

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**Andrêssa Silvino Ferreira Assis**

**ROTAVÍRUS EM ÁGUAS SUPERFICIAIS DA BACIA HIDROGRÁFICA  
DO CÓRREGO SÃO PEDRO, JUIZ DE FORA, MG**

Juiz de Fora  
2013

**ANDRÊSSA SILVINO FERREIRA ASSIS**

**ROTAVÍRUS EM ÁGUAS SUPERFICIAIS DA BACIA HIDROGRÁFICA  
DO CÓRREGO SÃO PEDRO, JUIZ DE FORA, MG**

Dissertação de Mestrado do Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, para obtenção do Título de Mestre em Ciências Biológicas na área de Imunologia e Doenças Infecto-Parasitárias.

**Orientadora: Dr<sup>a</sup>. Maria Luzia da Rosa e Silva**  
**Co-orientadores: Dr. Marcelo Henrique Otenio**  
**Dr<sup>a</sup>. Marize Pereira Miagostovich**

Juiz de Fora

2013

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de geração automática da Biblioteca Universitária da UFJF, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Assis, Andrêssa Silvino Ferreira.

ROTAVÍRUS EM ÁGUAS SUPERFICIAIS DA BACIA HIDROGRÁFICA DO CÓRREGO SÃO PEDRO, JUIZ DE FORA, MG / Andrêssa Silvino Ferreira Assis. -- 2013.

108 f. : il.

Orientadora: Maria Luzia da Rosa e Silva

Coorientador: Marcelo Henrique Otenio

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Imunologia e Genética, 2013.

1. Rotavírus. 2. Águas de Superfície. 3. Reação em Cadeia da Polimerase. 4. Vigilância Ambiental. I. Rosa e Silva, Maria Luzia da, orient. II. Otenio, Marcelo Henrique, coorient. III. Título.

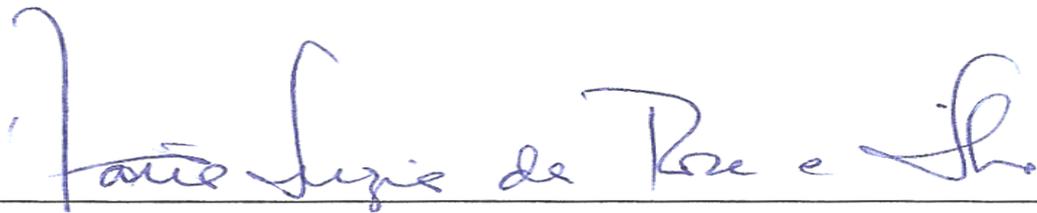
Andrêssa Silvino Ferreira Assis

**ROTAVÍRUS EM ÁGUAS SUPERFICIAIS DA BACIA HIDROGRÁFICA  
DO CÓRREGO SÃO PEDRO, JUIZ DE FORA, MG**

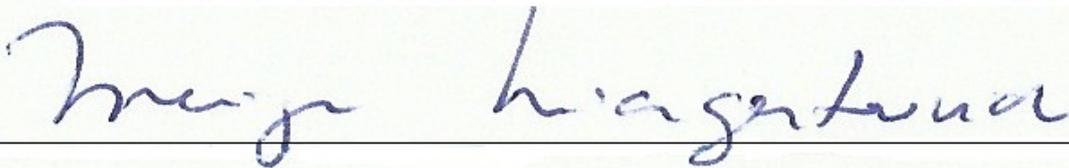
Dissertação de Mestrado do Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, para obtenção do Título de Mestre em Ciências Biológicas na área de Imunologia e Doenças Infecto-Parasitárias.

Aprovado em 21 de fevereiro de 2013.

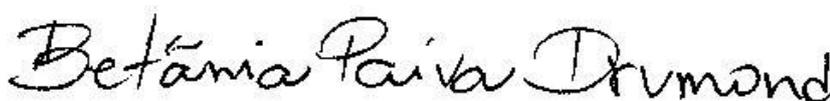
BANCA EXAMINADORA



Dra. Maria Luzia da Rosa e Silva (Orientadora)  
Universidade Federal de Juiz de Fora



Dra. Marize Pereira Miagostovich  
Instituto Oswaldo Cruz (IOC) / FIOCRUZ



Dra. Betânia Paiva Drumond  
Universidade Federal de Juiz de Fora

À minha família, que não mediu esforços para  
me auxiliar sempre que foi preciso.  
E a Deus, minha fortaleza e meu refúgio em  
todos os momentos.

## AGRADECIMENTOS

Ao meu marido Mayko pelo amor, companheirismo e confiança. Obrigada por dividir comigo todas as decepções, as angústias e as alegrias da “vida científica”.

Aos meus pais Lígia e Antônio, que no seu jeito simples de ver a vida me ensinaram a lutar para alcançar todos os objetivos almejados.

Aos meus irmãos Renata e João Vitor, ao meu cunhado Evaldo e ao meu afilhado Guilherme, pela companhia e torcida em todas as horas.

Ao meu avô, tios, tias, primos e primas que, mesmo não entendendo muito bem o que eu faço, acreditam em meus sonhos e torcem pelo meu sucesso. Especialmente, a minha querida avó, Zilda (Saudades), que iluminou a minha vida com seu amor, carinho e atenção.

A minha orientadora Dr<sup>a</sup>. Maria Luzia da Rosa e Silva, meus sinceros agradecimentos pela confiança, amizade e ensinamentos repassados ao longo destes seis anos de convívio. Foram muitos obstáculos, mas também muitas conquistas, o que me faz ter orgulho de participar da sua equipe de pesquisa e ter muita vontade de continuar.

Ao Laboratório de Virologia Comparada e Ambiental da FIOCRUZ-RJ, especialmente, ao Dr. José Paulo Gagliardi Leite e à Dr<sup>a</sup>. Marize Pereira Miagostovich, pela grande colaboração e suporte científico, que permitiu a concretização deste trabalho. Agradeço, ainda, à Carmen Baur Vieira por me receber na FIOCRUZ, ensinar a “arte de concentrar vírus na água” e responder a todos os milhões de e-mail, sempre cheios de dúvidas e à Marcelle Figueira Marques da Silva, pelo auxílio nos primeiros passos da edição de sequências.

À Embrapa Gado de Leite de Juiz de Fora, especialmente, ao Dr. Marcelo Henrique Otenio por acreditar no meu potencial e viabilizar o desenvolvimento deste trabalho, com apoio financeiro e contribuições científicas.

Ao Presidente da Companhia de Saneamento Municipal (Cesama), André Borges de Souza, que possibilitou o nosso acesso ao reservatório de abastecimento da represa de São Pedro.

Ao Major Luiz André Braidá Ribeiro, comandante da 4<sup>a</sup> Companhia de Polícia Militar Independente de Meio Ambiente e Trânsito Rodoviário de Juiz de Fora, que disponibilizou barco e efetivo para a primeira coleta no reservatório da represa.

