

Aplicação de Metodologia de Concentração Viral para Detecção de Astrovírus em Águas Ambientais

Flávia Ramos Guimarães

Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em
Saúde
Fundação Oswaldo Cruz

Orientadores: Dra. Marize Pereira Miagostovich
Dr. José Paulo Gagliardi Leite

Rio de Janeiro

2007

Folha de Aprovação

Título: Aplicação de Metodologia de Concentração Viral para Detecção de Astrovírus em Águas Ambientais

Nome: Flávia Ramos Guimarães

Dissertação submetida à Comissão Examinadora composta pelo corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz e por professores convidados de outras instituições, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre.

Profª _____
(INCQS/Fiocruz)

Dra. Manuela da Silva

Profª _____ (IBM/UFF)

Dra. Rita de Cássia Cubel Garcia

Profª _____
(IOC/Fiocruz)

Dra. Ana Maria Coimbra Gaspar

Orientador: _____

Dra. Marize Pereira Miagostovich

Dr. José Paulo Gagliardi Leite

Rio de Janeiro

2007

Guimarães, Flávia Ramos.

Aplicação de Metodologia de Concentração Viral para Detecção de Astrovírus em Águas Ambientais./ Flávia Ramos Guimarães. Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ, 2007.

xviii, 92p.

Dissertação (Mestrado) – Fundação Oswaldo Cruz, INCQS, PPGVS, RJ, 2007. Orientadores: Marize Pereira Miagostovich e José Paulo Gagliardi Leite.

1. Astrovírus 2. Método de concentração 3. Estação de Tratamento de Esgoto 4. Águas ambientais 5. RT-PCR 6. qPCR. I. Título

*Aos meus filhos, Bruno e Rodrigo,
e ao meu marido, Tatsuo,
pelo amor que me dedicam.*

Agradecimentos

- À Dra. Marize Pereira Miagostovich, pela orientação, apoio, confiança e amizade. Pelo exemplo de determinação, de que sempre é possível recomeçar e por não nos deixar desanimar.
- Ao Dr. José Paulo Gagliardi Leite, Chefe do Laboratório de Virologia Comparada, pela oportunidade de estar no laboratório, pela confiança, orientação, amizade e por seu exemplo de competência, seriedade e renovação.
- Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo financiamento e suporte prestados ao desenvolvimento deste trabalho (Processo nº472112/2004-0).
- À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Estudo Superior (Capes) pela concessão da bolsa de estudos de mestrado.
- À Coordenação e a Secretaria do Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária (PPGVS) pela oportunidade de participar desse programa e a todos os seus funcionários pela boa vontade e disponibilidade.
- À Vice Presidência de Serviços de Referência e Ambiente (Fiocruz) pelo suporte financeiro ao Projeto Manaus.
- À Diretoria de Administração do *Campus* (DIRAC- Fiocruz), em especial ao Engenheiro Tatsuo Shubo, pela disponibilização das amostras e dados da Estação de Tratamento de Esgoto.
- Ao Centro de Pesquisas Leônidas e Maria Deane (CPqLMD, Amazonas, Fiocruz), Centro Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA) e ao Centro de Pesquisas Eco-Naturais (CEPEN), em especial a Neusa Hamada e Sheyla

Couceiro, pela infraestrutura proporcionada para as coletas de amostras nos igarapés de Manaus.

- À Fabiana Fioretti Martins Ferreira, Túlio Machado Fumian e Carmem Baur, integrantes do grupo de pesquisa de Virologia Ambiental, pela amizade, companheirismo, auxílio, disponibilidade e sentimento de equipe, imprescindível para a realização desse trabalho.
- À todos os companheiros do Laboratório de Virologia Comparada: Alexandre Fialho, Ana Pinto, Edson Pereira, Eduardo Volotão, Francisca dos Santos, Gilmar Alcântara, Irene Araújo, Joeler Vargas, Marcelle Silva, Maria da Penha Xavier, Marilda Almeida, Matias Montero, Mônica Ferreira, Regianne Guedes, Rosane Assis e Tatiana Robaina pelo apoio, pelos valiosos momentos de descontração, constante disponibilidade nas atividades de laboratório e amizade.
- À Dra. Vanessa De Paula e Msc. Leonardo Diniz-Mendes pela colaboração nas coletas do Projeto Manaus, pelo auxílio e amizade.
- À Dra. Ana Carolina Magalhães Andrade e Dra. Márcia Terezinha B. M. Souza, Biomanguinhos, pela boa vontade e disponibilidade na realização da técnica de clonagem.
- À todos do Departamento de Virologia, Instituto Oswaldo Cruz, em especial aos amigos do Laboratório de Flavivírus pela disponibilidade, amizade e agradável convivência e à Heliana de Jesus Santos e Márcia Regina Ferreira pelo apoio e colaboração.
- À Dra. Rita Cubel Garcia pela revisão e participação na Comissão Examinadora.

- À Dra. Ana Gaspar, Dra. Cláudia Vitral, Dra. Manuela da Silva e Dr. Victor Marins, e pelo aceite em participar da Comissão Examinadora.
- Ao meu marido, Tatsuo, pela realização dos testes estatísticos, inúmeras correções de formatação, paciência infinita, amizade, compreensão, incentivo, carinho, por minha “filha-emprestada” Manuela e por seu amor.
- Aos meus pais, Adelmo e Regina, pelo exemplo de responsabilidade e integridade, pelo amor, paciência, dedicação e por me proporcionar o que havia de mais importante na minha formação profissional: o estudo.
- Ao meu filho Bruno, por sua compreensão no seu mundinho de criança, de tantos, “agora não filho...”, e por seu amor, carinho e preocupação, mesmo diante de tantas ausências. E ao meu filhinho Rodrigo, que ainda não conheço o rosto, mas já sinto todos os movimentos, que me acompanha tão de perto, por sua presença e amor.
- E à Deus, pelas pessoas que me cercam e pelas oportunidades que Ele me oferece.

Resumo

A utilização e a manutenção dos recursos hídricos são temas que apresentam uma importância crescente nas discussões mundiais, devido à preocupação com a futura escassez de água dentro dos padrões de qualidade aceitáveis para o consumo. Entre os maiores problemas na utilização da água, destaca-se a sua poluição por resíduos biológicos e químicos, tornando as águas contaminadas um importante meio de transmissão de várias doenças, entre estas, as gastroenterites de etiologia viral. Este estudo teve como objetivo implementar e analisar uma metodologia para concentração de astrovírus humano (HAstV) em águas ambientais, associada a métodos moleculares de detecção, caracterização e quantificação. Foi realizado um estudo experimental com amostras de diferentes matrizes aquáticas, incluindo água de rio, mar, consumo e esgoto (efluente e afluente) para avaliação da metodologia empregada e dois estudos de campo com um total de 100 amostras ambientais (48 provenientes de uma Estação de Tratamento de Esgoto [ETE] e 52 de água de rio). Foi utilizado o método de concentração por adsorção/eluição com membrana carregada negativamente seguido de ultrafiltração associada à detecção por reação em cadeia pela polimerase precedida da transcrição reversa (RT-PCR) e a quantificação pela PCR em tempo real quantitativa (qPCR). A caracterização molecular do vírus detectado foi realizada por sequenciamento parcial do genoma da segunda fase aberta de leitura. Experimentalmente, a taxa de recuperação variou de 2,4% a 65% entre os diferentes tipos de amostras de água. No estudo de campo, foram detectados 16% de HAstV no total de amostras ambientais, 17,3% em amostras de águas de igarapés e 16,7% na ETE. Uma amostra de rio foi caracterizada como HAstV-1. O método de qPCR apresentou sensibilidade de 18 cópias/reação e a análise comparativa dos resultados obtidos demonstrou uma baixa detecção (2%) quando comparada à RT-PCR (15%). A associação dos métodos utilizados evidenciaram a presença de HAstV em águas ambientais, sendo uma importante ferramenta para avaliação da qualidade de águas, da eficiência na remoção de partículas virais em diferentes métodos de tratamento de água e para esclarecimento da epidemiologia de surtos de HAstV de veiculação hídrica.

Abstract

The use and maintenance of water resources are issues that present increasing significance in world debates, due to concern with the future scarcity of water acceptable for consuming according to quality standards. Among the major problems of water use, the more important is the pollution by biological and chemical wastes, which makes contaminated water a significant transmission route of several diseases, as gastroenteritis of viral etiology. This study aimed to implement and analyze a methodology for human astrovirus (HAstV) concentration from environmental waters, associated with molecular methods of detection, characterization and quantification. An experimental research was performed with different aquatic sources samples, including river water, seawater, potable water and sewage (inflow and outflow) to evaluate the methodology used, and two field's research with a total of 100 environmental samples (48 from a Sewage Treatment Plant [STP] and 52 from river water). A method of concentration by adsorption/elution into an electronegative membrane followed by ultrafiltration combined to reverse transcriptase – polymerase chain reaction (RT-PCR) and real time PCR (qPCR) quantification was utilized. The molecular characterization of the detected virus was performed by genome partial sequencing of the second open reading frame (ORF-2). Experimentally, the recovery rate ranged from 2.4% to 65% among the different matrices of water samples. In field research, 16% of HAstV were detected of the total environmental samples, 17,3% from river water samples, and 16,7% from STP. One river water sample was characterized as HAstV-1. The qPCR method exhibited an 18 copies/reaction sensibility and the comparative analysis of the results showed a low detection (2%) in comparison with RT-PCR (15%). The association of the methods used proved the presence of HAstV in environmental waters, being an important tool for water quality assessment, for viral particle removal efficiency assessment in different treatment water methods and to elucidate the epidemiology HAstV waterborne outbreaks.

Lista de siglas e abreviaturas

μg - micrograma

μL – microlitro

AdV – adenovírus

AM – Amazonas

ANA - Agência Nacional de Águas

ANV – vírus da nefrite aviária

AstV - astrovirus

BAstV – astrovírus bovinos

CA – Califórnia

CaCl₂ – cloreto de cálcio

CaCo-2 – células de adenocarcinoma de cólon humano

cDNA – DNA complementar

CGLAB - Coordenação Geral de Laboratórios de Saúde Pública

CONAMA – Conselho Nacional de Meio Ambiente

DAstV – astrovírus de patos

dATP – desoxiadenina

dCTP – desoxicitosina

dGTP – desoxiguanina

DIRAC – Diretoria de Administração do *Campus* da Fiocruz

DMSO - dimetil sulfoxido

DNA – ácido desoxirribonucleico

dNTP - desorribonucleotídeo trifosfatado

DTT - Dithiothreitol

dTTP – desoxitimina

EDTA – ácido etilenodiamino tetracético

EIE – ensaio imunoenzimático

ETE – Estação de Tratamento de Esgoto

FAstV – astrovírus felino

Fiocruz– Fundação Oswaldo Cruz

g – grama

GPS - Sistema de Posicionamento Global
h – hora
H₂SO₄ - Ácido sulfúrico
HAdV40 – adenovírus humano tipo 40
HAdV41 – adenovírus humano tipo 41
HAstV – astrovírus humanos
HAV- virus da hepatite A
HCl – ácido clorídrico
HEV – vírus da hepatite E
IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
ICTV – Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus
INPA – Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia
L - litro
LB - Luria Bertani
LCCDM - Laboratório Central de Controle de Drogas e Medicamentos
LVC – Laboratório de Virologia Comparada
M –molar
m³ - metros cúbicos
ME – microscopia eletrônica
MgCl₂ – Cloreto de magnésio
min – minuto
mL – mililitro
mM – milimolar
NaCl – cloreto de sódio
NaOH – hidróxido de sódio
ng – nanograma
NoV – norovírus
OAstV – astrovírus de ovinos
°C – graus Celsius ‘
ORF –fase aberta de leitura, “open reading frame”
PAstV – astrovírus suíno

pb – pares de base
PCR – reação em cadeia pela polimerase
pH – potencial hidrogeniônico
PNRH - Política Nacional de Recursos Hídricos
 R_2 – regressão linear
RNA – ácido ribonucleico
rpm – rotação por minuto
RT-PCR - transcrição reversa seguida pela reação em cadeia pela polimerase
RV-A - rotavírus A
seg – segundo
SNFM - Serviço Nacional de Fiscalização da Medicina
SNGRH - Sistema Nacional de Gerenciamento de Recursos Hídricos
ssRNA – RNA fita simples
SVS - Secretaria de Vigilância em Saúde
TA – temperatura ambiente
TAsV – astrovírus de perus
TBE - Tris-Ácido Bórico-EDTA
TE - Tris-EDTA
USEPA - Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos, “United State Environmental Protection Agency Policy”
UT – Unidade de Turbidez
V - volts

Lista de figuras

| | | |
|--------------|--|----|
| Figura 1.1: | Rotas de transmissão de vírus entéricos no ambiente (adaptado de METCALF et al, 1995)..... | 08 |
| Figura 1.2: | Morfologia de astrovírus..... | 10 |
| Figura 1.3: | Árvore filogenética de máxima semelhança dos gêneros <i>Mamastrovirus</i> e <i>Avastrovirus</i> baseada na análise da região do genoma que codifica para a proteína do capsídeo (adaptado de WALTER & MITCHELL, 2003)..... | 12 |
| Figura 1.4: | Organização do genoma do astrovírus humano tipo 2 (HAstV-2) (Adaptado de JIANG et al,1993)..... | 13 |
| Figura 4.5: | Sistema de Filtração Millipore® | 28 |
| Figura 4.6: | Concentrador Centriprep® YM-50, Millipore..... | 29 |
| Figura 4.7: | Fluxograma com as etapas realizadas para concentração viral descrito por KATAYAMA et al (2002), incluindo modificações..... | 30 |
| Figura 4.8: | Foto de Satélite da cidade de Manaus, apresentando os pontos (1-13) que indicam onde foram realizadas as coletas de amostras de água..... | 32 |
| Figura 4.9: | Gráfico ilustrando a variação anual do pulso de inundação do Rio Negro, Manaus, entre os anos 1999 e 2001..... | 33 |
| Figura 4.10: | Visualização panorâmica da Estação de Tratamento de Esgoto (ETE), <i>Campus</i> de Manguinhos, Fundação Oswaldo Cruz..... | 34 |
| Figura 4.11: | Local de coleta (afluente e efluente) da Estação de Tratamento de Esgoto (ETE), <i>Campus</i> de Manguinhos, Fundação Oswaldo Cruz..... | 35 |

| | | |
|--------------|---|----|
| Figura 4.12: | Leitura de Coliformes Fecais com lâmpada ultravioleta utilizando Cartela Quanti-Tray®/2000 do Kit Colilert®-18..... | 40 |
| Figura 5.13: | Locais onde foram obtidas amostras de água superficial representando pontos onde foram e não foram detectados astrovírus humanos..... | 44 |
| Figura 5.14: | Árvore filogenética obtida a partir da análise de 348 nucleotídeos (nt 4574 - 4921) da região (ORF2) que codifica para a proteína do capsídeo do astrovírus humano (HAstV)..... | 48 |

Lista de quadros

| | | |
|-------------|---|----|
| Quadro 4.1: | Reagentes utilizados para a obtenção do cDNA pela transcrição reversa do RNA fita simples de astrovirus humano tipo 2..... | 22 |
| Quadro 4.2: | Seqüência, posição e localização dos iniciadores no genoma de astrovirus humano que foram utilizados na reação em cadeia pela polimerase (PCR) e na reação em cadeia pela polimerase em tempo real quantitativa (qPCR)..... | 23 |
| Quadro 4.3: | Reagentes para a realização da reação em cadeia pela polimerase (PCR) para obtenção do produto de 89pb da região da ORF2 dos astrovírus..... | 24 |
| Quadro 4.4: | Reagentes e condições para a realização da reação em cadeia pela polimerase quantitativa em tempo real (qPCR)..... | 27 |
| Quadro 4.5: | Meses de coleta de acordo com as estações seca (verão) e chuvosa (inverno) da cidade de Manaus..... | 33 |
| Quadro 4.6: | Seqüência, posição e localização dos iniciadores no genoma de astrovirus humano, que serão utilizados na reação em cadeia pela polimerase (PCR) para a detecção viral..... | 37 |
| Quadro 4.7: | Reagentes e condições para a realização da reação em cadeia pela polimerase (PCR) para detecção dos astrovírus humanos..... | 37 |
| Quadro 4.8: | Reagentes utilizados na reação de sequenciamento..... | 38 |

Lista de tabelas

| | | |
|-------------|---|----|
| Tabela 5.1: | Detecção de astrovírus humano em diferentes matrizes aquáticas utilizando os métodos de concentração viral com membrana carregada negativamente e reação em cadeia pela polimerase em tempo real quantitativo (qPCR)..... | 41 |
| Tabela 5.2: | Detecção astrovírus humanos (HAstV) em águas superficiais dos igarapés da cidade de Manaus de acordo com a localização e característica dos pontos de coleta e período da realização das mesmas..... | 43 |
| Tabela 5.3: | Análise microbiológica (Coliformes Fecal e Total e detecção de Astrovírus) das amostras coletadas na Estação de Tratamento de Esgoto do <i>Campus</i> Manguinhos, no período de janeiro a dezembro de 2005..... | 46 |

Sumário

| | | |
|----------|---|-----------|
| 1 | Introdução | 01 |
| 1.1 | Histórico da Legislação Sanitária Relacionada aos Recursos Hídricos... | 02 |
| 1.2 | Gastroenterite Aguda..... | 05 |
| 1.3 | Virologia Ambiental..... | 06 |
| 1.4 | Os Astrovírus..... | 10 |
| 1.4.1 | Morfologia e Classificação..... | 10 |
| 1.4.2 | Genoma dos Astrovírus..... | 12 |
| 1.4.3 | Características Físico-Químicas..... | 13 |
| 1.4.4 | Infecção e Manifestações Clínicas..... | 13 |
| 1.4.5 | Epidemiologia..... | 14 |
| 1.4.6 | Diagnóstico Laboratorial..... | 16 |
| 1.4.7 | Prevenção e Controle..... | 17 |
| | | |
| 2 | Justificativa | 18 |
| | | |
| 3 | Objetivos | 20 |
| 3.1 | Objetivo Geral..... | 20 |
| 3.2 | Objetivos Específicos..... | 20 |
| | | |
| 4 | Material e Métodos | 21 |
| 4.1 | Estabelecimento de Curva Padrão para Implementação do Método de Reação em Cadeia pela Polimerase em Tempo Real Quantitativa (qPCR)..... | 21 |
| 4.1.1 | Obtenção do “Amplicon” para Ligação com o Vetor de Clonagem..... | 21 |
| 4.1.2 | Ligação do “Amplicon” ao Vetor de Clonagem..... | 25 |
| 4.1.3 | Transformação Bacteriana e Purificação do DNA Plasmidial Contendo o Inseto de Astrovirus Humano tipo 2..... | 25 |
| 4.1.4 | Quantificação e Obtenção da Curva Padrão..... | 26 |

| | | |
|----------|---|-----------|
| 4.2 | Recuperação de Astrovírus Humano em Águas Contaminadas Experimentalmente..... | 27 |
| 4.3 | Detecção de Astrovírus em Diferentes Matrizes de Ecossistemas Aquáticos..... | 31 |
| 4.3.1 | Áreas de Estudo..... | 31 |
| 4.3.1.1 | Água de Igarapés de Manaus..... | 31 |
| 4.3.1.2 | Estação de Tratamento de Esgoto (ETE)..... | 34 |
| 4.3.2 | Concentração e Detecção das Amostras de Águas de Diferentes Ecossistemas Aquáticos..... | 35 |
| 4.3.2.1 | Detecção Genômica pela Reação em Cadeia pela Polimerase pela Transcrição Reversa (RT-PCR)- Método Qualitativo)..... | 36 |
| 4.3.2.2 | Sequenciamento Parcial do Genoma Viral..... | 38 |
| 4.3.2.3 | Análise Filogenética das Seqüências..... | 39 |
| 4.3.2.4 | Detecção Genômica pela Reação em Cadeia pela Polimerase em Tempo Real (qPCR)- Método Quantitativo..... | 39 |
| 4.3.3 | Quantificação de Coliformes Totais e Fecais..... | 39 |
| 4.3.4 | Análise Estatística..... | 40 |
| 5 | Resultados | 41 |
| 5.1 | Estabelecimento de Curva Padrão para Implementação do Método da Reação em Cadeia pela Polimerase em Tempo Real Quantitativo (qPCR)..... | 41 |
| 5.2 | Estudo Experimental – Detecção de Astrovírus Humano em Diferentes Matrizes Aquáticas..... | 41 |
| 5.3 | Estudo de Campo – Detecção e Caracterização de Astrovírus Humano em Águas de Igarapés de Manaus e Esgoto..... | 42 |
| 5.3.1 | Águas de Igarapés de Manaus..... | 42 |

| | | |
|------------|---|-----------|
| 5.3.2 | Estação de Tratamento de Esgoto (ETE)..... | 45 |
| 5.3.3 | Detecção de Astrovírus Humano – Reação em Cadeia pela Polimerase Qualitativa x Reação em Cadeia pela Polimerase em Tempo Real Quantitativa..... | 47 |
| 5.3.4 | Caracterização Molecular dos Astrovirus Humano..... | 47 |
| 6 | Discussão | 49 |
| 6.1 | Métodos de Concentração e Detecção Viral..... | 50 |
| 6.2 | Estudo de Campo – Detecção e Caracterização de Astrovírus em Águas de Igarapés de Manaus e Esgoto..... | 52 |
| 6.2.1 | Águas de Igarapés de Manaus..... | 53 |
| 6.2.2 | Estação de Tratamento de Esgoto (ETE)..... | 54 |
| 6.2.3 | Considerações Finais..... | 55 |
| 7 | Conclusões | 58 |
| 8 | Perspectivas | 59 |
| 9 | Referências Bibliográficas | 60 |
| 10 | Anexos | |
| Anexo 10.1 | Molecular detection and characterization of gastroenteritis viruses occurring naturally on the water streams in Manaus, Central Amazônia, Brazil..... | 77 |
| Anexo 10.2 | Molecular detection of Hepatitis A vírus in urban sewage in Rio de Janeiro, Brazil..... | 86 |

1 INTRODUÇÃO

A escassez dos recursos hídricos e a poluição ambiental têm colocado a cada dia mais, a questão do uso e da gestão da água no centro dos interesses em todo o mundo. Estima-se que 1,1 bilhão (18%) do total mundial de pessoas, continuem sem acesso a água potável e que 2,6 bilhões (42%) não disponham de tratamento de água (UNITED NATIONS, 2006). Segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), 2006, o Brasil possui 168.870m³/s de recursos hídricos superficiais, o que representa 50% do total de recursos da América do Sul e 11% dos recursos mundiais. Por possuírem imensas reservas de água doce, a população e o governo brasileiros têm uma grande responsabilidade na preservação da qualidade de sua água o que requer ações que possam combinar desenvolvimento e preservação ambiental.

Dentre os maiores problemas na utilização da água, se destacam a sua poluição por resíduos biológicos e químicos, considerando o crescimento populacional e o aumento do seu uso pelas indústrias. Águas contaminadas são um importante meio de transmissão de várias doenças, sendo o despejo de esgoto sem tratamento o mais freqüente fator de contaminação. Doenças veiculadas pela água estão entre uma das causas comuns de morte no mundo e afetam especialmente países em desenvolvimento. Estima-se que cerca de 25% dos leitos hospitalares no mundo sejam ocupados por pacientes com doenças transmitidas por veiculação hídrica (STRAUB & CHANDLER, 2003). Surto de doenças virais entéricas de veiculação hídrica têm sido descritos em muitos países e a lista de microorganismos potencialmente patogênicos continua aumentando (LECLERC *et al.*, 2002; STRAUB & CHANDLER, 2003).

Entre essas doenças a gastroenterite se destaca como um problema mundial de saúde pública, com 1,5 bilhão de casos ocorrendo anualmente, afetando comumente crianças abaixo de cinco anos de idade, principalmente em países em desenvolvimento, causando 1,8 milhões de óbitos por ano (BRYCE *et al.*, 2005).

Embora, dados recentes da Organização Mundial da Saúde (OMS) demonstrem que a mortalidade devido às gastroenterites esteja diminuindo, a morbidade permaneceu estável nas últimas quatro décadas (KOSEK *et al.*, 2003).

No Brasil, foram notificados em 2004 mais de dois milhões de casos de diarreia, afetando principalmente as regiões Nordeste e Sudeste do país e crianças menores de cinco anos de idade. A magnitude das doenças diarreicas agudas nessa faixa etária pode ser demonstrada pela quantidade de recursos destinados ao pagamento de internações hospitalares por esses agravos, que no período de 1995 a 2004 somaram mais de 173 bilhões de reais (BRASIL, 2006).

1.1 Histórico da Legislação Sanitária Relacionada aos Recursos Hídricos

Desde a antiguidade a humanidade demonstra preocupações e atitudes em relação à manutenção e validação da qualidade de vários ambientes, serviços e produtos, entre eles a água. Sendo a água um recurso natural indispensável à vida, sua necessidade e uso perpassam por toda a história da humanidade. Sua circulação promove o fluxo de tudo que possa vir a ser adicionado à ela, inclusive organismos patogênicos.

Os problemas sanitários sempre estiveram presentes no Brasil e ainda no período monárquico foi editado o Código de Posturas (1832) que apresentava normas sanitárias para diversos produtos e serviços, inclusive águas contaminadas e doenças infecto-contagiosas. O quadro sanitário negativo atravessou todo o Império, chegando à República. No fim do século XIX, os estados dispunham do Código Sanitário e, posteriormente, foi editado o Código Sanitário Federal (1923) existindo a preocupação com o controle da água e do esgoto. Na década de 1920, com a aceleração do processo de urbanização e industrialização, a saúde pública começou a ser vista como uma questão social devido à importância das doenças de massa. Criou-se então o Departamento Nacional de Saúde Pública e foi editado o Regulamento Sanitário Federal. A atenção para a análise de águas minerais e águas de abastecimento mostrava-se presente (COSTA & ROZENFELD, 2000).

Na época do Estado Novo (1930-1945) a edição de normas concentrou-se principalmente no campo dos medicamentos, soros e vacinas, mas também surgiram decretos em outras áreas, como o Código de Águas Minerais (1934). Neste período foi criado o Serviço Nacional de Fiscalização da Medicina (SNFM) através do Decreto nº3.171/41. O Serviço de Saúde dos Portos e o Serviço Federal de Águas e Esgotos, que já existiam na época da criação do SNFM, se mantiveram como órgãos separados (COSTA & ROZENFELD, 2000).

Em 1953 foi criado o Ministério da Saúde (Lei nº1920/53), que manteve em sua estrutura o Serviço de Saúde dos Portos. No ano seguinte criou-se o Laboratório Central de Controle de Drogas e Medicamentos (LCCDM) e, em 1961, foi incorporada a área de alimentos (LCCDMA). Após 1964, o campo de ação de Vigilância Sanitária aumentou e incorporou novos objetos e práticas de controle, acompanhando o crescimento da produção e do consumo de produtos e serviços de interesse sanitário. Consolidou-se o conceito de vigilância no controle de doenças transmissíveis e o termo Vigilância Sanitária passou a denominar o conjunto de ações nas áreas de portos e fronteiras. Nos anos 70, o termo Vigilância Sanitária se ampliou e passou a abranger também o controle sanitário de produtos e serviços de interesse da saúde. A partir de 1974 ocorreram várias reformas no setor da saúde e a criação da Lei da Vigilância Sanitária (Lei 6360/76) e a Lei das Infrações Sanitárias (lei 6437/77), válida até os dias de hoje. A década de 1980 foi caracterizada pela retomada ao exercício da cidadania e a redemocratização da sociedade brasileira, o que resultou na criação de legislações como a Lei 7374/85, que disciplina a ação civil pública de responsabilidade por danos ao meio ambiente e ao consumidor, a Política Nacional do Meio Ambiente (Lei 6938/81) e a nova Constituição Federal da República do Brasil (1988) (COSTA & ROZENFELD, 2000).

Em 19 de setembro de 1990 foi editada a Lei nº 8080 - Lei Orgânica da Saúde (BRASIL, 1990) – que define Vigilância Sanitária como “um conjunto de ações capaz de eliminar, diminuir ou prevenir riscos à saúde e de intervir nos problemas sanitários decorrentes do meio ambiente, da produção e circulação de bens e da prestação de serviços de interesse da saúde”. Em 1992 com a

Conferência do Rio (ECO-92), as questões ambientais ganharam mais destaque, com a Agenda 21 e a Carta da Terra. Em 8 de janeiro de 1997, foi criada a Lei 9433 (BRASIL, 1997) que institui a Política Nacional de Recursos Hídricos (PNRH) e cria o Sistema Nacional de Gerenciamento de Recursos Hídricos (SNGRH). A PNRH visa assegurar para a atual e as futuras gerações a disponibilidade e a qualidade da água, a utilização racional e integrada dos recursos hídricos e a prevenção e defesa contra eventos hidrológicos críticos de origem natural ou decorrente do uso inadequado dos recursos naturais. A água é definida como um “recurso natural, limitado, dotado de valor econômico, bem de domínio público com gestão descentralizada e visando sempre proporcionar o uso múltiplo das águas”.

A Agência Nacional de Águas (ANA) foi criada através da Lei nº 9984 (BRASIL, 2000), de 17 de julho de 2000, que a definiu como “entidade federal de implementação da PNRH, integrante do SNGRH, estabelecendo regras para a sua atuação, estrutura administrativa e suas fontes de recurso”. Neste mesmo ano foi editada a Resolução CONAMA nº 274 (BRASIL, 2001) que estabelece a classificação das águas em doces, salobras e salinas, instrumentos para avaliar a evolução da qualidade das águas e condições de balneabilidade indicando como parâmetro microbiológico o valor de até 2500 Coliformes Totais/100mL ou 2000 Coliformes Fecais/100mL ou 400 enterococos/100mL.

No dia 25 de março de 2004 foi editada a Portaria nº 518 (BRASIL, 2004) que estabelece os procedimentos e responsabilidades relativos ao controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade. A norma define como padrão microbiológico de potabilidade da água para consumo humano a ausência de Coliformes Totais e *Escherichia coli* ou coliformes termotolerantes em 100mL de água. Uma possível preocupação em relação à presença de vírus na água é demonstrada nesta mesma norma, no artigo 12, parágrafo 2º quando recomenda enfaticamente que “para a filtração rápida se estabeleça como meta a obtenção de efluente filtrado com valores de turbidez inferiores a 0,5 UT em 95% dos dados mensais e nunca superiores a 5,0 unidades de turbidez (UT)” a fim de “assegurar a adequada eficiência de remoção

de enterovírus, cistos de *Giardia sp* e oocistos de *Cryptosporidium sp.*”. Recentemente, foi editada a Resolução CONAMA nº 357/05 (BRASIL, 2005) que dispõe sobre a classificação dos corpos d’água e diretrizes ambientais para seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamentos de efluentes.

