, H.; AFONSO, A.; ITURRIZA, M.; MARTINHO, I.; RIBEIRO, C.; ROCHA, S.; MAGALHÃES, S.; CARVALHO, L.; BRANCA, F.; GRAY, J. G2P[4] the most prevalent rotavirus genotype in 2007 winter season in an European non-vaccinated population. **Journal of Clinical Virology**, n.45, p.76–78, 2009.
17. BAERT L, UYTENDAELE M, STALS A, VAN COILLIE E, DIERICK K, DEBEVERE J, BOTTELDOORN N. Reported foodborne outbreaks due to noroviruses in Belgium: the link between food and patient investigations in an international context. **Epidemiology and Infection**, v. 137, p. 316-325, 2009.
18. BASTOS, A.C.B.; QUARESMA, V.S.; DALMASCHIO, R.G.; CARMO,D.A.; SOUZA, P.M.; LIMA, B.; POZZI, F. Dinâmica Sedimentar e Morfologia de Fundo do Sistema Estuarino de Vitória, ES. **Congresso da Associação Brasileira de Estudos do Quaternário**, 2007.
19. BERECIARTU, A. B. K. G. J. Identification of viral agents causing gastroenteritis among children in Buenos Aires, **Argentina**, 197-203, 2002.
20. BERK, A.J. Adenoviridae: The viruses and their replication. **Fields Virology**, v.2, p.2355-2382, 2007.
21. BLACKLOW, N.R.; GREENBERG, H.B. Viral gastroenteritis. **The New England Journal of Medicine**, v.325, n.4, p.252-64, 1991.
22. BILICH, M. R.; LACERDA, M. P. C. **Avaliação da qualidade da água do Distrito Federal (DF), por meio de geoprocessamento**. Anais. XII Simpósio Brasileiro de Sensoriamento Remoto, Goiânia, Brasil, 16-21 abril 2005, INPE, p. 2059-2065.
23. BISHOP, R.F.; BUGG, H.C.; MASENDY CZ, P.J.; LUND, J.S.; GORRELL, R.J.; BARNES, G.L. Serum, fecal & breast milk rotavirus antibodies as indices in mother-infant pairs. **Journal of Infection Diseases**, v.174, n.1, p.22-29, 1996.
24. **BND** (Banco Nacional de Dados Oceanográficos) Precisões de marés (Máximas e Mínimas diárias). Disponível em: <<http://www.mar.mil.br/dhn/chm/tabuas/index.htm>>. Acesso em 22/07/2012.
25. BOFILL-MAS, S.; ALBINANA-GIMENEZ, N.; CLEMENTE-CASARES, P.; HUNDESA, A.; RODRIGUEZ-MANZANO, J.; ALLARD, A.; CALVO, M.; GIRONES, R. Quantification and stability of human adenoviruses and polyomavirus JCPyV in wastewater matrices. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, p. 7894-7896, 2006.
26. BOOM, R.; SOL, C. J. A.; SALIMANS, M. M. M.; JANSEN,C.L.; WERTHEIM-VAN DILLEN, P. M. E.; VAN DER NOORDAA, J. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. **Journal Clinical Microbiology**, v.28, n.3, p. 495-503, 1990.
27. BORCHARDT, M.A.; BERTZ, P.D.; SPENCER, S.K.; BATTIGELLI, D.A. Incidence of enteric viruses in groundwater from household wells in Wisconsin. **Applied and Environmental Microbiology**, v.69, p.1172-1180, 2003.
28. BOSCH, A. Human enteric viruses in the water environment: a minireview. **International Microbiology**, v.1, p.191-196, 1998.
29. BOSCH, A. **Human viruses in water**. Netherlands: Elsevier, 299p.,2007.
30. BOTTING, M.J.; PORBENI, E.O.; JOFFRES, M.R.; JOHNSTON, B.C.; BLACK, R.E.; MILLS. E.J. Water and sanitation infrastructure for health: The impact of foreign Aid. **Globalization and Health**, v.6, n.12, p.1-8, 2010.

31. BRAGA, B.; HESPANHOL, I.; CONEJO, J.G.L.; BARROS, M.T.L.; VERAS JÚNIOR, M.S.; PORTO, M.F.A.; NUCCI, N.L.R.; JULIANO, N.M.A.; EIGER, S. **Introdução à engenharia ambiental**. 2ed. São Paulo:Prentice Hall, 2003.
32. BRASIL, **Doença Diarréica por Rotavírus**: Vigilância Epidemiológica e Prevenção pela Vacina Oral de Rotavírus Humano - VORH. Informe técnico. 35p. 2006.
33. BRASIL, Portaria do Ministério da Saúde, nº518, 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 República Federativa do Brasil], Brasília.
34. BRASIL, Portaria do Ministério da Saúde, nº2914, de 12 de dezembro de 2011. **Dispõe sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade**. Diário Oficial [da República Federativa do Brasil], Brasília.
35. BRASIL, Resolução CONAMA, nº274, de 29 de novembro de 2000. **Classificação das águas doces, salobras e salinas essencial à defesa dos níveis de qualidade, avaliados por parâmetros e indicadores específicos, de modo a assegurar as condições de balneabilidade**. Diário Oficial [da República Federativa do Brasil], Brasília.
36. BRASIL, Resolução CONAMA, nº357, de 17 de março de 2005. **Classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências**. Diário Oficial [da República Federativa do Brasil], Brasília.
37. BRASIL, Resolução CONAMA, nº430, de 13 de maio de 2011. **Dispõe sobre as condições e padrões de lançamento de efluentes, complementa e altera a Resolução no 357, de 17 de março de 2005, do Conselho Nacional do Meio Ambiente-CONAMA**. Diário Oficial [da República Federativa do Brasil], Brasília.
38. BRAZ, E.M.Q.; FILHO, A.P. Influência do esgoto doméstico no manguezal. **Holos environment**, v.1, n.2, p.199-213, 2001.
39. BROWNELL, M.J.V.J.; HARWOOD, R.C.; KURZ, S.M.; MCQUAIG, J. Confirmation of putative stormwater impact on water quality at a Florida beach by microbial source tracking methods and structure of indicator organism populations. **Water Research**, n.41, p.3747-3757, 2007.
40. BULL RA, HYDE J, MACKENZIE JM, HANSMAN GS, OKA T, TAKEDA N, WHITE PA. Comparison of the replication properties of murine and human calicivirus RNA-dependent RNA polymerases. **Virus Genes**, v. 42, p. 16-27, 2010.
41. CABELLI, V. J. **Health effects for marine recreation waters**. USEPA 600/1-80-031. Health Effects Research Laboratory, Research Triangle Park, N.C. 1983.
42. CALGUA, B.; MENGEWEIN, A.; GRUNERT, A.; BOFILL-MAS, S.; CLEMENTE-CASARES, P.; HUNDESA, A.; WYN-JONES, A.P.; LOPEZ-PILA, J.M.; GIRONES,R. Development and application of a one-step low cost procedure to concentrate viruses from seawater samples, **Journal of Virology Methods**, v.153, p.79–83, 2008.
43. CARVALHO-COSTA FA, ARAUJO IT, SANTOS de ASSIS RM, FIALHO, A.M.; MARTINS, C.M.M.A; BÓIA, M.N.; LEITE, J.P.G. Rotavirus genotype distribution after vaccine introduction, Rio de Janeiro, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v.15, p. 95-97, 2009.
44. CARVALHO-COSTA, F.A.; VOLOTÃO E,M.; ASSIS, R.M.S.; FIALHO, A.M.; ANDRADE J.S.;ROCHA, L.N.;TORT, L.F.; SILVA, M.F.;GÓMEZ, M.M.;SOUZA, P.M.;LEITE, J.P. Laboratory-based rotavirus surveillance during the introduction of a vaccination program, Brazil, 2005-2009. **The Pediatric Infectious Diseases Journal**, v. 30, p. 35-41, 2011.

45. CAUL, E.O. Small round structured viruses: Airborne transmission and hospital control. **The Lancet**, v.343, p.1240-1242, 1994.
46. CDC.Updated Norovirus Outbreak Management and Disease Prevention Guidelines.**Recommendations and Reports**, v.60, n.3, 2011.
47. CDC (Centers for Disease Control and Prevention). Morbidity and Mortality Weekly Report. **Recommendations and Reports**, v.52, n.RR-16, 2003.
48. CHEN Y, LI Z, HAN D. Viral Agents Associated With Acute Diarrhea Among Outpatient Children In Southeastern China. **The Pediatric Infectious Disease Journal** [Epub ahead of print] 2013.
49. CHITAMBAR S, GOPALKRISHNA V, CHHABRA P. Diversity in the Enteric Viruses Detected in Outbreaks of Gastroenteritis from Mumbai, Western India. **International Journal of Environmental Research and Public Health**; v.9, p. 895-915, 2012.
50. CINTRÓN, G.; LUGO, A.E.; MARTINEZ, R. **Structure and functional properties of mangrove forest**. In: D'ARCY, W.G.;CORREA, M.D. (eds.), The Botany and Natural History of Panama. Missouri Botanical Garden, St. Louis, Missouri, p.53-66, 1985.
51. CHIGOR, V.N.; SIBANDA, T.; OKOH, A. I. Assessment of the Risks for Human Health of Adenoviruses, Hepatitis A Virus, Rotaviruses and Enteroviruses in the Buffalo River and Three Source Water Dams in the Eastern Cape. **Food and Environmental Virology**, 2014.
52. CORRÊA, T.A.F.; RAHL, V.L.M.; LOPES, C.A.M. Microbiological evaluation of hydric resources provided by the tietê river, district of vitoriana, botucatu, SP, Brazil. **Arquivo do Instituto de Biologia**, v.73, n.3, p.283-286, 2006.
53. DAS B.K., GENTSCH J.R., CICIRELLO H.G., WOODS P.A.; GUPTA A.; RAMACHANDRAN M.; KUMAR R.; BHAN M.K.; GLASS R.I. Characterization of rotavirus strains from newborns in New Delhi, India. **Journal Clinical of Microbiology**, v.32, p.1820-1822, 1994.
54. DAVINO A. Considerações hidrogeológicas preliminares sobre a bacia hidrográfica do Ribeirão da Onça, São Carlos, SP. Ribeirão Preto, Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras. **Relatório FAPESP**, 1984.
55. DAVISON, A.J.; BENKO, M.; HARRACH, B. Genetic content and evolution of Adenoviruses. **Journal Genetic Virologic**, v.84, p. 2895-2908, 2003.
56. DESSELBERGER, U.; BOSCH J.W.D.; MRUKOWICZ, J.; RODRIGO, C.; GIAQUINTO, C.; VESIKARI, T. Rotavirus types in Europe and their significance for vaccination. **The Pediatric Infectious Disease Journal**, n.25, p.30-41, 2006.
57. DEY SK, PHATHAMMAVONG O, OKITSU S. Seasonal pattern and genotype distribution of norovirus infection in Japan. **The Pediatric Infectious Disease Journal**, 29:32-34, 2010.
58. DI BIASE AM, PETRONE G, CONTE MP. Infection of human enterocyte-like cells with rotavirus enhances invasiveness of *Yersinia enterocolitica* and *Y. pseudotuberculosis*. **Journal of Medical Microbiology**, v. 49, p. 897-904, 2000.
59. DOLIN, R.; BLACKLOW, N.R.; DUPONT, H.; BUSCHO, R.F.; WYATT, R.G.; KASEL, J.A.; HORNICK, R.; CHANOCK, R.M. Biological properties of Norwalk agent of acute infectious nonbacterial gastroenteritis. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**,v.140, n.2, p.578-583, 1972.
60. EISENSTEIN, B. I. The polymerase chain reaction: A new method of using molecular genetics for medical diagnosis. **The New England Journal of Medicine**, v.322, n.3, p.178-183, 1990.