Ao Tenente Coronel Anderson Luiz Esteves Gomes, comandante do 4<sup>o</sup> Batalhão de Bombeiros Militar de Juiz de Fora, que disponibilizou barco e efetivo para as demais coletas no reservatório da represa, permitindo a análise deste manancial, com segurança.

À Dr<sup>a</sup> Miriam Aparecida de Oliveira Pinto, coordenadora do Laboratório de Análises de Alimentos e Água (LAAA) da Faculdade Farmácia da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF), e à Martha Eunice de Bessa, bioquímica responsável pelas análises microbiológicas de qualidade da água.

Ao Dr. Celso Bandeira, que com seus conhecimentos auxiliou na determinação dos pontos de coleta e à Flaviane Cândida, que nos ensinou a localizar cada um deles.

Ao Sr. Pelé, por nos guiar nas coletas do Córrego Grota do Pinto, dentro de sua propriedade.

À Dr<sup>a</sup>. Aline Siqueira Ferreira, pelo grande apoio na análise estatística dos dados obtidos neste estudo.

Aos mestres e colegas do Departamento de Microbiologia do ICB/UFJF, por toda a atenção e incentivo. Em especial, à Betânia Paiva Drummond, minha sincera gratidão por contribuir de forma ímpar em minha formação.

Aos meus colegas do Laboratório de Virologia ICB-UFJF, pelas tardes divertidas que trouxeram muito aprendizado. Em especial, ao Lucas, que foi fundamental nas exaustivas coletas de campo.

À Coordenação da Pós-Graduação em Ciências Biológicas e aos professores do programa, pelos valiosos ensinamentos transmitidos.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e à Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) pelo suporte financeiro, que tornou possível a concretização dos ensaios e a minha dedicação plena a este trabalho.

"O mais competente não discute,  
domina a sua ciência e cala-se."

Voltaire

## RESUMO

A descarga contínua de esgoto doméstico, *in natura*, nos mananciais aquáticos constitui um importante risco à saúde pública, já que as fezes humanas podem conter patógenos entéricos que contaminam e são disseminados pela água. É importante conhecer a qualidade microbiológica da água utilizada pela população, porém, os parâmetros avaliados para exposição humana a águas naturais, incluem apenas indicadores bacteriológicos, desconsiderando a presença de vírus. Assim, este estudo teve como objetivos verificar a presença de rotavírus do grupo A (RV-A) nas águas superficiais da bacia hidrográfica do Córrego São Pedro (BHCSF), bem como avaliar a eficiência das técnicas de detecção utilizadas e a influência da área e da época da coleta e dos parâmetros microbiológicos e físico-químicos de qualidade da água, na presença dos mesmos. No período de julho de 2011 a maio de 2012, foram realizadas seis coletas (três na época seca e três na época úmida), nas quais amostras de águas de superfície da BHCSF, foram tomadas em oito pontos georreferenciados (quatro em área não urbanizada e quatro em área urbanizada) totalizando 48 amostras. Parâmetros físico-químicos e microbiológicos de qualidade da água foram determinados em todas as coletas, nas águas de todos os pontos. As amostras de água foram concentradas pelo método de adsorção-eluição em membrana com carga negativa e os concentrados obtidos, submetidos à PCR qualitativa e quantitativa. RV-A foram detectados em 62,5% (30/48) das amostras testadas, com carga viral variando de  $4,74 \times 10^2$  a  $6,36 \times 10^4$  cópias de genoma/L. A técnica de PCR em tempo real foi a mais sensível na detecção do vírus ( $p=0,001$ ). As análises estatísticas mostraram que houve influência da área de coleta, tanto na detecção de RV-A ( $p < 0,001$ ), quanto na carga viral ( $p < 0,001$ ), indicando uma maior probabilidade de encontrar amostras positivas, com carga mais elevada, na área urbanizada da bacia, onde há vários pontos de descarga de esgoto bruto. Não houve influência da época de coleta na detecção ( $p = 0,371$ ) e na carga viral ( $p = 0,297$ ). A presença de RV-A foi observada em 50,0% (11/22) das amostras consideradas dentro do limite estabelecido para coliforme termotolerante em água doce de classe 1 e 2, comprovando que este padrão, não garante a ausência de RV-A. Foram observadas associações significativas entre a presença de RVA e a turbidez ( $p = 0,005$ ), o teor de nitrogênio amoniacal ( $p < 0,001$ ) e o teor de fósforo ( $p < 0,001$ ). Observou-se, ainda, uma correlação positiva e fraca entre a carga de RV-A e os parâmetros salinidade ( $r = 0,024$   $p = 0,325$ ) e temperatura da água ( $p = 0,027$ ,  $r = 0,320$ ). Os dados obtidos indicam que o padrão microbiológico, oficialmente utilizado para determinar a qualidade da água, não garante a ausência de patógenos virais, sendo necessário se estabelecer um sistema de vigilância ambiental de vírus entéricos em águas de superfície, de modo a aumentar a segurança da utilização deste recurso, para as diversas finalidades.

Descritores: Rotavírus, Águas de Superfície, Reação em Cadeia da Polimerase, Vigilância Ambiental.

## ABSTRACT

The continuous discharge of domestic sewage "in natura" in spring waters is regarded as a major risk to public health, since the human feces can contain enteric pathogens that contaminate water and are spread by through it. It is important to know the quality of water used by the population, however the parameters analyzed for human exposure to natural waters include bacteriological indicators only, disregarding the presence of viruses. Thus, this study investigated the contamination of spring waters of the drainage basin of the São Pedro (BHCSP) by group A rotavirus (RV-A), as well as checking the efficiency of the detection techniques and the presence of correlation between these viruses and microbiological parameters and physicochemical water quality. From July 2011 to May 2012, surface waters samples were taken in eight georeferenced points (four in non-urbanized area and four in urbanized area), in six campaigns (three in the dry season and the three in wet season), totaling 48 samples. Physicochemical and microbiological parameters of water quality were determined in all collections, in the samples of waters of all points. The samples were concentrated using an adsorption-elution method with a negatively charged membrane and the concentrates were subjected to qualitative and quantitative PCR. RV-A were detected in 62,5% (30/48) of the studied samples with the viral load ranging from  $4,74 \times 10^2$  -  $6,36 \times 10^4$  genomes copies/L. The real time PCR was more sensitive in detecting virus ( $p = 0,001$ ). Statistical analyzes showed that the presence of RV-A ( $p < 0,001$ ) and viral load ( $p < 0,001$ ) were influenced by the collection area, indicating a greater likelihood of finding positive samples with higher load in urbanized area of the basin, where there is discharge of raw sewage. There were no associations between detection ( $p = 0,371$ ) and viral load ( $p = 0,297$ ) with the season of collection. The presence of RV-A was observed in 50.0% (11/22) of samples considered within the limit established by thermotolerant coliforms in freshwater class 1 and 2 demonstrate, therefore, that this pattern does not guarantee the absence of human enteric viruses. Measured physicochemical parameters displayed significant associations between the presence RVA and turbidity ( $p = 0.005$ ), content of ammonia nitrogen ( $p < 0.001$ ) and content of phosphorus ( $p < 0.001$ ). It was also observed a weak positive correlation between viral load the RV-A and the salinity parameters ( $r = 0.024$   $p = 0.325$ ) and water temperature ( $p = 0.027$ ,  $r = 0.320$ ). These data indicate that the microbiological standard officially used to determine the water quality does not ensure the absence of viral pathogens, being necessary to establish an environment surveillance of enteric viruses in surface waters, in order to increase the safety of using this aquatic matrices for many purposes.