O provimento e o descarte de água em qualidade adequada é medida básica de promoção à saúde e prevenção de doenças. A crescente edição de normas que se referem a utilização e proteção dos recursos hídricos existentes em nosso país demonstram a preocupação com a importância desse assunto. O tema abordado nesse projeto de estudo insere-se no âmbito da Vigilância Sanitária no intuito de diminuir, eliminar e prevenir problemas sanitários e agravos à saúde decorrentes da contaminação do meio ambiente com dejetos sanitários, a fim de estabelecer melhores marcadores de poluição ambiental, a vigilância epidemiológica de vírus no ambiente associando-os aos surtos de gastroenterites ou em uma possível prevenção desses surtos.

1.2 Gastroenterite Aguda

O termo gastroenterite inclui uma variedade de estados patológicos do trato gastrointestinal causados por agentes infecciosos que invadem a mucosa, cuja principal manifestação é a diarreia, com fezes aquosas ou de pouca consistência, que pode vir acompanhada por náusea, vômito, febre e dor abdominal; e em alguns casos há presença de muco e sangue. (WILHELMI *et al.*, 2003; DISKIN, 2004; BRASIL, 2006).

Esses episódios são geralmente um processo auto-limitado de diarreia e vômito, com duração aproximada de 1 a 7 dias, sendo os vírus importantes agentes etiológicos desta doença, principalmente em crianças. Do ponto de vista clínico, as gastroenterites agudas causadas por vírus não podem ser distinguidas daquelas causadas por bactérias (WILHELMI *et al.*, 2003).

As manifestações diarreicas apresentam variações clínicas das formas brandas até as mais graves e as complicações ocorrem devido ao desequilíbrio hidroeletrólítico, que leva a desidratação, e sendo este relacionado, com

freqüência, à assistência e tratamento instituídos de forma inadequada podendo, inclusive, causar o óbito, principalmente quando associados à desnutrição. Os episódios diarréicos repetidos podem ocasionar desnutrição crônica, com retardo do desenvolvimento estado-ponderal e, até mesmo, da evolução intelectual (BRASIL, 2006).

No Brasil, apesar dos importantes avanços alcançados na prevenção e controle das doenças infecciosas, as doenças diarréicas agudas, continuam como um dos principais problemas de saúde pública e um grande desafio às autoridades sanitárias (BRASIL, 2006).

1.3 Virologia Ambiental

Os primeiros estudos em virologia ambiental tiveram início na década de 1940 com a tentativa de se detectar poliovírus pela inoculação de águas de esgoto em macacos. Esse estudo demonstrou que quando casos de paralisia eram prevalentes na comunidade, os poliovírus estavam presentes no esgoto (MELNICK, 1947).

Na década de 1950, iniciou-se a pesquisa de vírus na água após a ocorrência de um surto de hepatite em Nova Delhi (Índia), ocasionado pela contaminação do sistema de tratamento da água por esgoto. O tratamento da água com alumínio e cloro foi suficiente para evitar infecções bacterianas, no entanto, 30 mil casos de hepatite foram registrados neste período na população e o patógeno causador da epidemia foi identificado anos depois como o vírus da hepatite E (BOSCH, 1998).

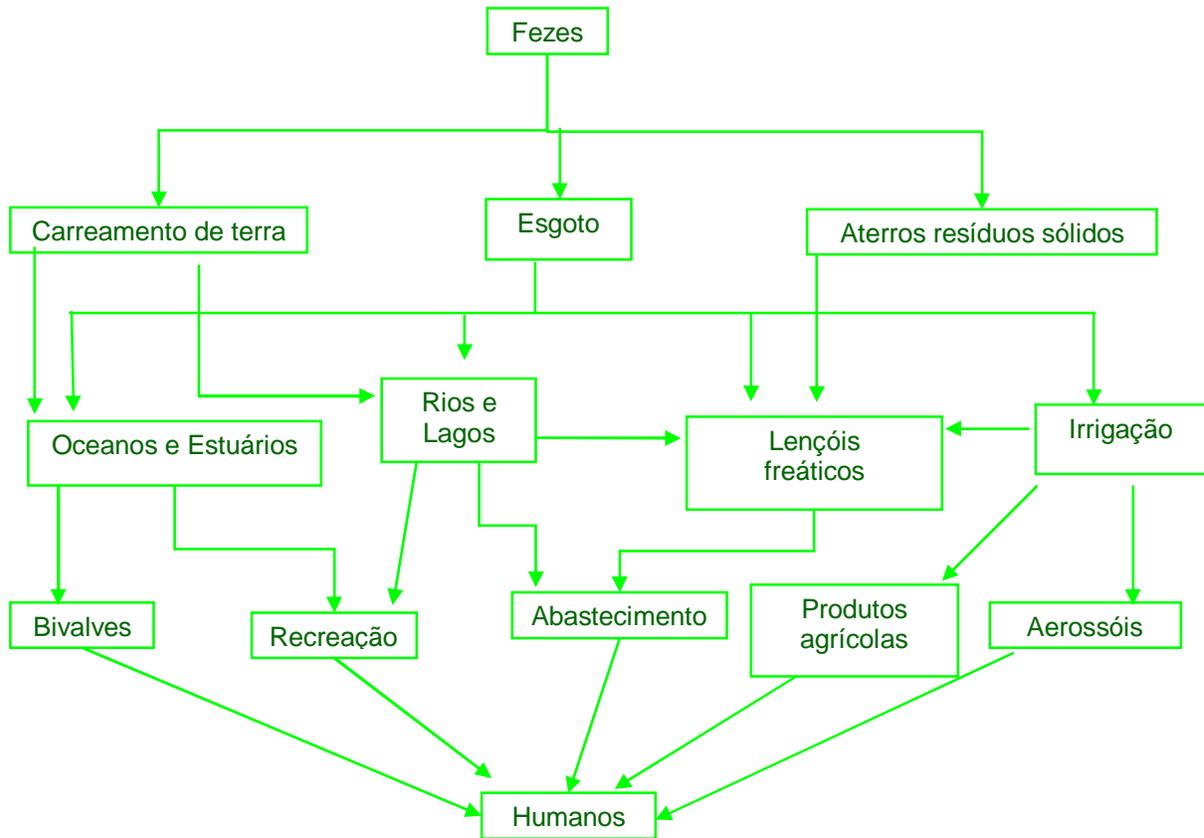
Em 1965 aconteceu a Primeira Conferência Internacional sobre “Transmissão dos vírus através de rotas aquáticas” em Cincinnati, Ohio, Estados Unidos da América (EUA). Outras conferências também ocorreram nas décadas posteriores: “Vírus na água”, na Cidade do México (1974) e “Vírus entéricos na água”, em Israel (1982). Essas conferências discutiram a importância em se desenvolver métodos para detecção de baixas concentrações virais em ambientes aquáticos, assim como a manutenção dos vírus em águas com adequado parâmetro bacteriológico, a dose infectante e a persistência viral em águas para

reuso estabelecendo a importância de um padrão viral de qualidade. Com estas perspectivas, diferentes estudos foram desenvolvidos visando o estabelecimento de técnicas de concentração viral, a eficiência de remoção e o monitoramento de vírus entéricos em diferentes matrizes aquáticas, contribuindo para o desenvolvimento da virologia ambiental a partir da década de 1980 (METCALF *et al.*, 1995).

Em todo o mundo, centenas de vírus entéricos são lançados no ambiente pelo despejo de esgotos, sem tratamento prévio, contaminando corpos d'água e mananciais. Uma vez presentes no ambiente, são altamente resistentes, podendo persistir por meses ou anos, mesmo em condições adversas. Estes vírus, responsáveis pela infecção do Homem e animais, são excretados em altas concentrações ($10^5 - 10^{11}$ /g fezes), podendo ser detectados em águas, mesmo após os processos de desinfecção e tratamento (GERBA *et al.*, 2002; ABBASZADEGA, 2001).

Existem várias rotas de exposição e contaminação a vírus entéricos podendo estes ser adquiridos, principalmente após o consumo de água ou de alimentos contaminados, incluindo os peixes e moluscos bivalves de ambientes marinhos contaminados, além de frutos e vegetais cultivados em solos irrigados com águas contaminadas por esgoto. Nas águas de recreação contaminadas por esgoto, os patógenos virais podem ser transmitidos após contato direto por meio da pele ou por ingestão acidental (BOSCH, 1998; WYN-JONES & SELLWOOD, 2001) (Figura 1.1).

Figura 1.1: Rotas de transmissão de vírus entéricos no ambiente (adaptado de METCALF *et al.*, 1995).



Os métodos de monitoramento de qualidade da água de recreação e de consumo utilizados atualmente são baseados em marcadores bacterianos. Entretanto, os vírus entéricos são mais resistentes à degradação do que os indicadores bacterianos fecais (SHUVAL, 1971), podendo estar presentes em águas onde os níveis bacterianos se encontram dentro dos padrões de qualidade (GRIFFIN *et al.*, 1999, NOBLE & FUHRMAN, 2001). A ausência de correlação entre esses dois parâmetros microbiológicos representam um risco potencial para a saúde humana, uma vez que águas dentro dos padrões bacterianos de

qualidade podem estar relacionadas com o aparecimento de surtos de doenças virais (BOSCH, 1998; HOT *et al.*, 2003; PUSCH *et al.*, 2005).

A Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (USEPA) indica o grupo dos vírus entéricos como o mais seguro e confiável para o monitoramento ambiental, já que são mais resistentes à variações de temperatura e a outras substâncias presentes na água (Karaganis *et al.*, 1983, Rzezutka & Cook, 2004). Entretanto, ao contrário da poluição por bactérias e fungos, a presença de partículas virais na água é de difícil detecção e exige tecnologias sofisticadas de concentração viral e, em certos casos, detecção molecular (METCALF *et al.*, 1995; WYN-JONES & SELLWOOD, 2001).

Recentemente, diferentes métodos de concentração viral, associados à métodos moleculares de detecção, em especial, métodos de amplificação genômica, como a transcrição reversa seguida pela reação em cadeia pela polimerase (RT-PCR) têm sido aplicados a diferentes amostras de águas de esgotos, rios e lagoas (PINA *et al.*, 1998; CHAPRON *et al.*, 2000; CHO *et al.*, 2000, WYN-JONES *et al.*, 2000; FOUT *et al.*, 2003). Os quatro principais grupos de vírus responsáveis pela gastroenterite aguda (rotavírus A [RV-A], astrovírus humano [HAstV], norovirus [NoV] e adenovírus entéricos tipo 40 e 41 [HAdV 40 e 41]), assim como outros vírus entéricos (enterovirus, vírus da hepatite A [HAV], vírus da hepatite E [HEV]) vêm sendo estudados nos últimos anos como importantes marcadores ambientais de contaminação de estações balneárias, estuários, águas tratadas e não tratadas, água mineral, frutos – do – mar, hortaliças e frutos (PINTO *et al.*, 2001; CARDUCCI *et al.*, 2003; CARRIQUE-MAS *et al.*, 2003; GOFTI-LAROCHE *et al.*, 2003; NADAN *et al.*, 2003; SHARMA *et al.*, 2003; VAN HEERDEN *et al.*, 2003).

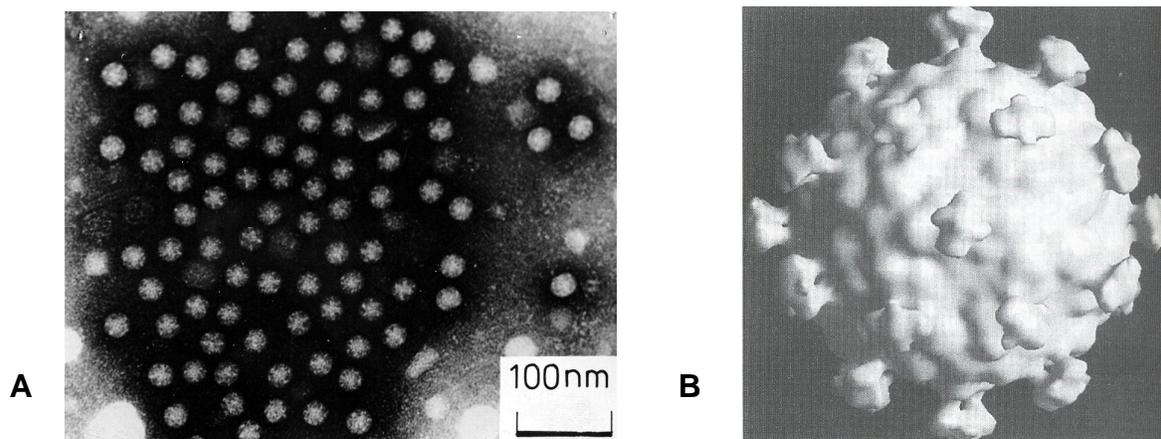
Os HAstV, assim como os NoV e os RV-A, têm sido reconhecidos como importantes agentes da gastroenterite viral aguda (GLASS *et al.*, 2001), sendo o papel da veiculação hídrica na transmissão destes um importante objeto de estudo.

1.4 Os Astrovírus

1.4.1 Morfologia e Classificação

Os Astrovírus foram descritos pela primeira vez por Appleton & Higgins (1975) que, analisando pela microscopia eletrônica (ME) o material fecal diarréico de recém nascidos hospitalizados com gastroenterite, identificaram pequenas partículas virais de forma arredondada, com 28-30nm de diâmetro e sem morfologia definida. Posteriormente, Madeley & Cosgrove (1975) observaram pela ME que algumas partículas tinham aspecto estelar e por isso denominaram-nas astrovírus (AstV). Os AstV não possuem envelope, são vírus pequenos e arredondados, que apresentam simetria icosaédrica com 5 a 6 vértices no capsídeo e um genoma de ácido ribonucleico (RNA) de fita simples com polaridade positiva. Possuem projeções externas de 10nm de comprimento e algumas partículas exibem um aspecto de anel periférico. Apesar de identificados pela ME como uma estrutura de aspecto estelar, apenas 10% das partículas virais observadas apresentam essa estrutura típica (Figura 1.2) (MONROE *et al.*, 1993).

Figura 1.2: Morfologia de astrovírus.



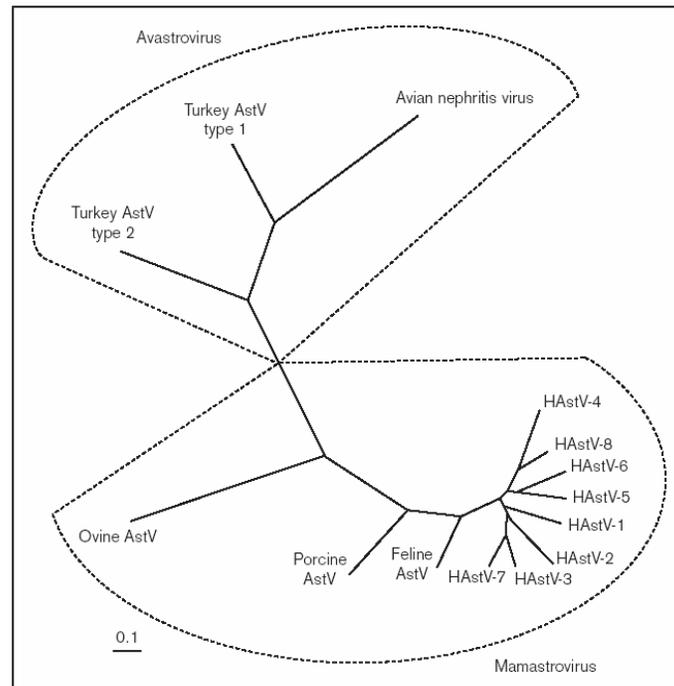
A) Micrografia eletrônica preparada por Dr. José Paulo Gagliardi Leite e Msc Andrea da Silva. Laboratório de Virologia Comparada Barra: 100nm
B) Criomicroscopia eletrônica da partícula de astrovirus (MATSUI & GREENBERG, 2001)

Inicialmente, os AstV foram classificados nas famílias *Picornaviridae* e *Caliciviridae*, de acordo com a morfologia, tamanho das partículas virais e composição do genoma, entre outras características físico-químicas (MATSUI & GREENBERG, 2001). Entretanto, com o seqüenciamento e análise do genoma, foi possível demonstrar diferenças significativas em relação às famílias anteriormente descritas. A partir destes resultados, os AstV foram classificados em uma nova família denominada *Astroviridae* (MONROE *et al.*, 1993) que é constituída por dois gêneros: *Mamastrovirus* e *Avastrovirus*. O gênero *Mamastrovirus* inclui astrovírus humano (HAstV) e de outros mamíferos, como bovinos (BAstV), felinos (FAstV), suínos (PAstV) e ovinos (OAstV) (Matsui & Greenberg, 2001). O gênero *Avastrovirus* inclui astrovírus de aves, como patos (DAstV), perus (TAstV) e o vírus da nefrite aviária (ANV) (WALTER & MITCHELL, 2003). Em mamíferos, os AstV estão associados a gastroenterites e em aves, a enterites, hepatites fulminantes e nefrites (INTERNACIONAL COMMITTEE ON TAXONOMY OF VIRUSES, 2003). Entretanto, eles são hospedeiros-restritos, porque não ocorre reatividade cruzada entre os AstV das diferentes espécies (LUKASHOV & GOUDSMIT, 2002).

Até o momento, foram descritos oito sorotipos de HAstV (HAstV-1 a 8), baseados na reatividade de anticorpos mono e policlonais com proteínas capsídicas. Todos os sorotipos possuem ao menos um epítopo em comum, a proteína capsídica VP26 (Wilhelmi *et al.*, 2003).

Os HAstV também podem ser classificados segundo o genotipo, com base na seqüência nucleotídica de uma região de 382 pares de bases (pb) da segunda fase aberta de leitura (ORF-2) (NOEL *et al.*, 1995). Análises filogenéticas demonstraram que os sorotipos de HAstV podem ser classificados em 7 genotipos correlacionados aos sorotipos, sendo que os sorotipos HAstV-4 e 8 foram agrupados como genotipo 4 (Oh & SCHREIER, 2001). Recentemente, um estudo demonstrou a existência de um novo genotipo que foi caracterizado como genotipo 8 (WANG *et al.*, 2001). A Figura 1.3 demonstra a semelhança dos gêneros *Avastrovirus* e *Mamastrovirus* e seus genotipos baseada na análise da ORF-2 (WALTER & MITCHELL, 2003).

Figura 1.3: Árvore filogenética de máxima semelhança dos gêneros *Mamastrovirus* e *Avastrovirus* baseada na análise da região do genoma que codifica para a proteína do capsídeo (adaptado de WALTER & MITCHELL, 2003).

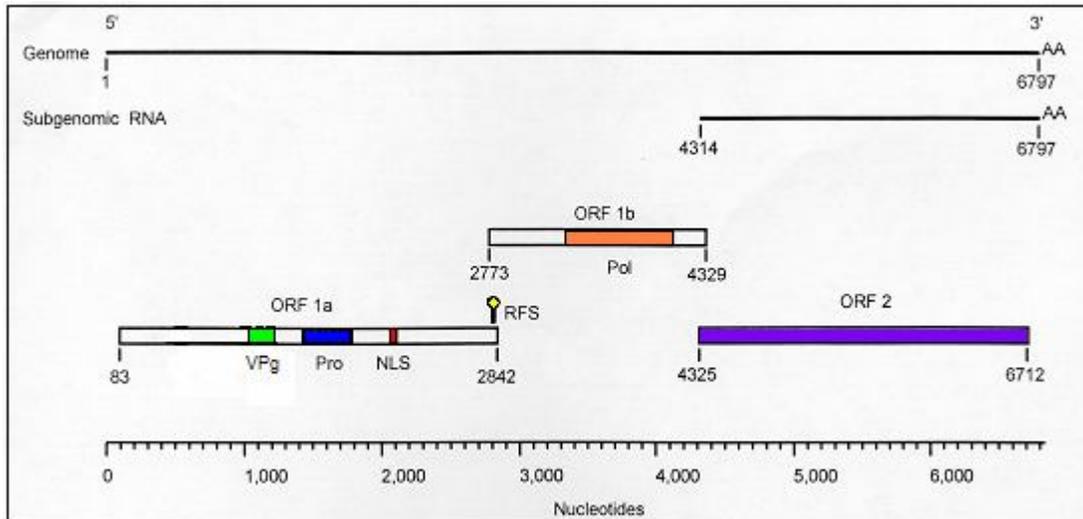


1.4.2 Genoma dos Astrovírus

O genoma dos HAstV é constituído por um RNA de fita simples de polaridade positiva com o número de nucleotídeos variando de 6844-7355 (WALTER & MITCHELL, 2003). Contém três fases abertas de leitura (ORF, “open reading frame”), chamadas ORF-1a, ORF-1b e ORF-2. A ORF-1a e a ORF-1b se encontram na região 5' do genoma e codificam as proteínas não estruturais (NSP); a ORF-2, localizada na região 3', codifica as proteínas estruturais do capsídeo (JONASSEN *et al.*, 2003) (Figura 1.4).

As proteínas estruturais codificadas na ORF-2 são sintetizadas como um precursor poliprotéico de 780 aminoácidos que, posteriormente, é clivado originando os três polipeptídeos do capsídeo viral (MENDEZ-TOSS *et al.*, 2003).

Figura 1.4: Organização do genoma do astrovírus humano tipo 2 (HAstV-2) (Adaptado de JIANG *et al.*, 1993).



VPg: Proteína de união ao genoma; Pro: Protease; NLS: Sinal de localização nuclear Pol: Polimerase; RFS: Estrutura do mecanismo de *frameshifting* ribossômico.

1.4.3 Características Físico-Químicas

As partículas dos HAstV são estáveis a pH 3,0, resistentes ao clorofórmio e a uma grande variedade de detergentes e solventes lipídicos. Esses vírus mantêm a atividade infectiva após 5 minutos a 60°C, sendo inativados com 10 minutos de exposição. Também são estáveis quando estocados a -80°C por um período de 10 anos, porém são instáveis se submetidos a descongelamentos (KURTZ & LEE , 1987; MATSUI & GREENBERG, 2001).

1.4.4 Infecção e Manifestações Clínicas

O período de incubação da infecção causada por HAstV é de 3 a 4 dias (KURTZ *et al.*, 1979). A sintomatologia é caracterizada pela presença de diarreia com fezes líquidas, persistindo de 2 a 3 dias, associada a vários outros sintomas, tais como: vômito, febre, anorexia, dor abdominal, tosse, coriza e muco, podendo

durar até 5 dias. A infecção de HAstV em associação à subnutrição, idade do paciente, co-infecções com outros agentes e utilização incorreta de antibióticos, pode resultar em uma diarreia persistente com sintomatologia de maior gravidade, desidratação profusa e, em determinados casos, levando à internação do paciente (PARASHAR *et al.*, 1998; CUBITT *et al.*, 1999).

O período de excreção do vírus é curto, variando de 3 a 5 dias, porém, em pacientes idosos, imunodeficientes ou imunodeprimidos, a excreção torna-se prolongada, podendo chegar a vários meses (KONNO *et al.*, 1982; BLACK *et al.*, 1993; CUBITT *et al.*, 1999). Os valores da taxa de excreção podem variar de 10^6 a 10^8 partículas/g fezes (CARTER, 2005).

1.4.5 Epidemiologia

Estudos realizados com voluntários demonstraram que as infecções por HAstV são adquiridas pelo contato pessoa-pessoa e pela ingestão de água e alimentos contaminados, tais como, mariscos e ostras provenientes de áreas poluídas por esgotos (ABAD *et al.*, 2001; MITCHELL, 2002; GOFTI-LAROCHE *et al.*, 2003; WALTER & MITCHELL, 2003). As crianças de até 5 anos são as mais susceptíveis à infecção, tendo sido descritas epidemias em escolas, creches e unidades pediátricas. Do total de crianças com gastroenterite causada por HAstV, 6% são hospitalizadas e o período de permanência no hospital é de até 6 dias. Os HAstV também estão associados a surtos de gastroenterite em adultos, idosos e pacientes imunodeficientes (LEITE *et al.*, 1991; LISTE *et al.*, 2000; SAKAMOTO *et al.*, 2000; SILVA *et al.*, 2001; CARDOSO *et al.*, 2002; VICTORIA, 2006).

Estudos sobre a sazonalidade dos HAstV são controversos com os períodos de surtos variando de acordo com a localização geográfica. Em regiões de clima temperado, as infecções ocorrem predominantemente nos meses de inverno e primavera, enquanto que nas regiões de clima tropical, a frequência aumenta na época das chuvas (MATSUI & GREENBERG, 2001). No Rio de Janeiro, um estudo relatou uma maior prevalência de HAstV nos meses de inverno-primavera, especialmente de junho a setembro (SILVA *et al.*, 2001) ,

porém outro trabalho sugeriu a prevalência nos meses de março a maio, no final do verão, início do outono (VICTORIA, 2006). Em Goiânia, foi observado um pico de detecção na primavera e começo do verão, correspondendo à estação chuvosa (CARDOSO *et al.*, 2002), entretanto, em São Luís (Maranhão), Gabbay e colaboradores (2005) não observaram nenhum padrão de sazonalidade durante os dois anos de estudo.

Em países desenvolvidos, a prevalência de gastroenterite associada a HAstV varia de 2 a 11% e nos países em desenvolvimento de 2 a 26% (CHIKHINBRACHET *et al.*, 2002; CUNLIFE *et al.*, 2002; DALTON *et al.*, 2002; RATCLIFF *et al.*, 2002). Nos últimos 10 anos, devido a vigilância epidemiológica e utilização de metodologias de detecção de HAstV, estes vírus tem sido reconhecidos como um importante agente etiológico das gastroenterites virais (GOFTI-LAROCHE *et al.*, 2003; WILHELMI *et al.*, 2003; ESPUL *et al.*, 2004).

A prevalência de cada sorotipo também varia segundo a localização geográfica (SAKAMOTO *et al.*, 2000) e segundo a época do ano (GUIX *et al.*, 2002). O HAstV-1 tem sido relatado como o sorotipo predominante em alguns países da Europa, EUA, Austrália, Japão, Coreia do Sul e Brasil (NOEL *et al.*, 1995; LISTE *et al.*, 2000; MÉNDEZ-TOSS *et al.*, 2000; SAKAMOTO *et al.*, 2000; SILVA *et al.*, 2001; CARDOSO *et al.*, 2002; DALTON *et al.*, 2002; GABBAY *et al.*, 2005)

No Brasil, no início da década de 1990, foram realizados os primeiros estudos para detecção de HAstV em amostras clínicas nas cidades do Rio de Janeiro e de São Paulo (LEITE *et al.*, 1991; STEWIEN *et al.*, 1991). Trabalhos em diferentes cidades do país demonstram a prevalência do HAstV variando de 2,8% a 14% em crianças hospitalizadas com gastroenterite aguda de até cinco anos de idade, correspondendo a maioria dos casos ao HAstV-1 sendo também detectados os HAstV-2, 3, 4, 5 e 8 (STEWIEN *et al.*, 1991; CARDOSO *et al.*, 2002; GABBAY *et al.*, 2005; 2006; MIRANDA, 2002; SILVA *et al.*, 2006; VICTORIA, 2006). Em um surto envolvendo crianças menores de três anos de idade com gastroenterite aguda em uma creche na cidade do Rio de Janeiro o HAstV-1 foi

detectado em 33% dos casos, sendo o único genotipo identificado (SILVA *et al.*, 2001).

1.4.6 Diagnóstico Laboratorial

Atualmente, a ME, primeira metodologia a ser empregada para a detecção dos HAstV, vem sendo substituída por técnicas moleculares, entre as quais a reação em cadeia pela polimerase precedida pela transcrição reversa (RT-PCR), “Northern blotting” e o ensaios imunoenzimáticos (EIE), já que estas apresentam maior sensibilidade quando comparadas à ME (APPLETON & HIGGINS, 1975; HERRMANN *et al.*, 1991; NOEL *et al.*, 1995; WALTER & MITCHELL, 2003).

O desenvolvimento de EIE, capazes de detectarem os oito sorotipos de HAstV, facilitaram os estudos epidemiológicos demonstrando a importância destes vírus, que era subestimada nos estudos de gastroenterite aguda. Entretanto, a detecção dos HAstV pela RT-PCR em amostras de fezes de crianças em creches ou hospitais tem demonstrado que este é um método de detecção mais sensível que o EIE (DALTON *et al.*, 2002; WALTER & MITCHELL, 2003). Iniciadores específicos para a região conservada que codifica a serina protease ou para a região não codificante 3' do genoma são utilizados para a detecção de todos os sorotipos pela RT-PCR (WALTER & MITCHELL, 2003), embora não exista consenso para a região do genoma do vírus a ser utilizada para a detecção com esta metodologia.

Alguns estudos utilizaram iniciadores das regiões conservadas como a da ORF1a (DALTON *et al.*, 2002; GUIX *et al.*, 2002), porém outros utilizaram iniciadores desenhados para reconhecer as seqüências nucleotídicas das extremidades 5' ou 3' da ORF-2 podendo agrupar filogeneticamente os 8 sorotipos dos HAstV. Dois dos métodos de genotipagem utilizando a RT-PCR são baseados nesta região variável do genoma viral, seja utilizando iniciadores comuns a todos os tipos de HAstV com a posterior reação de seqüenciamento ou utilizando iniciadores específicos para cada tipo de HAstV, determinando o tipo pelo número

de pares de base (pb) do produto amplificado (NOEL *et al.*, 1995; SAKAMOTO *et al.*, 2000; SCHNAGL *et al.*, 2002; CARDOSO *et al.*, 2002; GUIX *et al.*, 2005).

Protocolos de RT-PCR quantitativo foram descritos e esse método tem sido apontado como mais sensível para detecção de HAstV, com capacidade de detectar 0,0026 unidades infecciosas por microlitro (μL) (ROYUELA *et al.*, 2006) e 5 cópias/reação (ZHANG *et al.*, 2006). Este ensaio requer uma única etapa diminuindo o tempo de detecção e minimizando o risco de contaminação das metodologias de amplificação convencionais, além de ter a vantagem de quantificar a carga viral.

1.4.7 Prevenção e Controle

Para se determinar as medidas de controle das infecções virais responsáveis pela gastroenterite aguda é importante identificar os agentes etiológicos envolvidos nos surtos (THORNTON *et al.*, 2004). No controle dos surtos de gastroenterite aguda, se deve eliminar as fontes comuns de infecção, assim como também atuar na interrupção da transmissão de pessoa a pessoa. Como a enfermidade tem um curto período de incubação, a interrupção da transmissão é a principal estratégia para a prevenção, especialmente em hospitais e creches. Qualquer paciente com gastroenterite aguda sem diagnóstico deve ser tratado com as precauções apropriadas. É fundamental a atenção na higiene das mãos, que devem ser lavadas com água e sabão antes e após o contato com o paciente ou com objetos que podem estar contaminados e na desinfecção de superfícies contaminadas (WILHELMI *et al.*, 2003).