61. ENGLER, J.A.; HONG, J.S. Characterization of the adenovirus fiber protein. **Methods of Molecular Medicine**, v.131, p.281-298, 2007
62. ESTES, M.K.; KANG, G.; ZENG, C.Q.; CRAWFORD, S.E.; CIARLET, M. Pathogenesis of rotavirus gastroenteritis. **Novartis Foundation Symposium**, v.238, p.82-96, 2001.
63. FANKHAUSER, R.L.; MONROE, S.S.; NOEL, J.S.; HUMPHREY, C.D.; BRESEE, J.S.; PARASHAR, U.D.; ANDO, T.; GLASS, R.I. Epidemiologic and molecular trends of "Norwalk-like viruses" associated with outbreaks of gastroenteritis in the United States. **Journal of Infectious Diseases**, v.186, p.1-7, 2002.
64. FARTHING, M.J.G. **Viruses and the Gut**. Welwyn Garden City, Hertfordshire: Smith Kline & French, 112p, 1989.
65. FERNÁNDEZ, M.D.B.; TORRES, C.; POMA, H.R.; RIVIELLO-LÓPEZ, G.; MARTÍNEZ, L.C.; CISTERNA, D.M.; RAJAL, V.B. NATES, S.V.; MBAYED, V.A. Environmental surveillance of norovirus in Argentina revealed distinct viral diversity patterns, seasonality and spatio-temporal diffusion processes. **Science of the Total Environment**, v.437, p.262-269, 2012.
66. FERREIRA MSR, GARCIA RCC, XAVIER MPTP, et al. Genotyping of gastroenteric viruses in hospitalised children: first report of norovirus GII.21 in Brazil. **Memórias do Instituto OswaldoCruz**, v. 107, p. 1064-1067, 2012.
67. FERREIRA, M.S.R.; XAVIER, M.P.T.P.; FUMIAN, T.M.; VICTORIA,M.; OLIVEIRA,S.A. ; PENA,L.H.A.; LEITE,J.P.G.; MIAGOSTOVICH, M.P. Acute Gastroenteritis Cases Associated With Noroviruses Infection in the State of Rio de Janeiro. **Journal of Medical Virology**, v. 80, p. 338-344, 2008.
68. FIORETTI, J.M.; FERREIRA, M.S.R.; VICTORIA, M.; VIEIRA, C.B.; XAVIER, M.P.T.P.; LEITE, J.P.G.; MIAGOSTOVICH, M.P. Genetic diversity of noroviruses in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 106, n. 8, p. 942-947, 2011.
69. FLANNERY, F.; KEAVENEY, S.; RAJKO-NENOW, P.; O'FLAHERTY, V.; DORÉ, W. Concentration of norovirus during wastewater treatment and the impact on oyster contamination. **Applied and Environmental Microbiology**, 2012.
70. FONG, T.T.; LIPP, E.K. Enteric viruses of humans and animals in aquatic environments: health risks, detection, and potential water quality assessment tools. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v.69, p.357-371. 2005.
71. FONGARO, G.; NASCIMENTO, M.A.; VIANCELLI, A.; TONETTA, D.; PETRUCIO, M.M.; BARARDI, C.R. Surveillance of human viral contamination and physicochemical profiles in a surface water lagoon. *Water Science and Technology*, v.66, n.12, p.2682-2687, 2012.
72. FRANCA, R.M; FRISCHKORN, H.; SANTOS, M.R.P; MENDONÇA, L.A.R; BEZERRA, M.C. Contaminação de poços tubulares em Juazeiro do Norte Ceará. **Engenharia Sanitária. Ambiental**, v.11, p.92-102, 2006.
73. FRANCO, B.D.G.M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos alimentos**. Atheneu: São Paulo, 182p, 2003.
74. FROST, F.J.; KUNDE, T.R.; CRAUN, G.F. Is contaminated groundwater an important cause of viral gastroenteritis in the United States? **Journal of Environmental Health**, v.65, p.9-14, 2002.
75. FUMIAN, T.M.; GUIMARÃES, F.R.; PEREIRA V., JESUS, B.; dA SILVA, M. T.T.; MUYLAERT, F.F.; BOFILL-MAS, S.; GIRONÉS, R.; LEITE, J.P.G.; MIAGOSTOVICH, M.P. Molecular detection, quantification and characterization of human polyomavirus JC from waste water in Rio de Janeiro, Brazil. **Journal of Water and Health**, v.8, p.438, 2010.

76. FUMIAN, T.M.; LEITE, J.P.G.; CASTELLO, A.A.; GAGGERO, A.; CAILLOU, M.S.L.; MIAGOSTOVICH, M.P. Detection of rotavirus A in sewage samples using multiplex qPCR and an evaluation of the ultracentrifugation and adsorption-elution methods for virus concentration. **Journal of Virological Methods**, v.170, p.42–46, 2010.
77. 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 in circulation after the introduction of the Rotarix vaccine in Rio de Janeiro, Brazil. **Water Research**, v.45, p.5755-5763, 2011.
78. FUNASA. **Manual de saneamento**. 3ed. - Brasília: Fundação Nacional de Saúde, 480p. 2007.
79. GALDEAN N.; CALLISTO M.; BARBOSA F.A.R. Lotic ecosystems of Serra do Cipó, southeast Brazil: water quality and a tentative classification based on the benthic macroinvertebrate community. **Aquatic Ecosystem Health and Management**, v.3, p.545-552, 2000.
80. GENTSCH J.R.; GLASS R.I.; WOODS P.; GOUVEA V.; GORZIGLIA M.; FLORES J.; DAS B.K.; BHAN M.K. Identification of group A rotavirus gene 4 types by polymerase chain reaction. **Journal Clinical of Microbiology**, v.30, p.1365-1373, 1992.
81. GERBA, C.P.; GRAMOS, D.M.; NWACHUKU, N. Comparative inactivation of enteroviruses and adenoviruses 2 by UV light. **Applied Environmental Microbiology**, v.68, p.5167-5169, 2002.
82. GILGEN, M.; GERMANN, D.; LÜTHY, J.; HÜBNER, P.H. Three-step isolation method for sensitive detection of enterovirus, rotavirus, hepatitis A, and small round structured viruses in water samples. **International Journal of Food Microbiology**, v. 37, p. 189-199, 1997.
83. GLASS, R.I.; BRESEE, B.; JIANG, J.; GENTSCH, T.; ANDO, R.; FANKHAUSER, R.; NOEL, J.; PARASHAR, U.; ROSEN, B.; MONROE, S.S. Gastroenteritis viruses: an overview. **Novartis Foundation Symposia**, v. 238, p. 5-25, 2001.
84. GLASS, P.J.; WHITE, L.J.; BALL, J.M.; LEPARC-GOFFART, I.; HARDY, M.E.; ESTES, M.K. Norwalk Virus Open Reading Frame 3 Encodes a Minor Structural Protein. **Journal of Virology**, v.74, p.6581-6591, 2000.
85. GOETZ, A.; TSUNESHI, N. Applications of molecular filter membranes to the bacteriological analysis of water. **Journal American Water Works Association**, v.43, p. 943-945, 1951.
86. GOMES, Y.M. **Norovírus e adenovírus entérico em crianças quilombolas do norte do ES**. [Monografia – Departamento de Biologia – Universidade Federal do Espírito Santo], 2011.
87. GOTO, D.K.; YAN, T. Genotypic diversity of Escherichia coli the Water and Soil of Tropical Watersheds in Hawaii. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, n.12, p.3988-3997, 2011.
88. GOUVEA V.; GLASS R.I.; WOODS P.; TANIGUCHI K.; CLARK H.F.; FORRESTER B.; FANG Z.Y. Polymerase chain reaction amplification and typing of rotavirus nucleic acid from stool specimens. **Journal Clinical of Microbiology**, v.28, p.276-282, 1990.
89. GRABOW, W.O.K. Waterborne diseases: update on water quality assessment and control. **Water SA**, v.22, p.193-202, 1996.
90. GRAFF, J.W.; EWEN, J.; ETTAYEBI, K.; HARDY, M.E. Zinc-binding domain of rotavirus NSP1 is required for proteasome-dependent degradation of IRF3 and autoregulatory NSP1 stability. **Journal of General Virology**, v.88, p.613-620, 2007.
91. GRANT, L; VINJE, J.; PARASHAR, U.; WATT, J.; REID, R.; WEATHERHOLTZ, R.; SANTOSHAM, M.; GENTSCH, J.; O'BRIEN, K. Epidemiologic and Clinical Features of Other