Keywords: Rotavirus, Surface Waters, Polymerase Chain Reaction, Environmental surveillance.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1</b>	Microscopia eletrônica de partículas de rotavírus.....	21
<b>Figura 2</b>	Organização do genoma e da partícula de rotavírus.....	22
<b>Figura 3</b>	Representação esquemática do ciclo de replicação dos rotavírus.....	26
<b>Figura 4</b>	Diagrama ilustrando os mecanismos de patogênese da rotavirose.....	30
<b>Figura 5</b>	Funções da NSP4: intracelular (A) e extracelular (B).....	31
<b>Figura 6</b>	Localização da Bacia Hidrográfica do Córrego São Pedro (BHCSP), indicando suas sub-bacias.....	49
<b>Figura 7A</b>	Distribuição dos pontos de coleta na Bacia Hidrográfica do Córrego São Pedro.....	51
<b>Figura 7B</b>	Mapa geográfico da Bacia Hidrográfica do Córrego São Pedro, localizada no município de Juiz de Fora, MG, com destaque para os pontos de coletas georreferenciados.....	52
<b>Figura 8</b>	Fluxograma com as etapas realizadas para concentração viral.....	54
<b>Figura 9</b>	Sistema de filtração Millipore®.....	54
<b>Figura 10</b>	Concentrador Centriprep® YM-50, Millipore®.....	55
<b>Figura 11</b>	Detecção de rotavírus do grupo A nos 48 concentrados obtidos, utilizando-se as metodologias de PCR convencional, Nested PCR e PCR em tempo real.....	67
<b>Figura 12</b>	Média dos valores dos parâmetros físico-químicos – pH, temperatura, salinidade e condutividade, em todos os pontos analisados.....	72
<b>Figura 13</b>	Valores de cloro (mg/L) por ponto, obtidos em cada coleta, no período de julho de 2011 a maio de 2012.....	73
<b>Figura 14</b>	Valores de turbidez (UNT) por ponto, obtidos em cada coleta, no período de julho de 2011 a maio de 2012.....	74
<b>Figura 15</b>	Média dos valores dos parâmetros físico-químicos –oxigênio dissolvido, dureza e cloreto em todos os pontos analisados.....	75
<b>Figura 16</b>	Média dos valores dos parâmetros físico-químicos – ferro, fósforo e nitrogênio amoniacal em todos os pontos analisados.....	76

## LISTA DE TABELAS E QUADROS

<b>Tabela 1</b>	Descrição dos segmentos genômicos dos rotavírus e das proteínas estruturais e não estruturais codificadas pelos mesmos.....	23
<b>Quadro 1</b>	Valores de <i>cut-off</i> de percentagem de identidade nucleotídica que definem os diferentes genótipos de rotavírus do grupo A.....	25
<b>Tabela 2</b>	Classificação das águas doces, segundo Resolução nº357/2005 do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA).....	43
<b>Quadro 2</b>	Reagentes utilizados na reação da transcrição reversa para síntese de cDNA a partir do RNA total extraído.....	57
<b>Quadro 3</b>	Sequência de iniciadores de cadeia utilizados na cPCR para amplificação parcial do gene que codifica para a proteína VP6 de rotavírus do grupo A.....	58
<b>Quadro 4</b>	Reagentes utilizados na cPCR para amplificação parcial do gene que codifica para a proteína VP6 de rotavírus do grupo A.....	58
<b>Quadro 5</b>	Sequência de iniciadores de cadeia utilizados na <i>Nested-PCR</i> para amplificação parcial do gene que codifica para a proteína VP6 de rotavírus do grupo A.....	59
<b>Quadro 6</b>	Reagentes utilizados na <i>Nested-PCR</i> para amplificação parcial do gene que codifica para a proteína VP6 de rotavírus do grupo A.....	60
<b>Quadro 7</b>	Sequência de iniciadores de cadeia e sonda, utilizados na qPCR para amplificação parcial do gene que codifica para a proteína não estrutural NSP3 de rotavírus do grupo A.....	61
<b>Quadro 8</b>	Reagentes utilizados no qPCR para amplificação parcial do segmento que codifica para a proteína NSP3 de rotavírus do grupo A.....	62
<b>Quadro 9</b>	Valores limites estabelecidos para os parâmetros abaixo relacionados, nas águas de classes 1 e 2, pela Resolução nº357/2005 do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA).....	65
<b>Tabela 3</b>	Eficiência do método de concentração viral na detecção de rotavírus do grupo A.....	66
<b>Tabela 4</b>	Detecção de rotavírus do grupo A nos concentrados obtidos na Bacia Hidrográfica do Córrego São Pedro, por área, ponto e época de coleta.....	68
<b>Tabela 5</b>	Carga viral dos concentrados positivos para rotavírus do grupo A por área, ponto e época de coleta.....	68
<b>Tabela 6</b>	Contagem de coliformes termotolerantes nas amostras coletadas na Bacia Hidrográfica do Córrego São Pedro, nas diferentes áreas, pontos e época de coleta.....	69

<b>Tabela 7</b>	Valores médios $\pm$ desvio padrão, valores mínimo e máximo dos parâmetros físico-químicos analisados nas 48 amostras de água obtidas na Bacia Hidrográfica do Córrego São Pedro, no período de julho de 2011 a maio de 2012.....	71
-----------------	---	----