2 JUSTIFICATIVA

O Laboratório de Virologia Comparada (LVC) em apoio a Coordenação Geral de Laboratórios de Saúde Pública (CGLAB), vinculada à Secretaria de Vigilância em Saúde (SVS) do Ministério da Saúde, sendo credenciado como Laboratório de Referência Regional para Rotavíruses, pela portaria Ministerial No. 15 de 03 de janeiro 2002, atua na investigação da etiologia de surtos de gastroenterite viral aguda e desenvolve suas atividades de pesquisa com os RV, HAstV, NoV e HAdV40 e 41. Em 2004, foi responsável pela identificação de HAstV-1 em um surto de gastroenterite ocorrido no município de Itatiaia, RJ, cuja fonte de disseminação do vírus foi a água consumida pela população (dados não publicados). Na ocasião, a definição do agente etiológico foi realizada a partir da análise de espécime clínico. A ausência de um protocolo de concentração viral inviabilizou a investigação da presença do vírus na água e a determinação da água como fonte de contaminação foi definida apenas por critérios epidemiológicos. Neste surto ficou evidente a necessidade de se estabelecer no LVC um método prático e sensível para detecção de baixas concentrações de vírus em amostras provenientes de ecossistemas aquáticos.

No Brasil, existem estudos descrevendo a presença de RV-A em águas de esgoto e córregos na cidade de São Paulo (MEHNERT & STEWIEN, 1993, MEHNERT *et al.*, 1997), hepatite A em amostras ambientais (VILLAR *et al.*, 2006) e em ostras na cidade de Florianópolis, Santa Catarina (SINCERO *et al.*, 2006). Entretanto, até o momento, nenhum trabalho descrevendo a presença de HAstV em amostras ambientais brasileiras foi publicado.

A implantação do método de concentração viral associado a métodos moleculares de detecção contribuirá no esclarecimento de surtos de HAstV de veiculação hídrica e, conseqüentemente, em ações epidemiológicas efetivas. Em adição, esta ferramenta poderá ser utilizada no monitoramento de vírus em águas ambientais e na determinação do genotipo das amostras de HAstV circulantes no ambiente.

Além disto, com a introdução da Campanha de Vacinação anti-rotavírus em maio de 2006 pelo Programa Nacional de Imunização (PNI), tornou-se

fundamental identificar a presença de vírus responsáveis pela etiologia da gastroenterite aguda tanto em amostras ambientais quanto de origem humana.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

- Estabelecer e aplicar metodologia de concentração e detecção molecular de astrovirus em águas ambientais

3.2 Objetivos Específicos

- Estabelecer a metodologia de PCR quantitativo (qPCR).
- Avaliar o método de concentração viral por adsorção/eluição em membrana carregada negativamente seguido de ultrafiltração para detecção de HAstV em águas ambientais.
- Detectar pela amplificação genômica por métodos qualitativos (RT-PCR) e quantitativos (qPCR) HAstV em concentrados de águas ambientais.
- Caracterizar os genotipos de vírus circulantes pela metodologia de sequenciamento parcial da segunda fase aberta de leitura (ORF-2).
- Analisar filogeneticamente os HAstV detectados.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Estabelecimento de Curva Padrão para Implementação do Método de Reação em Cadeia pela Polimerase em Tempo Real Quantitativa (qPCR)

4.1.1 Obtenção do “Amplicon” para Ligação com o Vetor de Clonagem

Moléculas molde de RNA de HAstV-2 foram extraídas com o kit QIAamp Viral RNA Mini Kit[®] (Qiagen, Inc., Valencia, Califórnia, EUA) a partir de uma suspensão fecal positiva de um caso de gastroenterite aguda proveniente do Rio Grande do Sul pertencente a coleção do LVC. A síntese do cDNA foi realizada com a utilização de um iniciador randômico hexâmero pd(N)₆[®] (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, EUA), sendo essa etapa precedida pela desnaturação (97°C por 7 minutos, 4°C por 2 minutos) de 10µL de RNA e 2µL de dimetil sulfoxido (DMSO – Sigma, St. Louis, Missouri, EUA). Em seguida, foram adicionados os reagentes ao RNA e a mistura incubada a 42°C por 1 hora, e então por 7 minutos a 95 °C. O Quadro 4.1 apresenta os reagentes que foram utilizados para a reação de síntese do cDNA.

Quadro 4.1: Reagentes utilizados para a obtenção do cDNA pela transcrição reversa do RNA fita simples de astrovirus humano tipo 2.

| Reagentes | 1x / μL |
|--|--------------------|
| ssRNA | 10 |
| DMSO | 2 |
| H ₂ O DNAase/RNAase livre ¹ | 20,9 |
| Tampão 10 X ² | 5 |
| dNTP (dCTP/dTTP/dATP/dGTP(20 μM) ¹ | 4 |
| MgCl ₂ (50 mM) ² | 1,5 |
| DTT (100mM) ² | 1 |
| Iniciador randômico pd(N) ₆ [®] | 4 |
| RT Superscript II(200U/ μL) ² | 1 |
| RNAse out ² | 0,6 |
| Total | 50 |

¹ Gibco[®], Califórnia, EUA

² Invitrogen[™], Califórnia, EUA

Em seguida, 10 μL do cDNA foram submetidos a uma reação em cadeia pela polimerase (PCR) com a utilização de dois iniciadores específicos AV1 e AV2 (Le CANN *et al.*, 2004). O Quadro 4.2 descreve a seqüência, posição e localização dos iniciadores no genoma de HAstV que foram utilizados nessa reação para obtenção de um “amplicon” de 89 pb.

Quadro 4.2: Seqüência, posição e localização dos iniciadores no genoma de astrovirus humano, que foram utilizados na reação em cadeia pela polimerase (PCR) e na reação em cadeia pela polimerase em tempo real quantitativa (qPCR)

| Iniciadores | Seqüência 5' –3' | Região do genoma | Produto obtido |
|--------------------------|---|------------------|----------------|
| AV1 (+) ¹ | ⁶⁷⁷⁵ CCG AGT AGG ATC GAG GGT ⁶⁷⁹⁷ | ORF-2 | 89pb |
| AV2 (-) ¹ | ⁶⁷⁰⁸ GCT TCT GAT TAA ATC AAT TTT AA ⁶⁷²⁵ | ORF-2 | |
| AVS (sonda) ¹ | ⁶⁷³⁹ Fam ⁻ CTT TTC TGT CTC TGT TTA GAT TAT TTT AAT CAC C ⁻ Tamra 6772 | ORF-2 | - |

¹ Applied Biosystems, Foster City, Califórnia, EUA.

A PCR foi realizada em um volume final de 50µL e consistia de um ciclo de desnaturação a 94°C por 2 min, 45 ciclos de desnaturação à 94°C por 30 seg, anelamento à 53°C por 30 seg e extensão a 72°C por 1 min e um ciclo de extensão final à 72°C por 10 min. Os reagentes para a realização da PCR estão descritos no Quadro 4.3. A amplificação genômica foi realizada em um Termociclador (Peltier Thermal Cycler PTC 200[®], MJ Research, Massachussetts, EUA).

Quadro 4.3: Reagentes para a realização da reação em cadeia pela polimerase (PCR) para obtenção do produto de 89pb da região da segunda fase aberta de leitura (ORF2) dos astrovírus.

| Reagentes | 1X/ μ L |
|--|-------------|
| H ₂ O DNAase/RNAase livre ¹ | 27,8 |
| dNTP (20 μ M) ¹ | 4 |
| Tampão 10 X ¹ | 5 |
| MgCl ₂ (50 mM) ² | 2 |
| Iniciadores AV1 e AV2 (10 μ M) ³ | 0,6 |
| Taq Platinum Polimerase (5U/ μ l) ² | 0,6 |
| cDNA | 10 |
| Total | 50 |

¹ Gibco[®], Califórnia, EUA

² Invitrogen[™], Califórnia, EUA

³ Applied Biosystems, Foster City, Califórnia, EUA

min = minutos

seg = segundos

Para análise dos “amplicons” foi realizada eletroforese a 100V por 40 minutos onde 10 μ l do produto amplificado acrescido com 1 μ l de azul de bromofenol (Sigma Chemical Company, St. Louis, EUA) foram aplicados em gel de agarose (Sigma Chemical Company, St. Louis, EUA) a 1,5% em Tris-Ácido Bórico-EDTA 1X (100mM Tris, 90mM Ácido bórico, 100mM EDTA, pH 8,3) impregnado com 3 μ l de brometo de etídio 10 mg/ml (Gibco[®], Califórnia, EUA). Os amplicons foram visualizados com o auxílio de um transluminador (Labnet, Edison, NJ, EUA) e registrados por um sistema de captura e fotodocumentação (UVP, Mitsubishi, Japão).

4.1.2 Ligação do “Amplicon” ao Vetor de Clonagem

A ligação do “amplicon”, previamente preparado conforme descrito no item 4.1.1, foi realizada utilizando-se do *kit* TOPO TA Cloning Kit for Sequencing[®] (Invitrogen[™], Califórnia, EUA) segundo as recomendações do fabricante. Essa mistura foi incubada à temperatura ambiente (TA) durante 15 minutos.

4.1.3 Transformação Bacteriana e Purificação do DNA Plasmidial Contendo o Inseto de Astrovirus Humano tipo 2.

As células bacterianas (*E. coli* cepa TOP10F) competentes, previamente preparadas pelo método de cloreto de cálcio (CaCl₂) (SAMBROOK *et al.*, 2001), foram descongeladas em banho de gelo. A estas células, foram acrescidos 3µL do produto da ligação obtida conforme descrito no item 4.1.2, sendo as células, em seguida, incubadas durante 30 minutos em banho de gelo. Essa reação foi submetida a um choque térmico por 90 segundos a 42°C e uma nova incubação de banho de gelo foi realizada por um período de 10 minutos.

A recuperação das células bacterianas, após choque térmico, foi realizada adicionando-se à reação 300µl de meio Luria Bertani líquido (LB: 1% de triptona, 0,5% de extrato de levedura, 1% de NaCl, pH 7,0) sem antibióticos, seguido de incubação à 37°C sob forte agitação (250 rpm) por 1 hora (Gyrotech Water Bath Shaker Modelo G75, New Brunswick, Scientific Edison, New Jersey, EUA). (SAMBROOK *et al.*, 2001).

Após essa etapa, foi realizado o plaqueamento em uma única placa contendo meio LB sólido: LB líquido contendo 1,5% (p/v) de ágar suplementado contendo 100µg/mL de ampicilina. A placa foi incubada a 37°C por 16 horas. Após esta incubação, foram transferidas 10 colônias bacterianas correspondentes a 10 clones plasmidiais para tubos contendo 5mL de meio LB líquido suplementado com ampicilina 50µg/mL e incubadas por 16 horas

com agitação constante de 150rpm a 37°C (Gyrotech Water Bath Shaker Modelo G75, New Brunswick, Scientific Edison, New Jersey, EUA).

Para a seleção dos clones contendo o inserto, foi realizada a extração do DNA plasmidial a partir das culturas dos clones bacterianos utilizando-seo Kit “Miniprep DNA Purification System[®]” (Promega Corporation, Madison, Winsconsin, EUA) de acordo com o protocolo descrito pelo do fabricante.

Após a extração, o DNA plasmidial foi submetido a uma reação de PCR com os iniciadores AV1 e AV2 como previamente descrito no item 4.1.1, para a caracterização do inserto.

4.1.4 Quantificação e Obtenção da Curva Padrão

A concentração de plasmídeo recombinante com o produto de PCR de HAstV-2 foi estimada utilizando 50µL do produto em espectofotômetro com comprimento de onda de 260 nm de acordo com o protocolo descrito pelo fabricante (Biophotometer, Eppendorf, Hamburg, Alemanha). A quantificação medida é fornecida em ng/µL, sendo transformada em número de cópias/µL (n° cópias/µL) de acordo com a fórmula: n° cópias/µL = concentração (g/ µL) X 6,022 X 10²³/ número de pb do plasmídeo recombinante X 660. O título obtido foi de 1,8 X 10⁷ cópias/ µL.

Foram realizadas diluições seriadas de 10 obtendo-se concentrações desde 1,8 x 10⁷ até 1,8 X 10⁰ para obtenção da curva padrão. Foram feitas alíquotas com estas concentrações e armazenadas a -20 °C para posterior utilização.

Em uma microplaca óptica de 96 amostras (MicroAmp[®], Applied Biosystems, Foster City, Califórnia, EUA) foram adicionados 5µL de cada diluição do padrão a 20µL de uma mistura de reagentes. A reação do qPCR foi realizada em plataforma ABI 7500 (Applied Biosystem, Califórnia, EUA), com um volume final de 25µL e consistia em um ciclo de 50°C por 2 min seguido de 45 ciclos de 95°C por 10 min, 94°C por 15 seg e 55°C por 1 min. O Quadro 4.4 descreve os reagentes utilizados na reação.

Quadro 4.4: Reagentes e condições para a realização da reação em cadeia pela polimerase quantitativa em tempo real (qPCR).

| Reagentes | 1X/ μ L |
|--|-------------|
| H ₂ O DNAase/RNAase livre ¹ | 6,625 |
| Taq Man [®] Universal PCR Master MIX ² | 12,5 |
| Iniciador AV1 (10 μ M) ³ | 0,25 |
| Iniciador AV2 (10 μ M) ³ | 0,25 |
| Sonda AVS (10 μ M) ³ | 0,375 |
| cDNA | 5 |
| Total | 25 |

¹ Gibco[®], Califórnia, EUA

² Applied Biosystems, Branchburg, Nova Jersey, EUA

³ Applied Biosystems, Foster city, Califórnia, EUA

min. = minuto

seg = Segundo

4.2 Recuperação de Astrovírus Humano em Águas Contaminadas Experimentalmente

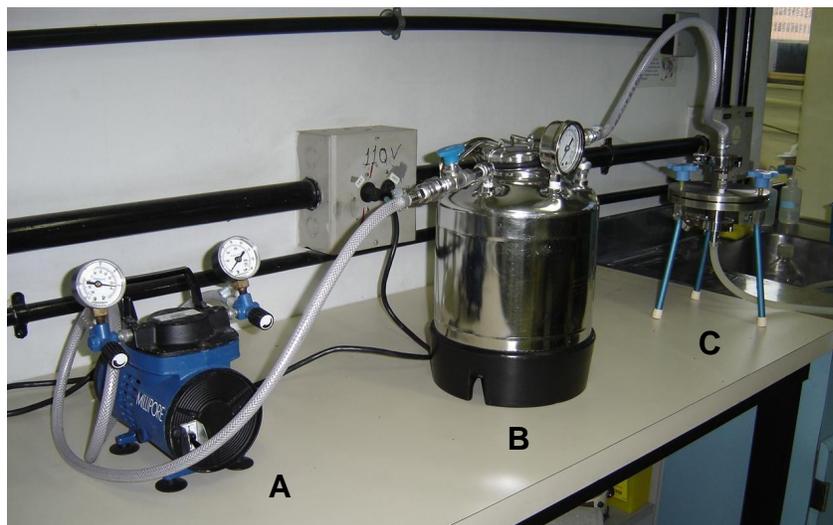
Suspensões fecais previamente positivas pela RT-PCR convencional foram submetidas à técnica de qPCR para quantificação viral e utilização nos experimentos de recuperação de HAstV em diferentes matrizes aquáticas. O RNA viral foi extraído com a utilização do kit QIAamp Qiagen de acordo com o protocolo descrito pelo fabricante. O cDNA foi obtido de acordo com a descrição no item 4.1.1 e a reação de qPCR foi efetuada em duplicata como descrito no item 4.1.4.

Foram semeadas 100 μ L de suspensão fecal contendo $2,6 \times 10^6$ de HAstV em 2 litros (L) de água de consumo, marinha (Posto 2 da Praia da Barra da Tijuca, Rio de Janeiro), de rio (Rio dos Macacos, Jardim Botânico, Rio de Janeiro) e águas de esgoto bruto e tratado (Estação de Tratamento de Esgoto [ETE] do Campus Manguinhos, Fiocruz, Rio de Janeiro). O método de concentração viral foi realizado segundo protocolo descrito por KATAYAMA *et al.* (2002) com as adaptações necessárias para as diferentes matrizes utilizadas. A amostra de água

de consumo foi de clorada com 0,8 mL/L de tiosulfato de sódio 10% (Reagen, Rio de Janeiro, Brasil) (CETESB, 2006).

Amostras controles, sem adição de vírus, e amostras previamente inoculadas foram submetidas ao processo de clarificação que consiste na remoção de resíduos grosseiros por filtração com pré-filtros AP-20[®] (membranas de 142 mm de diâmetro, Millipore) utilizando um Sistema de Filtração Millipore (Millipore, Rio de Janeiro, Brasil) constituído por uma bomba de vácuo, um recipiente de pressão e um suporte para a colocação das membranas (Figura 4.5). Em todas as amostras com, exceção da água do mar, foi adicionado 1,2g de cloreto de magnésio (MgCl₂ - Vetec, Rio de Janeiro, Brasil). O pH foi ajustado para 5,0 com a utilização de ácido clorídrico 6N (HCl - Merck, Rio de Janeiro, Brasil).

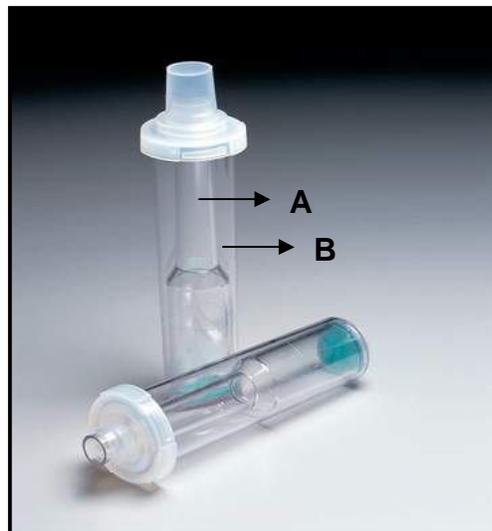
Figura 4.5: Sistema de Filtração Millipore[®]



A – Bomba de vácuo com manômetros, B – Recipiente de pressão, C – Suporte de membrana

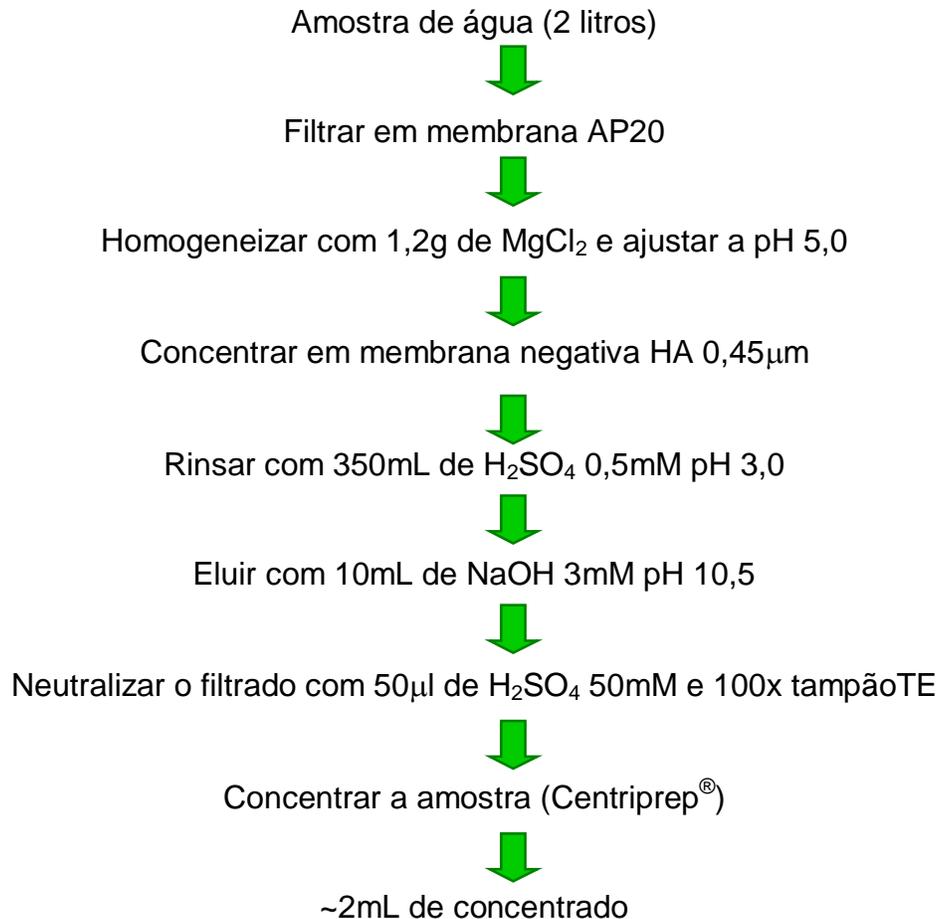
Após clarificação, as amostras foram filtradas em uma membrana HA negativamente carregada (142mm de diâmetro, malha de 0,45 μ m, Millipore) acoplada ao Sistema de Pressão Millipore. A membrana foi rinsada com 350mL de ácido sulfúrico 0,5 mM (H_2SO_4 – Merck, Rio de Janeiro, Brasil). Os vírus foram eluídos em 15 mL de hidróxido de sódio 3mM pH 10,5 (NaOH – Vetec, Rio de Janeiro, Brasil), através de agitação por 5 minutos. O eluato foi neutralizado pela adição de 100 μ L de H_2SO_4 50 mM e 100 μ L de tampão Tris-EDTA (TE) 100x (10 μ M Tris, 1mM EDTA, pH 8,0). O eluato neutralizado foi transferido para uma unidade do concentrador Centriprep[®] YM-50 (Millipore, Rio de Janeiro, Brasi) (Figura 4.6) seguido de centrifugação a 1500 x g por 10 min a 4°C, até obter volume final aproximado de 2mL (Figura 4.7).

Figura 4.6: Concentrador Centriprep[®] YM-50, Millipore



A – Tubo coletor
B – Recipiente externo para amostra

Figura 4.7: Fluxograma com as etapas realizadas para concentração viral descrito por KATAYAMA *et al.* (2002), incluindo modificações.



A extração do RNA viral foi processada a partir de 140 µL do concentrado final com a utilização do kit QIAamp Qiagen de acordo com o protocolo descrito pelo fabricante. O cDNA foi obtido de acordo com a descrição no item 4.1.1 e a reação de qPCR foi efetuada como descrito no item 4.1.4.

4.3 Detecção de Astrovírus em Diferentes Matrizes de Ecossistemas Aquáticos

A metodologia de concentração viral associada a métodos qualitativo e quantitativo de detecção foi aplicada em dois estudos de campo realizados para investigação de HAsTV em águas de rio e esgoto. As coletas de água de rio foram realizadas em igarapés da cidade de Manaus (AM) em colaboração com o Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA) e com o Centro de Pesquisa Maria & Leônidas Deane, Fiocruz, Manaus, AM. As coletas de águas residuais (esgoto) foram realizadas na ETE localizada no *Campus* principal da Fiocruz em colaboração com a Diretoria de Administração do *Campus* (DIRAC) da Fiocruz, Rio de Janeiro.

4.3.1 Áreas de Estudo:

4.3.1.1 Água de Igarapés de Manaus

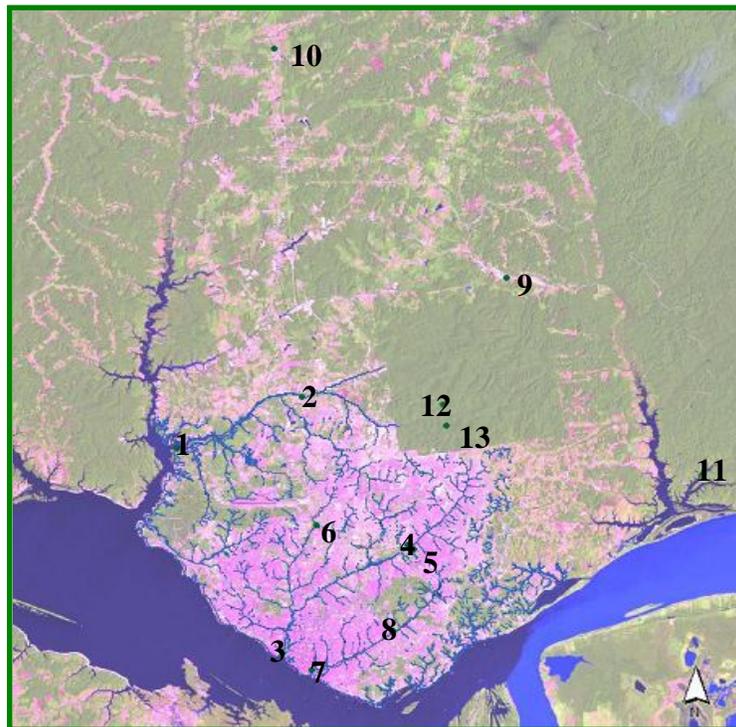
Treze pontos de coleta foram definidos e georeferenciados na rede hidrográfica formada pelas bacias do Tarumã-Açu, Mindu-São Raimundo, Quarenta-Educandos e Puraquequara, onde está localizado o município de Manaus, com 1.688.524 habitantes, concentrados na área urbana (IBGE, 2006).

Os pontos de coleta de amostras de águas superficiais foram definidos de acordo com diferentes áreas de ocupação humana seguindo os seguintes critérios: a) três pontos controle de Floresta primária, localizados em área de reserva florestal, com vegetação intacta, acesso humano restrito e livre de esgoto doméstico, b) dois pontos em uma área descampada aonde a ocupação humana é reduzida e apresentam poucos pontos de despejo de esgoto doméstico e c) oito pontos localizados em áreas com diferentes graus de influência antrópica sem serviço de tratamento de água ou esgoto.

Esses pontos foram precisamente localizados utilizando-se o Sistema de Posicionamento Global – GPS (TREX Legend – Gramin Ltda – Olathe, Kansas,

EUA). A Figura 4.8 apresenta as diferentes bacias e sua localização na cidade de Manaus.

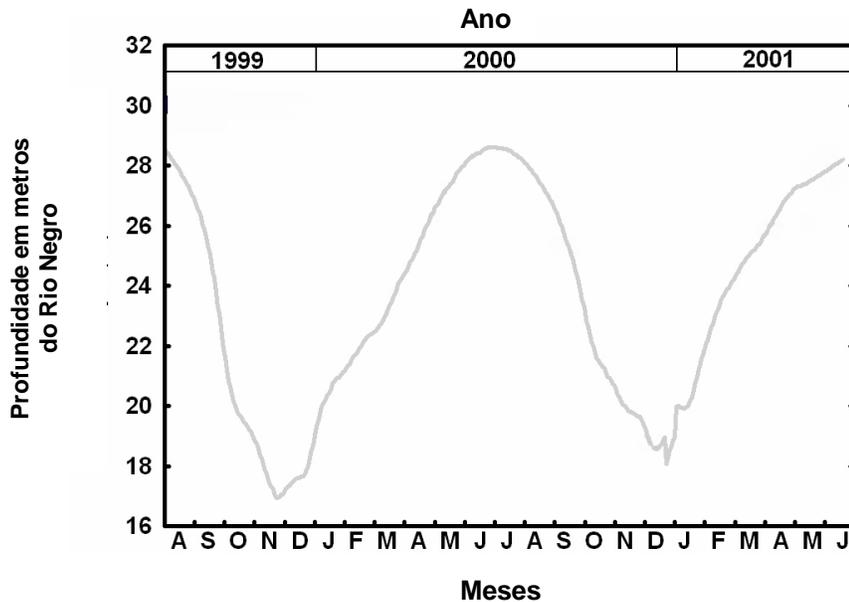
Figura 4.8: Foto de satélite da cidade de Manaus, apresentando os pontos (1-13) que indicam onde foram realizadas as coletas de amostras de água.



- a) Floresta Primária = 11, 12, 13
- b) Descampado = 9 e 10
- c) Áreas com influência antrópica = 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 e 8.

Quatro campanhas de coletas trimestrais foram realizadas no período de agosto de 2004 a junho de 2005. O período das coletas foi determinado pela variação anual do pulso de inundação do Rio Negro que corresponde às estações seca e chuvosa da região (Figura 4.9; Quadro 4.5).

Figura 4.9: Gráfico ilustrando a variação anual do pulso de inundação do Rio Negro, Manaus, entre os anos 1999 e 2001.



Quadro 4.5: Meses de coleta de acordo com as estações seca (verão) e chuvosa (inverno) da cidade de Manaus.

| Mês/Ano | Estação |
|----------------|---------------------------|
| Agosto/2004 | Início da seca |
| Novembro/2004 | Seca |
| Fevereiro/2005 | Início da estação chuvosa |
| Junho/2005 | Estação chuvosa |

As amostras de águas da superficiais (3L) foram coletadas de cada ponto (1-13), armazenadas em recipientes estéreis e mantidas sob refrigeração para posterior investigação viral.