- Enteric Viruses Associated with Acute Gastroenteritis in American Indian Infants. **The Journal of Pediatrics** (Article in Press), 2012.
92. GREEN, K.Y.; ANDO, T.; BALAYAN, M.S.; BERKE, T.; CLARKE, I.N.; ESTES, M.K.; MATSON, D.O.; NAKATA, S.; NEILL, J.D.; STUDDERT, M.J.; THIEL, H.J. Taxonomy of the Caliciviruses. **Journal of Infectious Diseases**, v.181, n.2, 322-330, 2000.
 93. GREIG JD, LEE MB. Enteric outbreaks in long-term care facilities and recommendations for prevention: a review. **Epidemiology Infections**, v.137, p. 145-55, 2009.
 94. GURGEL, R.G.; BOHLAND, A.K.; VIEIRA, S.C.; OLIVEIRA, D.M.; FONTES, P.B.; BARROS, V.F. Incidence of rotavirus and all-cause diarrhea in Northeast Brazil following the introduction of a national vaccination program. **Gastroenterology**, v.137, n.6, p.1970-1975, 2009.
 95. GURGEL, R.Q.; CUNLIFFE, N.A.; NAKAGOMIC, O.; CUEVAS, L.E. Rotavirus genotypes circulating in Brazil before national rotavirus vaccination: A review. **Journal of Clinical Virology**, n.43, p.1-8, 2008.
 96. GRASSI,T.; F. BAGORDO, A. IDOLO, F. LUGOLI, G. GABUTTI AND A. DE DONNO. Rotavirus detection in environmental water samples by tangencial flow ultrafiltration, *Environmental Monitoring and Assessment*, v. 164, n. 1-4, p. 199-205, 2010.
 97. HAAS, C.N., ROSE, J.B., GERBA, C.P. **Quantitative Microbial Risk Assessment**. New York: Wiley, 1999.
 98. HAFLIGER, D.; HÜBNER, P.H.; LÜTHY, J. Outbreak of viral gastroenteritis due to sewage-contaminated drinking water. **International Journal of Food Microbiology**, v.54, p.123-126, 1999.
 99. HAFLIGER, D.; GILGEN, M.; LUTHY, J.; HUBNER, P. Seminested RT-PCR systems for small round structured viruses and detection of enteric viruses seafood. **International Journal of Food Microbiology**, v. 37, p. 27-36, 1997.
 100. HALL, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, v.41, p.95-98. 1999.
 101. HALL AJ, ROSENTHAL M, GREGORICUS N, GREENE SA, FERGUSON J, HENAO OL, et al. Incidence of acute gastroenteritis and role of norovirus, Georgia, USA, 2004-2005. **Emerging Infectious Diseases**; v. 17, p.1381-1388, 2011.
 102. HALL, A.J.; VINJÉ, J.; LOPMAN, B.; PARK, G.W.; YEN, C.; GREGORICUS, N. Centers of Disease Control and Prevention. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, v.60, p.1-16, 2011.
 103. HARAMOTO, E.; KITAJIMA, M.; KATAYAMA, H.; OHGAKI, S. Real-time PCR detection of adenoviruses, polyomaviruses, and torque teno viruses in river water in Japan. **Water Research**, v. 44, p. 1747-1752, 2010.
 104. HE, X.; WEI, Y.; CHENG, L.; ZHANG, D.; WANG, Z. Molecular detection of three gastroenteritis viruses in urban surface waters in Beijing and correlation with levels of fecal indicator bacteria. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 184, p. 5563-5570, 2012.
 105. HEALTH CANADA. **Guidelines for canadian drinking water quality: guideline technical document-enteric viruses**. Ottawa: Water, Air and Climate Change Bureau, Healthy Environments and Consumer Safety Branch, Health Canada, p.1-64, 2011.
 106. HERNANDEZ-MORGA, J.; LEON-FELIX, J.; PERAZA-GARAY, F.; GIL-SALAS, B.G.; CHAIDEZ, C. Detection and characterization of hepatitis A virus and Norovirus in estuarine

- water samples using ultrafiltration-RT-PCR integrated methods. **Journal of Applied Microbiology**, v. 106, p. 1579-1590, 2009.
107. HERNROTH, B.E.; HANSSON-CONDEN, A.C.; REHNSTAM-HOLM, A.S. GIRONES, R.; ALLARD, A. Environmental factors influencing human viral pathogens and their potential indicator organisms in the blue mussel, *Mytilus edulis*: first Scandinavian report, **Applied and Environmental Microbiology**, v.68, p.4523-4533, 2002.
 108. HENRICKSON, S.E., WONG, T.; ALLEN, P.; FORD, T.; EPSTEIN, P.R. Marine swimming-related illness: implications for monitoring and environmental policy. **Environmental Health Perspectives**, v.109, p.645-650, 2001.
 109. HERZ, R. **Manguezais do Brasil**. IOUSP/CIRM, São Paulo, 1991.
 110. HEWITT, J.; LEONARD, M.; GREENING, G.E.; LEWIS, G.D. Influence of wastewater treatment process and the population size on human virus profiles in wastewater. **Water Research**, v. 45, p. 6267-6276, 2011.
 111. HEWITT, J.; GREENING, G.E.; LEONARD, M.; LEWIS, G.D. Evaluation of human adenovirus and human polyomavirus as indicators of human sewage contamination in the aquatic environment. *Water Research*, v.47, n.17, p.6750-6761, 2013.
 112. HUSSAIN, J.A.A.; ABID, H.; RAHMAN, Z. Bacteriological quality assessment of drinking water from Khyber agency and its impacts on public health. **Pakistan Journal Biochemistry & Molecular Biology**, v.44, n.2, p.73-76, 2011.
 113. HUSMAN, A.M., LODDER, W.J., RUTJES, S.A., SCHIJVEN, J.F. AND TEUNIS, P.F. Long-term inactivation study of three enteroviruses in artificial surface and groundwaters, using PCR and cell culture. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, p. 1050-1057, 2009.
 114. IBGE. **População de Vitória**. Disponível em:<http://legado.vitoria.es.gov.br/regionais/Censo_2010/Tab1_sinopse_pop.asp>. Acesso em 30 de Julho de 2012.
 115. ICTVdB Management. 00.001. **Adenoviridae**. In: ICTVdB - The Universal Virus Database, version 3. Büchen-Osmond, C. (Ed), Columbia University, New York, USA, 2006.
 116. ICTVdB Management. 00.001. **Adenoviridae**. In: ICTVdB - The Universal Virus Database, version 3. Büchen-Osmond, C. (Ed), Columbia University, New York, USA. Disponível em:< http://ictvdb.bio-mirror.cn/ictv/fs_adeno.htm>. Acessado em 15 de maio de 2014.
 117. ICTVdB Management. 00.060.0.03. **Rotavirus**. In: ICTVdB - The Universal Virus Database, version 4. Büchen-Osmond, C. (Ed), Columbia University, New York, USA, 2006.
 118. ITURRIZA-GOMARA, M.; GREEN, J.; BROWN, D.W.G.; DESSLBERGER, U.; GRAY, J.J. Comparison of specific and random priming in the reverse transcriptase polymerase chain reaction for genotyping group A rotaviruses. **Journal of Virological Methods**, v.78, p.93-103, 1999.
 119. JAIANI, E.; KOKASHVILI, T.; MITAISHVILI, N.; ELBAKIDZE, T.; JANELIDZE, N.; LASHKHI, N.; KALANDADZE, R.; MIKASHVIDZE, E.; NATROSHVILI, G.; WHITEHOUSE, C.A.; HUQ, A.; TEDIASHVILI, M. Microbial water quality of recreational lakes near Tbilisi, Georgia. **Journal of Water Health**, v. 11, n.2, p.333-345, 2013.
 120. JENG, H. A. C.; ENGLANDE, A. J.; BAKEER, R. M.; BRADFORD, H. B. Impacto of urban stormwater runoff on estuarine environmental quality. **Estuarine, Coastal and Shelf Science**, v. 63, p. 513-526, 2005.

121. JESUS, H.C.; COSTA, E.A.; MENDONÇA, A.S.F.; ZANDONADE, E. Distribuição de metais pesados em sedimentos do sistema estuarino da Ilha de Vitória-ES. **Química Nova**, v.27, n.3, p.378-386, 2004.
122. JIANG, S. Human Adenoviruses in Water: Occurrence and Health Implications: A Critical Review. **Environmental Science & Technology**, v.40, p.7132-7140, 2006.
123. JONES, M.S.; HARRACH, B.; GANAC, R.D.; GOZUM, M.M.; DELA CRUZ, W.P.; RIEDEL, P.; PAN, C.; DELWART, E.L.; SCHNURR, D.P. New adenovirus species found in a patient presenting with gastroenteritis. **Journal of Virology**, v.81, p. 5978-5984, 2007.
124. JONES, M. K.; WATANABE, M.; ZHU, S.; GRAVES, C.L.; KEYES, L. R.; GRAU, K. R.; GONZALEZ-HERNANDEZ, M. B.; IOVINE, N. M.; WOBUS, C. E.; VINJE, J.; TIBBETTS, S. A.; WALLET, S. M.; KARST, S. M. Enteric bacteria promote human and mouse norovirus infection of B cells. **Science**, v. 392, n. 6210, 2014.
125. JUSTINO, J. F. **Avaliação de coliformes e vírus entéricos na água e no mexilhão (*Mytella guyanensis*) em área de manguezal da baía de Vitória (ES)**. [Dissertação de Mestrado – Departamento de Engenharia Ambiental – Universidade Federal do Espírito Santo], 96p., 2009.
126. KAMEL, A.H.; ALI, M.A.; EL-NADY, H.G.; DERAZ, A.; AHO, S.; POTHIER, P.; BELLLOT, G. Presence of enteric hepatitis viruses in the sewage and population of Greater Cairo. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 17, p.1469-0691, 2011.
127. KATAYAMA, H.; SHIMASAKI, A.; OHGAKI, S. Development of a Virus Concentration Method and Its Application to Detection of Enterovirus and Norwalk Virus from Coastal Seawater. **Applied and Environmental Microbiology**, v.68, n.3, p.1033-1039, 2002.
128. KARST, S.M. Pathogenesis of Noroviruses, Emerging RNA Viruses. **Viruses**, v.2, p.748-781, 2010.
129. KELLER, R.; JUSTINO, J.F.; CASSINI, S.T. Assessment of water and seafood microbiology quality in a mangrove region in Vitória, Brazil. **Journal of Water Health**, v.11, n.3, p.573-580, 2013.
130. KISHIDA, N.; MORITA, H.; HARAMOTO, E.; ASAMI, M.; AKIBA, M. One-year weekly survey of noroviruses and enteric adenoviruses in the Tone river water in Tokyo metropolitan area, Japan. **Water Research**, 2012.
131. KISHINHI, S.S.; TCHOUNWOU, P.B.; FARAH, I.O. Molecular Approach to Microbiological Examination of Water Quality in the Grand Bay National Estuarine Research Reserve (NERR) in Mississippi, USA. **Journal of Environmental Health Insights**, v.15, .n.7, p.33-41, 2013.
132. KITTIGUL L, POMBUBPA K, TAWEEKATE Y. Molecular characterization of rotaviruses, noroviruses, sapovirus, and adenoviruses in patients with acute gastroenteritis in Thailand. **Journal of Medical Virology**, 81:345-353, 2009.
133. KJERFVE, B.; LACERDA, L.D. "Mangroves of Brazil Conservation and Sustainable Utilization of Mangrove Forests in Latin America and Africa Regions, Part I – Latin America, **International Society for Mangrove Ecosystems**, Japan, 1993.
134. KO, G., CROMEANS, T.L.; SOBSEY, M.D. Detection of infectious adenovirus in cell culture by mRNA reverse transcription-PCR. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, 7377-7384, 2003.
135. KRONEMAN. A; EVERARDO VEGA; HARRY VENNEMA; JAN VINJE; PETER A. WHITE; GRANT HANSMAN; KIM GREEN; VITO MARTELLA; KAZUHIKO KATAYAMA;