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AL	Aglutinação em Látex
BHCSP	Bacia Hidrográfica do Córrego de São Pedro
BLAST	“Basic Local Alignment Search Tool” – Ferramenta de busca de alinhamento local
°C	Graus Celsius
Ca <sup>2+</sup>	Cálcio
cDNA	DNA complementar
cm	Centímetros
cg	Cópias de genoma
Cl <sup>-</sup>	Cloreto
CONAMA	Conselho Nacional do Meio Ambiente
COPAM	Conselho Estadual de Políticas Ambientais
cPCR	Reação em cadeia da polimerase convencional
DLP	“Double Layered Particle” – partícula de dupla camada
DMSO	Dimetil sulfóxido
DNA	“Deoxyribonucleic acid” – ácido desoxirribonucleico
dNTP	Desoxinucleotídeos trifosfatados
dsRNA	“double-stranded RNA” – RNA de dupla fita
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EIE	Ensaio imunoenzimático
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
eNSP4	NSP4 com funções extracelulares
EUA	Estados Unidos da América
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
g	Força centrífuga relativa
HCl	Ácido clorídrico
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Ácido sulfúrico
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IME	Imunomicroscopia eletrônica
iNSP4	NSP4 com funções intracelulares
IP <sub>3</sub>	Trifosfato de inositol
Km	quilômetro
Km <sup>2</sup>	quilômetros quadrados
L	Litro

m	Metros
M	Molar
µg	Micrograma
ME	Microscopia eletrônica
mg	Miligrama
MgCl <sub>2</sub>	Cloreto de magnésio
mL	Mililitro
µL	Microlitros
µm	Micrometros
µM	Micromolar
mm	Milímetros
mM	Milimolar
mRNA	RNA mensageiro
mS	Milisiemens
N	Normal
NCBI	“National Center for Biotechnology Information” – Centro Nacional de Informações Biotecnológicas
NaOH	Hidróxido de sódio
nm	Nanômetros
NMP	Número mais que provável
NSP	“Non Structural Protein” – proteína não estrutural
pb	Pares de base
PCR	“Polymerase Chain Reaction” – Reação em cadeia da polimerase
PLC	Fosfolipase C
PNI	Programa Nacional de Imunização
qPCR	Reação em cadeia da polimerase quantitativo
RE	Retículo endoplasmático
RER	Retículo endoplasmático rugoso
RNA	“Ribonucleic acid” – ácido ribonucleico
RNA <sup>+</sup>	RNA de polaridade positiva
RNA <sup>-</sup>	RNA de polaridade negativa
rpm	Rotações por minuto
RT-PCR	“Reverse transcript polymerase chain reaction” - Reação em cadeia da polimerase precedida de Transcrição reversa
RV	Rotavírus
RV-A	Rotavírus do grupo A
SG	Subgrupo
siRNA	“small interference RNA” – pequeno RNA interferente

SLP	“Single Layered Particle” – partícula de camada única
SNE	Sistema Nervoso Entérico
TLP	“Triple Layered Particle” – partícula de tripla camada
TBE	Tris-borato-ácido etilenodiamino tetra-acético
UFJF	Universidade Federal de Juiz de Fora
UNT	Unidades de turbidez
VORH	Vacina Oral de RV Humano
VP	“Virion Protein” – proteína viral
WHO	“World Health Organization” – Organização Mundial da Saúde
$\chi^2$	Teste Qui-quadrado

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	17
<b>2 REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	20
2.1 <b>Histórico</b> .....	20
2.2 <b>Morfologia, taxonomia e estrutura</b> .....	21
2.3 <b>Classificação</b> .....	24
2.4 <b>Replicação viral</b> .....	26
2.5 <b>Patogenia</b> .....	29
2.6 <b>Manifestações clínicas</b> .....	32
2.7 <b>Epidemiologia</b> .....	33
2.8 <b>Diagnóstico e métodos de detecção</b> .....	35
2.9 <b>Tratamento e controle</b> .....	38
2.10 <b>Disseminação de vírus na água</b> .....	40
<b>3 JUSTIFICATIVA</b> .....	45
<b>4 OBJETIVOS</b> .....	47
4.1 <b>Objetivo geral</b> .....	47
4.2 <b>Objetivos específicos</b> .....	47
<b>5 METODOLOGIA E ESTRATÉGIAS DE AÇÃO</b> .....	48
5.1 <b>Área de estudo</b> .....	48
5.2 <b>Coletas</b> .....	51
5.3 <b>Concentração viral</b> .....	53
5.4 <b>Detecção de rotavírus do grupo A</b> .....	56
5.4.1 <b>Extração do ácido nucléico</b> .....	56
5.4.2 <b>Síntese de DNA complementar (cDNA)</b> .....	57
5.4.3 <b>Amplificação parcial do gene que codifica para a proteína VP6 de rotavírus do grupo A</b> .....	57
5.4.4 <b>Nested PCR do gene que codifica para a proteína VP6 de rotavírus do grupo A</b> ..	59
5.4.5 <b>Análise dos produtos por eletroforese em gel de agarose</b> .....	60
5.5 <b>Quantificação de rotavírus do grupo A</b> .....	61
5.5.1 <b>Determinação da eficiência do método de concentração viral</b> .....	62
5.6 <b>Determinação dos parâmetros microbiológicos</b> .....	63
5.7 <b>Determinação dos parâmetros físico-químicos</b> .....	64

5.8 Análise estatística.....	64
6 RESULTADOS.....	66
6.1 Detecção e quantificação de rotavírus do grupo A.....	66
6.2 Parâmetros microbiológicos .....	69
6.4 Parâmetros físico-químicos.....	70
7 DISCUSSÃO .....	77
8 CONCLUSÕES.....	89
REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA.....	90

# 1 INTRODUÇÃO

Amplamente reconhecida como recurso natural essencial para a existência da vida, a água é utilizada pelo homem em inúmeras atividades, com destaque para o abastecimento doméstico e industrial, a irrigação, a preservação da fauna e da flora, a recreação e o lazer, a geração de energia elétrica, a navegação, a harmonização paisagística e o transporte de dejetos. Entretanto, a má utilização dos recursos hídricos, associada a não preservação, tem culminado na degradação e consequente escassez dos mesmos, bem como em alterações de ecossistemas aquáticos (VON SPERLING, 2005).

Um relatório recente, sobre o monitoramento mundial de água potável e saneamento, afirma que 11% da população mundial (mais de 780 milhões de pessoas), ainda, não tem acesso à água potável e 37% (2,5 bilhões) dela, carecem de saneamento básico. Embora este documento tenha registrado alguns avanços quando compara os dados de 1990 aos de 2010, muito ainda precisa ser feito, pois as tendências atuais apontam para números inaceitáveis em 2015 quando, segundo projeções, 605 milhões de pessoas permanecerão sem uma fonte adequada de água potável e 2,4 bilhões, sem instalações sanitárias (WHO, 2012).

No Brasil, segundo o último Plano Nacional de Saneamento Básico, divulgado pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), 99,4% dos municípios apresentam rede geral de abastecimento de água, no entanto apenas 87,2% distribuem água tratada. Dentre os serviços de saneamento, cabe ressaltar que apenas 55,2% dos municípios disponibilizam serviços de coleta de esgoto e menos de um terço (28,5%) realiza o seu tratamento (IBGE, 2008). Em casos de ausência da rede de distribuição de água, as principais fontes alternativas utilizadas pela população são chafariz, poço particular, carro pipa, corpos d'água, cisternas e bicas. Quanto ao esgoto, as alternativas giram em torno da utilização de fossas, valas a céu aberto e lançamento direto em corpos d'água (IBGE, 2011).