4.3.1.2 Estação de Tratamento de Esgoto (ETE)

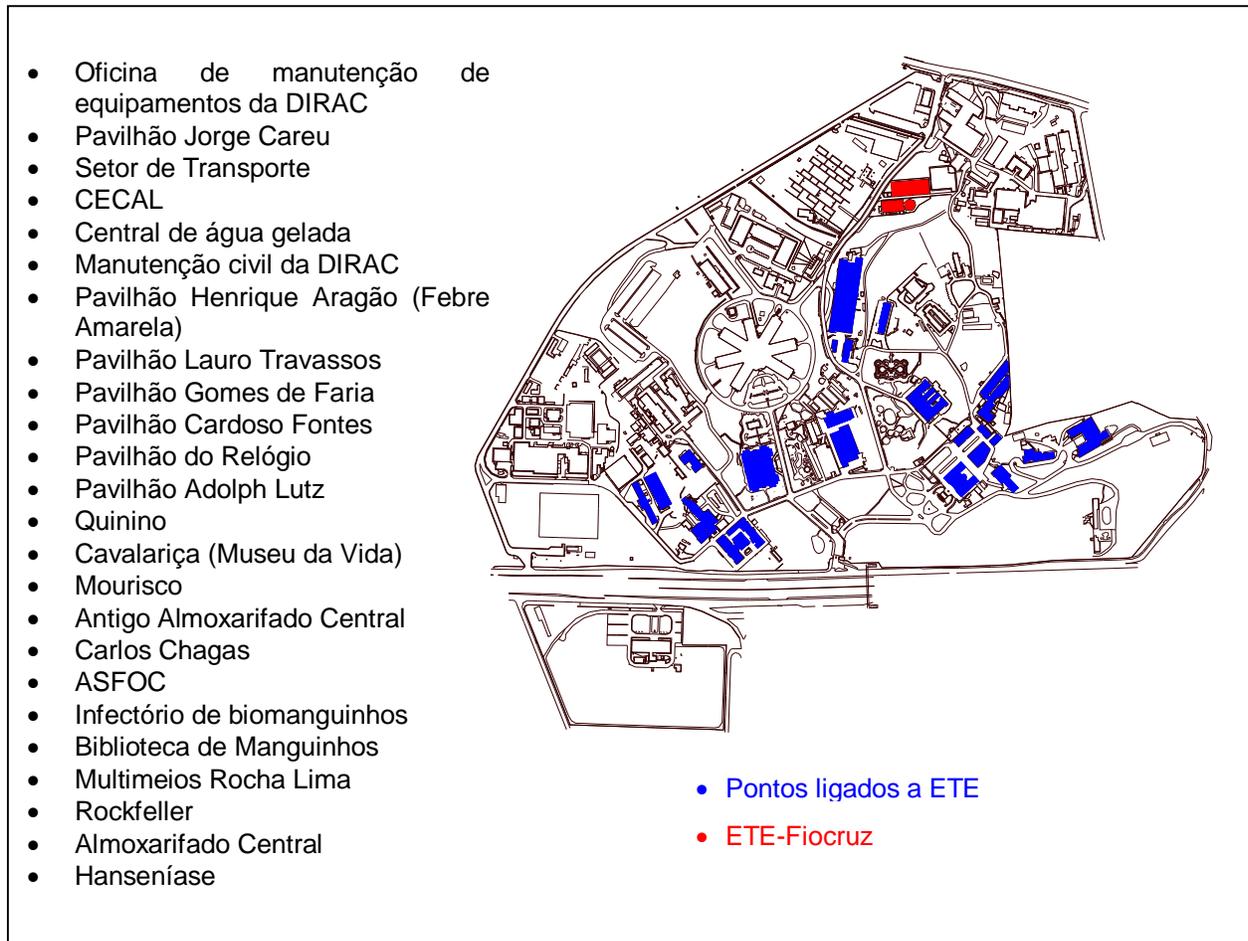
A ETE envolvida nesse estudo localiza-se na cidade do Rio de Janeiro, dentro do *Campus* de Manguinhos, Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz) (Figura 4.10). É uma estação de tratamento secundário por lodos ativados, aeração prolongada, com nitrificação e desnitrificação biológica. A população de projeto é de 8000 habitantes, perfazendo uma vazão total de 512m³/dia. Atualmente, em função da precariedade da rede coletora, trata em torno de 30% do volume de projeto, sendo que o efluente tratado é lançado no Rio Faria Timbó, que margeia o terreno do *Campus*. Os pontos de coleta de esgoto do *Campus* ligados a ETE podem ser observados na figura 4.11.

Figura 4.10: Visualização panorâmica da Estação de Tratamento de Esgoto, *Campus* de Manguinhos, Fundação Oswaldo Cruz.



A – Caixa de Areia
B – Tanque de Aeração
C – Decantador

Figura 4.11: Planta indicativa dos prédios ligados a Estação de Tratamento de Esgoto do *Campus* de Manguinhos, Fundação Oswaldo Cruz (setembro de 2005).



Foram realizadas 24 coletas compostas de amostras do afluente e efluente da ETE (Figura 4.11). Cada amostra composta foi obtida através de oito alíquotas de 250mL, coletadas em intervalos de uma hora durante oito horas, armazenadas em recipiente de vidro estéril e mantidas sob refrigeração até o envio ao LVC. As coletas foram realizadas quinzenalmente no período de janeiro a dezembro de 2005.

Figura 4.12: Local de coleta (afluente e efluente) da Estação de Tratamento de Esgoto, *Campus* de Manguinhos, Fundação Oswaldo Cruz.



Coleta do Efluente



Coleta do Afluente

4.3.2 Concentração e Detecção das Amostras de Águas de Diferentes Ecossistemas Aquáticos

As amostras de águas, provenientes da ETE ou de rio, foram clarificadas e concentradas de acordo com a descrição do item 4.2.

As amostras provenientes da ETE foram tratadas previamente com Vertrel[®] (Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, Missouri, EUA). Foram adicionados 70 μ L de Vertrel para 140 μ L da amostra, centrifugados a 800 x g por 10 minutos. O sobrenadante foi coletado e utilizado para o processo de extração.

O RNA viral foi extraído a partir do concentrado de água, utilizando o kit QIAamp Qiagen de acordo com o protocolo descrito pelo fabricante, e estocado a -70°C .

4.3.2.1 Detecção Genômica pela Reação em Cadeia pela Polimerase Precedida pela Transcrição Reversa (RT-PCR) - Método Qualitativo

A síntese do cDNA para as amostras provenientes de águas de rio foi realizada de acordo com a descrição no item 4.1.1. Para a realização da síntese do cDNA dos concentrados provenientes das águas da ETE, foi adicionado a mistura 0,05µL de β-Mercaptoetanol 1,43 M (Sigma, St. Louis, Missouri, EUA).

Os Quadros 4.6 e 4.7 apresentam os iniciadores específicos previamente descritos por NOEL et al. (1995) e os reagentes utilizados na reação de amplificação genômica para detecção de HAstV, respectivamente. A amplificação foi realizada em um volume final de 50µL e consistia de um ciclo de desnaturação a 94°C por 2 min, seguido de 40 ciclos de desnaturação à 94°C por 30 seg, anelamento à 50°C por 30 seg e extensão a 72°C por 1 min e um ciclo de extensão final à 72°C por 10 min, em um Termociclador Peltier Thermal Cycler PTC 200 (MJ Research, Massachussetts, EUA).

Quadro 4.6: Seqüência, posição e localização dos iniciadores no genoma de astrovirus humano, que foram utilizados na reação em cadeia pela polimerase (PCR) para a detecção viral.

| Iniciadores | Seqüência 5' –3' | Região do genoma | “Amplicon” obtido |
|--------------------------|--|------------------|-------------------|
| Mon 269 (+) ¹ | * ⁴⁵²⁶ CAA CTC AGG AAA CAG GGT GT ⁴⁵⁴⁵ | ORF2 | 449pb |
| Mon 270 (-) ¹ | * ⁴⁹⁵⁵ TCA GAT GCA TTG TCA TTG GT ⁴⁹⁷⁴ | ORF2 | |

¹ Invitrogen™, Califórnia, EUA

(+): sense

(-): antisense

Quadro 4.7: Reagentes e condições para a realização da reação em cadeia pela polimerase (PCR) para detecção de astrovírus humano.

| Reagentes | 1X/μL |
|---|-----------|
| H ₂ O DNAase/RNAase livre ¹ | 24,4 |
| dNTP (dCTP, dDTP, dATP, dGTP) ¹ | 4 |
| Tampão 10 X ² | 5 |
| MgCl ₂ (50 mM) ² | 2 |
| Iniciadores 269/270 (20μM) ² | 4 |
| Taq Polimerase Platinum (5U/μl) ² | 0,6 |
| cDNA | 10 |
| Total | 50 |

¹ Gibco®, Califórnia, EUA

² Invitrogen™, Califórnia, EUA

A análise dos produtos da PCR foi realizada por eletroforese a 100V por 40 minutos, onde 10μl do produto amplificado, acrescido com 1μl de azul de bromofenol (Sigma Chemical Company, St. Louis, EUA), foi aplicado em gel de

agarose (Sigma Chemical Company, St. Louis, EUA) a 1,5% em TBE 1X impregnado com 3µL de brometo de etídio 10 mg/ml (Gibco[®], Califórnia, EUA). Os produtos amplificados foram visualizados com o auxílio de um transluminador (Labnet, Edison, NJ, EUA), registradas por um sistema de captura e fotodocumentação (UVP, Mitsubishi, Japão) e purificados utilizando o kit comercial QIAquick Gel Extration Kit[®](QIAGEN, Valencia, Califórnia, EUA) de acordo com o protocolo descrito pelo fabricante para caracterização do genotipo viral pelo sequenciamento.

4.3.2.2 Sequenciamento Parcial do Genoma Viral

Os produtos purificados foram quantificados em gel de agarose 1,5% utilizando como padrão o Low DNA Mass Ladder[®] (Invitrogen[™], Califórnia, EUA).

Para a reação de sequenciamento foi utilizado o kit comercial Big Dye Terminator[®] v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Foster City, Califórnia, EUA) e os mesmos iniciadores utilizados nas reações de amplificação genômica (Quadro 4.8).

Quadro 4.8: Reagentes utilizados na reação de sequenciamento.

| Reagentes | 1X / µL |
|---|-----------|
| Iniciador (Mon 269 ou 270) ¹ 2µM | 2 |
| Tampão de sequenciamento 2,5X ² | 2 |
| Big Dye ² | 2 |
| H ₂ O DNAase/RNAase livre ³ | 10 |
| DNA (10 ng) | 4 |
| Total | 20 |

¹ Invitrogen[™], Califórnia, EUA

² Applied Biosystems, Foster city, Califórnia, EUA

³ Gibco[®], Califórnia, EUA

Para a purificação das reações de seqüência foram utilizadas as Colunas CENTRI-SEP[®] (Princeton Separations, Califórnia, EUA) conforme protocolo recomendado pelo fabricante.

Foi utilizado o seqüenciador automático modelo 3100 (Applied Biosystems, Califórnia, EUA) para obter os eletroferogramas.

4.3.2.3 Análise Filogenética das Seqüências

As seqüências obtidas foram alinhadas utilizando o programa Blast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Blast/>) e comparadas com seqüências de diferentes genotipos e outras provenientes de diferentes países, resgatas do EntrezPubmed–GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=Genome>).

A análise filogenética das seqüências foi realizada utilizando o MEGA 2 versão 2.1 (KUMAR *et al.*, 2001) e a distância genética calculada pelo modelo Kimura2-parâmetros, utilizando o método *neighbor-joining* com *bootstrap* de 1000 réplicas.

4.3.2.4 Detecção Genômica pela Reação em Cadeia pela Polimerase em Tempo Real (qPCR) - Método Quantitativo

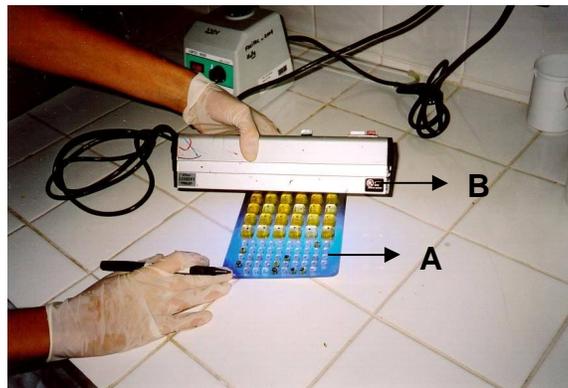
A partir do cDNA sintetizado no item 4.3.2.1, foi realizada a reação de qPCR para quantificação da amostras, como descrito no item 4.1.2. Todas as amostras foram analisadas em duplicata.

4.3.3 Quantificação de Coliformes Totais e Fecais

Para as amostras provenientes da ETE de Manguinhos, Fiocruz foram realizadas as quantificações de Coliformes Totais e Fecais com a utilização do Kit Colilert[®]-18 Quanti-Tray[®]/2000 (Figura 4.12 -IDEXX Laboratories, Westbrook, EUA). Inicialmente, foram realizadas em água destilada, diluições seriadas de 10 da amostra de esgoto, iniciando em 10⁻¹ até 10⁻⁸ para a determinação da diluição a ser utilizada. A diluição para a realização do teste foi determinada como sendo

10^{-5} para o efluente e 10^{-3} para o afluente. Foram adicionadas 100mL da amostra diluída à cartela e após incubação de 24 horas à 35°C, foi realizada a leitura de Coliformes Totais pela visualização direta. A leitura de Coliformes Fecais foi determinada com o auxílio de uma lâmpada ultravioleta. O resultado foi expresso de acordo com a tabela apresentada pelo fabricante em número mais provável (NMP)/100mL.

Figura 4.13: Leitura de Coliformes Fecais com lâmpada ultravioleta utilizando Cartela Quanti-Tray[®]/2000 do Kit Colilert[®]-18.



A – Cartela Quanti-Tray[®]/2000
B – Lâmpada ultravioleta

4.3.4 Análise Estatística

Para análise dos resultados de diferença de positividade entre as técnicas de PCR qualitativo e qPCR e diferença de presença de amostras positivas na área urbana e rural dos igarapés de Manaus foi realizado o teste qui quadrado (χ^2) para independência com 1 grau de liberdade e nível de significância de 5%, utilizando a correção de Yates somente para as amostras de Manaus.

5 RESULTADOS

5.1 Estabelecimento de Curva Padrão para Implementação do Método da Reação em Cadeia pela Polimerase em Tempo Real Quantitativa (qPCR)

A curva padrão obtida com o plasmídeo contendo o inserto de HAstV-2 apresentou coeficiente de regressão linear (R_2) de 0,997 e inclinação de -3,77, com limite de detecção de 18 cópias ($1,8 \times 10^1$). A cada reação foi utilizada uma nova curva com os padrões alíquotados e estocados a -20°C para aferição do teste, apresentando variações de valor de R_2 de 0,995 a 0,999 e de inclinação de -3,64 a -4,0.

5.2 Estudo Experimental - Detecção de Astrovírus Humano em Diferentes Matrizes Aquáticas

A Tabela 5.1 apresenta o número de cópias de HAstV recuperadas em diferentes matrizes aquáticas e sua taxa de recuperação após semeadura experimental de $2,6 \times 10^6$ cópias em 2L de amostra.

Tabela 5.1: Detecção de astrovírus humano em diferentes matrizes aquáticas utilizando os métodos de concentração viral com membrana carregada negativamente e reação em cadeia pela polimerase em tempo real quantitativa (qPCR).

| Matriz aquática | Número de cópias recuperadas | Taxa de recuperação |
|------------------------|-------------------------------------|----------------------------|
| Água de consumo | 1×10^5 | 3,8% |
| Água de rio | $1,7 \times 10^6$ | 65,4% |
| Água do mar | $2,9 \times 10^5$ | 11,1% |
| Esgoto bruto | $1,1 \times 10^5$ | 4,2% |
| Esgoto tratado | $6,3 \times 10^4$ | 2,4% |

5.3 Estudo de Campo - Detecção e Caracterização de Astrovírus Humanos em Águas de Igarapés de Manaus e Esgoto

5.3.1 Águas de Igarapés de Manaus

No período de agosto de 2004 a junho de 2005 foram coletadas, em quatro campanhas de coleta, 52 amostras de água proveniente dos igarapés das bacias hidrográficas de Manaus. Foram detectadas nove (17,3%) amostras positivas para HAstV (Tabela 5.2), sendo oito pela técnica de PCR e uma pela qPCR, quantificada em 25,6 cópias/reação.

As amostras positivas para HAstV foram identificadas em quatro pontos de coleta: a) três deles localizados na microbacia do Mindú-São Raimundo e b) um na bacia do Tarumã-Açu. No ponto 4, localizado na microbacia Mindú-São Raimundo, os HAstV foram detectados nas quatro campanhas de coleta realizadas.

Foram coletadas amostras de seis pontos na área urbana (24 amostras), quatro pontos na área rural (16 amostras) e três pontos na área controle (12 amostras). Os HAstV foram detectados em 12,5% (2/16) das amostras coletadas na área rural e em 29,2% (7/24) das obtidas na área urbana, não havendo diferença significativa entre as áreas ($\chi^2 = 0,98$ e nível de significância = 5%). Não foram detectados HAstV em amostras coletadas em áreas controle (Figura 5.13).

Tabela 5.2: Detecção de astrovírus humanos (HAstV) em águas superficiais dos igarapés da cidade de Manaus de acordo com a

| Ocupação Humana / Área | Bacias | Num. Ponto | Localização do Ponto | Sistema de Posicionamento Global | Período de coleta | | | | | |
|------------------------|--------------------------|------------|----------------------|----------------------------------|-------------------|----------|----------|----------|--------------------------------------|-------|
| | | | | | Ago 2004 | Nov 2004 | Fev 2005 | Jun 2005 | Características dos pontos de coleta | |
| Área rural | Tarumã-Açu | 1 | Estuário do Tarumã | 03°00'17,9" | 60°05'29,4" | HAstV | HAstV | - | - | - |
| | | 2 | Meio do Tarumã | 02°58'23,4" | 60°01'16,4" | - | - | - | - | - |
| | | 3 | Estuário do Mindú | 03°07'41,5" | 60°01'58,9" | - | - | - | - | HAstV |
| Área urbana | Mindú - São Raimundo | 4 | Meio do Mindú | 03°03'48,1" | 59°57'46,1" | HAstV | HAstV | HAstV | HAstV | HAstV |
| | | 5 | Meio do Mindú | 03°03'53,0" | 59°57'44,9" | HAstV | - | - | HAstV | - |
| | | 6 | Meio do Mindú | 03°03'04,4" | 60°00'50,2" | - | - | - | - | - |
| | | 7 | Estuário do Quarenta | 03°08'19,5" | 60°00'59,5" | - | - | - | - | - |
| Área rural | Puraquequara Tarumã- Açu | 8 | Meio do Quarenta | 03°06'54,1" | 59°58'15,0" | - | - | - | - | - |
| | | 9 | Descampado 01 | 02°54'07,4" | 59°54' 25,2" | - | - | - | - | - |
| | | 10 | Descampado02 | 02°45'47,7" | 60°02'12,2" | - | - | - | - | - |
| Floresta Primária | Puraquequara TARumã-Açu | 11 | Mainã Grande | 03°02'04,9" | 59°79' 76,2" | - | - | - | - | - |
| | | 12 | Reserva Ducke | 02°58'42,6" | 59°56'34,9" | - | - | - | - | - |
| | | 13 | Reserva Ducke | 02°59'28,5" | 59°56'29,0" | - | - | - | - | - |

¹ Amostra positiva pela qPCR . (-) = negativo

Figura 5.14: Locais onde foram obtidas amostras de água superficial representando pontos onde foram e não foram detectados astrovírus humanos.

Ponto 1 Tarumã-Açu



Ponto 5 Mindú - São Raimundo



Ponto 3 Mindú - São Raimundo



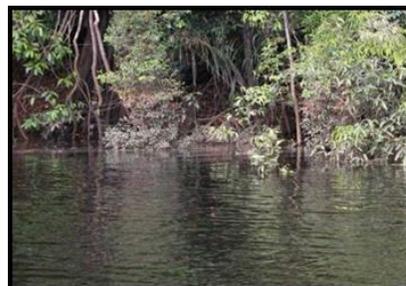
Ponto 10 - Descampado



Ponto 4 Mindú - São Raimundo



Ponto 11 - Floresta Primária



Ponto 1, 3, 4 e 5 = detecção de HAstV

Ponto 10 (Área Rural) e Ponto 11 (Floresta Primária) = ausência de HAstV

5.3.2 Estação de Tratamento de Esgoto (ETE)

Foram obtidas 48 amostras de águas residuais em 24 coletas realizadas no período de janeiro a dezembro de 2005 na ETE do *Campus Manguinhos*. Um total de 8 (16,7%) amostras foram positivas para HAstV, sendo 7 pela técnica de RT-PCR convencional e uma pela qPCR tendo esta a concentração de 26,7 cópias/reação.

A distribuição dos HAstV detectados por mês e local de coleta demonstra que 50% (4/8) dos vírus foram detectados em amostras de esgoto tratado e que em duas coletas foram detectados HAstV em amostras provenientes de esgoto bruto (efluente) e esgoto tratado (afluente).

A contagem de Coliformes Totais e Fecais nas amostras de afluente e efluente demonstraram um alto percentual na eficiência de remoção de coliformes da ETE após tratamento (Tabela 5.3).

Tabela 5.3: Análise microbiológica (Coliforme Total e Fecal e detecção de Astrovírus) das amostras coletadas na Estação de Tratamento de Esgoto do Campus Manguinhos, no período de janeiro a dezembro de 2005.

| Coleta | Efluente | | | Afluente | | | Eficiência na Remoção de Coliformes | | |
|--------|--------------|--------------|----------|----------------|--------------|----------|-------------------------------------|---------------|--------|
| | Colif. Total | Colif. Fecal | HAstrV | Colif. Total | Colif. Fecal | HAstrV | Colif. Totais | Colif. Fecais | |
| Jan | 1 | 1,90E+06 | 6,20E+05 | - | 5,45E+04 | 4,10E+03 | + | 97,13% | 99,99% |
| | 2 | 5,30E+06 | 1,10E+06 | - | 6,60E+04 | 1,00E+04 | - | 98,75% | 99,99% |
| Fev | 3 | NR* | NR* | - | NR* | NR* | + | NR* | NR* |
| | 4 | 2,31E+07 | 7,40E+06 | - | 3,69E+05 | 1,34E+05 | - | 98,40% | 99,99% |
| Mar | 5 | 5,94E+07 | 8,60E+06 | - | 3,73E+05 | 5,20E+04 | - | 99,37% | 99,99% |
| | 6 | 2,31E+07 | 7,40E+06 | - | 6,97E+04 | 1,10E+04 | - | 99,99% | 99,99% |
| Abr | 7 | 6,80E+07 | 7,10E+06 | - | 1,90E+05 | 2,40E+04 | - | 99,72% | 99,99% |
| | 8 | 7,91E+09 | 2,43E+08 | - | 1,19E+05 | 2,00E+04 | - | 99,99% | 99,99% |
| Mai | 9 | 5,25E+08 | 3,05E+07 | - | 3,93E+04 | 2,00E+03 | - | 99,99% | 99,99% |
| | 10 | NR* | NR* | - | NR* | NR* | - | NR* | NR* |
| Jun | 11 | NR* | NR* | - | NR* | NR* | - | NR* | NR* |
| | 12 | 1,00E+08 | 1,33E+07 | - | 5,73E+05 | 7,40E+04 | - | 99,43% | 99,99% |
| Jul | 13 | 1,18E+08 | 4,86E+07 | - | 1,03E+05 | 1,43E+04 | - | 99,91% | 99,99% |
| | 14 | 1,78E+09 | 5,20E+07 | + | 1,66E+06 | 1,20E+05 | + | 99,91% | 99,99% |
| Ago | 15 | 1,45E+09 | 1,00E+07 | - | 6,60E+05 | 2,70E+04 | - | 99,95% | 99,99% |
| | 16 | 5,24E+08 | 7,40E+06 | - | 3,28E+05 | 8,50E+03 | - | 99,94% | 99,99% |
| Set | 17 | 8,29E+09 | 3,10E+07 | + | 9,30E+06 | NR* | - | | NR* |
| | 18 | 3,13E+09 | 3,00E+07 | + | 1,90E+06 | 2,00E+04 | - | 99,94% | 99,93% |
| Out | 19 | 7,27E+09 | 1,34E+08 | - | 1,12E+07 | 8,60E+04 | - | 99,85% | 99,99% |
| | 20 | 1,39E+09 | 5,30E+07 | + ¹ | 1,20E+06 | 4,10E+04 | + | 99,91% | 99,99% |
| Nov | 21 | 1,57E+08 | 2,28E+07 | - | 3,13E+05 | 1,00E+04 | - | 99,80% | 99,99% |
| | 22 | 6,21E+08 | 1,65E+08 | - | 2,39E+05 | 9,10E+04 | - | 99,96% | 99,99% |
| Dez | 23 | 4,65E+08 | 4,00E+07 | - | 2,22E+04 | 1,00E+04 | - | 99,99% | 99,99% |
| | 24 | 2,28E+08 | 1,00E+07 | - | 6,24E+04 | 9,70E+04 | - | 99,97% | 99,99% |

NR= Não realizado; ¹ Amostra positiva para HAstrV pela qPCR.
 (-)= negativo; (+)= positivo

5.3.3 Detecção de Astrovirus Humano – Reação em Cadeia pela Polimerase Qualitativa x Reação em Cadeia pela Polimerase em Tempo Real Quantitativa

A avaliação destes métodos foi realizada partindo da hipótese de que não havia diferença de positividade entre os dois métodos. O teste χ^2 para independência apresentou o valor igual a 10,86 sendo o valor tabelado, para 1 grau de liberdade e significância de 5%, de 3,84. Logo, existe diferença entre as metodologias utilizadas, demonstrando que a qPCR, embora detectando 18 cópias/reação, apresentou menor positividade quando comparado com a PCR qualitativa.

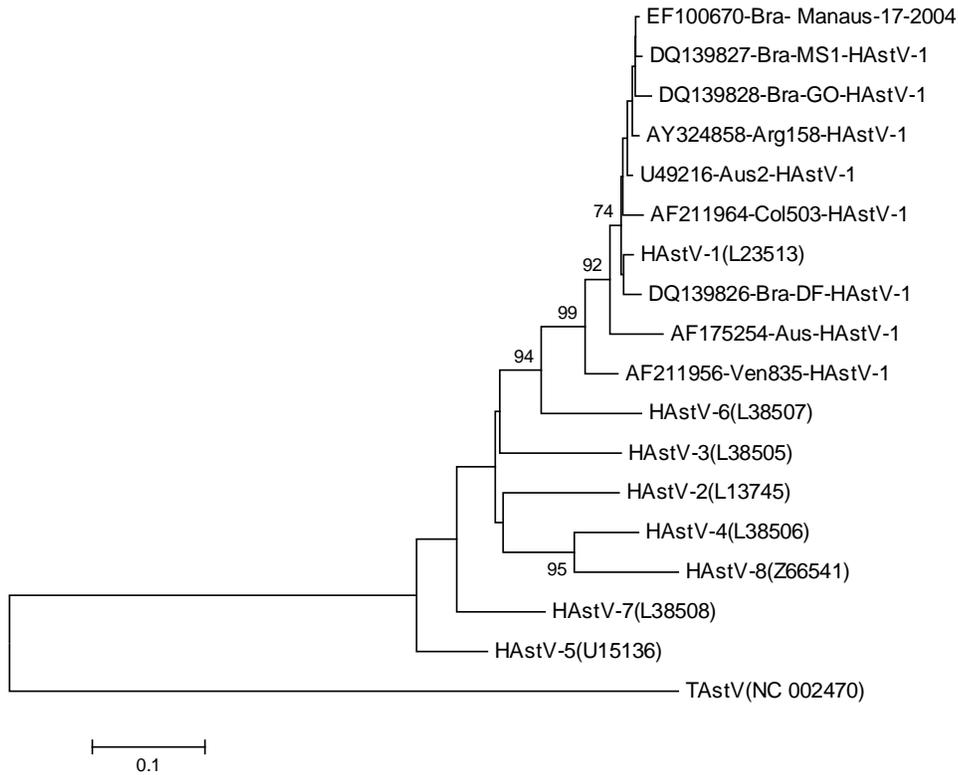
5.3.4 Caracterização Molecular dos Astrovírus Humano

O seqüenciamento parcial do genoma foi realizado em uma amostra para confirmação e caracterização do genotipo circulante no ambiente. A amostra seqüenciada foi obtida na 2ª campanha de coleta na bacia Mindú-São Raimundo, no ponto 4, em Manaus. A sequência de 348 nucleotídeos (nt 4574 - 4921) da ORF-2 que codifica para a proteína do capsídeo do astrovírus humano foi depositada no GenBank com número de acesso EF100670.

A análise filogenética desta amostra juntamente com os protótipos dos oito genotipos de HAstV descritos na literatura e disponíveis no GenBank permitiu caracterizar essa sequência como HAstV tipo 1 apresentando uma identidade nucleotítica de 97,4% com o protótipo (L23513) (Figura 5.14).

Foram realizadas análises filogenéticas utilizando seqüências de amostras provenientes de diferentes localidades apresentando maior identidade nucleotídica (99,1% e 98,2%) com as amostras brasileiras obtidas em Campo Grande, no estado de Mato Grosso do Sul, 2003 (DQ139827) e em Goiânia, Goiás, 2001 (DQ139828), respectivamente.

Figura 5.15: Árvore filogenética obtida a partir da análise de 348 nucleotídeos (nt 4574 - 4921) da região (ORF2) que codifica para a proteína do capsídeo do astrovírus humano (HAstV).



Os protótipos de HAstV estão indicados pelo número do genótipo seguido do número de acesso no GenBank (Exemplo: HAstV-1 L23513). A amostra seqüenciada neste trabalho e as demais amostras estão representadas pelo número de acesso no GenBank (Ex: EF100670). TAstV: astrovírus de peru.

6 DISCUSSÃO

A água é constituinte essencial à vida e recurso precioso da humanidade. Quando negligenciada e contaminada se torna fonte de transmissão de várias enfermidades, principalmente as gastroenterites. O consumo de água fora dos padrões de qualidade, o saneamento precário e as condições fisiológicas devido à má nutrição são fatores responsáveis pela manutenção da taxa de morbidade e pela alta taxa de mortalidade dessa enfermidade (GALDIERO *et al.*, 2005).

Atualmente, o HAstV é reconhecido mundialmente como um dos principais patógenos responsáveis pela etiologia da diarreia viral aguda (GOFTI-LAROCHE *et al.*, 2003; WILHELMI *et al.*, 2003; ESPUL *et al.*, 2004; VICTORIA, 2006).

Devido à importância crescente dos HAstV nos casos de gastroenterite na década de 90, diferentes estudos realizados na Europa, EUA, América do Sul e África têm investigado estes vírus no ambiente e demonstrado sua presença em rios, represas, águas residuais e lodo (PINTO *et al.*, 1996; MARX *et al.*, 1998; CHAPRON *et al.*, 2000; PINTO *et al.*, 2001; TAYLOR *et al.*, 2001; Le CANN *et al.*, 2004; MELEG *et al.*, 2006; GUTIÉRREZ *et al.*, 2007).

No Brasil, diversos trabalhos têm sido desenvolvidos a fim de avaliar a qualidade microbiológica da água, com ênfase na pesquisa de contaminação bacteriana (ALVES *et al.*, 2002; MARQUES, 2003; NOGUEIRA *et al.*, 2003), sendo poucos os estudos que investigam a presença de vírus entéricos humanos em água ambientais (MEHNERT & STEWIEN, 1993, MEHNERT *et al.*, 1997; QUEIROZ *et al.*, 2000; VILLAR *et al.*, 2006). A ausência de métodos de concentração viral de alta eficiência de recuperação e de métodos de detecção de baixo custo e complexidade tem sido apontada como responsável pelo pequeno número de estudos na área de virologia ambiental (TAVARES *et al.*, 2005), havendo uma demanda crescente de estudos que estabeleçam métodos rápidos e sensíveis para detecção de vírus em amostras ambientais.