- MARION KOOPMANS. Proposal for a unified norovirus nomenclature and genotyping . Archives in Virology, v. 158, n. 10, p. 2059-2068, 2013.
136. KUNDU, A.; MCBRIDE, G.; WUERTZ, S. Adenovirus-associated health risks for recreational activities in a multi-use coastal watershed based on site-specific quantitative microbial risk assessment. **Water Research**, v.47, n.16, p.6309-6325, 2013.
 137. LANDIS, J.R., KOCH, G.G. The measurement of observer agreement for categorical data. **Biometrics**, n.33, p. 159-174, 1977.
 138. LANZIERI, T.M.; LINHARES, A.C.; COSTA, I.; KOLHE, D.A.; CUNHA, M.H.; ORTEGA-BARRIA, E.; COLINDRES, R.E. Impact of rotavirus vaccination on childhood deaths from diarrhea in Brazil. **International Journal of Infectious Diseases**, n.15, p.206-210, 2011.
 139. LEAL, D.A.G.; RAMOS, A.P.D.; SOUZA, D.S.M.; DURIGAN, M.; GREINERT-GOULART, J.A.; MORESCO, V.; AMSTUTZ, R.C.; MICOLID, A.H.; NETO, R.C.; BARARDI, C.R.M.; FRANCO, R.M.B. Sanitary quality of edible bivalve mollusks in Southeastern Brazil using an UV based deuration system. **Ocean & Coastal Management**, v. 72, p.93-100, 2013.
 140. LECLERC, H.; SCHWARTZBROD, L.; DEICAS, E. Microbial agents associated with waterborne diseases. **Critical Reviews in Microbiology**, v.28, p.371-409, 2002.
 141. LEE, C.S.; LEE, C.; MARION, J.; WANG, Q.; SAIF, L.; LEE, J. Occurrence of human enteric viruses at freshwater beaches during swimming season and its link to water inflow. **Science of the Total Environment**, v.472, p.757-766, 2014.
 142. LEE, G.C.; JHEONG, W.H.; KIM, M.J.; CHOI, D.H.; BAIK, K.H. A 5-year survey (2007-2011) of enteric viruses in Korean aquatic environments and the use of coliforms as viral indicators. **Microbiology and Immunology**, v. 57, p. 46-53, 2013.
 143. LEE, S.H.; KIM, S.J. Detection of infectious enteroviruses and adenoviruses in tap water in urban areas in Korea. **Water Research**, v.36, p.248-256, 2002.
 144. LESS, D. Viruses and Bivalve Shellfish. **International Journal of food Microbiology**, v.59, p.81-116, 2000.
 145. LEVETT PN, GU M, LUAN B. Longitudinal study of molecular epidemiology of small round-structured viruses in a pediatric population. **Journal of Clinical Microbiology**, 34:1497-1501, 1996.
 146. LEVINE, M.M.; EDELMAN, R. Acute diarrheal infections in infants. I. Epidemiology, treatment, and prospects for immunoprophylaxis. **Hospital Practice**, v.14, p.89-100, 1979.
 147. LYSÉN, M.; THORHAGEN, M.; BRYTTING, M.; HJERTQVIST, M.; ANDERSSON, Y.; HEDLUND, K. Genetic Diversity among Food-Borne and Waterborne Norovirus Strains Causing Outbreaks in Sweden. **Journal of Clinical Microbiology**, v.47, n.8, p. 2411-2418, 2009.
 148. LIU C, GRILLNER L, JONSSON K, et al. Identification of viral agents associated with diarrhea in young children during a winter season in Beijing, China. **Journal of Clinical Virology**, v. 35, p. 69-72, 2006.
 149. LOCAS, A.; MARTINEZ, V.; PAYMENT, P. Removal of human enteric viruses and indicator microorganisms from domestic wastewater by aerated lagoons. **Canadian Journal of Microbiology**, v.56, p.188-194, 2010.
 150. LOPMAN, B.A.; REACHER, M.H.; VIPOND, I.B.; HILL, D.; PERRY, C.; HALLADAY, T.; BROWN, D.W.; EDMUNDS, W.J.; SARANGI, J. Epidemiology and cost of nosocomial gastroenteritis, Avon, England, 2003. **Emerging Infectious Diseases**, v.10, n.10, 2004.

151. LUZ, R.B.; KLUGE, M.; FABRES, R.B.; FONTANA, T.; PACHECO, A.; STAGGMEIER, R.; RODRIGUES, M.T.; FLECK, J.D.; SPILK, F.R. Presença de partículas virais infecciosas em amostras de água de diferentes tipos e localidades do Rio Grande do Sul, Brasil. **Revista brasileira de Biociências**, v.10, n.1, p.103-106, 2012.
152. MACÊDO, J.A.B. **Águas e águas**. Ed.2. Belo Horizonte:CRQ, 2004.
153. MACHADO, W.C.P.; BECEGATO, V.A.; BITTENCOURT, A.V.L. Anthropoc Influence in the Water Quality of the River Basin that Supplies the Pato Branco Municipality-PR. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.52, n.1, p. 221-232, 2009.
154. MACHAY, I.M.; ARDEN, K.E.; NITSCHKE, A. Real-time PCR in Virology. **Nucleic Acids Research**, v.30, n.6, p.1292-1305, 2002.
155. MADHI, S.A.; CUNLIFFE, N.A.; STEELE, D.; WITTE, D.; KIRSTEN, M.; LOUW, C.; NGWIRA, B.; VICTOR, J.C.; GILLARD, P.H.; CHEUVART, B.B.; HAN, H.H.; NEUZIL, K.M. Effect of human rotavirus vaccine on severe diarrhea in African infants. **The New England Journal of Medicine**, v.362, p.289-298, 2010.
156. MAYLA, A.Y.S.; AMR, A.S.S. Chemical and microbiological quality of drinking water in Gaza Strip, Palestine. **Science Vision**, v.10, n.3, p.80-88, 2010.
157. MELNICK, J.L.; GERBA, C.P. Viruses in water and soil. **Public health Reviews**, v.9, p.185-213, 1980.
158. MEHNERT, D.U. Universidade de São Paulo (USP). Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Microbiologia. Laboratório de vírus entéricos humanos e animais. Vírus no meio ambiente. Universidade de São Paulo, 2003. Disponível em: http://icb.usp.br/~dumehner/linha_de_pesquisa.html. Acesso em: 13 de agosto de 2003.
159. MESQUITA, J.R.; VAZ, L.; CERQUEIRA, S.; CASTILHO, F.; SANTOS, R.; MONTEIRO, S.; MANSO, C.F.; ROMALDE, J.L.; NASCIMENTO, M.S. Norovirus, hepatitis A virus and enterovirus presence in shellfish from high quality harvesting areas in Portugal. **Food Microbiology**, v.28, p.936-941, 2011.
160. 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, n.2, p.375-382, 2008.
161. MIAGOSTOVICH, M.P., GUIMARÃES, F.R., VIEIRA, C.B., FUMIAN, T.M., DA GAMA, N.P., VICTORIA, M., DE OLIVEIRA, J.M., DE OLIVEIRA MENDES, A.C., GASPAS, A.M., LEITE, J.P. Assessment of water quality in a border region between the atlantic forest and an urbanised area in rio de janeiro, Brazil. *Food Environment Virology*, v.6, n.2, p. 110-115, 2014.
162. MINISTÉRIO DA SAÚDE. 2004. **Portaria/MS n.º 518**. 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. 2004.
163. MORAIS, A.C. **Estimativa de cargas poluidoras na Baía de Vitória, ES, com uso de sistemas de informações geográficas e sensoriamento remoto**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental – UFES), 2008.
164. MORENO, S.; ALVARADO, M.V.; BERMÚDEZ, A.; GUTIÉRREZ, M.V. Análisis filogenético de las cepas de rotavirus y virus de la hepatitis A encontradas en agua de consumo en el municipio de Quibdó, Chocó. **Biomedica**, v.29, p.209-17, 2009.