Esses dados são preocupantes, visto que a qualidade da água pode ser ameaçada pela presença de microrganismos patogênicos provenientes, por exemplo, do despejo de esgoto não tratado, nos corpos de águas superficiais. O consumo ou o uso recreativo de água não tratada, pela população, representa um

grave problema de saúde, levando-se em conta que um quarto dos leitos hospitalares, no mundo, são ocupados por pacientes com complicações decorrentes de infecções veiculadas pela água (STRAUB e CHANDLER, 2003). Dentre tais complicações, a diarreia se destaca, globalmente, no grupo das doenças mais comuns, associada a altas taxas de morbi-mortalidade. A doença diarreica pode ser causada por uma grande variedade de agentes etiológicos, como bactérias, parasitos, protozoários e vírus (WILHELMI, ROMAN e SÁNCHEZ-FAUQUIER, 2003; ESTES e KAPIKIAN, 2007). Dentro deste contexto, destaca-se a importância dos vírus entéricos, como os rotavírus (RV), os norovírus, alguns adenovírus, o vírus da hepatite A e os poliovírus, dentre outros. Estes vírus contaminam a água destinada ao consumo humano, uma vez que são eliminados em concentrações extremamente elevadas, que podem variar de  $10^5$  a  $10^{11}$  partículas virais, por grama de fezes (FARTHING, 1989; BOSCH et al., 2008).

A capacidade destes agentes de propagar uma infecção veiculada pela água está associada a diversos fatores (ABBASZADEGAN, 2001; WYN-JONES e SELLWOOD, 2001; LECLERC, SCHWARTZBROD e DEI-CAS, 2002), como:

- ✓ dose infectante extremamente baixa (cerca de dez unidades infecciosas);
- ✓ viabilidade das partículas que se mantem potencialmente infectantes durante vários meses na água, resistindo a condições ambientais adversas;
- ✓ capacidade de resistir a processos de tratamento de água e esgoto, aplicados no controle bacteriano, inclusive a cloração e
- ✓ ausência de correlação, em termos qualitativos e quantitativos, com os atuais indicadores bacterianos de contaminação de águas.

Dentre os vírus gastroentéricos associados a surtos de veiculação hídrica, destacam-se os RV do grupo A (RV-A) e os norovírus, os principais responsáveis por grande parte dos surtos e casos esporádicos de gastroenterite infantil aguda e não bacteriana, em todo o mundo (PARASHAR et al., 2006; ZHENG et al., 2006).

As infecções por RV-A são uma causa comum de diarreia grave na infância, estando associadas a cerca de 611 mil mortes ao ano e 39% das hospitalizações por diarreia (PARASHAR et al., 2006; CDC, 2011). No Brasil, os estudos de epidemiologia molecular envolvendo amostras clínicas, estão bem estabelecidos nas diferentes regiões geográficas, os quais apontaram prevalências que variam de 12 a 42% (GUSMÃO et al., 1999; LINHARES, 2000; ROSA E SILVA, NAVECA e CARVALHO, 2001; ROSA E SILVA, CARVALHO e GOUVEA, 2002; SOUZA et al.,

2002; CARDOSO et al., 2003; SANTOS e HOSHINO, 2005; FERREIRA, 2010; ANTUNES, 2011).

Assim, o despejo irregular de esgoto doméstico em mananciais aquáticos, contendo uma grande quantidade de vírus que, normalmente, são excretados por indivíduos sintomáticos ou não, preocupa no sentido da potencial contaminação destes ambientes. Neste sentido, várias pesquisas ambientais tem sido desenvolvidas com a finalidade de avaliar a qualidade da água, utilizando-se os parâmetros bacteriológicos estabelecidos (SCOTT et al., 2002; MARQUES, 2003). Entretanto, são recentes os estudos realizados sobre a presença de vírus entéricos humanos em águas de consumo, de recreação e em esgotos, bem como sobre seu envolvimento em surtos de gastroenterites, hepatites e conjuntivites, desencadeados por veiculação hídrica. Em parte, esta situação pode ser explicada pela baixa eficiência de recuperação de vírus, pelos métodos de concentração utilizados e, também, pelos métodos de detecção pouco sensíveis, onerosos e de complexa implantação (MEHNERT e STEWIEN, 1993). Apesar disso, avanços recentes nestas técnicas tem proporcionado maior êxito nas investigações realizadas, nesse campo de estudo.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 Histórico

O potencial dos vírus como agentes da gastroenterite começou a ser investigado em 1940, no entanto, esta busca desapontou muitos virologistas, que por anos, não conseguiram associá-los à doença diarreica em humanos (WILHELMI, ROMAN e SÁNCHEZ-FAUQUIER, 2003; ESTES e KAPIKIAN, 2007).

Apenas no início da década de 70 as primeiras correlações entre os vírus e a diarreia em crianças foram evidenciadas. Primeiro quando partículas virais de 27 nanômetros (nm) foram descobertas, utilizando a imunomicroscopia eletrônica (IME), em material fecal proveniente de um surto de diarreia, ocorrido na cidade de Norwalk, tendo por isso recebido a denominação de vírus Norwalk (KAPIKIAN et al., 1972). Um ano depois, outros pesquisadores, ao observarem cortes de mucosa duodenal, utilizando a técnica de microscopia eletrônica (ME), descreveram partículas de 70 nm, denominadas, posteriormente, de RV (BISHOP et al., 1973).

A partir desta descoberta, em um curto intervalo de tempo, a investigação de vírus em fezes de crianças com doença diarreica aguda levou a confirmação da associação dos RV com a doença, além da descoberta de outros agentes, tais como os astrovírus e os adenovírus entéricos (ESTES e KAPIKIAN, 2007; WARD, MCNEAL e STEELE, 2008).

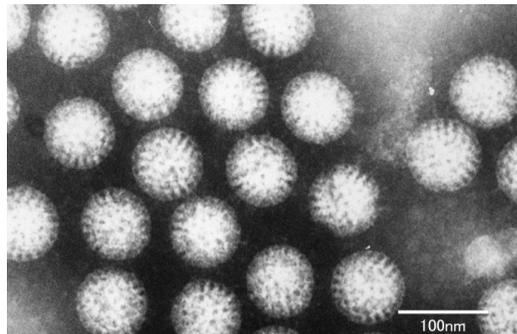
Apesar dos RV humanos terem sido descobertos em 1973, partículas semelhantes já tinham sido isoladas de animais, anteriormente. Adams e Kraft (1963), citados por Estes e Kapikian (2007), isolaram partículas semelhantes a vírus, do tecido intestinal de camundongos infectados com diarreia. No mesmo ano, Malherbe e Harwin (1963) as isolaram de *swabs* retais de macacos saudáveis, enquanto Mebus, Underdahl e Rhodes (1969) demonstraram a presença de partículas virais de 70 nm, em fezes de bezerros com doença diarréica.