6.1 Métodos de Concentração e Detecção Viral.

Os primeiros trabalhos de detecção de HAstV em amostras de águas ambientais descrevem a associação de métodos de concentração viral e isolamento de vírus em cultura de célula, seguido ou não de RT-PCR (PINTÓ *et al*, 1996; ABAD *et al*, 1996; MARX *et al*, 1998; CHAPRON *et al*, 2000; TAYLOR *et al*, 2001). Entretanto, os HAstV apresentam lenta propagação em cultivo celular, sendo considerados vírus fastidiosos o que determinou a eleição de métodos moleculares de detecção para a realização deste estudo. A utilização da técnica de PCR para detecção apresenta vantagem em relação ao isolamento viral, principalmente em relação ao tempo de realização do método (ABBASZADEGAN *et al*, 1999, GOFTI-LAROCHE *et al*, 2001; CARDUCCI *et al*, 2003). A principal desvantagem apontada na utilização de técnicas moleculares em estudos ambientais é a sua incapacidade de distinguir vírus potencialmente infecciosos de vírus inativados. Entretanto, a baixa estabilidade do ácido nucléico livre no ambiente sugere que este método detecte partículas virais intactas e não o genoma viral livre da partícula, apesar do mesmo poder ser detectado mesmo quando os vírus estão inativados por desinfecção química, calor ou proteases presentes na água (CARDUCCI *et al*, 2003; MELEG *et al*, 2006).

Várias metodologias baseadas nas características físico-químicas das partículas virais podem ser utilizadas para a concentração viral nas amostras ambientais. Esses métodos utilizam a capacidade dos vírus de serem adsorvidos em matrizes carregadas positiva ou negativamente (membranas, fibras de vidro, de pó ou de algodão) e em uma posterior eluição química. As técnicas de concentração também podem estar baseadas no fato dos vírus apresentarem uma massa molecular relativamente alta, o que possibilita concentrá-los através de métodos de ultracentrifugação ou ultrafiltração (WYN-JONES & SELLWOOD, 2001; FONG & LIPP, 2005; GARCÍA, 2006).

O método de adsorção-eluição utilizando membranas carregadas positivamente tem sido utilizado para a recuperação viral em amostras ambientais (STANDARD METHODS, 1995; MEHNERT *et al*, 1997; QUEIROZ *et al*, 2000;

FONG & LIPP, 2005). Entretanto, a utilização do extrato de carne para eluição do concentrado tem sido apontada como um fator inibidor da PCR e conseqüentemente, protocolos envolvendo adsorção-eluição com soluções inorgânicas tem se apresentado como uma alternativa quando a detecção viral é realizada por métodos moleculares. Em adição, estas membranas são mais eficientes na recuperação viral a partir de água do mar e em águas com alta turbidez do que as carregadas positivamente (LUKASIK *et al*, 2000; KATAYAMA *et al*, 2002; FONG & LIPP, 2005).

O protocolo utilizado nesse estudo, associando método de adsorção-eluição em membranas negativas seguido de ultrafiltração com qPCR, apresentou eficiência variável na recuperação de HAstV em diferentes matrizes aquáticas contaminadas experimentalmente. A recuperação variou de 2,4% a 65% dependendo do tipo de água utilizada para o estudo experimental. KATAYAMA e colaboradores (2002) descreveram uma recuperação viral variando de 50 a 70% para poliovírus em água de mar inoculada artificialmente. ROSE *et al*. (2006) utilizando o método descrito por KATAYAMA *et al*. (2002) obtiveram uma taxa de recuperação de 71% em água marinha para poliovírus, porém para HAV a taxa foi de 12%. Em um outro estudo, FUHRMAN *et al*. (2005) utilizando o mesmo método para enterovírus a taxa de recuperação foi de 51% em água doce e 23% em água do mar. Nesse mesmo trabalho também está demonstrado que concentrações mais baixas de vírus, que refletem melhor a realidade de concentração de vírus em amostras ambientais, apresentam uma taxa de recuperação menor e mais variável, sendo de 17% para água doce e 12% em água marinha. Corroborando com FUHRMAN e colaboradores (2005) também encontramos nesse estudo uma taxa de recuperação maior em águas de rio (65%) do que em águas do mar (11%).

Novos estudos avaliando o papel dos inibidores presentes principalmente em águas residuais devem ser estimulados, uma vez que esta é a primeira descrição da utilização do método descrito por KATAYAMA *et al* (2002) para detecção de HAstV em amostras ambientais. Substâncias químicas orgânicas e inorgânicas como ácido húmicos, tânicos, metais pesados e outros têm sido

descritos como importantes fatores de inibição de detecção viral (IIZERMAN et al., 1997).

6.2 Estudo de Campo - Detecção e Caracterização de Astrovírus em Águas de Igarapés de Manaus e Esgoto

Os percentuais de detecção de HAstV foram similares nos ecossistemas investigados: 17,3% em amostras de água doce e 16,7% na ETE, que se apresentaram dentro do esperado para amostras ambientais. A frequência de HAstV em amostras ambientais tem variado de 6 a 50% (PINTO *et al*, 1996; 2001; MARX *et al*, 1998; CHAPRON *et al*, 2000; TAYLOR *et al*, 2001; GOFTI-LAROCHE *et al*, 2003), enquanto que na população, a prevalência de gastroenterites associadas a HAstV varia entre 2 a 11% em países desenvolvidos e 2 a 26% em países em desenvolvimento (CHIKHIN-BRACHET *et al.*, 2002, CUNLIFE *et al.*, 2002; DALTON *et al.*, 2002; RATCLIFF *et al*, 2002). No Brasil, a prevalência de HAstV em população pediátrica varia de 2 a 14% (STEWIEN *et al.*, 1991; CARDOSO *et al.*, 2002; GABBAY *et al.*, 2005; 2006; SILVA *et al.*, 2006; VICTORIA, 2006).

Entretanto, alguns estudos realizados principalmente em águas residuais demonstram elevados percentuais (43 a 100%) de HAstV no ambiente (CHAPRON *et al*, 2000; NADAN *et al*, 2003; LE CANN *et al*, 2004; MELEG *et al*, 2006), sugerindo que a maioria das infecções causadas por HAstV podem ser assintomáticas e/ou apresentarem uma morbidade digestiva branda levando a uma subestimativa da prevalência real da infecção por esse vírus na população (KURTZ & LEE, 1987; EGGLESTONE *et al.*, 1999; MELEG *et al.*, 2006). MELEG *et al* (2006) sugerem que estudos realizados com amostras ambientais possam substituir os realizados somente com a utilização de amostras clínicas hospitalares, para uma melhor determinação da circulação dos HAstV, visto que, já foi observado uma prevalência maior desses vírus no ambiente do que em amostras clínicas.

6.2.1 Água de Igarapés de Manaus

A investigação de HAstV nos igarapés de Manaus, Amazônia Central, fez parte de um estudo que teve como objetivo determinar a presença dos principais vírus responsáveis pela gastroenterite aguda em águas ambientais e demonstrar a contaminação viral decorrente do rápido e desordenado crescimento da cidade.

Neste contexto, a detecção de outros vírus foi realizada (ANEXO 10.1) e a metodologia de adsorção-eluição em membrana carregada negativamente associada com o método de detecção molecular (PCR convencional) se mostrou eficiente não só para a recuperação de HAstV assim como para uma ampla variedade de vírus em água de rio (ANEXO 10.1, DE PAULA *et al*, *in press*)

Ainda dentro do mesmo projeto, em colaboração com o Instituto Leônidas & Maria Deane, realizou-se uma avaliação da contaminação bacteriana pela pesquisa de Coliformes Totais e Fecais. O resultado microbiológico demonstrou que níveis de Coliformes Totais e Fecais excederam os valores recomendados pela Organização Mundial de Saúde (5000 e 1000 NMP/100 mL), respectivamente, em 67% (35/52) e 73% (38/52) das amostras de água (dados não apresentados). Somente 2 pontos (ponto 1 - Estuário do Tarumã-Açu - e ponto 12 - Reserva Ducke) foram negativos para contaminação fecal nas quatro campanhas de coleta realizadas durante este estudo. Interessantemente, duas amostras de HAstV foram detectadas em um destes pontos (ponto 1), sugerindo que a presença viral não apresenta correlação com os padrões bacterianos, corroborando resultados similares obtidos em outros estudos (BOSCH, 1998; HOT *et al.*, 2003; PUSCH *et al.*, 2005).

Os dados de contaminação microbiológica (viral e bacteriano) se somam a trabalhos que demonstram a atividade antropogênica na região, aonde o desenvolvimento urbano ao longo dos igarapés, conduziu à perda da biodiversidade e a uma diminuição na qualidade da água nestes ecossistemas, principalmente devido à descarga de esgoto sem tratamento, diretamente nos igarapés (MELO *et al.*, 2005; CASEY *et al.*, 2006; COUCEIRO *et al.*, 2007; ANEXO 10.1).

Com relação aos casos de diarreia na cidade de Manaus, verifica-se um grande número de ocorrências em todas as áreas da cidade. Em 2002, foi registrado um total de 52.787 casos, sendo a maioria deles ocorrendo nas zonas Norte e Leste da Cidade (INFORME GEO MANAUS, 2002). Embora não se tenha estudos específicos sobre os HAstV na cidade de Manaus, os vírus encontrados no ambiente refletem a circulação dos mesmos na população local. É fato conhecido que 1/3 dos casos de diarreia mundial são de origem viral e que os HAstV estão entre os principais agentes desta infecção (GLASS et al 2001). Desta forma, os resultados obtidos neste estudo contribuem com informações pioneiras sobre a circulação de HAstV na cidade Manaus.

6.2.2 Estação de Tratamento de Esgoto (ETE)

Dados referentes à investigação de HAstV na ETE demonstraram 50% de detecção viral tanto no efluente quanto no afluente. Este dado sugere que os HAstV resistem ao tratamento de esgoto realizado na ETE, se mantendo no ambiente após o despejo no corpo d'água e não apresentando relação com a alta eficiência na remoção dos Coliformes Totais e Fecais.

A presença de HAstV na ETE corrobora estudos que detectam a presença de HAstV no efluente e no afluente (NADAN *et al*, 2003; LE CANN *et al*, 2004; MELEG *et al*, 2006). No mesmo projeto de estudo da ETE o índice de remoção de HAV (42,3%) foi menor que o de Coliforme Total e Fecal (ANEXO 10.2). LE CANN *et al* (2004) demonstraram a presença de HAstV com média de quantificação de 4×10^6 no efluente e de 1×10^4 no afluente, apresentando uma redução de 99%, sendo uma taxa de redução similar a de coliformes da ETE estudada neste trabalho. Outros estudos demonstram a presença de outros vírus, como enterovírus, NoV, HAV, RV-A e HAdV 40 e 41 no esgoto, com a presença viral podendo ser detectada no efluente e afluente das ETEs (MEHNERT *et al* 1993; TSAI *et al*, 1993; LAVERICK *et al*, 2004; FORMIGA-CRUZ *et al*, 2005, ANEXO 10.2)

Índices elevados de HAstV em ETEs, como demonstrados em alguns estudos, de 43 a 100% no efluente e 82,3% no afluente (NADAN *et al*, 2003; LE CANN *et al*, 2004; MELEG *et al*, 2006), são explicados pela alta soroprevalência, em torno de 80-90%, na população total e também pelo fato de a maioria das infecções por HAstV serem assintomáticas. Além disso, esse vírus tem um alto percentual de excreção e grande estabilidade no ambiente. Neste estudo, a prevalência de 16,7% pode ser explicada pelo fato da baixa carga orgânica que alimenta a ETE em estudo e também pelo fato de sua população ser restrita, podendo não ser uma boa representação da população geral, visto que, a maioria das infecções sintomáticas são encontradas principalmente em crianças abaixo de cinco anos, imunocomprometidos e idosos e também pela baixa taxa de recuperação do método nessa matriz aquática. A realização de estudos em ETEs que atendam a uma maior rede de esgoto representando melhor a população como um todo, seriam importantes para a verificação da frequência e circulação de HAstV no ambiente e na comunidade.

6.2.3 Considerações finais

Em ambos os estudos de campo (água de rio e esgoto), ficou evidente que o protocolo de qPCR não foi capaz de detectar um maior número de amostras quando comparado com o PCR qualitativo. Embora descrito como mais sensível e recomendado para utilização em amostra ambiental, aonde é baixa a concentração viral (DONALDSON *et al*, 2002; LAVERICK *et al*, 2004; LE CANN *et al*, 2004;) o qPCR utilizado (LE CANN *et al*, 2004) não apresentou resultados satisfatórios. A diferença da região alvo dos iniciadores específicos para as metodologias utilizadas (PCR e qPCR) poderiam explicar esta discordância de resultados, entretanto, estudos anteriores descrevem a sensibilidade dos iniciadores utilizados (MITCHELL *et al*, 1995; NOEL *et al*, 1995; MARX *et al*, 1998; TAYLOR *et al*, 2001; ZHANG *et al*, 2006). Por outro lado, alguns estudos também descrevem uma sensibilidade mais baixa da técnica de qPCR em comparação ao PCR tradicional (GRIMM *et al*, 2004; NOBLE *et al*, 2003).

Outros protocolos de qPCR para detecção de HAstV foram desenvolvidos (ROYUELA *et al*, 2006; ZHANG *et al*, 2006) porém utilizando amostras clínicas e o fluoróforo SYBR[®] Green.

A implantação do método de qPCR descrito por LE CANN *et al* (2004) para amostras ambientais que utiliza os fluoróforos do sistema TaqMan[®] (composto de uma sonda específica), foi efetuada com o estabelecimento da curva padrão para a realização dessa técnica. Os padrões desenvolvidos e utilizados nessa curva apresentaram parâmetros de sensibilidade muito próximos (18 cópias/reação) aos determinados por LE CANN *et al* (2004) (26 cópias/reação). ZHANG *et al* (2006) utilizando estes mesmos iniciadores no sistema SYBR[®] Green atingiu uma sensibilidade de 5 cópias/reação. Embora de custo menor e com um aumento na sensibilidade do teste, a ocorrência de reações inespecíficas tem sido apontada como um dos problemas do SYBR[®] Green (NOVAIS & PIRES-ALVES, 2004).

Os protocolos de TaqMan[®] utilizando sondas específicas aumentam a especificidade do teste, porém neste estudo pode ter sido responsável pela baixa detecção de HAstV. A variabilidade dos HAstV pode dificultar que uma única sonda específica detecte todos os genótipos do vírus (ZHANG *et al*, 2006). Além disso, muitos estudos indicam a prevalência dos genótipos de HAstV pode variar com a localização geográfica e época do ano (SAKAMOTO *et al*, 2000; GUIX *et al*, 2002). Nossos dados sugerem que a sonda desenvolvida por LE CANN *et al* (2004) pode ter apresentado uma alta especificidade na detecção dos HAstV explicando a baixa detecção nas amostras.

O estabelecimento de uma técnica eficiente de qPCR é necessário, seja com um novo conjunto de iniciadores, uma nova sonda ou a utilização de protocolos com SYBR[®] Green deve ser considerada uma vez que esta metodologia é uma ferramenta de grande importância para a detecção de vírus no ambiente. Além de sensível, é capaz de gerar resultados quantitativos, possui maior rapidez na análise das amostras, apresentando, potencialmente, um menor risco de contaminação, evitando análises posteriores a amplificação.

Outro desafio no estabelecimento de metodologias no campo da virologia ambiental é a caracterização molecular das amostras obtidas. Neste estudo, a

perda de DNA durante o procedimento de purificação, possivelmente devido a baixa titulação viral encontrada nas amostras ambientais, não permitiu o sequenciamento de grande parte das amostras detectadas. Somente uma amostra proveniente da 2ª campanha de coleta de Manaus foi seqüenciada e caracterizada como HAstV-1. Esse genotipo é associado a vários surtos no Brasil e no mundo sendo reconhecido como o genotipo predominante (NOEL *et al.*, 1995; LISTE *et al.*, 2000; MÉNDEZ-TOSS *et al.*, 2000; SAKAMOTO *et al.*, 2000; SILVA *et al.*, 2001; CARDOSO *et al.*, 2002; DALTON *et al.*, 2002; GABBAY *et al.*, 2005; SILVA *et al.*, 2006; VICTORIA, 2006). Em adição, as amostras positivas pelo qPCR não apresentaram resultado positivo pelo RT-PCR não possibilitando a caracterização molecular das mesmas.

A implantação de técnicas de concentração, detecção, caracterização e quantificação viral em amostras ambientais vêm ganhando importância nas pesquisas em saúde pública e qualidade da água. Essas ferramentas têm se tornado cada vez mais necessárias para um controle mais eficiente da qualidade das águas, podendo fornecer subsídios para atender futuras normas de controle microbiológico que exijam a pesquisa de vírus entéricos. Esses métodos permitem a determinação do envolvimento real das águas contaminadas na transmissão de doenças, entre elas, hepatites, conjuntivites e gastroenterites. O estabelecimento e implantação dessas técnicas em amostras ambientais possibilitam o esclarecimento da epidemiologia das infecções, monitoramento do nível dos vírus nas amostras ambientais, a verificação da eficiência na remoção de partículas virais em diferentes tratamentos usados em ETE e para desinfecção de água potável.

7 CONCLUSÕES

- ✓ A associação dos métodos utilizados de concentração e detecção evidenciaram a presença de HAstV em água ambientais.
- ✓ Em estudo experimental, a associação dos métodos de concentração utilizando membranas carregadas negativamente e detecção por qPCR demonstrou eficiência variável (2,4 a 65,4%) de acordo com as matrizes aquáticas testadas, sendo mais eficiente em água de rio.
- ✓ Em estudo de campo nos igarapés de Manaus, os HAstV foram detectados em 17,3% (9/52) das amostras, não apresentando diferença significativa da presença viral entre as áreas urbana e rural dos igarapés. A amostra de HAstV circulante em Manaus foi caracterizada como HAstV-1.
- ✓ No estudo de campo realizado na Estação de Tratamento de Esgoto foram identificados 16,7% (8/48) de HAstV nas amostras, apresentando positividade de 50% no efluente e no afluente da ETE, demonstrando a resistência do vírus ao tratamento.
- ✓ O protocolo de PCR qualitativo (15%) apresentou maior positividade que o qPCR (2%) sendo recomendado para estudos utilizando amostras ambientais.
- ✓ A baixa detecção de HAstV pelo qPCR sugere alta especificidade da sonda utilizada no método, que deve ser otimizado para detecção de um maior número de amostras.

8 PERSPECTIVAS

O método implementado neste estudo se apresenta como uma ferramenta indispensável para o esclarecimento de surtos de HAstV de veiculação hídrica, assim como abre novas perspectivas para a realização de diversos estudos no campo da virologia ambiental: determinação da qualidade das águas, eficiência na remoção de partículas virais em diferentes métodos de tratamento e desinfecção de água potável.

Entretanto, os resultados obtidos apontam também a necessidade de se aperfeiçoar as metodologias de concentração e detecção de HAstV utilizando qPCR, principalmente para detecção destes vírus em águas residuais e de consumo. Serão implementadas algumas modificações tais como: variações na concentração de Mg_2Cl , assim como aprimoramento da técnica de qPCR com a utilização de uma nova sonda ou o fluoróforo SYBR[®] Green.

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABAD, F. X. *et al.* Astrovirus survival in drinking water. **Appl Environ Microbiol** v.63, n. 8, p. 3119-3122, ago. 1996.

_____. Potential role of fomites in the vehicular transmission of human astroviruses. **Appl Environ Microbiol** v.67, p. 3904-3907, set. 2001.

ABBASZADEGAN, M. *et al.* Detection of enteroviruses in groundwater with the PCR. **Appl Environ Microbiol** v.59, p. 1318-1324, mai. 1999.

_____. Advanced detection of viruses and protozoan parasites in water. **Reviews Biol. Biotechnol** n.2, p.21-26, 2001.

ALVES, N. C.; ODORIZZI, A. C.; GOULART, F. Análise microbiológica de águas minerais e de água potável de abastecimento, Marília, SP. **Rev Saúde Pública** v.36, n.6, p.749-751. dez. 2002.

APPLETON, H.; HIGGINS, P. G. Viruses and gastroenteritis in infants (letter). **Lancet**, v.1, n. 7919, p.1297, jun. 1975.

BLACK, R. E. Persistent diarrhoea in children of developing countries. **Pediatr Infect Dis J**, n.12, p.751-761, 1993.

BOSCH, A. Human enteric viruses in the water environment: a minireview. **Int Microbiol**, v.1, n.3, p.191-6, set. 1998.

BRASIL . Lei 9984, de 17 de julho de 2000. Dispõe sobre a criação da Agência Nacional de Águas - ANA, entidade federal de implementação da Política Nacional de Recursos Hídricos e de coordenação do Sistema Nacional de Gerenciamento de Recursos Hídricos, e dá outras providências. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, v: 138, nº 137, Seção 1, p: 1, publicado em 18 de julho de 2000.

BRASIL. Lei nº 9433, 8 de janeiro de 1997. Institui a Política Nacional de Recursos Hídricos, cria o Sistema Nacional de Gerenciamento de Recursos Hídricos, regulamenta o inciso XIX do art. 21 da Constituição Federal, e altera o art. 1º da Lei 8.001 de 13 de março de 1990, que modificou a Lei 7.990 de 28.12.1989. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, V: 135, nº 6, Seção 1, p: 470, publicado em 9 de janeiro de 1997.

BRASIL. Lei 8080, de 19 de setembro de 1990. Dispõe sobre as condições para a promoção, proteção e recuperação da saúde, a organização e o funcionamento dos serviços correspondentes e dá outras providências. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, publicado em 20 de setembro de 1990.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria 518, de 25 de março de 2004. Estabelece os procedimentos e responsabilidades relativos ao controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade, e dá outras providências. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, nº 59, Seção 1, p. 266-270, publicado em 26 de março de 2004.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA). Resolução nº 357, de 17 de março de 2005. Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamentos de efluentes, e dá outras providências.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA). Resolução nº 274, de 29 de novembro de 2000. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, publicado em 8 de janeiro de 2001.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Informe Técnico Doença Diarréica por Rotavírus: Vigilância Epidemiológica e Prevenção pela Vacina Oral de Rotavírus Humano**. 2006. Disponível em: <http://www.portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/informe_rotavirus_02_03_2006.pdf. > Data de acesso: 14 dezembro 2006.

BRYCE, J.; *et al.* WHO estimates of the causes of death in children. **Lancet**, v..365, n. 9465, p.1147-1152, mar-abr. 2005.

CARDOSO, D. D. *et al.* Detection and genotyping of astrovirus from children with acute gastroenteritis from Goiânia, Goiás, Brazil. **Medical Science Monitor**, v.8, n. 9, p.624-628, set. 2002.

CARDUCCI, A. *et al.* Virological control of groundwater quality using biomolecular tests. **Water Sci Technol**, v.47, n.3, p.261-266, 2003.

CARRIQUE-MAS, J. *et al.* A Norwalk-like virus waterborne community outbreak in a Swedish village during peak holiday season. **Epidemiol Infect**, v. 131, n.1, p.737-744, ago. 2003.

CARTER, M. J. Enterically infecting viruses: pathogenicity, transmission and significance for food and waterborne infection. **J Appl Microbiol**, v.98, n.6, p.1354-1380, 2005.

CASEY, J. F.; KAHN, J. R.; RIVAS, A. Willingness to pay for improved water service in Manaus, Amazonas, Brazil. **Ecol Econ**, v. 58, n. 2, p. 365-372, jun. 2006.

CETESB. COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL. Setor de Transferência de Conhecimento Ambiental. **Coleta e preservação de amostras de água**. São Paulo, 2006.

- CHAPRON, C. D. *et al.* Detection of astroviruses, enteroviruses, and adenovirus types 40 and 41 in surface waters collected and evaluated by the information collection rule and an integrated cell culture-nested PCR procedure. **Appl Environ Microbiol** v. 66, n. 6, p. 2520-2525, jun. 2000.
- CHIKHIN-BRACHET, R. *et al.* Virus diversity in a winter epidemic of acute diarrhea in France. **J Clin Microbiol** v. 40, n.11, p. 4266-4272, nov. 2002.
- CHO, H. B. *et al.* Detection of adenoviruses and enteroviruses in tap water and river water by reverse transcription multiplex PCR. **Can J Microbiol** v. 46, n.5, p. 417-424, mai. 2000.
- COSTA, E. A.; Rozenfeld, S. Constituição da Vigilância Sanitária no Brasil in: Rozenfeld, S. **Fundamentos da Vigilância Sanitária**. 20^a ed, Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 2000, p. 15-40.
- COUCEIRO, S. R. M. *et al.* Deforestation and sewage effects on aquatic macroinvertebrates in urban streams in Manaus, Amazonas, Brazil. **Hydrobiol** n. 575, p. 271-284, 2007.
- CUBITT, W. D. *et al.* Application of electronmicroscopy, enzyme immunoassay, and RT-PCR to monitor an outbreak of astrovirus type 1 in a paediatric bone marrow transplant unit. **J Méd Virol** v. 57, n.3, p. 313-321, mar. 1999.
- CUNLIFFE, N. A. *et al.* Detection and characterisation of human astroviruses in children with acute gastroenteritis in Blantyre, Malawi. **J Med Virol** v.67, n.4, p. 563-566, ago. 2002.
- DALTON, R. M. *et al.* Astrovirus acute gastroenteritis among children in Madrid, Spain. **Pediatr Infect Dis J** v. 21, n.11, p. 1038-1041, nov. 2002.
- DISKIN, A. **Gastroenteritis**. Nebraska, EUA, 2004. Disponível em: <<http://www.emedicine.com/emerg/topic213.htm>>. Data de acesso: 9 agosto 2004.

DE PAULA, V. S. *et al.* Hepatitis A virus in environmental water samples from the Amazon Basin. **Water Res**, *in press*.

DONALDSON, K. A.; GRIFFIN, D. W. ; PAUL, J. Detection, quantitation and identification of enteroviruses from surface waters and sponge tissue from the Florida Keys using real-time RT-PCR. **Water Res**, v.36, n.10, p. 2505-2514, mai. 2002.

EGGLESTONE, S. I. *et al.* Absence of human astrovirus RNA in sewage and environmental samples. **J Appl Microbiol**, v. 86, n. 4, p.709-714, abr. 1999.

ESPUL, C. *et al.* Prevalence and characterization of astroviruses in Argentinean children with acute gastroenteritis. **J Med Virol**,v.72, n.1, p. 75-82, jan. 2004.

FONG, T. T.; LIPP, E. K. Enteric viruses of human and animals in aquatic environments : health risk, detection and potencial water quality assessment tools. **Microbiol Mol Biol Rev**, v. 69, n.2, p.357-371, jun. 2005.

FORMIGA-CRUZ, M. *et al.* 2005. Nested multiplex PCR assay for detection of human enteric viruses in shellfish and sewage. **J Virol Methods**, v.125, n.2, p. 111-1118, mai. 2005.

FOUT, G. S. *et al.* A multiplex reverse transcription-PCR method for detection of human enteric viruses in groundwater. **Appl Environ Microbiol**, v. 69, n. 6, p. 3158-3164, jun. 2003.

FUHRMAN, J. A. ; LIANG, X. ; NOBLE, R. T. Rapid detection of enteroviruses in small volumes of natural waters by real-time quantitative reverse transcriptase PCR. **Appl Environ Microbiol**, v. 71, n. 8, p. 4523-4530, ago. 2005.

GABBAY, Y. B. *et al.* Prevalence and genetic diversity of astroviruses in children with and without diarrhea in Sao Luis, Maranhao, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz.** v.100, n.7, p.709-714, nov. 2005.

GABBAY, Y. *et al.* Characterization of an astrovirus genotype 2 strain causing an extensive outbreak of gastroenteritis among Maxakali Indians, Southeast Brazil. **J Clin Virol,** v.37, n. 4, p.287-292, dez. 2006.

GARCÍA, M. E. Virus en aguas de consumo. **Hig Sanid Ambient,** n.6, p.173-189, jul. 2006.

GALDIERO, E. *et al.* Reverse transcriptase-PCR for the detection of Astrovirus in Children with nosocomial acute diarrhoea in Nápoles, Italy. **Med Mal Infect,** v. 35, n.4, p.213-217, abr. 2005.

GERBA, C. P.; GRAMOS, D. M.; NWACHUKU, N. Comparative inactivation of enteroviruses and adenovirus 2 by UV light. **Appl Env Microbiol,** v.68, n.10, p. 5167–5169. out. 2002.

GLASS, R. I. *et al.* Gastroenteritis viruses: an overview. **Novartis Found Symp,** n.238, p. 5-25, 2001.

GOFTI-LAROCHE, L. *et al.* A new analytical tool to assess health associated with the virological quality of drinking water (EMIRA study). **Water Sci Technol,** v. 43, n. 12, p.39-48, 2001.

_____ *et al.* Are waterborne astrovirus implicated in acute digestive morbidity (EMIRA study)? **J Clin Virol,** v. 27, n.1, p. 74-82, mai. 2003.

GRIMM, A. C. *et al.* Development of an astrovirus RT-PCR detection assay for use with conventional, real-time, and integrated cell culture/RT-PCR. **Can J Microbiol,** v. 50, n.4, p. 269-78, abr. 2004.

GRIFFIN, D. W. *et al.* Detection of viral pathogens by reverse transcriptase PCR and of microbial indicators by standard methods in the canals of the Florida Keys. **Appl Environ Microbiol**, v.65, n.9, p. 4118–4125, sep. 1999.

GUIX, S. *ET AL.* Molecular epidemiology of astrovirus infection in Barcelona, Spain. **J Clin Microbiol**, v. 40, n. 1, p. 133-139, jan. 2002.

_____ *et al.* Human astrovirus C-terminal nsP1a protein is involved in RNA replication. **Virology**, v.333, n. 1, p. 124-131, mar. 2005.

GUTIERREZ, M. F. *et al.* Presence of viral proteins in drinkable water – Sufficient condition to consider water a vector of viral transmission? **Wat Res**, v. 41, n.2, p. 373-378, jan. 2007.

HERRMANN, J. E. *et al.* Astroviruses as a cause of gastroenteritis in children. **N Eng J Med**, v. 324, n.25, p.1757-1760, jun. 1991.

HOT, D. *et al.* Detection of somatic phages, infectious enteroviruses and enterovirus genomes as indicators of human enteric viral pollution in surface water. **Water Res**, v. 37, n. 19: 4703-10, nov. 2003.

IBGE. INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Cidades**. 2006. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/cidadesat/default.php>> Data de acesso: 01 de março de 2007.