165. MORESCO, V.; VIANCELLI, A.; NASCIMENTO, M.A.; SOUZA, D.S.M.; RAMOS, A.P.D.; GARCIA, L.A.T.; SIMÕES, C.M.O. BARARDI, C.R.M. Microbiological and physicochemical analysis of the coastal waters of southern Brazil. **Marine Pollution Bulletin**, v.64, p.40–48, 2012.
166. MORRISON, T. B., WEIS, J. J., WITTEWER, C. T. Quantification of low-copy transcripts by continuous SYBR Green I monitoring during amplification. *Biotechniques*, v. 24, p. 954 – 958, 1998.
167. MORGA JH, LEON-FELIX J, PERAZA-GARAY F, GIL-SALAS BG, CHAIDEZ C. Detection and characterization of hepatitis A virus and norovirus in estuarine water samples using ultrafiltration-RT-PCR integrated methods. **Journal of Applied Microbiology**, v. 106, p. 1579-1590, 2009.
168. MOTE, B.L.; TURNER, J.W.; LIPP, E.K. Persistence and growth of the fecal indicator bacteria enterococci in detritus and natural estuarine plankton communities. **Applied and Environmental Microbiology**, v.78, n.8, p.2569-2577, 2012.
169. MULLIS, K.B.; FALOONA, F.A. Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase-catalyzed chain reaction. **Methods in Enzymology**, v.155, p.335-351, 1987.
170. NALESSO, R.C.; PIUMBINI, P.P.; PARESQUE, K.; ALMEIDA, L.G.; NICKEL, V.; TONINI, J.F.R.; VIERA, G.A.R. **Obtenção de sementes de ostra *Crassostrea sp.* Em coletores artificiais no litoral sul do Espírito Santo**. II Congresso Brasileiro de Oceanografia, 2005.
171. NOGUEIRA, A.; CARDOSO, M. DELGADILLO, I.; ALMEIDA, A. Evaluation of the Microbiological Quality of Drinking Water in the District of Bragança (Northwest Portugal) throughout a Ten-Year Period (1996–2005), during the Implementation of the 1998/83 EC Directive. **Journal of Environmental Quality**, v.39, p.609-616, 2010.
172. NORDGREN J, NITIEMA LW, SHARMA S, et al. Emergence of Unusual G6P[6] Rotaviruses in Children, Burkina Faso, 2009–2010. **Emerging Infectious Diseases**, v. 18. 2012.
173. ODUM, E. P. **Fundamentos de ecologia**. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2001.
174. OLDAK E, SULIK A, ROZKIEWICZ D, LIWOCH-NIENARTOWICZ N, ZAWADZKA E. Norovirus and Rotavirus-two major causative agents of sporadic viral gastroenteritis in hospitalized Polish children. **Advanced Medicine and Science**, 54:183-186, 2009.
175. OLIVEIRA, L.K.; FLECK, J.D.; COMERLATO, J.; KLUGE, M.; BERGAMASCHI, B.; FABRES, R.B.; LUZ, R.B.; SILVA, J.V.S.; BALDASSO, N.; SPIKI, F.R. Enteric viruses in water samples from Brazilian dairy farms. **Agricultural Water Management**, v.111, p.34–39, 2012.
176. OLOFSSON, S.; BRITTAIN-LONG, R.; ANDERSSON, L. M.; WESTIN, J.; LINDH, M. PCR for detection of respiratory viruses: seasonal variations of virus infections. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, v. 9, n. 8, p. 615-626, 2011.
177. OUYANG, Y.; NKEDI-KIZZA, P.; WU, Q.T.; SHINDE, D.; HUANG, C.H. Assessment of seasonal variations in surface water quality. **Water Research**, v.40, p.1800-1810, 2006.
178. PALACIO, H.A.Q.; ANDRADE, E.M.A.; LOPES, F.B.; BARROS, D.M.; ARRAES, F.D.D. Similaridade da qualidade das águas superficiais da bacia do Curu, Ceará. **Ciência Rural**, v.39, n.9, p.2494-2500, 2009.
179. PALOMBO, E.A.; BISHOP, R.F. **Rotaviruses**. eLS. John Wiley & Sons, Ltd: Chichester, 10p. 2011.

180. PANG, X.L.; ZENG, S.Q.; HONMA, S.; NAKATA, S.; VESIKARI, T. Effect os rotavirus vaccine on Sapporo virus gastroenteritis in Finnish infants. **Paeditrical Infectious Diseases Journal**, v.20, p.295-300, 2001.
181. PARASHAR, U. D., C. J. GIBSON, J. S. BRESSE, GLASS R. I. Rotavirus and severe childhood. **Emerging Infectious Diseases**, 12:304-306, 2006.
182. PEREIRA, W.S.; FREIRE, R.S. Ferro zero: uma nova abordagem para o tratamento de águas contaminadas com compostos orgânicos poluentes. **Química Nova**, v.28, n.1, p.130-136, 2005.
183. PHANUWAN, C.; TAKIZAWA,S.; OGUMA, K.; KATAYAMA, H.; YUNIKA, K. AND OHGAKI,S. Monitoring of human enteric viruses and coliform bacteria in waters after urban flood in Jakarta, Indonesia. **Water Science & Technology**, v.54, n.3, p.203-210, 2006.
184. PIEDRAS,R.S.N; BAGER, A.; MORAES, P.R.R.; ISOLDI, L.A.; FERREIRA, O.G.L.; HEEMANN, C. Macroinvertebrados bentônicos como indicadores de qualidade de água na Barragem Santa Bárbara. **Ciência Rural**, v.36, n.2, 2006.
185. PILLAI, S. D.; JOSEPHSON, K. L; BAILY, R. L.; GERBA, C. P.; PEPPER, I. L. Rapid method for processing soil samples for polymerase chain reaction amplification of specific gene sequences. **Applied and Environmental Microbiology**, v.57, p.2285-2286, 1991.
186. PINA, S., PUIG, M., LUCENA, F., JOFRE, J. AND GIRONES, R. Viral pollution in the environment and in shellfish: human adenovirus detection by PCR as an index of human viruses. **Applied Environment Microbiology**v.64, p.3376–3382, 1998.
187. PITOIS, F.; THOMAS, O.; THORAVAL, I.; BAURÈS, E. Learning from 8 years of regional cyanobacteria observation in Brittany in view of sanitary survey improvement. **Environment International**, v.2, p.113-118, 2014.
188. PRADO, T.; FUMIAN, T.M.; MIAGOSTOVICH, M.P.; GASPAR, A.M.C. Monitoring the hepatitis A virus in urban wastewater from Rio de Janeiro, Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene** v. 106, p. 104-109, 2012.
189. PRATA, C.; ANDREIA RIBEIRO, ANGELA CUNHA, NEWTON. C. M. GOMES AND ADELAIDE ALMEIDA. Ultracentrifugation as a direct method to concentrate viruses in environmental waters: virus-like particle enumeration as a new approach to determine the efficiency of recovery. **Journal of Environmental Monitoring**, v. 14, n. 64, 2012.
190. PRAVEENA, S.M.; CHEN, K.S.; ISMAIL, S.N. Indicators of microbial beach water quality: preliminary findings from Teluk Kemang beach, Port Dickson (Malaysia). **Marine Pollution Bulletin**, v.76, n.1-2, p.417-419, 2013.
191. PRESCOTT, L.M.; HARLEY, J.P.; KLEIN, D.A. **Microorganisms and Environment**. Brown Publishers, USA, 3ed., p. 850-851, 1996.
192. PRZYBYLA-KELLY, K.; NEVERS, M.B.; BREITENBACH, C.; WHITMAN, R.L. Recreational water quality response to a filtering barrier at a Great Lakes beach. **Journal of Environmental Management**, v.129, p.635-41, 2013.
193. QUEIROZ, A.P.S.; SANTOS, F.M.; SASSAROLI, A.; HÁRSI, C.M.; MONEZI, T.A.; MEHNERT, D.U. Electropositive filter membrane as an alternative for the elimination of PCR inhibitors from sewage and water samples. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, p. 4614-4618, 2001.
194. RIGO D.**Análise do escoamento em regiões estuarinas com manguezais – medições e modelagem na Baía de Vitória, ES**. Tese de Doutorado, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Oceânica, COPPE, UFRJ, Rio de Janeiro. 156p. 2004.

195. RIGOTTO, C.; SINCERO, T.C.M.; SIMÕES, C.M.O.; BARARDI, C.R.M. Detection of adenoviruses in shellfish by means of conventional-PCR, nested-PCR, and integrated cell culture PCR (ICC/PCR). **Water Research**, v.39, p.297-304, 2005.
196. RIGOTTO, C.; VICTORIA, M.; MORESCO, V.; KOLESNIKOVAS, C.K.; CORRÊA, A.A.; SOUZA, D.S.; MIAGOSTOVICH, M.P.; SIMÕES, C.M.; BARARDI, C.R. Assessment of adenovirus, hepatitis A virus and rotavirus presence in environmental samples in Florianópolis, South Brazil. **Journal of Applied Microbiology**, v.109, n.6, p.1979-1987, 2010.
197. RICKLEFS, R.E. **The economy of nature**. 4 ed. Freeman and Company:New York, 1996.
198. ROBINSON, C.; ECHAVARRIA, M. Adenoviruses. **Manual of Clinical Microbiology**, ASM Press, 2007.
199. RUFINO, R.C.; **Avaliação da qualidade ambiental do município de Tubarão(SC) através do uso de indicadores ambientais** [Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Santa Catarina, Brasil], 123f, 2002.
200. RUX, J.J.; BURNETT, R.M. Adenovirus structure. **Human Gene Therapy and Human Gene Therapy Methods**, v.15, n.12, p.1167-1176, 2004.
201. SÁ, H.S. Caracterização da fauna de crustáceos (Crustacea) do manguezal de Cariacica, Espírito Santo, Brasil. **Caderno de pesquisas da UFES**, n.1, p.15-26, 1995.
202. SAIKI, R.K.,D.H.; GELFAND, S.; STOFFEL, S.J.; SCHARF, R.; HIGUCHI, G.T.; HORN, K.B.; MULLIS, H.A. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. **Science**, v.239, p.487-494, 1988.
203. SÁNCHEZ-FAUQUIER A, MONTERO V, COLOMINA J. Global study of viral diarrhea in hospitalized children in Spain: Results of Structural Surveillance of Viral Gastroenteritis Net Work (VIGESSnet) 2006–2008. **Journal of Clinical Virology**, v. 52, p. 353-358, 2011.
204. SANTAMARIA, J.; TORANZOS, G.A. Enteric pathogens and soil: a short review. **International Microbiology**, v.6, p.5-9. 2003.
205. SCALLAN E, HOEKSTRA RM, ANGULO FJ, TAUXE RV, WIDDOWSON M-A, ROY SL, *et al*. Foodborne illness acquired in the United States -major pathogens. **Emerging of Infectious Diseases**. V. 17, p. 7–15, 2011.
206. SCARPATI, K.F. **Avaliação quantitativa de vírus entéricos em mexilhão (*Mytella guyanensis* e *Mytella charruana*) e ostra (*Crassostrea rhizophorae*) em área de manguezal da Baía de Vitória (es) com a utilização da PCR em tempo real**[Dissertação de Mestrado – Departamento de Engenharia Ambiental – Universidade Federal do Espírito Santo], 143p. 2012.
207. SERRACCA, L.; VERANI, M.; BATTISTINI, R.; ROSSIN, I.; CARDUCCI, A.; ERCOLINI, C. Evaluation of Adenovirus and E. coli as indicators for human enteric viruses presence in mussels produced in La Spezia Gulf (Italy). **Letter in Applied Microbiology**, v. 50, p. 462-467, 2010.
208. SHANNON, M.; MCQUAIG, T.M.; SCOTT, J.O.; LUKASIK, J.H.; VALERIE, J.H. Quantification of human polyomaviruses JC virus and BK virus by TaqMan Quantitative PCR and Comparison to Other Water Quality Indicators in water and fecal samples. **Applied and environmental microbiology**, v.75, n.11, p.3379-3388, 2009.
209. SHAW, A.R. The rotavirus vaccine saga. **Annual Review of Medicine**, v.57, p.167-180, 2006.
210. SCHAEFFER-NOVELLI.Y.Manguezal: Ecosistema entre a Terra e o Mar.**Caribbean Ecological Research**, São Paulo, 1991.