No Brasil, o RV foi detectado pela primeira vez no ano de 1976, em Belém, Pará, utilizando-se a técnica de ME (LINHARES, 2000). Entretanto, o

desenvolvimento do ensaio imunoenzimático, representou o marco inicial para inúmeras pesquisas realizadas em âmbito nacional (PEREIRA et al., 1985).

## 2.2 Morfologia, taxonomia e estrutura

Os RV possuem simetria icosaédrica, aspecto radiado e constituem um gênero distinto da família *Reoviridae* (MATTHEWS, 1979). As partículas não envelopadas medem cerca de 100 nm de diâmetro, incluindo as projeções proteicas (espículas). Ao serem observadas por ME (Figura 1) apresentam três camadas de proteínas, que lhe conferem um aspecto de roda de carroça – que deu o nome ao vírus (roda em latim é *rota*) (ESTES e KAPIKIAN, 2007).

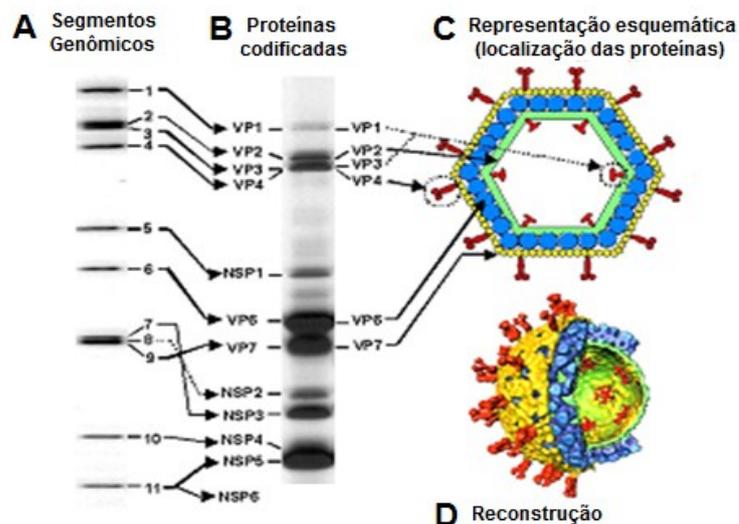


**Figura 1:** Microscopia eletrônica de partículas de rotavírus. Fonte: ANDRADE-GÓES, 2005.

A camada externa é formada pelas proteínas estruturais (do inglês *virion protein* – VP) VP7 e VP4, enquanto a camada intermediária é constituída pela proteína VP6. A camada interna, também conhecida como cerne, é constituída por uma camada de proteína VP2 que envolve o genoma viral, ao qual estão associadas as proteínas VP1 e VP3 (ESTES e KAPIKIAN, 2007). O fluxo de compostos em solução para o interior do capsídeo e o efluxo de RNA mensageiro (mRNA) é realizado através dos 132 canais (12 canais de classe I, 60 de classe II e 60 de classe III) presentes na partícula viral completa, também chamada de partícula de tripla camada (do inglês - *triple-layered particle* – TLP), com poder infectante (ARIAS et al., 2004).

As partículas de dupla camada (do inglês - *double-layered particle* – DLP) não possuem a camada proteica externa (VP4 e VP7) e são conhecidas como partículas brutas, sem poder infectante, porém transcricionalmente ativas. Por outro lado, as partículas de camada única (do inglês - *single-layered particle* – SLP), também denominadas cerne, são desprovidas das camadas proteicas externas (VP4 e VP7) e intermediária (VP6), não são infectantes e, ao contrário das TLPs e DLPs, raramente são visualizadas na ME (ESTES e KAPIKIAN, 2007).

O genoma viral é constituído por 11 segmentos de RNA de fita dupla (do inglês *double-stranded ribonucleic acid* - dsRNA), que são responsáveis pela codificação de 6 proteínas estruturais (VP1-VP4, VP6 e VP7) e 6 proteínas não estruturais (do inglês *non structural protein* – NSP1 a 6) do vírus (Figura 2).



**Figura 2:** Organização do genoma e da partícula de rotavírus. **(A)** Representação esquemática dos 11 segmentos genômicos de dsRNA dos RV visualizados gel de poliacrilamida após eletroforese. **(B)** Proteínas virais estruturais e não estruturais codificadas pelos segmentos genômicos. **(C)** Localização das proteínas estruturais na partícula viral. **(D)** Reconstrução da partícula viral em três dimensões (Adaptada de Andrade-Goes, 2005).

De acordo com Costa, Cardoso e Grisi (2005), o tamanho dos segmentos varia de 667 (segmento 11) a 3.302 (segmento 1) pares de bases (pb), sendo o genoma total composto por, aproximadamente, 18.522 pb. As proteínas virais estão descritas na tabela 1, destacando-se que as VP são encontradas na partícula viral, enquanto as NSP apenas na célula infectada (ARIAS et al., 2004; GREENBERG e ESTES, 2009).

**Tabela 1:** Descrição dos segmentos genômicos dos rotavírus e das proteínas estruturais e não estruturais codificadas pelos mesmos.

Segmento de RNA (número de pares de base)	Proteínas virais codificadas			
	Designação (número de aminoácidos)	Localização na partícula viral	Número de cópias por virion	Propriedades e funções
1 (3302)	VP1 (1088)	Cerne	12	RNA polimerase dependente de RNA.
2 (2690)	VP2 (881)	Cerne	120	Necessária para atividade de VP1 e formação do cerne viral.
3 (2591)	VP3 (835)	Cerne	12	Forma um complexo com VP1 e atua como guaniltransferase e metiltransferase.
4 (2362)	VP4 (776) VP5* (529) VP8* (247)	Capsídeo externo	120 (60 dímeros)	Hemaglutinina (adesão celular), clivada em VP5* e VP8* por ação de proteases (tripsina); apresenta propriedades antigênicas.
5 (1611)	NSP1 (495)	Não estrutural	----	Apresenta atividade de ligação ao RNA, mas não é essencial em algumas linhagens.
6 (1356)	VP6 (397)	Capsídeo interno	780 (260 trimeros)	Proteína hidrofóbica e imunogênica que contém os antígenos de grupo e subgrupo; representa 50-60% da massa viral.
7 (1105)	NSP3 <sup>1</sup> (315)	Não estrutural	----	Intensifica a síntese de proteínas virais e inibe a tradução de proteínas da célula hospedeira.
8 (1059)	NSP2 <sup>1</sup> (317)	Não estrutural	----	Apresenta atividade de ligação ao RNA viral, atua como helicase e forma o viroplasma com NSP5.
9 (1062)	VP7 <sup>1</sup> (326)	Capsídeo externo	780 (260 trimeros)	Glicoproteína integrada à membrana do RER, dependente de cálcio e altamente imunogênica.
10 (751)	NSP4 (175)	Não estrutural	----	Glicoproteína integrada à membrana do RER que atua como receptora intracelular de DLPs; modula o cálcio intracelular; atua na morfogênese e como enterotoxina viral.
11 (667)	NSP5 (198)	Não estrutural	----	Atua como fosfoquinase, forma o viroplasma com NSP2 e interage com VP2 e NSP6.
	NSP6 (92)	Não estrutural	----	Constitui o viroplasma e interage com NSP5.