IIZERMAN, M.M.; DAHILILNG, D. R.; FOUT, G. S. A method to remove environmental inhibitors prior to the detection of waterborne enteric viruses by reverse transcription-polymerase chain reaction. **J Virol Methods**, v. 63, n. 1-2, p. 145-153. jan. 1997.

INFORME GEO MANAUS 2002. Projeto Geo Cidades: relatório ambiental urbano integrado. Rio de Janeiro: Concórdio Parceria 21, 2002.

INTERNACIONAL COMMITTEE ON TAXONOMY OF VIRUSES. **Virus taxonomy on line**. 2003. Disponível em:

<http://www.virustaxonomyonline.com/virtax/lpext.dll/vtax/agp-0013/psr10/psr10-sec1-0002?f=templates&fn=document-frame.htm&q=astrovirus&x=Simple&2.0>

Data de acesso: 01/03/2007.

JIANG, B. *et al.* RNA sequence of astrovirus: distinctive genomic organization and a putative retrovirus-like ribosomal frameshifting signal that directs the viral replicase synthesis. **Proc Natl Acad Sci U S A** v. 90 n. 22, p. 10539-10543, nov. 1993.

JONASSEN, C. M. *et al.* Complete genomic sequences of astroviruses from sheep and turkey: comparison with related viruses. **Virus Res**, v. 91, n. 2, p.195-201, fev. 2003.

KARAGANIS, J. V. *et al.* Research priorities for monitoring viruses in the environment. in: **Environmental Monitoring and Support Laboratory, U.S.** Environmental Protection Agency, Office of Research and Development. 1983.

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. **Appl Environ Microbiol**, v. 68, n.3, p.1033-1039, mar. 2002.

KOSEK, M.; BERN, C.; GUERRANT, R. L. The global burden of diarrhoeal disease, as estimated from studies published between 1992 and 2000. **Bull. World Health Org**, v. 81, n. 3, p.197-201. mai. 2003.

KONNO, T. *et al.* Astrovirus-associated epidemic gastroenteritis in Japan. **J Med Virol**, v.9, n.1, p. 11-17, 1982.

KUMAR, S. *et al.* MEGA2: molecular evolutionary genetics analysis software. **Bioinformatics**, v. 17, n.12, p. 1244-1245, dez. 2001

KURTZ, J. B. *et al.* Astrovirus infection in volunteers. **J Med Virol**, v. 3, n. 3, p. 221-30, 1979.

_____ ; LEE, T. W. Astroviruses: human and animal. **Ciba Found Symp**, n. 128, p. 92-107, 1987.

LAVERICK, M. A.; WYN-JONES, A. P.; CARTER, M. J. Quantitative RT-PCR for the enumeration of noroviruses (Norwalk-like viruses) in water and sewage. **Appl Microbiol**, v. 39, n. 2, p. 127-136, ago. 2004.

LE CANN, P. *et al.* Quantification of human astroviruses in sewage using real-time RT-PCR. **Res Microbiol**, v. 155, n. 1, p. 11-15, jan-fev. 2004.

LECLERC, H.; SCHWARTZBROD, L.; DEI-CAS, E. Microbial agents associated with waterborne diseases. **Crit Rev Microbiol**, v. 28, n.4, p. 371-409, 2002.

LEITE, J. P.; BARTH, O. M.; SCHATZMAYR, H. G. Astrovirus in faeces of children with acute gastroenteritis in Rio de Janeiro, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 86, n. 4, p. 489-490, out-dez. 1991.

LISTE, M. B. *et al.* Enteric virus infections and diarrhea in healthy and human immunodeficiency virus-infected children. **J Clin Microbiol**, v. 38, n. 8, p. 2873-2777, ago. 2000.

LUKASHOV, V. V.; GOUDSMIT, J. Evolutionary relationships among Astroviridae. **J Gen Virol**, v. 83, pt. 6, p. 1397-1405, jun. 2002.

LUKASIK, J. *et al.* Influence of salts on virus adsorption to microporous filters. **Appl Environ Microbiol**, v. 66, n. 7, p. 2914-2920, jul. 2000.

MADELEY C R, COSGROVE B P 28nm particles in faeces in infantile gastroenteritis.(Letter) **Lancet**, v. 2, p. 451-452, sep. 1975

MARQUES, R. G. **Ocorrência de coliformes e Salmonella em águas de irrigação de hortaliças nos municípios de Goiânia e Aparecida de Goiânia, Goiás.** Goiás: UFG. 2003. Dissertação (Mestrado em Medicina Tropical) - Universidade Federal de Goiás, Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, Goiânia.

MARX, F. E.; TAYLOR, M. B.; GRABOW, W. Q. O. K. The application of a reverse transcriptase-polymerase chain reaction-oligonucleotide probe assay for the detection of human astroviruses in environmental water. **Wat Res**, v. 32, n. 7, p. 2147-2153, 1998.

MATSUI, S. M.; GREENBERG, H. B. Astroviruses in: Fields B. N., Knipe D. M., Howley P. M., Chanock R. M., Melnick J. L., Monath T. P., Roizman B., Straus S. E. (eds.). **Virology**. 4ª ed, Philadelphia, Editora: Lippincott-Raven Publishers, 2001, vol 1, p. 875-893.

MEHNERT, D. U.; STEWIEN K, E. Detection and distribution of rotavírus in raw sewage and creeks in São Paulo, Brazil. **Appl Environ Microbiol**, v. 59, n.1, p. 140-143, jan. 1993.

_____ *et al.* Detection of rotavirus in sewage and creek water: efficiency of the concentration method. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 92, n.1, p. 97-100, jan-fev. 1997.

MELEG, E. *et al.* Human astroviruses in raw sewage samples in Hungary. **J Appl Microbiol**, v.101, n. 5, p.1123-1129, nov. 2006.

MELNICK, J. L. Poliomyelitis virus in urban sewage in epidemic and non-epidemic times. **Am J Hyg**, v. 45, p. 240-253, 1947.

MELO, E. G. F.; SILVA, M. S. R.; MIRANDA, S. A. F. Influência antrópica sobre as águas na cidade de Manaus – Amazonas. **Caminhos de geografia**, v.5, n. 16, p. 40-45, 2005. Disponível em :www.ig.ufu.br/revista/caminhos.html. Data de acesso: 12 janeiro 2006.

MENDEZ-TOSS, M. *et al.* **Molecular analysis of a serotype 8 human astrovirus genome. J Gen Virol**, v. 81, p. 2891-2897, dez. 2000.

_____ *et al.* Protein products of the open reading frames encoding nonstructural proteins of human astrovirus serotype 8. **J Virol**, v.77, n.21, p. 11378-11384. nov. 2003.

METCALF, T. G.; MELNICK, J. L.; ESTES, M. K. Environmental virology: from detection of virus in sewage and water by isolation to identification by molecular biology--a trip of over 50 years. **Annu Rev Microbiol**, v.49, p. 461-487, 1995.

MIRANDA, V. Q. S. **Detecção molecular de astrovírus em casos de gastroenterite aguda**. Rio de Janeiro: UFRJ, 2002. Monografia (Bacharelado em Microbiologia e Imunologia) - Universidade Federal do Rio de Janeiro - RJ.

MITCHELL, D. K. *et al.* Virologic features of an astrovirus diarrhea outbreak in a day care center revealed by reverse transcriptase-polymerase chain reaction. **J Infect Dis**, v. 172, n. 6, p.1437-44, dez. 1995.

_____. Astrovirus gastroenteritis. **Pediatr Infect Dis J**, v. 21, n.11, p. 1067-1069, nov. 2002.

MONROE, S. S. *et al.* Subgenomic RNA sequence of human astrovirus supports classification of Astroviridae as a new family of RNA viruses. **J Virol** v. 67, n. 6, p. 3611-3614, jun.1993.

NADAN, S. *et al.* Molecular characterization of astroviruses by reverse transcriptase PCR and sequence analysis: comparison of clinical and environmental isolates from South Africa. **Appl Environ Microbiol**, v. 69, n. 2, p. 747-753, fev.2003.

NOBLE, R. T. ; FUHRMAN, J. A. Enteroviruses detected by reverse transcriptase polymerase chain reaction from the coastal waters of Santa Monica Bay, California: low correlation to bacterial indicator levels. **Hydrobiologia** v. 460, p.175–184. set. 2001.

_____ *et al.* Use of viral pathogens and indicators to differentiate between human and non-human fecal contamination in a microbial course tracking comparison study. **J Wat Health**, v.1, n.4, p.195-207, dez. 2003.

NOEL, J. *et al.* Typing of human astroviruses from clinical isolates by enzyme immunoassay and nucleotide sequencing. **J Clin Microbiol**, v. 33, n. 4, p. 797-801, abr. 1995.

NOGUEIRA, G. *et al.* Microbiological quality of drinking water of urban communities, Brazil. **Rev. Saúde Pública**, v.37, n.2, p. 232-236. abr. 2003.

NOVAIS, C. M.; PIRES-ALVES, M. PCR em tempo real. **Rev Biotec Cien Desenv**, 33 ed., p.10-13. jul-dez. 2004.

OH, D.; SCHREIER, E. Molecular characterization of human astroviruses in Germany. **Arch Virol**, v.146, n.3, p. 443-455, 2001.

PARASHAR, U. D. *et al.* Kilgore P E, Holman R C, Clarke M J, Breses M D. Glass R I Diarrheal mortality in US infants, **Arch Pediatr & Adolesc Med**, v. 152, n. 1, p. 47-51, jan. 1998.

PINA, S. *et al.* Viral pollution in the environment and in shellfish: human adenovirus detection by PCR as an index of human viruses. **Appl Environ Microbiol**, v.64 n. 9, p. 3376-3382, set. 1998.

PINTO, R. M. *et al.* Detection of infectious astroviruses in water. **Appl Environ Microbiol**, v.62, n. 5, p.1811–1813, mai. 1996.

_____; VILLENA, C. ; LE GUYADER, F. Astrovirus detection in wastewater samples. **Water Sci Technol** v. 43, n. 12, p. 73-76, 2001.

PUSCH, D. *et al.* Detection of enteric viruses and bacterial indicators in German environmental waters. **Arch Virol**, v.150, n.5, p. 929-947, mai. 2005.

QUEIROZ, A. P. *et al.* Factors that can interfere with virus concentration from wastewater when using Zeta Plus 60S filter membranes. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 95, n. 5, p.713-716, sep-out. 2000.

RATCLIFF, R. M.; DOHERTY, J. C.; HIGGINS, G. D. Sensitive detection of RNA viruses associated with gastroenteritis by a hanging-drop single-tube nested reverse transcription-PCR method. **J Clin Microbiol**, v. 40,n. 11, p. 4091-4099, nov. 2002.

ROSE, M. A. *et al.* Quantitation of hepatitis A virus and enterovirus levels in the lagoon canals and Lido beach of Venice, Italy, using real-time RT-PCR. **Wat Res**, v.40, n.12, p. 2387-2396. jul. 2006.

ROYUELA, E.; NEGREDO, A.; SANCHEZ-FAUQUIER, A. Development of a one step real-time RT-PCR method for sensitive detection of human astrovirus. **J Virol Methods**, v.133, n.1, p. 14-19, abr. 2006.

RZUZUTKA, A.; COOK, N. Survival of human enteric viruses in the environment and food. **FEMS Microbiology Reviews** v.28, n.4, p. 441– 453. out. 2004

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATS, D. **Molecular Cloning: laboratory manual**. 3^aed. Nova York: Cold Spring Harbor laboratory Press, Cold Spring Harbor, 2001.

SAKAMOTO, T. *et al.* Molecular epidemiology of astroviruses in Japan from 1995 to 1998 by reverse transcription-polymerase chain reaction with serotype-specific primers (1 to 8). **J Med Virol**, v.61, n.3, p. 326-331, jul. 2000.

SCHNAGL, R. D. *et al.* Incidence of human astrovirus in central Australia (1995 to 1998) and comparison of deduced serotypes detected from 1981 to 1998. **J Clin Microbiol**, v. 40, n.11, p. 4114-4120, nov. 2002.

SHARMA, S.; SACHDEVA, P.; VIRDI, J. S. Emerging water-borne pathogens. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 61, n.5-6, p.424-8, jun. 2003.

SHUVAL, H. I. Detection and control of enteroviruses in the water environment. in: Shuval, H.I. **Developments in Water Quality Research**. Ann Arbor: Ann Arbor-Humphrey, 1971. p. 47.

SILVA, A. M. *et al.* An outbreak of gastroenteritis associated with astrovirus serotype 1 in a day care center, in Rio de Janeiro, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v.96, n. 8, p. 1069-1073, nov. 2001

SILVA, P. A.; CARDOSO, D. D.; SCHREIER, E. Molecular characterization of human astroviruses isolated in Brazil, including the complete sequences of astrovirus genotypes 4 and 5. **Arch Virol**, v.151, n. 7, p. 1405–1417, jul. 2006.

SINCERO, T. C. *et al.* Detection of hepatitis A vírus (HAV) in oysters (*Crassostrea gigas*). **Was Res**, v.40, n.5, p. 895-902, mar. 2006.

STANDARD METHODS for the Examination of Water and Wastewater, 19 ed. Washington, DC: **American Public Health Association**, 1995.

- STRAUB, T. M.; CHANDLER, D. P. Towards a unified system for detecting waterborne pathogens. **J Microbiol Methods**, v. 53, n.2, p. 185-97, mai. 2003.
- STEWIEN, K. E. *et al.* Occurrence of human astrovirus in Sao Paulo City, Brazil. **Rev Saúde Pública**, v. 25, n. 2, p. 157-158, abr. 1991.
- TAYLOR, M. B. *et al.* The occurrence of hepatitis A and Astroviruses in selected river and dam waters in South Africa. **Wat. Res**, v. 35, n.11, p. 2653-2660, ago. 2001.
- TAVARES, T. M.; CARDOSO, D. D. P.; BRITO, W. M. E. D. Vírus entéricos veiculados por água: aspectos microbiológicos e de controle de qualidade da água. **Rev Patologia Tropical**, v. 34, n.2, p.85-105, 2005.
- THORNTON, A. C.; JENNINGS-CONKLIN, K. S.; MCCORMICK, M. I. Noroviruses: agents in outbreaks of acute gastroenteritis. **Disaster Manag Response**, v.2, n.1, p. 4-9. jan-fev. 2004.
- TSAI, Y. L. *et al.* Simple method of concentrating enteroviruses ad hepatitis A virus from sewage and ocean water for rapid detection by reverse transcriptase-polymerase chain reaction. **Appl Environ Microbiol**, v. 59, n. 10, p. 3488-3491, out. 1993.
- UNITED NATIONS. UN Web Services Section, Department of Public Information, United Nations ©. **Water for Life 2005-2015**. 2006. Disponível em: <<http://www.un.org/waterforlifedecade/factsheet.htm>>. Data de acesso: 18 janeiro 2007.
- VAN HEERDEN, J. *et al.* Incidence of adenoviruses in raw and treated water. **Water Res**, v. 37, n. 15, p. 3704-3708, set. 2003.

VICTORIA, M. M. **Detecção e caracterização molecular de astrovirus e norovirus em casos de gastroenterite aguda em crianças hospitalizadas no município do Rio de Janeiro.** Rio de Janeiro: Fiocruz, 2006. Dissertação (Mestrado em Biologia Parasitária) – Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro.

VILLAR, L. M. *et al.* Evaluation of methods used to concentrate and detect hepatitis A virus in water samples. **J Virol Methods**, v. 137, n. 2, p.169-176, nov. 2006.

WALTER J E, MITCHELL D K. Astrovirus infection in children. **Curr Opin Infect Dis**, v.16, n. 3, p. 247-253, jun. 2003.

WANG, Q. H. *et al.* Genetic analysis of the capsid region of astroviruses. **J Med Virol**, v. 64, n. 3, p. 245-255, jul. 2001.

WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Water Supply and Sanitation Council, Global Water Supply and Sanitation Assessment 2000 Report.** New York: UNICEF. 2000.

WILHELMI, I.; ROMAN, E.; SANCHEZ-FAUQUIER, A. Viruses causing gastroenteritis. **Clin Microbiol Infect**, v.9, n. 4, p. 247-262, abr. 2003.

WYN-JONES, A. P. *et al.* The detection of small round-structured viruses in water and environmental materials. **J Virol Methods**, v. 87, n. 1-2, p. 99-107, jun. 2000.

_____; Sellwood, J. Enteric viruses in the aquatic environment. **J Appl Microbiol**, v. 91, n. 6, p. 945-962, dez. 2001.

ZHANG, Z. *et al.* Quantitation of human astrovirus by real-time reverse-transcription-polymerase chain reaction to examine correlation with clinical illness. **J Virol Methods**, 134, n. 1-2, p. 190-196, jun. 2006.

ANEXO 10.1

“Molecular detection and characterization of gastroenteritis viruses occurring naturally on the water streams in Manaus, Central Amazônia, Brazil.”

“Environmental Microbiology”

Molecular Detection and Characterization of Gastroenteritis Viruses Occurring Naturally in the Stream Waters of Manaus, Central Amazônia, Brazil[∇]

Marize P. Miagostovich,¹ Fabiana F. M. Ferreira,¹ Flávia R. Guimarães,¹ Túlio M. Fumian,¹ Leonardo Diniz-Mendes,¹ Sérgio Luiz B. Luz,² Luciete A. Silva,² and José Paulo G. Leite^{1*}

Laboratory of Comparative Virology, Oswaldo Cruz Institute, Rio de Janeiro,¹ and Biodiversity in Health, Leônidas and Maria Deane Research Center, Oswaldo Cruz Foundation (Fiocruz), Manaus,² Brazil

Received 27 April 2007/Accepted 7 November 2007

To assess the presence of the four main viruses responsible for human acute gastroenteritis in a hydrographic network impacted by a disordered urbanization process, a 1-year study was performed involving water sample collection from streams in the hydrographic basin surrounding the city of Manaus, Amazonas, Brazil. Thirteen surface water sample collection sites, including different areas of human settlement characterized as urban, rural, and primary forest, located in the Tarumã-Açu, São Raimundo, Educandos, and Puraquequara microbasins, were defined with a global positioning system. At least one virus was detected in 59.6% (31/52) of the water samples analyzed, and rotavirus was the most frequent (44.2%), followed by human adenovirus (30.8%), human astrovirus (15.4%), and norovirus (5.8%). The viral contamination observed mainly in the urban streams reflected the presence of a local high-density population and indicated the gastroenteritis burden from pathogenic viruses in the water, principally due to recreational activities such as bathing. The presence of viral genomes in areas where fecal contamination was not demonstrated by bacterial indicators suggests prolonged virus persistence in aquatic environments and emphasizes the enteric virus group as the most reliable for environmental monitoring.

Although water is recognized as the most precious natural resource on our planet, human activities disregard this fact by continually polluting freshwater bodies. Increasing worldwide awareness of the poor quality of potable water has occurred mainly due to the significant increase in human morbidity and mortality. More than 2.2 million people die every year from diseases associated with poor quality water and sanitary conditions, mostly in developing countries. The presence of pathogenic enteric microorganisms in aquatic environments reveals how human health can be affected by contamination from sewage discharge into surface waters. It is estimated that nearly a quarter of all hospital beds in the world are occupied by patients presenting complications arising from infections caused by enteric microorganisms (53, 56).

Water sanitary quality is usually determined by the concentration of fecal indicator bacteria and occasionally by bacteriophages (8, 17). However, numerous investigations have shown that achieving minimum fecal coliform standards does not predict viral contamination (8, 47). Enteric viruses are highly stable in the environment, maintaining their infectivity even after exposure to treatment processes, and are often the most diluted pathogens in water, thus requiring concentration methods for their detection (2, 8, 42, 53).

After replication in the gastrointestinal tract, human enteric pathogenic viruses are excreted in high concentrations in the

feces (10^5 to 10^{11} /g feces) and can enter the environment through the discharge of waste materials from symptomatic or asymptomatic carriers and therefore may be dispersed in environmental waters (2). Difficulties in obtaining viruses from environmental samples have been overcome through the association of virus concentration methods with the use of molecular techniques, such as PCR, which provide rapid, sensitive, and specific detection (2, 15, 16, 32, 35, 46, 48, 54).

Although the presence of viruses in water is underestimated, mainly due to the difficulties associated with the detection of such agents in different matrices, enteric viruses have been implicated in waterborne outbreaks in different countries every year (2, 36, 38, 53). Among these, rotaviruses (RV), noroviruses (NoV), human astroviruses (HAstV), and human adenoviruses (HAAdV) are recognized as the most important etiologic agents of acute gastroenteritis and have been considered for environmental monitoring (11, 29, 55).

Diarrhea, a water-related disease, is a global public health problem and is ranked third among the causes of death affecting children under 5 years old, accounting for 17% of all deaths. It is estimated that 1.5 billion episodes occur each year, mostly in developing countries. It is recognized that a significant proportion of diarrhea cases caused by waterborne transmission in such countries is related to water quality. Levels of diarrhea disease differ between communities due to socioeconomic factors such as water availability and hygienic behavior (9, 45).

Despite a significant decrease in diarrhea-related mortality in developed and some developing countries, such as Brazil, diarrhea is still an important cause of morbidity in these coun-

* Corresponding author. Mailing address: Laboratório de Virologia Comparada, Pavilhão Cardoso Fontes, Av. Brasil 4.365, Manguinhos, CEP 21040-360, Rio de Janeiro, RJ, Brazil. Phone and fax: 5521-25602921. E-mail: jogleite@ioc.fiocruz.br.

[∇] Published ahead of print on 7 December 2007.

tries (37). In the Northern region of Brazil, the city of Manaus reported an increase of 90.5% in the number of diarrhea cases between 1998 and 2000, from 8,878 cases to 16,914 (4).

The goal of this study was to assess viral contamination by the four main viruses responsible for acute gastroenteritis (RV, HAdV, HAstV, and NoV) in the hydrographic network that surrounds Manaus. Investigation and determination of the viruses that are dumped into streams from domestic sewage without prior treatment, as occurs in Manaus, could reveal how rapid population growth associated with a disordered urbanization process represents a threat to human health caused by the increased risk of disease transmission.

MATERIALS AND METHODS

Study area. The city of Manaus (3°S, 60°W) is the capital of Amazonas, which is the largest Brazilian state located in the northern region of the country. The city has an area of 11,458.5 km², corresponding to 0.73% of the territory of the State of Amazonas (1,577,820.2 km²). The city of 1,403,796 inhabitants is located 900 miles (1,450 km) inland from the Atlantic coast, in the heart of the Amazon rain forest. It is surrounded by a dense hydrographic network composed by the Tarumã-Açu basin, which is partially situated within the urban area; the Puraqueara basin, which is located in the forest area; and the São Raimundo and Educandos microbasins of the Negro River basin, within the urban area of Manaus.

Thirteen precisely positioned sites located in these different basins were defined with a global positioning system (TREX Legend; Garmin Ltd., Olathe, KS). These sites were chosen for water sample collection and were positioned in different areas of human settlement; three control sites were represented by streams located in primary forest with intact vegetation and free of domestic sewage (sites 11 to 13); two sites were located at decamped areas, where the streams are also not affected by domestic sewage (sites 9 and 10); and eight sites were situated in regions of variable human settlement (sites 1 to 8). The São Raimundo and Educandos basins are characterized as urban areas with the presence of squatter slums without basic services such as sewage and a water supply. Some urban streams present different levels of water degradation processes, caused mainly by the complete or partial removal of riparian vegetation and by pollution from domestic sewage that is dumped into these streams without prior treatment (18).

Sampling schedule. The 1-year environmental surveillance was based on four sample collections at each site, conducted between August 2004 and June 2005, according to the annual fluctuation level of the Negro River, which usually shows a peak flood in June during the wet season. A total of 52 samples were obtained from collections performed in August (beginning of the dry season) and November (dry season), 2004, and in February (beginning of the wet season) and June (wet season), 2005.

Three-liter samples of surface water were collected in sterile bottles and transferred to the laboratory, where they were immediately stored at 4°C for viral and bacteria investigations, while the physicochemical parameters were measured in locum.

Physicochemical parameters. Temperature (°C), conductivity (µS), dissolved oxygen (DO; mg/liter), and pH were measured at the moment of collection with a YSI model 85 handheld salinity, conductivity, DO, and temperature system (YSI, Incorporated, Yellow Springs, OH) and a portable potentiometer (pH tester 2, waterproof, double junction).

Bacteriology. Standard multiple-tube fermentation and the membrane filtration technique for determining total and fecal coliforms were performed according to previously described protocols (17).

Virus concentration. The viral particles present in the samples were concentrated by the adsorption-elution method, with negatively charged membranes with the insertion of an acid rinse step for the removal of cations, as described previously (35). Briefly, the samples were prefiltered through an AP20 membrane (Millipore), and prior to process filtration, 1.2 g of MgCl₂ was added to 2 liters of water and the pH was adjusted to 5. The samples were filtered in a type HA negatively charged membrane (Millipore) with a 0.45-µm pore size with a vacuum pump system. The membrane was rinsed with 350 ml of 0.5 mM H₂SO₄ (pH 3.0), after which 15 ml of 1 mM NaOH (pH 10.8) was used to release the virus from the membrane. To neutralize the solution, 50 µl of 50 mM H₂SO₄ and 100× TE buffer (pH 8.0) was added. The eluate was filtered by using a Centriprep Concentrator 50 (Millipore) and centrifuged at 1,500 × g for 10 min at

4°C to obtain a final volume of 2 ml. The system was soaked briefly in a 10% bleach solution and rinsed in deionized H₂O prior to each use.

RNA and DNA extraction. Nucleic acid extraction was processed with the QIAamp viral RNA and QIAamp viral DNA kits (Qiagen, Inc., Valencia, CA) according to the manufacturer's instructions.

Reverse transcription (RT) reaction. cDNA synthesis was carried out by RT with a random primer (PdN₆; 50 A₂₆₀ units; Amersham Biosciences, Chalfont St Giles, Buckinghamshire, United Kingdom) for three groups of enteric viruses, i.e., RV, HAstV, and NoV. Briefly, 2 µl of dimethyl sulfoxide (Sigma, St. Louis, MO) and 10 µl of RNA were mixed, heated at 97°C for 7 min, and chilled on ice for 2 min. The components of the mixture and their final concentrations for a 50-µl RT reaction were as follows: 2.5 mM each deoxynucleoside triphosphate (GIBCO BRL, Life Technologies, Inc., Grand Island, NY), 1.5 mM MgCl₂, 200 U of Superscript II reverse transcriptase (Invitrogen), and 1 µl of PdN₆. The RT reaction mixture was incubated in a thermal cycler (PTC-100 Programmable Thermal Controller; MJ Research, Inc., Watertown, MA) at 42°C for 60 min and 95°C for 10 min.

Primers and PCR protocols for virus detection. Primer characteristics and references for the amplification conditions of different PCR and nested PCR protocols used for nucleic acid detection of RV, NoV, HAstV, and HAdV were all described previously (3, 20, 24, 28, 43). To avoid false-positive results, quality control measures were followed as recommended and for each set of amplifications, negative and positive control samples were included. All methodologies were standardized with reference strains of each virus, and for the present study, previously characterized virus strains obtained from fecal samples were used as positive controls. The PCR products were resolved on 1.0% electrophoresis grade agarose gel (GIBCO BRL, Life Technologies, Inc., Grand Island, NY), followed by ethidium bromide staining (0.5 µg/ml), and images were obtained with the image capture system (BioImaging Systems) with the Labworks 4.0 software program.

Molecular characterization of RVs. Molecular characterization of RV was performed with specific primers routinely used for the binary classification of group A RV into G (VP7) and P (VP4) types, where G stands for glycoprotein and P stands for protease-sensitive protein. All procedures were performed with previously described primers and amplification conditions (20, 28).

Nucleotide sequencing of HAstVs, NoVs, and HAdVs. The amplicons of HAstV and NoV and the first round of HAdV (primers hex1deg and hex2deg) obtained in the PCR were sequenced to confirm the correct PCR products. The amplicons were purified with the QIAquick gel extraction kit (Qiagen) according to the manufacturer's instructions and quantified by 1% agarose gel electrophoresis with the Low DNA Mass Ladder (Invitrogen) as a molecular pattern. The PCR amplicons were sequenced with an ABI Prism 3100 genetic analyzer and Big Dye Terminator cycle sequencing kit v. 3.1 (PE Applied Biosystems, Foster City, CA) in both directions, with the same primers used in the amplification reactions. CentriSep columns (Princeton Separations, Inc., Adelphia, NJ) were used to purify the sequencing reaction products, according to the manufacturer's recommendations.

Strain characterization and phylogenetic analysis. Nucleotide sequences were edited and aligned with the BioEdit sequence alignment editor (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>). The sequences were compared with their respective prototypes and to other sequences available in the GenBank database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?DB=pubmed>). Rooted phylogenetic trees were constructed with the MEGA 2 software (<http://www.megasoftware.net/>) by the neighbor-joining method, with genetic distance corrected by the Kimura two-parameter model with 1,000 pseudoreplicates.

Statistical analysis. Statistical results were produced by the software Epi Info, version 3.3, from the Centers for Disease Control and Prevention (<http://www.cdc.gov/epiinfo/>).

Nucleotide sequence accession numbers. The GenBank accession numbers for the sequences obtained in this study are DQ464891 to DQ464895 (HAdV), EF100670 (HAstV), and EF107526 (NoV).

RESULTS

Fifty-two river water concentrates were analyzed by PCR assay during this study, and at least one virus was detected in 31 (59.6%) of these. The number of viruses detected in water samples from different sites was variable (Table 1), totaling 50 virus strains, with RV (23 to 44.2%) verified as the most prevalent detected, followed by HAdV (16 to 30.8%), HAstV (8 to 15.4%), and NoV (3 to 5.8%). The different distributions of

TABLE 1. Sample collection site characteristics and virus groups detected in 52 surface water samples obtained during four collection periods

| Human settlement level/ area type | Basin | Site no./stream | Virus(es) collected | | | |
|--------------------------------------|--------------|--------------------------------------|---------------------|--------------------|------------------------|----------------|
| | | | August 2004 | November 2004 | February 2005 | June 2005 |
| Low/rural | Tarumã-Açú | 1/estuary 2/medium | HAdV RV | HAdV, RV | RV | RV |
| High/urban | São Raimundo | 3/estuary | HAdV, RV | RV | RV | HAdV, HAdV, RV |
| | | 4/medium | HAdV, AdV | HAdV, HAdV, NoV | HAdV, HAdV, RV, NoV | HAdV, HAdV, RV |
| High/urban | Educandos | 5/medium | | HAdV, RV | HAdV, HAdV, RV | HAdV |
| | | 6/medium | | RV | RV | |
| Low/rural | Puraquequara | 7/estuary | HAdV | HAdV | NoV, RV | HAdV, RV |
| | Tarumã-Açú | 8/medium | HAdV, RV | HAdV | HAdV, RV | RV |
| Very low/primary forest | Puraquequara | 9/decamped in 2001 | | | | RV |
| | Tarumã-Açú | 10/decamped in 2002 | | | | |
| Very low/primary forest | Puraquequara | 11/Mainã Grande | | RV | | |
| | Tarumã-Açú | 12/Reserva Ducke 13/Reserva Ducke | RV | | RV | HAdV |

these viruses according to the collection area revealed that RV, HAdV, and HAdV were detected at sites located in the primary forest and rural areas (Table 2). The urban streams located at the Educandos (sites 7 and 8) and São Raimundo (sites 3 to 6) basins presented a high level of viral contamination, as revealed by the percentages of virus detection per site of 100.0% (8/8) and 81.3% (13/16), respectively. In these basins, all four groups of viruses investigated were detected, with HAdV and RV being the most frequent viruses present in the Educandos basin. Site 4, located in São Raimundo, presented the highest number of viral types detected and the highest variability of virus strains belonging to the four groups tested. This site is an urban stream presenting intact vegetation; however, it routinely receives contamination from sewage discharge originating from the surrounding houses.