211. SCHETTINI, C.A.F.; PEREIRA F.J.; SPILLERE, L. Caracterização oceanográfica e biogeoquímica Dos estuários dos rios Tavares e Defuntos, Reserva extrativista de Pirajubaé, Florianópolis, SC. **Notas Técnicas Facimar**, v.4, p.11-28, 2000.
212. SCHMALTZ, M.A.C. **Qualidade e disponibilidade de água: efeitos, conseqüências da tecnologia e avaliação de padrões de qualidade**. 2004. Dissertação (Mestre em Biotecnologia), Universidade Vale do Rio Verde de Três Corações, Minas Gerais, 2004.
213. SHIMIZU, H.; PHAN, T.G. An outbreak of adenovirus serotype 41 infection in infants and children with acute gastroenteritis in Maizuru City, Japan. **Infection, Genetics and Evolution**, v.7, n.2, p.279-284, 2007.
214. SIEBENGA, J.J.; VENNEMA, H.; RENCKENS, B.; BRUIN, E.; VAN DER VEER, B.; SIEZEN, R.J.; KOOPMANS, M. Epochal evolution of GGII.4 norovirus capsid proteins from 1995 to 2006. *Journal of Virology*, v. 81, n. 18, p. 9932-9941, 2007.
215. SIQUEIRA, R.S. **Manual de microbiologia de alimentos**. Brasília: EMBRAPA, 159p. 1995.
216. SILVA, J.S. **Estudo da interação do adenovírus humano, sorotipo 41 (HAdV-41), com células permissivas**. [Tese de Doutorado – Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo] 51p. 2008.
217. SILVA, M.P.; CAVALLI, D.R.; OLIVEIRA, T.C.R.M. Avaliação do padrão coliformes a 45 °C: Comparação da eficiência das técnicas dos tubos múltiplos e Petrifilmna detecção de coliformes totais e *Escherichia coli*em alimentos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.26, n.2, p.352-359, 2006.
218. SILVA, N.; JUNQUEIRA, V.C.A. **Métodos de análise microbiológica de alimentos**. Campinas: ITAL, 228p. 1995.
219. SINCLAIR, R.G.; JONES, E.L.; GERBA, C.P. Viruses in recreational water-borne disease outbreaks: a review. **Journal of Applied Microbiology**, v. 107, p.1769-1780, 2009.
220. SINCERO, T.C.M.; LEVIN, D.B.; SIMÕES, C.M.O.; BARARDI, C.R.M. Detection of hepatitis A virus (HAV) in oysters (*Crassostrea gigas*). **Water Research**, v.40, p.895-902, 2006.
221. SIQUEIRA, J.A.M.; LINHARES, A.C.; OLIVEIRA, D.S.; LUCENA, M.S.S.; WANZELLER, A.L.; MASCARENHAS, J.D.P.; GABBAY, Y.B. Evaluation of third-generation RIDASCREEN enzyme immunoassay for the detection of norovirus antigens in stool samples of hospitalized children in Belém, Pará, Brazil. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 71, p. 391-395, 2011.
222. SOARES, L. S.; GUERRA, S. F. S.; OLIVEIRA, A. S. L.; SANTOS, F. S.; MENEZES, E. M. F. C.; MASCARENHAS, J. A. P.; LINHARES, A. C. Diversity of Rotavirus strains Circulating in Northern Brazil After Introduction of a Rotavirus Vaccine: High Prevalence of G3P[6] Genotype. **Journal of Medical Virology**, v. 86, p. 1065-1072, 2014.
223. SOLER, M.; LOBOS, S.; LORCA, M.; NAVARRETE, E. Enterovirus en aguas naturales de Valparaíso: una propuesta metodológica para su análisis. **Revista de Biología Marina y Oceanografía**, v.2, n.44, p.511-516, 2009.
224. SRCHD (Santa Rosa County Health Department). **Adenovirus**. Disponível em: <<http://srchd.wordpress.com/search-aggregators>>. Acessado em 04 de julho de 2012.
225. STALEY, C.; GORDON, K.V.; SCHOEN, M.E.; HARWOOD, V.J. Performance of two quantitative PCR methods for microbial source tracking of human sewage and implications for


- microbial risk assessment in recreational waters. **Applied and Environmental Microbiology**, v 78, n.20, p.7317-7326, 2012.
226. STEWART, P.M.; BUTCHER, J.T.; SWINFORD, T.O. Land use, habitat and water quality effects on macroinvertebrate communities in three watersheds of a Lake Michigan associated marsh system. **Aquatic Ecosystems Health Management**, v.3, n.1, p.179-189, 2000.
227. STOECKEL, D.M.; HARWOOD, V.J. Performance, design, and analysis in microbial source tracking studies. **Applied and Environmental Microbiology**, v.73, p.2405-2415, 2007.
228. SYMONDS, E.M., GRIFFIN, D.W. AND BREITBART, M. Eukaryotic viruses in wastewater samples from the United States. **Applied Environment Microbiology** v.75, p.1402–1409, 2009.
229. SYRMIS, M. W.; WHILEY, D.; THOMAS, M.; MACKAY, I.M.; WILLIAMSON, J.; SIEBERT, D.J.; NISSEN M. D.; SLOOTS, T.P. A sensitive, specific, and cost-effective multiplex reverse transcriptase - PCR assay for the detection of seven common respiratory viruses in respiratory samples. *Journal of Molecular Diagnostics*, v.6, n.2, p. 125-131, 2004.
230. TAYLOR, M. B. Water and food borne viruses: current developments. **Continuing Medical Education**, 29, 207–209, 2011.
231. TRABELSI, A.; PEENZE, I.; PAGES, C.; JEDDI, M.; STEELE, D. Distribution of rotavirus VP7 serotypes and VP4 genotypes circulating in Sousse, Tunisia, from 1995 and 1999: Emergence of Natural Human Reassortments. **Journal of Clinical Microbiology**, v.38, p.3415-3419, 2000.
232. TRANG, N.V.; LUAN, L.T.; KIM-ANH, L.T.; HAU, V.T.B; NHUNG, T.H.; PHASUK, P.; SETRABUTR, O.; SHIRLEY,H.; VINJE, J.; ANH,D.D.; MASON, C.J. Detection and Molecular Characterization of Noroviruses and Sapoviruses in Children Admitted to Hospital With Acute Gastroenteritis in Vietnam. **Journal Medical Virology**, v.84, p.290-297, 2012.
233. TSAI, Y.L.; SOBSEY, M.D.;SANGERMANO, L.R.; PALMER, C.J. Simple method of concentrating enteroviruses and hepatitis A virus from sewage and ocean water for rapid detection by reverse transcriptase-polymerase chain reaction, **Applied Environment Microbiology**, v.59, n.10, p.3488–3491, 1993.
234. USEPA, **Edition of the Drinking Water Standards and Health Advisories**. 820-R-11-002, 2011.
235. USEPA (United States Environmental Protection Agency). **Guidance for assessment, listing and reporting requirements pursuant to sections 303(d), 305(b), and 314 of the Clean Water Act**. U.S. Environmental Protection Agency, Washington, DC. 2005
236. USEPA(United States Environmental Protection Agency).**Bacterial water quality standards for recreational waters** (fresh and marine waters). EPA/823.R-03/008. U.S. Environmental Protection Agency, Office of Water, Washington, DC. 2003.
237. VALE, C.C.; FERREIRA, R.D. Os manguezais do litoral do Estado do Espírito Santo. **Anais do IV Simpósio de Ecossistemas Brasileiros**, v.1, p.88-94, 1998.
238. 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. **Brazilian Journal of Biology**, v. 72, n. 2, p. 323-329, 2012.

239. VELAZQUEZ FR, MATSON DO, GUERRERO ML. Serum antibody as a marker of protection against natural rotavirus infection and disease. **The Journal of Infectious Diseases**, 182:1602-1609, 2000.
240. VERNACCHIO, L.; VEZINA, R.M.; MITCHELL, A.A.; LESKO, S.M.; PLAUT, A.G.; ACHESON, D.W. Diarrhea in American infants and young children in the community setting: incidence, clinical presentation and microbiology. **The Pediatric Infectious Disease Journal**, v. 25: p. 2-7, 2006.
241. Verhoef L, Koopmans M, Van Pelt W, Duizer E, Haagsma J, Werber D, et al. The estimated disease burden of norovirus in the Netherlands. **Epidemiology Infectious**, v.7, p. 1–11, 2012.
242. VERONEZ, Jr, P.; BASTOS, A.C.; PIZZIN, B.F.; GAVA, R.D.; QUARESMA, V.S.; SILVA, C.G. Sonar de varredura lateral e sísmica de alta resolução aplicados no estudo de ecofácies na baía de Vitória - ES. **Revista Brasileira de Geofísica**, v.27, n.3, 2009.
243. VIEIRA, C.B.; MENDES, A.C.O.; GUIMARÃES, F.R.; FUMIAN, T.M.; LEITE, J.P.G.; GASPAR, A.M.C.; MIAGOSTOVICH, M.P. Detection of enteric viruses in recreational waters of an urban lagoon in the city of Rio de Janeiro, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.107, n.6, p.778-784, 2012.
244. VIGNESH, S.; DAHMS, H.U.; EMMANUEL, K.V.; GOKUL, M.S.; MUTHUKUMAR, K.; KIM, B.R.; JAMES, R.A. Physicochemical parameters aid microbial community? A case study from marine recreational beaches, Southern India. **Environmental Monitoring and Assessment**, v.186, n.3, p.1875-1887, 2014.
245. VINJE, J.; KOOPMANS, M.P.G. Simultaneous detection and genotyping of “Norwalk-like viruses” by oligonucleotide array in a reverse line blot hybridization format. **Journal of Clinical Microbiology**, v.38, p.2595-2601, 2000.
246. VINJÉ, J.; HAMIDJAJA, R.A.; SOBSEY, M.D. Development and application of a capsid VP1 (region D) based reverse transcription PCR assay for genotyping of genogroup I and II noroviruses. **Journal of Virological Methods**, v.116, p.109-117. 2004.
247. XIAO, G.; WANG, Z.; CHEN, J.; QIU, Z.; LI, Y.; QI, J.; LIU, W.; SHU, W. Occurrence and infection risk of waterborne pathogens in Wanzhou watershed of the Three Gorges Reservoir, China. **Journal of Environmental Sciences (China)**. v.25, n.9, p.1913-1924, 2013.
248. WALKER, N.J. Real-Time and Quantitative PCR: Applications to Mechanism-Based Toxicology. **Journal of Biochemical and Molecular Toxicology**, v.15, n.3, p.121-127, 2001
249. WALSH, G.E. Mangroves: A review. **Academic press**, p.51-174, 1974.
250. WIKSWO, M.E.; CORTES, J.; HALL, A.J.; VAUGHAN, G.; HOWARD, C.; GREGORICUS, N.; CRAMER, E.H. Disease Transmission and Passenger Behaviors during a High Morbidity Norovirus Outbreak on a Cruise Ship. **Clinical Infectious Diseases**, v.52, n.9, p.1116–1122, 2011.
251. WILHELMI, I., ROMAN, E., SANCHEZ-FAUQUIER, A. Viruses causing gastroenteritis. **Clinical Microbiology and Infection**, v.9, p.247-262, 2003.
252. WHITE, P. A. Evolution of Norovirus. *Clinical Microbiology and Infection*. DOI: 10.1111/1469-0691.12746, 2014.
253. WOLD, W.S.M.; HORWITZ, M.S. **Adenoviruses**. Fields Virology, 5ed. 2007.
254. WRIGTH, S.A.; BIELUCH, V.M. Select nosocomial viral infection. **Hertlung**. v.22, n.2, p.183-187, 1993.