Siglas: VP: proteína estrutural; NSP: proteína não estrutural; RER: Retículo endoplasmático rugoso; DLP: partícula de dupla camada. \* O asterisco é utilizado para identificar as proteínas resultantes da clivagem de VP4 (VP5\* e VP8\*). <sup>1</sup> Pode ser codificada pelos segmentos 7, 8 ou 9 dependendo da amostra viral. Fonte: Estes e Kapikian, 2007.

### 2.3 Classificação

De acordo com as características antigênicas da proteína VP6, os RV são classificados em sete grupos, designados de A a G. Os RV-A são os de maior importância epidemiológica, tendo sido claramente estabelecidos como causadores de doença diarreica em crianças e indivíduos jovens, de várias espécies de mamíferos e aves (WILHELMI, ROMAN e SÁNCHEZ-FAUQUIER, 2003).

Dentro do grupo A, baseado nas características antigênicas das proteínas e nas sequências dos genes que as codificam, os RV são, ainda, classificados em sorotipos (determinado por métodos de neutralização, utilizando-se anticorpos monoclonais) e genótipos (definidos pela análise molecular dos genes), respectivamente (ESTES e KAPIKIAN, 2007).

A proteína VP6 também classifica, sorologicamente, os RV-A nos subgrupos (SG) I, II, I + II e não-I e não-II, definidos de acordo com a presença ou ausência de dois epítomos distintos, que reagem com um, dois ou nenhum anticorpo monoclonal (WILHELMI, ROMAN e SÁNCHEZ-FAUQUIER, 2003; LEITE, CARVALHO-COSTA e LINHARES, 2008). Os SG I e II tem sido os mais encontrados, sendo SGII relacionado a estirpes de origem humana e o SGI relacionado a estirpes de origem animal (ITURRIZA-GÓMARA et al., 2002). Outra forma de determinar o subgrupo é pelo sequenciamento do gene que codifica a proteína VP6, também denominada proteína I, por constituir o capsídeo interno dos RV.

A classificação genotípica dos RV-A tem sido realizada por um sistema binário, baseada na determinação dos genótipos G (gene que codifica a glicoproteína VP7) e P (gene que codifica a proteína VP4, que é sensível à protease). Em 2008, um grupo de pesquisadores que trabalham com a classificação destes vírus, propuseram um sistema completo de classificação, tendo como base as propriedades moleculares dos 11 segmentos de dsRNA. Este novo sistema baseou-se na caracterização molecular e análise filogenética do genoma completo, de 53 protótipos do vírus. Os diferentes genótipos descritos para cada um dos segmentos são divididos segundo valores de *cut-off* específicos de identidade nucleotídica, para cada um destes genes (Quadro 1). Assim, foi determinada a nova designação dos genótipos, que passa a ser descrita da seguinte forma: Gx-P[x]-Ix-Rx-Cx-Mx-Ax-Nx-Tx-Ex-Hx, onde cada letra simboliza, respectivamente, os genes

responsáveis pela codificação das proteínas VP7-VP4-VP6-VP1-VP2-VP3-NSP1-NSP2-NSP3-NSP4-NSP5/6 e o x, um número arábico iniciando em 1 (MATTHIJNSSENS et al., 2008a,b).

**Quadro 1:** Valores de *cut-off* de percentagem de identidade nucleotídica que definem os diferentes genótipos de rotavírus do grupo A.

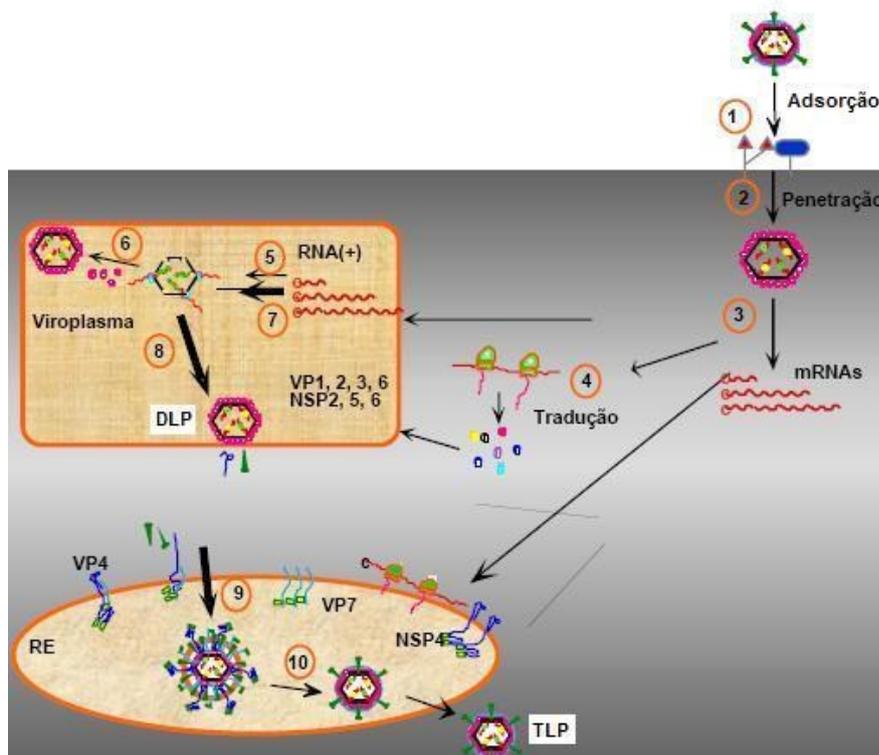
<b>Gene</b>	<b>Proteína codificada</b>	<b>Valores de <i>cut-off</i> de identidade nucleotídica (%)</b>	<b>Designação dos nomes de genótipos</b>	<b>Genótipos</b>
1	VP1	83	RNA polimerase - RNA dependente (R)	4
2	VP2	84	Proteína do cerne (C)	5
3	VP3	81	<b>Metiltransferase (M)</b>	6
4	VP4	80	Sensível à protease (P)	27
5	NSP1	79	<b>Antagonista do Interferon (A)</b>	14
6	VP6	85	Capsídeo interno (I)	11
7, 8 ou 9	NSP3	85	Intensificador de tradução (T)	7
7, 8 ou 9	NSP2	85	<b>NTPase (N)</b>	5
7, 8 ou 9	VP7	80	<b>Glicoproteína (G)</b>	19
10	NSP4	85	<b>Enterotoxina (E)</b>	11
11	NSP5	91	Fosfoproteína ( <i>pHosphoprotein</i> ) (H)	6

Fonte: Matthijnsens e colaboradores, 2008a,b.