The microbiological analysis results showed that the total and fecal coliform values in the samples exceeded those established by the standard methods used for the examination of water and wastewater guideline for recreational water (most-probable numbers [MPN], 5,000 and 1,000/100 ml) by 67.3% (35/52) and 73.1% (38/52), respectively. Sites that were positive for the presence of fecal coliforms included 6 of the 20 sites located in primary forest and rural areas, 4 out of 8 in the Tarumã-Açu microbasin, and all 14 sites located in the São

Raimundo and Educandos microbasins. Only two sites (site 1, the Tarumã-Açu estuary, and site 12, the Ducke Forest Reserve) were negative for fecal contamination in the four water samples obtained during this study. However viruses were detected in the strains obtained from the estuary (Fig. 1). The Tarumã-Açu estuary (site 1) is perpendicular to the Negro River and has a few floating houses. The water is clear, besides being naturally dark and regularly used for recreational bathing.

The frequency of sites where the presence of fecal coliforms exceeded an MPN of 1,000/ml and where virus detection was positive characterized significant microbiological contamination in the urban water streams and revealed that HAdV is the most significant marker of human presence (Table 2). Enteric virus detection in samples positive and negative for fecal coliforms was 63.2% (24/38) and 50.0% (7/14), respectively ($P = 0.29$), showing no correlation between these findings.

Global analysis for the presence of viruses and fecal coliforms by using recreational water parameters (MPN, 1,000/ml) according to the collection period demonstrated a slight increase in the number of strains detected during wet-season rainfall, although the number of positive sites for virus detection remained almost unaltered (data not shown).

The median values for the physicochemical parameters, including temperature, pH, DO, and conductivity, obtained at each site during the four sample collections are shown in Fig. 2. Observation revealed that the pH, DO, and conductivity generally followed two different patterns, characterizing the two distinct areas studied, i.e., areas with zero or minimal human settlement and areas where human activity clearly affected the local natural conditions. The former areas were characterized by acidic water presenting low electrical conductivity and high DO content. The urban areas (São Raimundo and Educandos) presented higher pH and conductivity values and low DO contents. The temperature of the water samples was the most stable parameter, ranging from 24.5°C to 30.6°C and from 24.0°C to 32.8°C in the respective areas.

TABLE 2. Frequencies of the viruses investigated and fecal coliforms detected in the areas studied

| Pathogen | No. (%) found in: | | Chi square | P value |
|-------------------|------------------------|------------------------------------|------------|---------|
| | Urban area (n = 24) | Rural and forest areas (n = 28) | | |
| Any enteric virus | 21 (87.5) | 10 (35.7) | 14.4 | <0.001 |
| RV | 15 (62.5) | 8 (28.6) | 6.0 | 0.014 |
| NoV | 3 (12.5) | | 3.7 | 0.09 |
| HAdV | 6 (25.0) | 2 (7.1) | 3.2 | 0.08 |
| HAdV | 15 (62.5) | 1 (3.6) | 21.1 | <0.001 |
| Fecal coliforms | 24 (100.0) | 14 (50.0) | 16.4 | <0.001 |

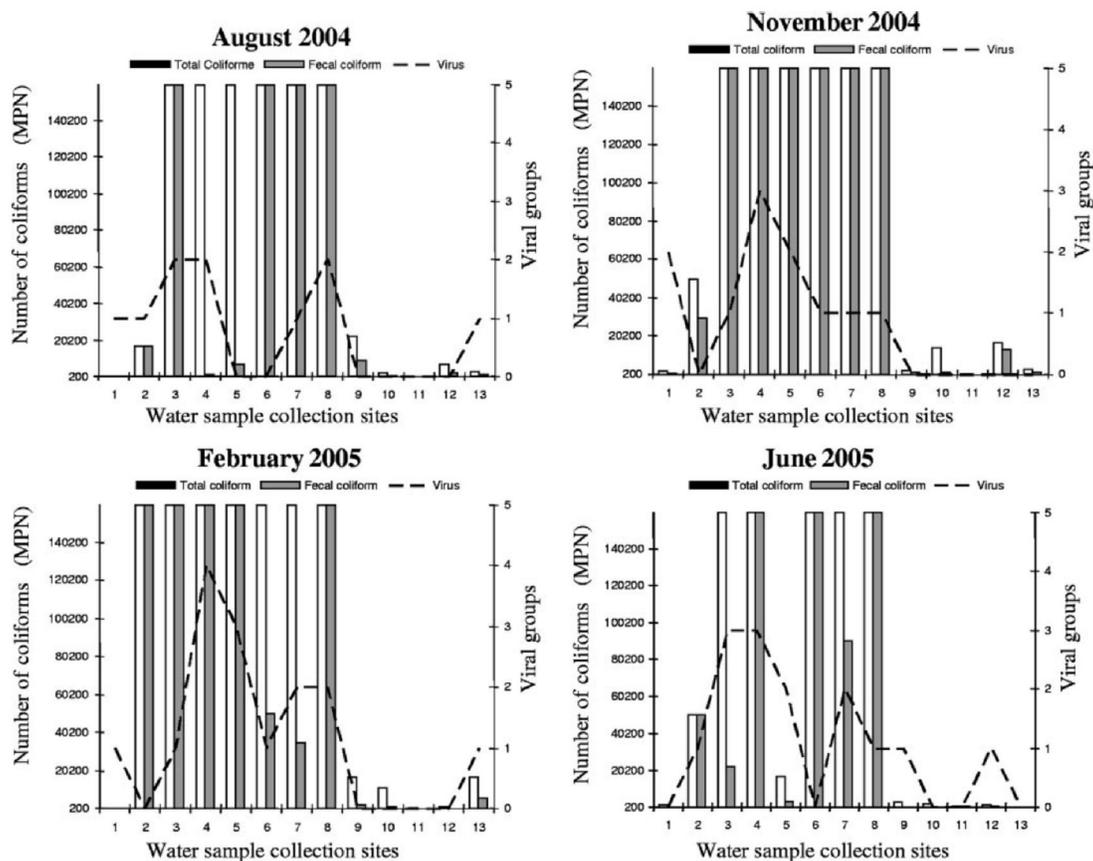


FIG. 1. Microbiological results obtained with water samples collected at 13 sites from streams of the Amazon hydrographic network according to the collection period.

Molecular characterization. Genotyping of VP4 of group A RV demonstrated that 13 samples were P[8], 1 was a coinfection of P[8] and P[4], and 1 was untypeable. Regarding VP7, 10 samples were characterized as G1 and 1 was untypeable. Only three samples were characterized for both VP4 and VP7 genes, and all of these were P[8],G1. Most of the positive samples were obtained from polluted streams; however, three were collected in rural and forest areas.

For HAdV, HAsTV, and NoV genotyping, phylogenetic analysis was performed by comparing the nucleotide sequences obtained with their respective genotypes and with other strains available in the GenBank database representing different countries worldwide. For HAsTV, the sequence analysis was performed based on a region of 348 nucleotides in open reading frame 2 of the HAsTV genome, which clustered this strain with the HAsTV Oxford type 1 prototype (nucleotide identity of 97.4%). Phylogenetic analysis performed to correlate the HAsTV sequence with other isolates from different countries worldwide revealed a cluster including strains from Argentina, Colombia, and Brazil. Among the Brazilian strains, the envi-

ronmental sequence displayed identities varying from 90.2% to 98.9%.

Partial sequencing of one strain was performed with region B primers to determine the NoV genogroups. Phylogenetic analysis revealed that this strain clustered within GII; however, we were unable to determine its genotype with this set of primers. Molecular characterization of HAdV was performed by sequencing 5 out of 16 detected strains. The sequence analysis corresponded to the 253 nucleotides between positions 47 and 299 within the hexon gene. The data generated were compared with the GenBank database and used to construct a phylogenetic tree, which, according to the nucleotide sequence identities (data not shown), showed that all of the strains belonged to species F; two of them were HAdV-40, and three were HAdV-41.

DISCUSSION

According to the Brazilian Institute of Geography and Statistics, Brazil has surface water resources of 168,870 m³/s, rep-

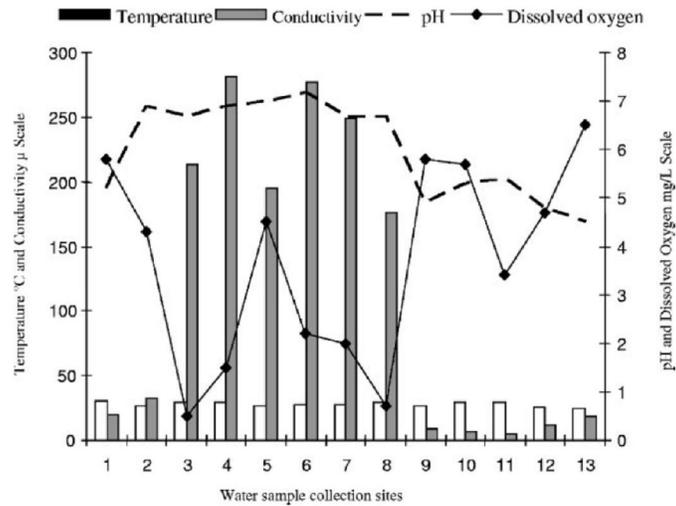


FIG. 2. Means of the physicochemical data obtained from the 52 surface water samples collected during the study period according to the collection sites.

representing 50% and 11% of all the water available in Latin America and in the world, respectively. Seventy percent of Brazilian freshwater resources are located in the northern region of the country, in the Amazon hydrographic basin, where only 7% of the Brazilian population lives. Although this is a favorable situation, water quality is declining in most regions of the country, mainly due to rapid population growth without corresponding planning control. Similar to other Brazilian cities, Manaus has undergone rapid population growth in the last 3 decades, exhibiting growth from 300,000 inhabitants in the 1970s to 1,403,796 in the year 2000. Today, the urban population represents 99.4% of the total population (4, 39). This increase is the result of a large population influx to the city due to federal government policies that provide incentives for manufacturing activities initiated during the 1960s (12).

Urban development along the streams has led to a loss of biodiversity and to a decrease in water quality in these ecosystems, due to a series of adverse effects on these water bodies, including the discharge of untreated sewage directly into streams (12, 18, 41). The presence of the four main viruses responsible for acute gastroenteritis observed in the water of urban streams provides evidence that these viruses circulate at relatively high frequencies among the population of Manaus, while also reflecting the effects of increased population densities and anthropogenic activities on freshwater resources. In addition, this information could provide an assessment of the risk of human disease associated with sewage disposal into the streams of Manaus. These findings indicate the gastroenteritis burden of pathogenic viruses present in the water, due to the use of river water for drinking or due to other routes of transmission, such as poor hygiene, lack of sanitation, or even contamination due to recreational activities such as bathing in these areas. Studies showing viral diarrheal illness due to waterborne transmission related to poor water quality have

been documented, including the ingestion of contaminated water during body contact recreation (22, 26, 31, 38, 52). In addition, the detection and characterization of HAdV, RV, HAsV, and NoV in environmental water samples may provide potentially useful data for epidemiological studies. The diversity of viruses detected in the water was variable and depends on factors like population density and infection prevalence within a given community, such that the amount of viruses dumped directly into river water in untreated discharge could explain the prevalence and distribution of such viruses.

In the present study, RV was the most prevalent virus detected, with P[8],G1 the only genotype characterized by a semi-nested, typing-specific PCR, a reflection within the environment concerning the impact of these viruses on the population. RV has been described as the most important virus in cases of acute gastroenteritis, since it is responsible for a third of these cases and RV P[8],G1 has been described as the most common genotype circulating worldwide (44, 49). In a study performed in Germany (47), RV RNA was detected and confirmed in 3 to 24% of the effluent and surface water samples tested.

The high percentage of RV detection in the present samples indicates that this virus should be considered for use as a potential indicator of fecal environmental contamination in developing countries, where their circulation in the environment appears to be higher than HAdVs, which are already considered a molecular index of human virus presence in the environment (7, 13, 46). Recently, an epidemiological surveillance of human enteric viruses of different environmental matrices detected the same viral strain in feces of gastroenteritis cases and in water and suggested both RV and HAdV as reference viruses for risk assessment (11). The stability of RV in environmental waters has been previously described, and its resistance to physicochemical treatment processes used by sewage treatment plants may facilitate its transmission (5).

Single-stranded RNA (ssRNA) virus detection rates were lower, especially for NoV. We believed that the protocol used could affect this result, and it is probable that the percentage of NoV detected would have been higher if a nested (or seminested) PCR assay had been used. The high sensitivity of the nested PCR has been described and for RV could detect double-stranded RNA from as few as 10 to 100 particles (28). Despite the low levels of NoV detected, the emergence of these viruses resulting in outbreaks of gastroenteritis is notable (6, 10, 33). To date, no reliable data regarding the frequency of NoV in Manaus are available and therefore the impact of these infections could not be measured. HAsVs have been recognized as important etiologic agents of viral gastroenteritis, contributing to 2 to 26% of the gastroenteritis cases in developing countries (19, 29, 55). The current rate of HAsV detection in this study is within the 6 to 50% range of surface water, as previously described (15, 29, 47).

The present results, based on direct molecular detection of viruses in river water, were confirmed by direct sequencing of PCR amplicons of one HAsV strain, one NoV strain, and six HAdV strains to ensure detection specificity. Nucleotide sequence analysis revealed the presence of HAsV-1 and NoV genogroup II strains, confirming the wide distribution of these viruses, as previously described (10, 14, 23, 25, 27, 33, 51). The fact that the HAdV detected belongs to species F, serotypes 40 and 41, was also verified. The different types of HAdV detected confirm that the quality control measures adopted throughout these procedures were sufficient to ensure these results. In addition, a study of hepatitis A virus (HAV) carried out with the same samples (21) corroborated these results.

The present study also evaluated the potential of the virus concentration method by negatively charged membrane filtration associated with different PCR protocols routinely used for stool samples. The detection of ssRNA, double-stranded RNA, and DNA viruses revealed that the association of the methods described here is a feasible approach for detecting the main waterborne enteric viruses responsible for gastroenteritis in environmental water samples collected from different grades of pollution. The lower virus detection rate in polluted water samples during the dry season could be explained by the concentration of inhibitors throughout this period. It has been demonstrated that the presence of organic compounds such as humic, fulvic, and tannic acids, proteins, and inorganic compounds such as metals present in the environment is a major obstacle to the routine detection of enteric viruses from environmental waters by PCR (1, 32, 50). In this study, 21 water samples were negative for the presence of HAdV, HAsV, NoV, and RV; however, considering that Torque teno virus and HAV were also investigated in the same water samples (results published elsewhere; 21; L. Diniz-Mendes, unpublished data), the number of water samples negative for all viruses was reduced to 11. Unfortunately, the presence of compounds that could inhibit RT-PCR/PCR was not evaluated. Previously, this method showed average recovery yields of spiked poliovirus of 62% from 1 liter of artificial seawater (35).

Recently, environmental virological studies have emerged worldwide and procedures for concentrating virus in water samples associated with different detection methodologies have been described (13, 30, 40, 48). In this study, we attempted to gain an initial insight into NoV, HAsV, RV, and

HAdV occurrence within surface water samples of the Amazon basin. Thus, the PCR approach was useful as an alternative to overcome the limitations of conventional techniques, such as cell culture, since NoV cannot be grown in cell culture and RV, HAsV, HAdV-40, and HAdV-41 are fastidious agents (8, 15, 34). In fact, the characteristics of these viruses were determining factors when selecting the association of a membrane negative charged method with certain PCR methods, since conventional virus concentration procedures that use positive membrane and beef extract as an eluate are known to present certain inhibitory effects on PCR detection for viruses (1, 15, 46).

Although the method used for detecting enteric viruses cannot distinguish between infectious and noninfectious virions, the detection of an ssRNA genome in the environment suggests the presence of an infective virus since this molecule is not very stable under environmental conditions (40). Further studies concerning virus viability in these water samples should be performed by cell culture or cell culture associated with PCR, as previously described (15, 47).

The presence of viral genomes in areas showing low levels of fecal contamination by bacterial indicators suggests the prolonged persistence of these viruses in the environment and indicates that the enteric virus group is more reliable for environmental monitoring than bacterial indicators. It has been recognized that these viruses are more stable than bacteria in water and sewage, constituting not only a potential hazard but also good indicators of fecal pollution, as well as the potential presence of other viruses (8).

The anthropogenic influence on streams within the urban area of the municipality of Manaus was also notable due to the high quantities of total and fecal coliforms present in the water samples and the physicochemical analyses that corroborated previous findings, characterizing the São Raimundo and Educandos microbasins with an increased pH, high conductivity, and a low DO content (41). Monitoring of these streams revealed that viral contamination could be derived from infected residents of the São Raimundo and Educandos microbasins and reinforces the need to make improvements in water supply, sewage disposal, garbage collection, and urban drainage services, as suggested in previous reports (12, 41). The flooding events that occur annually in these areas may increase the number of waterborne disease exposure scenarios (4). Additionally, a previous study performed in the city of Manaus by using macroinvertebrates as bioindicators demonstrated that 80% of the streams within the urban area are impacted, such that their abiotic characteristics have been modified by deforestation and water pollution (18).

In Brazil, a lack of studies regarding viral contamination monitoring in surface water exists, and to the best of our knowledge, no investigation to date has evaluated the presence of viruses in river water of the hydrographic basin of Amazonas. Data concerning HAV obtained in the same study were published elsewhere (21). The viral contamination detected in this study provides a better assessment of human disease risk associated with sewage disposal into river water, increases our knowledge regarding this subject, and assists in the development of more efficient public health actions. The possibility of detecting human enteric viruses in a given water source will facilitate the provision of appropriate advice to public and

responsible authorities regarding the use and treatment of water. Continuous viral contamination monitoring is useful for preventing waterborne disease outbreaks and for understanding the impact caused by human occupation and the use of territories that contain freshwater resources.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by the Vice-Presidência de Serviços de Referência e Ambiente, Fiocruz, and the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, 303539/2004-6).

We thank Ana Maria Coimbra Gaspar, Josino Costa Moreira, and Ary Carvalho de Miranda for their collaboration in planning this project; Matias Victória and Filipe Anibal da Costa for nucleotide sequencing and statistic analysis, respectively; and the staff of the Centro de Pesquisas Leônidas e Maria Deane (CPQLMD), Fiocruz, Amazonas, the Instituto Nacional de Pesquisas do Amazonas (INPA), and the Centro de Pesquisas Eco-Naturais (CEPEN), especially Neusa Hamada and Sheyla Conceiro, who provided the infrastructure for realizing the sample collections.

REFERENCES

- Abbaszadegan, M., M. S. Huber, C. P. Gerba, and I. L. Pepper. 1993. Detection of enteroviruses in groundwater with the PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 59:1318-1324.
- Abbaszadegan, M. 2001. Advanced detection of viruses and protozoan parasites in water. *Rev. Biol. Biotechnol.* 2:21-26.
- Allard, A., B. Albinsson, and G. Wadell. 2001. Rapid typing of human adenoviruses by a general PCR combined with restriction endonuclease analysis. *J. Clin. Microbiol.* 39:498-505.
- Anonymous. 2002. Projeto geo cidades: relatório ambiental urbano integrado: informe GEO: Manaus. Consórcio Parceria, Rio de Janeiro, Brazil.
- Ansari, S. A., V. S. Springthorpe, and S. A. Sattar. 1991. Survival and vehicular spread of human rotaviruses: possible relation to seasonality of outbreaks. *Rev. Infect. Dis.* 13:448-461.
- Bhanton, L. H., S. M. Adams, R. S. Beard, G. Wei, S. N. Bulens, M. A. Widdowson, R. I. Glass, and S. S. Monroe. 2006. Molecular and epidemiologic trends of calciviruses associated with outbreaks of acute gastroenteritis in the United States, 2000-2004. *J. Infect. Dis.* 193:413-421.
- Bofill-Mas, S., N. Albinana-Gimenez, P. Clemente-Casares, A. Hundsda, J. Rodriguez-Manzano, A. Allard, M. Calvo, and R. Girones. 2006. Quantification and stability of human adenoviruses and polyomavirus JCPyV in wastewater matrices. *Appl. Environ. Microbiol.* 72:7894-7896.
- Bosch, A. 1998. Human enteric viruses in the water environment: a minireview. *Int. Microbiol.* 3:191-196.
- Bryce, J., C. Boschi-Pinto, K. Shibuya, and R. E. Black. 2005. WHO estimates of the causes of death in children. *Lancet* 365:1147-1152.
- Bull, R. A., E. T. Tu, C. J. Melver, W. D. Rawlinson, and P. A. White. 2006. Emergence of a new norovirus genotype II.4 variant associated with global outbreaks of gastroenteritis. *J. Clin. Microbiol.* 44:327-333.
- Carducci, A., M. Verani, R. Battistini, F. Pizzi, E. Rovini, E. Andreoli, and B. Casini. 2006. Epidemiological surveillance of human enteric viruses by monitoring of different environmental matrices. *Water Sci. Technol.* 54:239-244.
- Casey, J. F., J. R. Kahn, and A. Rivas. 2006. Willingness to pay for improved water service in Manaus, Amazonas, Brazil. *Ecol. Econ.* 58:365-372.
- Castignolles, N., F. Petit, I. Mendel, L. Simon, L. Cattolico, and C. Buffet-Janvresse. 1998. Detection of adenovirus in the waters of the Seine River estuary by nested-PCR. *Mol. Cell. Probes* 12:175-180.
- Castilho, J. G., V. Munford, H. R. Resque, U. Fagundes-Neto, J. Vinjé, and M. L. Raez. 2006. Genetic diversity of norovirus among children with gastroenteritis in Sao Paulo State, Brazil. *J. Clin. Microbiol.* 44:3947-3953.
- Chapron, C. D., N. A. Ballester, J. H. Fontaine, C. N. Frades, and A. B. Margolin. 2000. Detection of astroviruses, enteroviruses, and adenovirus types 40 and 41 in surface waters collected and evaluated by the information collection rule and an integrated cell culture-nested PCR procedure. *Appl. Environ. Microbiol.* 66:2520-2525.
- Cho, H. B., S. H. Lee, J. C. Cho, and S. J. Kim. 2000. Detection of adenoviruses and enteroviruses in tap water and river water by reverse transcription multiplex PCR. *Can. J. Microbiol.* 46:417-424.
- Clesceri, L. S., A. E. Greenberg, and A. D. Eaton (ed.). 1998. Standard methods for the examination of water and wastewater, 20th edition, p. 906. American Public Health Association, Washington, DC.
- Conceiro, S. R. M., N. Hamada, S. L. B. Luz, B. R. Forsberg, and T. P. Pimentel. 2007. Deforestation and sewage effects on aquatic macroinvertebrates in urban streams in Manaus, Amazonas, Brazil. *Hydrobiologia* 575: 271-284.
- Cunliffe, N. A., W. Dove, J. S. Gondwe, B. D. Thindwa, J. Greensill, J. L. Holmes, J. S. Bresee, S. S. Monroe, R. I. Glass, R. L. Broadhead, M. E. Molyneux, and C. A. Hart. 2002. Detection and characterization of human astroviruses in children with acute gastroenteritis in Blantyre, Malawi. *J. Med. Virol.* 67:563-566.
- Das, B. K., J. R. Gentsch, H. G. Cicirello, P. A. Woods, A. Gupta, M. Ramachandran, R. Kumar, M. K. Bhan, and R. I. Glass. 1994. Characterization of rotavirus strains from newborns in New Delhi, India. *J. Clin. Microbiol.* 32:1820-1822.
- De Paula, V. S., L. Diniz-Mendes, L. M. Villar, S. B. Luz, M. S. Jesus, N. M. V. S. da Silva, and A. M. C. Gaspar. 2007. Hepatitis A virus in environmental water samples from the Amazon basin. *Water Res.* 41:1169-1176.
- Divizia, M., R. Gabrieli, D. Donia, A. Macaluso, A. Bosch, S. Guix, G. Sánchez, C. Villena, R. M. Pintó, L. Palombi, E. Buonuomo, F. Cenko, L. Leno, D. Bebeci, and S. Bino. 2004. Waterborne gastroenteritis outbreak in Albania. *Water Sci. Technol.* 50:57-61.
- Espul, C., N. Martinez, J. S. Noel, H. Cuello, C. Abrile, S. Grucci, R. Glass, T. Berke, and D. O. Matson. 2004. Prevalence and characterization of astroviruses in Argentinean children with acute gastroenteritis. *J. Med. Virol.* 72:75-82.
- Fankhauser, R. L., S. S. Monroe, J. S. Noel, C. D. Humphrey, J. S. Bresee, U. D. Parashar, T. Ando, and R. I. Glass. 2002. Epidemiologic and molecular trends of "Norwalk-like viruses" associated with outbreaks of gastroenteritis in the United States. *J. Infect. Dis.* 186:1-7.
- Galdiero, E., A. Marinelli, M. G. Pisciotta, I. Pagliara, E. S. Di Monteforte, and G. Liguori. 2005. Reverse transcriptase-PCR for the detection of astrovirus in children with nosocomial acute diarrhoea in Naples, Italy. *Med. Mal. Infect.* 35:213-217.
- Gallay, A., H. De Valk, M. Cournot, B. Ladeuil, C. Hemery, C. Castor, F. Bon, F. Megraud, P. Le Cann, and J. C. Desenclos. 2006. A large multipathogen waterborne community outbreak linked to faecal contamination of a groundwater system, France, 2000. *Clin. Microbiol. Infect.* 12:561-570.
- Gallimore, C. I., M. A. Barreiros, D. W. Brown, J. P. Nascimento, and J. P. G. Leite. 2004. Noroviruses associated with acute gastroenteritis in a children's day care facility in Rio de Janeiro, Brazil. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 37:321-326.
- Gentsch, J. R., R. I. Glass, P. Woods, V. Gouvea, M. Gorziglia, J. Flores, B. K. Das, and M. K. Bhan. 1992. Identification of group A rotavirus gene 4 types by polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.* 30:1365-1373.
- Goffi-Laroche, L., B. Gratacap-Cavallier, D. Demanse, O. Genoulaz, J. M. Seigneurin, and D. Zmirou. 2003. Are waterborne astrovirus implicated in acute digestive morbidity (E.M.I.R.A. study)? *J. Clin. Virol.* 27:74-82.
- Gutiérrez, M. F., M. V. Alvarado, E. Martinez, and N. J. Ajami. 2007. Presence of viral proteins in drinkable water—sufficient condition to consider water a vector of viral transmission? *Water Res.* 41:373-378.
- Hoebe, C. J., H. Vennema, A. M. de Roda Husman, and Y. T. van Duynhoven. 2004. Norovirus outbreak among primary schoolchildren who had played in a recreational water fountain. *J. Infect. Dis.* 189:699-705.
- Ijzerman, M. M., D. R. Dahling, and G. S. Fout. 1997. A method to remove environmental inhibitors prior to the detection of waterborne enteric viruses by reverse transcription-polymerase chain reaction. *J. Virol. Methods* 63: 145-153.
- Ike, A. C., S. O. Brockmann, K. Hartelt, R. E. Marschang, M. Contzen, and R. M. Oehme. 2006. Molecular epidemiology of norovirus in outbreaks of gastroenteritis in southwest Germany from 2001 to 2004. *J. Clin. Microbiol.* 44:1262-1267.
- Kapikian, A. Z., and R. M. Chanock. 2001. Rotaviruses, p. 1657-1708. *In* B. N. Fields, D. M. Knipe, and P. M. Howley (ed.), *Virology*, vol. 2. Lippincott-Raven Press, Philadelphia, PA.
- Katayama, H., A. Shimasaki, and S. Ohgaki. 2002. Development of a virus concentration method and its application to detection of enterovirus and Norwalk virus from coastal seawater. *Appl. Environ. Microbiol.* 68:1033-1039.
- Kim, S. H., D. S. Cheon, J. H. Kim, D. H. Lee, W. H. Jheong, Y. J. Heo, H. M. Chung, Y. Jee, and J. S. Lee. 2005. Outbreaks of gastroenteritis that occurred during school excursions in Korea were associated with several waterborne strains of norovirus. *J. Clin. Microbiol.* 43:4836-4839.
- Kosek, M., C. Bern, and R. L. Guerrant. 2003. The global burden of diarrhoeal disease, as estimated from studies published between 1992 and 2000. *Bull. W.H.O.* 81:197-201.
- Kukkula, M., P. Arstila, M. L. Klossner, L. Maunula, C. H. Bonsdorff, and P. Jaatinen. 1997. Waterborne outbreak of viral gastroenteritis. *Scand. J. Infect. Dis.* 29:415-418.
- Magalhães, F., and E. Rojas. 2005. The re-urbanization of the city center of Manaus, Brazil—facing the challenges of informal settlements. 41st ISOCaRP Congress.
- Meleg, E., F. Jakab, B. Kocsis, K. Bányai, B. Meleg, and G. Szucs. 2006. Human astroviruses in raw sewage samples in Hungary. *J. Appl. Microbiol.* 101:1123-1129.
- Melo, E. G. F., M. S. R. Silva, and S. A. F. Miranda. 2005. Antropic influence on the water of streams in the city of Manaus. *Caminhos Geogr.* 5:40-47.
- Metcalf, T. G., and X. Jiang. 1988. Detection of hepatitis A virus in estuarine samples by gene probe assay. *Microbiol. Sci.* 5:296-300.