255. WYN-JONES A.P.; SELLWOOD, J. A review: Enteric viruses in aquatic environment. **Journal of Applied Microbiology**, v.91, p.945-962, 2001.
256. YOKOYA, N.S. Distribuição e origem. In: SCHAEFFER-NOVELI, Y. Manguezal: ecossistema entre a terra e o mar. São Paulo: **Caribbean Ecological Research**, 1995. p. 9-12.
257. 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 of Virological Methods**, v.153, p.238–240, 2008.

10 APÊNDICES

Apêndice 1. Termo de aprovação do estudo no Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo.



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Vitória-ES, 05 de julho de 2011.

De: Prof. Dr. Adauto Emmerich Oliveira
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Ciências da Saúde

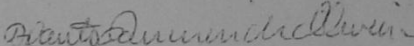
Para: Prof. (a) Regina de Pinho Keller
Pesquisador (a) Responsável pelo Projeto de Pesquisa nº. 041/11 intitulado
“Avaliação dos Efeitos de ações antrópicas sobre a qualidade físico-química e microbiológica da água e de mariscos na região estuarina da Baía de Vitória-ES e suas conseqüências sobre a saúde da população”

Senhor (a) Pesquisador (a),

Informamos a Vossa Senhoria, que o Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, após analisar o Projeto de Pesquisa nº. 041/11 intitulado **“Avaliação dos Efeitos de ações antrópicas sobre a qualidade físico-química e microbiológica da água e de mariscos na região estuarina da Baía de Vitória-ES e suas conseqüências sobre a saúde da população”** e o **Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**, cumprindo os procedimentos internos desta Instituição, bem como as exigências das Resoluções 196 de 10.10.96, 251 de 07.08.97 e 292 de 08.07.99, **APROVOU** o referido projeto, em Reunião Ordinária realizada em 29 de junho de 2011.

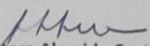
Lembramos que, cabe ao pesquisador responsável elaborar e apresentar os relatórios parciais e finais de acordo com a resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196 de 10/10/96, inciso IX.2. letra “c”.

Atenciosamente,


Coordenador do
Comitê de Ética em Pesquisa
CEP/UFES

Av. Marechal Campos, 1468 – Maruípe – Vitória – ES – CEP 29.040-091.
Telefax: (27) 3335 7211

Apêndice 2. Termo de encaminhamento de pesquisador emitido pela Secretaria Municipal de Saúde de Vitória (SEMUS) para o desenvolvimento do estudo na Unidade de Pronto Atendimento de São Pedro e na Unidade de Saúde da Ilha das Caieiras, Vitória-ES.

PREFEITURA DE VITÓRIA		CARTA DE APRESENTAÇÃO	
Origem	Destino	Data	Emitida por
SEMUS/ETSUS	SEMUS/ PA SÃO PEDRO E US ILHA DAS CAIEIRAS	26/09/2011	JÚLIA
Resumo do Assunto			
ENCAMINHAMENTO DE PESQUISADOR			
<p>Senhor(a) Diretor(a),</p> <p>O projeto de pesquisa da Universidade Federal do Espírito Santo - UFES, intitulado “Avaliação dos efeitos de ações antrópicas sobre a qualidade físico-química e microbiológica da água e de mariscos na região estuarina da Baía de Vitória-ES e suas consequências sobre a saúde da população” de autoria de Rodrigo Pratte Santos, Karoline Fernandes Scarpati de Souza, Susanne Mariani Loss e Sara Angelino Martins com orientação da Professora Regina de Pinho Keller foi aprovado para sua realização.</p> <p>Esclarecemos que o presente estudo será desenvolvido com o objetivo de:</p> <p>Avaliar se o consumo ou manuseio de mariscos, pescados em área de manguezal impactada pela contaminação de esgotos domésticos não tratados, contribui para a alta prevalência de casos de gastroenterites na população infantil da região.</p> <p>A metodologia a ser utilizada será através de entrevista pré-elaborada com perguntas direcionadas às mães ou responsáveis legais da criança de 0 a 12 anos e aplicação de questionário fechado com 12 perguntas. As amostras de fezes das crianças já coletadas pela unidade e identificadas com infecção como episódios diarreicos serão investigadas quanto a presença de vírus entéricos.</p> <p>Ressaltamos que a pesquisadora foi orientada que a liberação está condicionada à devolução dos resultados em forma de CD e que a não devolutiva dos resultados em até dois meses após o término desta referida pesquisa implicará no indeferimento de outras solicitações protocolizadas pelo seu orientador.</p> <p>Solicitamos que a pesquisadora seja recepcionada e que a pesquisa seja viabilizada pelo serviço.</p> <p>Atenciosamente,</p> <p style="text-align: center;"></p> <p>Josenan de Alcântara Almeida Costa Diretora da Escola Técnica e Formação Profissional de Saúde</p>			

Apêndice 3. Termo de consentimento para participação no estudo da prevalência de vírus entéricos na população da região de São Pedro, Vitória-ES.

Instituição: Departamento de Engenharia Ambiental da Universidade Federal do Espírito Santo

Título: Avaliação dos efeitos de ações antrópicas sobre a qualidade físico-química e microbiológica da água e de mariscos na região estuarina da Baía de Vitória-ES e suas consequências sobre a saúde da população.

Investigadores: Regina de Pinho Keller, Ethel Leonor Noia Maciel, Rodrigo Pratte-Santos, Karolina Fernandes Scarpati de Souza, Susanne Mariani Loss, Sara Angelino Martins e Isis de Castro Souza.

DIREITOS: Esse termo de consentimento informará sobre o estudo no qual você está sendo convidado a participar. Antes de tomar conhecimento de qualquer coisa, é importante que você saiba que sua participação é inteiramente voluntária. Você pode decidir não participar deste estudo, sem que nenhum prejuízo decorra desta decisão. A informação obtida a partir deste estudo será publicada, porém a sua identidade será mantida em sigilo todas as vezes, bem como em qualquer publicação futura que vier a resultar deste estudo. Representantes das instituições colaboradoras podem inspecionar sobre quaisquer aspectos deste estudo que necessitem de esclarecimento.

OBJETIVOS: A proposta deste estudo será avaliar se o consumo ou manuseio de mariscos pela população da região de São Pedro em Vitória, pescados em área de manguezal impactada pela contaminação com esgotos domésticos não tratados, contribui para a alta prevalência de casos de gastroenterites na população infantil da região.

PROCEDIMENTOS: para participar deste estudo você precisará coletar uma amostra de fezes para que possamos avaliar a presença de microorganismos que podem causar doença (infecção intestinal).

Todos os resultados serão encaminhados a unidade de saúde para que possam constar do prontuário da criança e verificar junto a equipe médica a necessidade de tratamento da criança.

RISCOS: Não haverá nenhum risco envolvendo os pacientes.

BENEFÍCIOS: A sua participação neste estudo será importante para que possamos conhecer a prevalência de vírus entéricos (microorganismos que ficam no intestino) na região de estudo e esclarecer a alta notificação de casos de gastroenterites.

CUSTO E PAGAMENTOS: Não haverá custos para os pacientes e eles não receberão quaisquer pagamentos pela sua aceitação em participar deste estudo.

Para informações adicionais sobre o estudo você pode contatar a Dra. Regina de Pinho Keller ou a Dra. Ethel Leonor Noia Maciel.

Endereço dos investigadores: UFES/CT/Departamento de Engenharia Ambiental
Av. Fernando Ferrari, 514, CEP: 29075-910, Vitória, ES.
Telefone: (27) 3335-2119

Contato do CEP:
Telefone: (27) 3335-7211
e-mail: cep@ccs.ufes.br / cep.ufes@hotmail.com

Após você ter lido, e ter esclarecido suas dúvidas, se concordar em participar deste estudo, por favor assine abaixo.

NOME DO VOLUNTÁRIO
Data:

ASSINATURA

Eu expliquei o propósito deste estudo ao voluntário. Ao meu ver, o paciente entendeu o objetivo, o procedimento, os riscos e benefícios deste estudo.