43. Noel, J., T. W. Lee, J. B. Kurtz, R. I. Glass, and S. S. Monroe. 1995. Typing of human astroviruses from clinical isolates by enzyme immunoassay and nucleotide sequencing. *J. Clin. Microbiol.* **33**:797–801.
44. Parashar, U. D., C. J. Gibson, J. S. Bresse, and R. I. Glass. 2006. Rotavirus and severe childhood. *Emerg. Infect. Dis.* **12**:304–306.
45. Payment, P., and P. H. Hunter. 2001. Endemic and epidemic infectious intestinal disease and its relationship to drinking water, p. 61–88. *In* L. Fewtrell and J. Bartram (ed.), *Water quality: guidelines, standards and health. Assessment of risk and risk management for water-related infectious disease*. IWA Publishing, London, United Kingdom.
46. Puig, M., J. Jofre, F. Lucena, A. Allard, G. Wadell, and R. Girones. 1994. Detection of adenoviruses and enteroviruses in polluted waters by nested PCR amplification. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**:2963–2970.
47. Pusch, D., D.-Y. Oh, S. Wolf, R. Dumke, U. Schroter-Bobsin, M. Hohne, I. Roske, and E. Schreier. 2005. Detection of enteric viruses and bacterial indicators in German environmental waters. *Arch. Virol.* **150**:929–947.
48. Rose, M. A., A. K. Dhar, H. A. Brooks, F. Zecchini, and R. M. Gersberg. 2006. Quantification of hepatitis A virus and enterovirus levels in the lagoon canals and Lido beach of Venice, Italy using real time RT-PCR. *Water Res.* **40**:2378–2396.
49. Santos, N., and Y. Hoshino. 2005. Global distribution of rotavirus serotypes/genotypes and its implication for the development and implementation of an effective rotavirus vaccine. *Rev. Med. Virol.* **15**:29–56.
50. Shieh, Y. S., D. Wait, L. Tai, and M. D. Sobsey. 1995. Methods to remove inhibitors in sewage and other fecal wastes for enterovirus detection by the polymerase chain reaction. *J. Virol. Methods* **54**:51–66.
51. Silva, P. A., D. D. Cardoso, and E. Schreier. 2006. Molecular characterization of human astroviruses isolated in Brazil, including the complete sequences of astrovirus genotypes 4 and 5. *Arch. Virol.* **151**:1405–1417.
52. Standish-Lee, P., and E. Loboschfsky. 2006. Protecting public health from the impact of body-contact recreation. *Water Sci. Technol.* **53**:201–207.
53. Straub, T. M., and D. P. Chandler. 2003. Towards a unified system for detecting waterborne pathogens. *J. Microbiol. Methods* **53**:185–197.
54. Villar, L. M., V. S. de Paula, L. Diniz-Mendes, E. Lampe, and A. M. Gaspar. 2006. Evaluation of methods used to concentrate and detect hepatitis A virus in water samples. *J. Virol. Methods* **137**:169–179.
55. Wilhelm, I., E. Roman, and A. Sánchez-Fauquier. 2003. Viruses causing gastroenteritis. *Clin. Microbiol. Infect.* **9**:247–262.
56. Wyn-Jones, A. P., and J. Sellwood. 2001. Enteric viruses in the aquatic environment. *J. Appl. Microbiol.* **91**:945–962.

ANEXO 10.2

“Molecular detection of Hepatitis A virus in urban sewage in Rio de Janeiro, Brazil.”

“Letters in Applied Microbiology”

ORIGINAL ARTICLE

Molecular detection of hepatitis A virus in urban sewage in Rio de Janeiro, Brazil

L.M. Villar¹, V.S. de Paula¹, L. Diniz-Mendes¹, F.R. Guimarães¹, F.F.M. Ferreira¹, T.C. Shubo², M.P. Miagostovich¹, E. Lampe¹ and A.M.C. Gaspar¹

¹ Department of Virology, Oswaldo Cruz Institute, Rio de Janeiro, Brazil

² Diretoria de Administração, Serviço de Programas e Projetos Especiais, Oswaldo Cruz Foundation, Rio de Janeiro, Brazil

Keywords

HAV, real-time PCR, sewage, subgenotype IA, subgenotype IB.

Correspondence

Livia Melo Villar, Dept. of Virology, Av. Brasil 4365, 21045-900 Rio de Janeiro, RJ, Brasil. E-mail: lvillar@ioc.fiocruz.br

2007/0140: received 30 January 2007, revised 5 March 2007 and accepted 20 March 2007

doi:10.1111/j.1472-765X.2007.02164.x

Abstract

Aims: A one-year survey was conducted to examine hepatitis A virus (HAV) prevalence, distribution of genotypes and their relationship to bacterial indicators in raw and treated sewage samples.

Methods and Results: Fifty sewage samples (raw = 25 and treated = 25) were collected twice monthly from one sewage treatment plant in Rio de Janeiro. Virus concentration was performed by adsorption to an electronegative membrane followed by ultrafiltration. Viral RNA was detected by nested reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) and real-time PCR and positive products were directly sequenced. Total and faecal coliform concentrations were also determined. By nested RT-PCR, HAV RNA was detected in 16/50 (32%) and eight (16%) of them were found in treated sewage samples. By real-time PCR, HAV RNA was detected in 46/50 (92%) samples and 24 were from treated sewage. Phylogenetic analyses classified nine isolates (56%) as subgenotype IA and seven (44%) as IB.

Conclusions: Real-time PCR was more sensitive than nested RT-PCR; the presence of subgenotypes IA and IB was described and bacterial indicators cannot be used to predict HAV presence in sewage.

Significance and Impact of the Study: These results demonstrated that HAV still remains in the environment after sewage treatment and could play an important role in maintaining the endemicity of HAV infection.

Introduction

Hepatitis A virus (HAV) has been associated with many outbreaks of waterborne origin in communities and schools (De Serres *et al.* 1999; Villar *et al.* 2004). The traditional detection of viruses in water, including monitoring treatment removal efficiency, is carried out by a labour-intensive tissue culture methodology (American Public Health Association 1992) that shows lack of sensitivity, lengthy analysis time (up to 6 weeks) and problems in detecting low virus numbers, which is the typical situation in environmental water samples (Tsai *et al.* 1994).

Moreover, tissue culture is not applicable for primary isolation of wild-type HAV which makes this methodology not available for HAV detection in environment.

The use of molecular techniques, such as polymerase chain reaction (PCR), that is faster and more sensitive for the detection of viruses has been well documented in recent years (Tsai *et al.* 1993; Morace *et al.* 2002; Kittigul *et al.* 2006; Myrmel *et al.* 2006; Villar *et al.* 2006; De Paula *et al.* 2007). More recently, real-time PCR was also applied to quantify the presence of HAV in complex environmental matrices (Abd el-Galil *et al.* 2005; Brooks *et al.* 2005; Jothikumar *et al.* 2005; Villar *et al.* 2006; Rose *et al.*

2006; De Paula *et al.* 2007). This method improves the accuracy and sensitivity of traditional PCR by adding a fluorescently labelled probe so that the target gene can be detected and quantified without subsequent verification. Among the various quantitative PCR strategies available, those based on real-time monitoring of the amplification reaction are the most accurate (Kalinina *et al.* 1997).

These new methods offer several advantages such as rapid turnaround time and a high degree of sensitivity. Through enzymatic amplification, PCR is capable of detecting the viral genomic RNA in diluents containing less than 1 PFU (Tsai *et al.* 1993). Because the PCR does not require cell cultivation, it has been effectively used to detect viruses which are difficult to cultivate (Tsai *et al.* 1993; Morace *et al.* 2002; Kittigul *et al.* 2006; Myrmel *et al.* 2006) such as HAV from sewage samples (Vaidya *et al.* 2002; Pinto *et al.* 2007).

Therefore, the presence of HAV was assayed in raw and treated sewage samples at one treatment plant in Rio de Janeiro (Brazil) by nested and real-time PCR, and the possible HAV reduction by treatment was calculated throughout the year 2005. Furthermore, the genetic diversity of HAV present in sewage was investigated by nucleotide sequencing. The concentration of faecal and total coliform was also tested and the relationship between coliforms and HAV was determined.

Materials and methods

Water samples

From January to December 2005, 50 raw and treated sewage composite samples were collected biweekly from one activated sludge plant responsible for the urban sewage treatment of the city of Rio de Janeiro, Brazil. For each one, eight 250 ml deal were collected until form 2 l of sample stored in glass bottles.

The samples were delivered to the laboratory at the same day of collection and immediately analysed. Total and faecal coliforms were assayed by Colilert (IDEXX Laboratories, Westbrook, ME) according to the protocols described by the manufacturer. Temperature and pH of the samples were determined on site upon collection.

Concentration methods

Each 2 l of sewage sample was concentrated to detect HAV using the method described by Katayama *et al.* (2002) with the exception that we added 1.5 mmol of MgCl₂ and adjusted the pH to 5.0 with HCl. This method was previously evaluated to concentrate HAV (Villar *et al.* 2006) and it uses a HA-negatively charged membrane (Millipore, Burlington, MA, USA) and the eluate (10 ml)

was reconcentrated using a Centriprep YM-50 Concentrator (Millipore) to obtain a final volume of 2 ml.

Qualitative nested reverse transcription PCR and sequencing

Viral RNA was extracted from 140 µl of the eluate using the Qiagen Viral RNA KIT (Qiagen, Valencia, Spain). Reverse transcription was carried out at 37°C for 1 h using 10 µl of RNA, random primer (Invitrogen, Rockville, MD, USA) and Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase (Invitrogen). Then, VP1/2A region was amplified using nested reverse transcriptase (RT)-PCR as described elsewhere (De Paula *et al.* 2002). The sensitivity and specificity of primers to detect HAV RNA in water samples were previously demonstrated (Villar *et al.* 2006). The PCR products were loaded onto a 2% agarose gel, electrophoresed and stained with ethidium bromide to visualize bands (expected length, 247 bp). Amplicons were purified using the QIAquick Gel extraction kit (Qiagen) according to the manufacturer's recommendations. Direct nucleotide sequencing reaction was performed in both directions of HAV RNA-positive samples with a Big Dye Terminator kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) and an automatic DNA sequencer (ABI Prism 310; Applied Biosystems). The sequences reported in this paper have been deposited in the GenBank sequence database under the following accession numbers: EF204116 to EF204131.

Sequence analysis

The GCG software package, version 10.1 (Wisconsin Sequence Analysis Package; Genetic Computer Group, Madison, WI, USA), was used for editing, aligning of nucleotides and translation of nucleotides into amino acid sequences. Multiple alignments were initially performed with the Clustal X program (Thompson *et al.* 1997). A matrix was then generated to construct the Kimura two-parameter model (Felsenstein 1993). Using this matrix and the neighbour-joining method (Saitou and Nei 1987), a phylogenetic tree was generated, the reliability of which was assessed by bootstrap resampling (1000 pseudoreplicates). These methods were implemented using the MEGA 2.1 program (Kumar *et al.* 2001).

Quantitative PCR standard curve

The 5' noncoding region of the HAV genome was chosen to design the TaqMan assay. The primers, probe and reaction conditions were previously described (Villar *et al.* 2006; De Paula *et al.* 2007). All PCR reactions were carried out using the 7500 Real-Time PCR System (Applied

Biosystems). The RT step for the real-time assay was performed as described before for qualitative PCR.

Calculation of HAV and coliforms removal

The HAV removal was determined by dividing the result of the subtraction among HAV concentration found by TaqMan Assay in raw and treated sewage samples by the concentration found in the raw sewage samples. Total coliforms (TC) and faecal coliforms (FC) removal was determined the same way, by dividing the result of the subtraction value of coliforms found in raw and treated sewage samples by the concentration found in the raw sewage samples as was determined by Colilert.

Statistical analysis

Data are expressed as mean \pm SD. Statistical analysis was performed using the chi-square (χ^2) test for independence or with Yate's continuity correction. Differences between groups were considered to be statistically significant at $P < 0.05$. All calculations were undertaken by using SPSS version 8.0.

Results

HAV detection in sewage

Table 1 shows the water quality parameters of raw and treated sewage samples. For raw sewage samples, TC yielded a population density from 6.3×10^7 to 2×10^9 most probable number (MPN) ml^{-1} , the density of FC ranged from 5.5×10^6 to 8.2×10^7 MPN ml^{-1} , but TC and FC mean values did not show any seasonal variation. HAV was detected by nested PCR in 8 of 25 raw samples, and a tiny high positivity was observed during autumn (4/7) and spring (3/6). By real-time PCR, viral load ranged from 1.2×10^2 to 8.9×10^2 copies ml^{-1} , summer presented

the highest mean value (8.9×10^2 copies ml^{-1}) and HAV RNA was detected in 22 samples (88%).

For treated sewage samples, TC concentration ranged from 1×10^5 to 2×10^6 MPN ml^{-1} , and FC concentration ranged from 1.1×10^4 to 4.5×10^4 MPN ml^{-1} , but the mean values of TC and FC did not show any seasonal variation. HAV was detected by nested PCR in 8 of 25 treated samples, the highest positivity was observed during spring (3/6) and by real-time PCR the viral load ranged from 1.7×10^2 to 3.8×10^2 copies ml^{-1} , 24 samples were positive (96%) and a higher mean value was observed in autumn (3.8×10^2 copies ml^{-1}). None of these variables were statistically significant in relation to positivity to nested and real-time PCR.

Efficiency of the treatment

After primary (sedimentation) and biological (activated sludge) secondary treatment, 99.9% of TC and 99.9% of FC were removed, but only 42.3% of HAV. These results demonstrated that sewage treatment was efficient to reduce a high concentration of TC and FC but it was not efficient to reduce HAV particles. The mean concentration of TC was 5.7×10^7 MPN ml^{-1} in HAV-positive raw sewage samples, while it was 4.3×10^7 MPN ml^{-1} in HAV-negative raw sewage samples. The mean concentration of FC was 3.2×10^4 MPN ml^{-1} for HAV-positive treated sewage samples while it was 3.7×10^4 MPN ml^{-1} for HAV-negative treated sewage samples. These results showed that there was no association between bacterial indicators concentration and HAV detection showing that these indicators cannot predict the presence of HAV.

Phylogenetic analysis of HAV in sewage water samples

A total of 16 out of 50 samples were HAV RNA-positive by nested RT-PCR and were submitted to nucleotide sequencing in order to confirm the presence of HAV

Table 1 Water quality parameters and HAV detection by nested and real-time PCR in raw and treated sewage

| Season | Type | pH | Temperature (°C)* | Total coliforms (MPN ml^{-1})* | Faecal coliforms (MPN ml^{-1})* | Real-time PCR (copies ml^{-1})* | Real-time PCR (n total ⁻¹) | Nested PCR (n total ⁻¹) | Genotypes (n type ⁻¹) |
|--------|----------------|-----|-------------------|--|---|---|--|-------------------------------------|-----------------------------------|
| Summer | Raw sewage | 6 | 27.7 | 6.3×10^7 | 5.5×10^6 | 8.9×10^2 | 6/6 | 1/6 | 1(IA) |
| | Treated sewage | 6 | 28.5 | 1.8×10^5 | 4.1×10^4 | 2.7×10^2 | 6/6 | 2/6 | 2(II) |
| Autumn | Raw sewage | 6.2 | 25 | 1.8×10^9 | 7.8×10^7 | 6.9×10^2 | 7/7 | 4/7 | 2(IA)/2(II) |
| | Treated sewage | 6 | 27.8 | 1×10^5 | 1.1×10^4 | 3.8×10^2 | 7/7 | 1/7 | 1(II) |
| Winter | Raw sewage | 6 | 25.5 | 2×10^9 | 2.7×10^7 | 3.3×10^2 | 5/6 | 0/6 | ND |
| | Treated sewage | 5.7 | 25.1 | 2×10^6 | 4.2×10^4 | 3.6×10^2 | 6/6 | 2/6 | 2(II) |
| Spring | Raw sewage | 6.5 | 25.3 | 1×10^9 | 8.2×10^7 | 1.2×10^2 | 4/6 | 3/6 | 3(IA) |
| | Treated sewage | 5.5 | 25.8 | 2×10^6 | 4.5×10^4 | 1.7×10^2 | 5/6 | 3/6 | 3(IA) |

*Mean values are shown.

ND, not detected; HAV, hepatitis A virus; PCR, polymerase chain reaction; MPN, most probable number

RNA and to carry out the genotyping. A BLAST software evaluation of the 218-bp fragment (positions 3024–3191) indicated that HAV RNA-positive samples showed homologies: 85.3–96.3% to the HAV strain HAS-15 and 88.5–100% to strain HM-175. Figure 1 shows the phylogenetic tree of nucleotide sequences from the 16 positive samples, together with 13 HAV strains selected randomly from environment and Brazilian patients, as well as six reference sequences from HAV subgenotypes IA, IB, IIA, IIB, IIIA and IIIB. Nine samples belong to subgenotype IA and seven samples to subgenotype IB. In the raw sewage samples, subgenotype IA was found in 6/8 samples while in the treated sewage samples subgenotype IB was found in 5/8 samples.

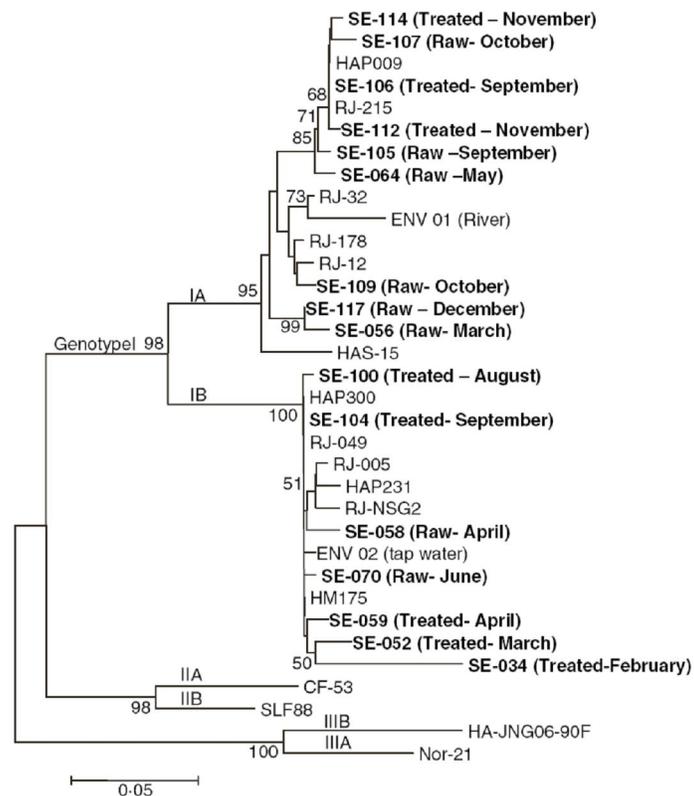
Identity among nucleotide sequence of sewage isolates and the river water isolate previously in Rio de Janeiro (Villar *et al.* 2006) varied from 84.9% to 95%. Identity among sewage isolates and the tap water isolate from a day care centre experienced an outbreak in the year 2004 (Rio de Janeiro) (Villar *et al.* 2006) and it varied from 88.1% to 99.5%. A comparison of the predicted amino

acid sequences of the VP1/2A region from sewage isolates demonstrated an identity to HAS-15 from 86.1% to 100% and related to HM-175 from 87.5% to 100%. Identity among amino acid sequences from sewage samples was from 87.5% to 100% (data not shown).

Discussion

HAV has also been detected in raw urban sewage in other countries, such as India and Italy (Morace *et al.* 2002; Vaidya *et al.* 2002). In the present study, HAV was detected by nested RT-PCR in 16/50 (32%) and by real-time PCR in 46/50 (92%) sewage samples. This high rate of HAV positivity provides convincing evidence that HAV infection is widespread in the Brazilian environment. Since, the prevalence of infection has diminished (Vital *et al.* 2006), outbreaks of hepatitis A still occur in Brazil, as documented in the last years (Villar *et al.* 2004; Morais *et al.* 2006). HAV prevalence determined by nested RT-PCR in this study (32%) was high compared with the study conducted by Vaidya *et al.* (2002) in India

Figure 1 Phylogenetic relationship of sewage (SE) hepatitis A virus (HAV) isolates (represented in bold). A 218-bp segment of the HAV virion protein VP1/2A genome region was analysed using the two-parameter model of Kimura. The numbers at nodes indicate bootstrap percentages after 1000 replicate samplings. Only percentages > 50% are shown. The numbers in parentheses show the type of specimen and month of collection. Genotypes and subgenotypes are indicated for each branch. Reference sequences from GenBank included isolates belonging to genotypes IA (HAS-15, accession number X15464), IB (HM-175, M14707), IIA (CF53/Berne, L07693), IIB (SLF88, AY032861), IIIA (NOR-21, AJ299464) and IIIB (HA-JNG06-90F, AB258387). Bar, genetic distance: 0.05.



(24-42%), but it was low compared with data obtained in sewage samples from Cairo city (71%) (Pinto *et al.* 2007). These differences in HAV prevalence could be related to the different epidemiology of HAV infection in these different geographical areas, as well as to the methods used to concentrate and detect HAV in the sewage samples.

In this study, we showed the applicability of molecular methods to detect HAV RNA in sewage samples, especially TaqMan PCR system which is highly sensitive to detect and enumerate HAV RNA as it detects HAV in 46 samples showing 92% prevalence. Moreover, the present study showed no correlation between viral contamination and bacterial indicators using PCR as it was demonstrated by other researchers (Skraber *et al.* 2004; Choi and Jiang 2005) and that sewage treatment was efficient to reduce coliforms, but not to reduce virus that can persist in the environment longer than bacteria (Lucena *et al.* 2004). So risks based on bacterial standards may seriously underestimate the risk of virus-associated waterborne illness (Noble and Fuhrman 2001; Jiang and Chu 2004).

The presence of subgenotypes IA and IB was observed in Brazilian sewage as it was previously demonstrated among sera collected from patients with acute hepatitis (De Paula *et al.* 2002, 2004; Villar *et al.* 2004) and from water collected from river and tap water in Brazil (Villar *et al.* 2006; De Paula *et al.* 2007). Furthermore, close genetic relationship was observed among sewage and clinical and environmental isolates showing that HAV strains have been disseminated into the environment in our region. The presence of subgenotypes IA, IB and IIIA was demonstrated in Spain sewage reflecting the diversity of HAV in the environment such as in clinical patients (Pina *et al.* 2001).

Conclusion

The present study describes the first detection of HAV in sewage samples in Rio de Janeiro, Brazil, showing that, although the efficiency of sewage treatment was good to eliminate bacterial indicators, it was not efficient to eliminate HAV. As the virus still persists in the sewage it probably constitutes one important source of HAV dissemination in the environment. No correlation was observed among coliforms and HAV presence showing that these indicators could not be used to indicate HAV presence. The presence of two subgenotypes IA and IB was demonstrated in the sewage samples. Real-time PCR and nested RT-PCR were suitable to detect HAV in raw and treated sewage samples, however real-time PCR was more sensitive and it could enumerate HAV RNA showing in this way the efficiency of sewage treatment. Monitoring the presence of virus is a critical component of the evaluation of the quality of sewage in the environment.

Acknowledgements

This study received financial support from the following Brazilian agencies: CNPq, National Council for Scientific and Technological Development (project number: CNPq 472112/2004-0); Fiocruz, Oswaldo Cruz Foundation; and CAPES, Office of the Coordinator for the Advancement of Upper-Level Personnel.

References

- Abd el-Galil, K.H., el-Sokkary, M.A., Kheira, S.M., Salazar, A.M., Yates, M.V., Chen, W. and Mulchandani, A. (2005) Real-time nucleic acid sequence-based amplification assay for detection of hepatitis A virus. *Appl Environ Microbiol* **71**, 7113–7116.
- American Public Health Association. (1992) *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, 18th edn. Washington, D.C.: American Public Health Association.
- Brooks, H.A., Gersberg, R.M. and Dhar, A.K. (2005) Detection and quantification of hepatitis A virus in seawater via real-time PCR. *J Virol Methods* **127**, 109–118.
- Choi, S. and Jiang, S.C. (2005) Real-time PCR quantification of human adenoviruses in urban rivers indicates genome prevalence but low infectivity. *Appl Environ Microbiol* **71**, 7426–7433.
- De Paula, V.S., Baptista, M.L., Lampe, E., Niel, C. and Gaspar, A.M. (2002) Characterization of hepatitis A virus isolates from subgenotypes IA and IB in Rio de Janeiro, Brazil. *J Med Virol* **66**, 22–27.
- De Paula, V.S., Lu, L., Niel, C., Gaspar, A.M. and Robertson, B.H. (2004) Genetic analysis of hepatitis A virus isolates from Brazil. *J Med Virol* **73**, 378–383.
- De Paula, V.S., Diniz-Mendes, L., Villar, L.M., Luz, S.B., Silva, L.A., Jesus, M.S., da Silva, N.M.V.S. and Gaspar, A.M.C. (2007) Hepatitis A virus in environmental water samples from the Amazon Basin. *Water Res* **41**, 1169–1176.
- De Serres, G., Cromeans, T.L., Levesque, B., Brassard, N., Barthe, C., Dionne, M., Prud'homme, H., Paradis, D., *et al.* (1999) Molecular confirmation of hepatitis A virus from well water: epidemiology and public health implications. *J Infect Dis* **179**, 37–43.
- Felsenstein, J. (1993) *Phylogenetic Inference Package*, Version 3.5. Seattle, WA: Department of Genetics, University of Washington.
- Jiang, S.C. and Chu, W. (2004) PCR detection of pathogenic viruses in southern California urban rivers. *J Appl Microbiol* **97**, 17–28.
- Jothikumar, N., Cromeans, T.L., Sobsey, M.D. and Robertson, B.H. (2005) Development and evaluation of a broadly reactive TaqMan assay for rapid detection of hepatitis A virus. *Appl Environ Microbiol* **71**, 3359–3363.
- Kalinina, O., Lebedeva, I., Brown, J. and Silver, J. (1997) Nanoliter scale PCR with TaqMan detection. *Nucleic Acids Res* **25**, 1999–2004.

- Katayama, H., Shimasaki, A. and Ohgaki, S. (2002) Development of a virus concentration method and its application to detection of enterovirus and Norwalk virus from coastal seawater. *Appl Environ Microbiol* **68**, 1033–1039.
- Kittigul, L., Uthaisin, A., Ekchaloemkiet, S., Utrarachkij, F. and Luksamijarulkul, P. (2006) Detection and characterization of hepatitis A virus in water samples in Thailand. *J Appl Microbiol* **100**, 1318–1323.
- Kumar, S., Tamura, K., Jakobsen, I.B. and Nei, M. (2001) MEGA 2: molecular evolutionary genetics analysis software. *Bioinformatics* **17**, 1244–1245.
- Lucena, F., Duran, A.E., Moron, A., Calderon, E., Campos, C., Gantzer, C., Skrabber, S. and Jofre, J. (2004) Reduction of bacterial indicators and bacteriophages infecting faecal bacteria in primary and secondary wastewater treatments. *J Appl Microbiol* **97**, 1069–1076.
- Morace, G., Aulicino, F.A., Angelozzi, C., Constanzo, L., Donadio, F. and Rapicetta, M. (2002) Microbial quality of wastewater: detection of hepatitis A virus by reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *J Appl Microbiol* **92**, 828–836.
- Morais, L.M., De Paula, V.S., Arantes, M.R., Oliveira, M.L. and Gaspar, A.M. (2006) Early infection and asymptomatic spread of hepatitis A virus in a public child care center in Rio de Janeiro, Brazil: should attending children under two years of age be vaccinated? *Mem Inst Oswaldo Cruz* **101**, 401–405.
- Myrmel, M., Berg, E.M., Grinde, B. and Rimstad, E. (2006) Enteric viruses in inlet and outlet samples from sewage treatment plants. *J Water Health* **4**, 197–209.
- Noble, R.T. and Fuhrman, J.A. (2001) Enteroviruses detected by reverse transcriptase polymerase chain reaction from the coastal waters of Santa Monica Bay, California: low correlation to bacterial indicator levels. *Hydrobiologia* **460**, 175–184.
- Pina, S., Buti, M., Jardi, R., Clemente-Casares, P., Jofre, J. and Girones, R. (2001) Genetic analysis of hepatitis A virus strains recovered from the environment and from patients with acute hepatitis. *J Gen Virol* **82**, 2955–2963.
- Pinto, R.M., Alegre, D., Dominguez, A., El-Senousy, W.M., Sanchez, G., Villena, C., Costafreda, M.I., Aragones, L., et al. (2007) Hepatitis A virus in urban sewage from two Mediterranean countries. *Epidemiol Infect* **135**, 270–273.
- Rose, M.A., Dhar, A.K., Brooks, H.A., Zecchini, F. and Gersberg, R.M. (2006) Quantitation of hepatitis A virus and enterovirus levels in the lagoon canals and Lido beach of Venice, Italy, using real-time RT-PCR. *Water Res* **40**, 2387–2396.
- Saitou, N. and Nei, M. (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* **4**, 406–425.
- Skraber, S., Gassilloud, B. and Gantzer, C. (2004) Comparison of coliforms and coliphages as tools for assessment of viral contamination in river water. *Appl Environ Microbiol* **70**, 3644–3649.
- Thompson, J.D., Gibson, T.J., Plewniak, F., Jeanmougin, F. and Higgins, D.G. (1997) The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res* **25**, 4876–4882.
- Tsai, Y.-L., Sobsey, M.D., Sangermano, L.R. and Palmer, C.J. (1993) Simple method of concentrating enteroviruses and hepatitis A virus from sewage and ocean water for rapid detection by reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Appl Environ Microbiol* **59**, 3488–3491.
- Tsai, Y.L., Tran, B., Sangermano, L.R. and Palmer, C.J. (1994) Detection of poliovirus, hepatitis A virus, and rotavirus from sewage and ocean water by triplex reverse transcriptase PCR. *Appl Environ Microbiol* **60**, 2400–2407.
- Vaidya, S.R., Chitambar, S.D. and Arankalle, V.A. (2002) Polymerase chain reaction-based prevalence of hepatitis A, hepatitis E and TT viruses in sewage from an endemic area. *J Hepatol* **37**, 131–136.
- Villar, L.M., Meyer, A., Lampe, E. and Gaspar, A.M.C. (2004) Genetic variability of hepatitis A virus isolates in Rio de Janeiro: implications for the vaccination of school children. *Braz J Med Biol Res* **37**, 1779–1787.
- Villar, L.M., De Paula, V.S., Diniz-Mendes, L., Lampe, E. and Gaspar, A.M. (2006) Evaluation of methods used to concentrate and detect hepatitis A virus in water samples. *J Virol Methods* **137**, 169–176.
- Vitral, C.L., Gaspar, A.M. and Souto, F.J. (2006) Epidemiological pattern and mortality rates for hepatitis A in Brazil, 1980–2002 – a review. *Mem Inst Oswaldo Cruz* **101**, 119–127.