NOME DA TESTEMUNHA
Data:

ASSINATURA

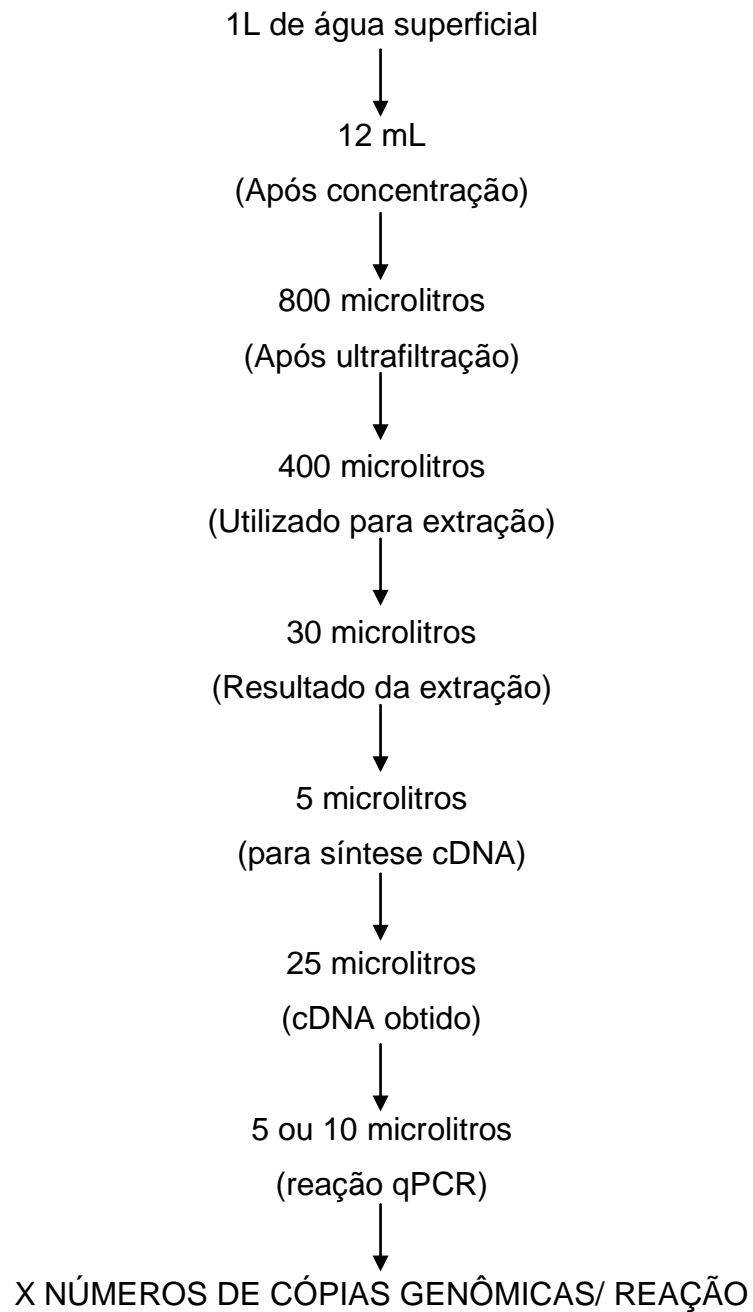
NOME DO INVESTIGADOR
Data:

ASSINATURA

Apêndice 4. Ficha de pesquisa de vírus entéricos em crianças com doença diarreica aguda cadastradas na Unidade de Pronto Atendimento de São Pedro e na Unidade de Saúde da Ilha das Caieiras, Vitória, ES.

Data: ___/___/___	
Nome da criança: _____	
Nome do responsável: _____	
Telefone: _____	Bairro: _____
1) Sexo	8) Duração da diarreia
a) Masculino	a) 0 – 24 hs
b) Feminino	b) 1 – 3 dias
2) Faixa Etária	c) > 3 dias
a) <6meses	9) Ocorrência de vômitos na última semana?
b) 6 meses à 1 ano	a) Sim
c) 2 à 3 anos	b) Não
d) 4 à 8 anos	10) Ocorrência de febre na última semana?
e) 9 à 12 anos	a) Sim
3) Escolaridade	b) Não
a) Não frequenta	11) Participou de atividades recreativas na água recentemente?
b) Creche	a) Sim
c) Ensino fundamental (<5ºano)	b) Não
d) Ensino fundamental (>5ºano)	12) Sofreu vacinação viral recentemente?
4) Renda Familiar Mensal (salário mínimo)	a) Sim
a) <2	b) Não
b) 2 à 4	13) Recebeu vacinação para Rotavírus?
c) >4	a) 1 dose
5) Possui intolerância a algum alimento?	b) 2 doses
a) Sim	c) Nenhuma
b) Não	d) Sem informação
6) Tipo de alimentação na semana do registro na Unidade de Saúde	
a) Mariscos da região	
b) Aleitamento exclusivo	
c) Aleitamento misto	
d) Alimentação caseira (familiar)	
7) Contato com caso de diarreia?	
a) Sim	
b) Não	
<u>Anotações gerais:</u>	

Apêndice 5. Cálculo para obtenção do número de cópias genômicas em 100 ml de água superficial.



ENTÃO: Exemplo, obtenção de 10 cópias genômicas/reação

$$\begin{array}{r} 10 \text{ cópias} - 5 \text{ microlitros cDNA} \\ X \quad - 25 \text{ microlitros cDNA} \end{array} \quad \mathbf{x 5}$$

$X = 50 \text{ cópias genômicas} / 25 \text{ microlitros cDNA}$

25 microlitros cDNA = 5 microlitros da extração ácidos nucléicos

$$\begin{array}{r} 50 \text{ cópias genômicas} - 5 \text{ microlitros extração ácidos nucléicos} \\ Y \quad - 30 \text{ microlitros da extração ácidos nucléicos} \end{array} \quad \mathbf{x 6}$$

$Y = 300 \text{ cópias genômicas} / 30 \text{ microlitros da extração ácidos nucléicos}$

30 microlitros da extração ácidos nucléicos = 400 microlitros do ultraconcentrado

$$\begin{array}{r} 300 \text{ cópias genômicas} - 400 \text{ microlitros do ultraconcentrado} \\ Z \quad - 800 \text{ microlitros do ultraconcentrado total} \end{array} \quad \mathbf{x 2}$$

$Z = 600 \text{ cópias genômicas} / 800 \text{ do ultraconcentrado total}$

800 do ultraconcentrado total equivalem a 12 mL do volume concentrado

12 mL do volume concentrado equivalem a 1L (1000 mL).

Para obtenção do resultado em 100 mL, dividi-se o número de cópias obtidos por 10.

$$\begin{array}{r} 600 \text{ cópias genômicas} - 1000 \text{ mL} \\ W \quad - 100 \text{ mL de água do estuário} \end{array} \quad \mathbf{x 1/10}$$

$W = 60 \text{ Cópias genômicas} / 100 \text{ mL de água do estuário}$

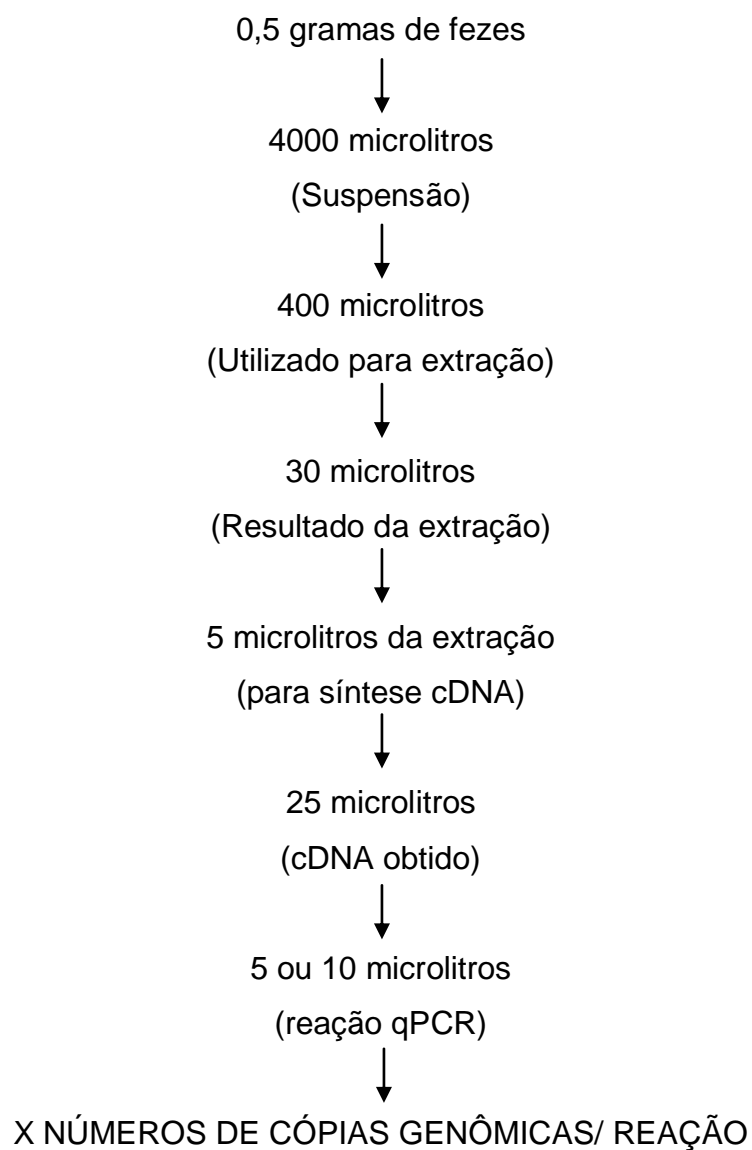
$K = \text{constante } (5 \times 6 \times 2 = 60)$

$X = \text{número de cópias genômicas por ciclo}$

$N = \text{número de cópias genômicas/g de tecido de molusco}$

$$N = (X * K) / 10$$

Apêndice 6. Cálculo para obtenção do número de cópias genômicas por grama de fezes.



ENTÃO: Exemplo, obtenção de 10 cópias genômicas/reação

10 cópias – 5 microlitros cDNA

X – 25 microlitros cDNA **x 5**

X = 50 cópias genômicas/ 25 microlitros cDNA

25 microlitros cDNA = 5 microlitros da extração ácidos nucleicos

50 cópias genômicas – 5 microlitros extração ácidos nucleicos

Y – 30 microlitros da extração ácidos nucleicos **x 6**

Y = 300 cópias genômicas/ 30 microlitros da extração ácidos nucleicos

30 microlitros da extração ácidos nucleicos = 400 microlitros da extração inicial

300 cópias genômicas – 400 microlitros da extração inicial

Z – 4000 microlitros de suspensão **x 10**

Z = 3000 cópias genômicas/4000 microlitros de suspensão

4000 microlitros de suspensão = 0,5g de fezes

3000 cópias genômicas – 0,5 g de fezes

W – 1g de fezes **x 2**

W = 1500 Cópias genômicas/g fezes

K = CONSTANTE (5 x 6 x 10 x 2 = 600)

(X * K)