Em virtude do aumento no número de genótipos, o grupo de pesquisadores acima, propôs a criação do seguinte sistema de nomenclatura, a fim de unificá-la: grupo de RV / espécie de origem / país de identificação / nome comum / ano de identificação / genótipos G e P, além de diretrizes específicas para amostras selvagens, amostras obtidas de cultura de células, amostras vacinais e amostras produzidas em laboratório, utilizando rearranjo ou procedimentos de genética reversa (MATTHIJNSSENS et al., 2011).

## 2.4 Replicação viral

Em virtude do tropismo natural apresentado pelos RV, a replicação viral ocorre nas células epiteliais maduras das vilosidades intestinais. O passo inicial do ciclo (Figura 3) consiste na ligação de TLPs à superfície da célula hospedeira, através da interação de VP4 e VP7 com receptores celulares. A fixação é determinada pela proteína VP4 ou por seu produto de clivagem (VP5\*), sendo importante destacar que a etapa de ligação, que ocorreu anteriormente, não depende desta clivagem, ao contrário do processo de penetração, que é potencializado pela atividade lipofílica de VP5\* (ARIAS et al., 2004; ESTES e KAPIKIAN, 2007; DESSELBERGER et al., 2009).



**Figura 3:** Representação esquemática do ciclo de replicação dos rotavírus. Etapas: (1) Adsorção do vírus à superfície celular; (2) Penetração e desnudamento da partícula viral, produzindo DLP; (3) Transcrição primária (RNA<sup>+</sup>); (4) Síntese das proteínas virais; (5) Síntese primária de RNA; (6) Montagem da partícula viral; (7) Síntese secundária de RNA; (8) Montagem das DLPs; (9) Brotamento da DLP na membrana do RE; (10) Perda do envoltório transitório, gerando TLPs (Adaptada de Mascarenhas, 2006).

A penetração pode ocorrer, diretamente, através da membrana ou por endocitose mediada por receptores. Este processo se desenvolve de forma coordenada, envolvendo várias etapas de interações sequenciais, com ligantes diversos e uma série de mudanças conformacionais nas proteínas do capsídeo. Durante ou logo após a penetração, as partículas infecciosas sofrem desnudamento, pela ação de enzimas celulares e baixa concentração de cálcio, ou seja, perdem as duas proteínas do capsídeo externo, transformando-se em DLPs (ARIAS et al., 2004; ESTES e KAPIKIAN, 2007; DESSELBERGER et al., 2009; GREENBERG e ESTES, 2009).

A replicação ocorre totalmente no citoplasma da célula e se inicia com a RNA polimerase dependente de RNA (VP1) em conjunto com VP3, transcrevendo fitas de RNA de polaridade positiva (RNA<sup>+</sup>) a partir de todos os 11 segmentos genômicos virais, processo conhecido como transcrição primária, que pode ocorrer antes da formação do viroplasma. Parte destas moléculas de RNA<sup>+</sup> funcionam como mRNA viral, que saem das DLPs pelos 12 canais de classe I existentes em VP2, sendo traduzidos, no citoplasma celular, em proteínas estruturais e não estruturais (ESTES; KAPIKIAN, 2007; DESSELBERGER et al., 2009).

A maioria das proteínas codificadas pelo genoma viral é sintetizada em ribossomos livres e o seu produto se acumula no citoplasma, à exceção de VP7 e NSP4, que são sintetizadas em ribossomos ligados ao RER, onde são glicosadas e a seguir inseridas em sua membrana (COSTA, CARDOSO e GRISI, 2005; ESTES e KAPIKIAN, 2007; DESSELBERGER et al., 2009).

Duas a três horas após o início da infecção formam-se inclusões citoplasmáticas denominadas viroplasmas, que são essenciais para a replicação, o empacotamento do genoma e as etapas iniciais de morfogênese do vírus (DESSELBERGER et al., 2009). Estas estruturas especializadas possuem forma e tamanho variável durante o ciclo de replicação e estão localizadas junto ao núcleo da célula e próximas do retículo endoplasmático (RE) (GREENBERG e ESTES, 2009). Seus principais componentes são as proteínas NSP2 e NSP5, mas também contém VP1, VP2, VP3, VP6 e, inicialmente, mRNA de todos os segmentos. No interior do viroplasma, durante a montagem de DLPs, ocorre o processo de transcrição secundária, no qual fitas de RNA<sup>+</sup> funcionam como molde para a produção de fitas de RNA de polaridade negativa (RNA<sup>-</sup>), resultando em dsRNA que

constituem o genoma da progênie viral (KAPIKIAN, HOSHINO e CHANOCK, 2001; ESTES e KAPIKIAN, 2007).

Um dos aspectos mais interessantes da replicação dos RV, que os diferencia de membros de outros gêneros da família *Reoviridae*, é que as DLPs emergem dos viroplasmas e brotam para dentro do RE, adquirindo um envelope transitório, que contém NSP4, as proteínas virais de superfície VP4 e VP7, além de quantidades bem menores de outras proteínas não estruturais (PORUCHYNSKY e ATKINSON, 1991 citado por ARIAS et al., 2004; ESTES e KAPIKIAN, 2007).

O brotamento é mediado pela NSP4, uma glicoproteína viral integrada na membrana do RE, que desempenha papel fundamental na morfogênese viral, ao atuar como receptor intracelular da VP6, presente na DLP. À medida que as partículas se movem em direção ao interior do RE, elas passam pelo processo de maturação final, sob influência de íons cálcio, e o envelope vai sendo substituído por uma fina camada de proteína que constitui o capsídeo externo, formando a TLP, ou seja, a partícula viral completa e infecciosa (ESTES e KAPIKIAN, 2007; DESSELBERGER et al., 2009).

Os mecanismos precisos da remoção do envelope ou da montagem do capsídeo externo não são claros, mas estudos com pequenos RNAs interferentes (siRNA) realizados por Cuadras e colaboradores (2006) indicaram que VP4 é montada ainda no RE e que VP7 está envolvida na remoção do envelope.

Os efeitos da replicação do RV em células cultivadas são específicos para cada tipo de célula. Em células não polarizadas, o ciclo termina quando a progênie viral é liberada por lise da célula hospedeira. Neste caso, a proteína NSP4 medeia a morte desta célula, promovendo um aumento no nível de cálcio intracelular, que afeta a permeabilidade da membrana plasmática e das junções celulares, enquanto a NSP3 reduz a síntese proteica, ambas contribuindo para a lise celular. Nas células epiteliais polarizadas, os RV induzem a apoptose, de modo que a interação de VP4 com actina e lipídios celulares tem sido sugerida como o mecanismo pelo qual a membrana é desestabilizada, facilitando a saída dos vírus, antes dos efeitos citopáticos se tornarem evidentes. Finalmente, ao serem liberadas, as partículas virais infectam outros enterócitos, reiniciando o ciclo (ESTES e KAPIKIAN, 2007; DESSELBERGER et al., 2009).

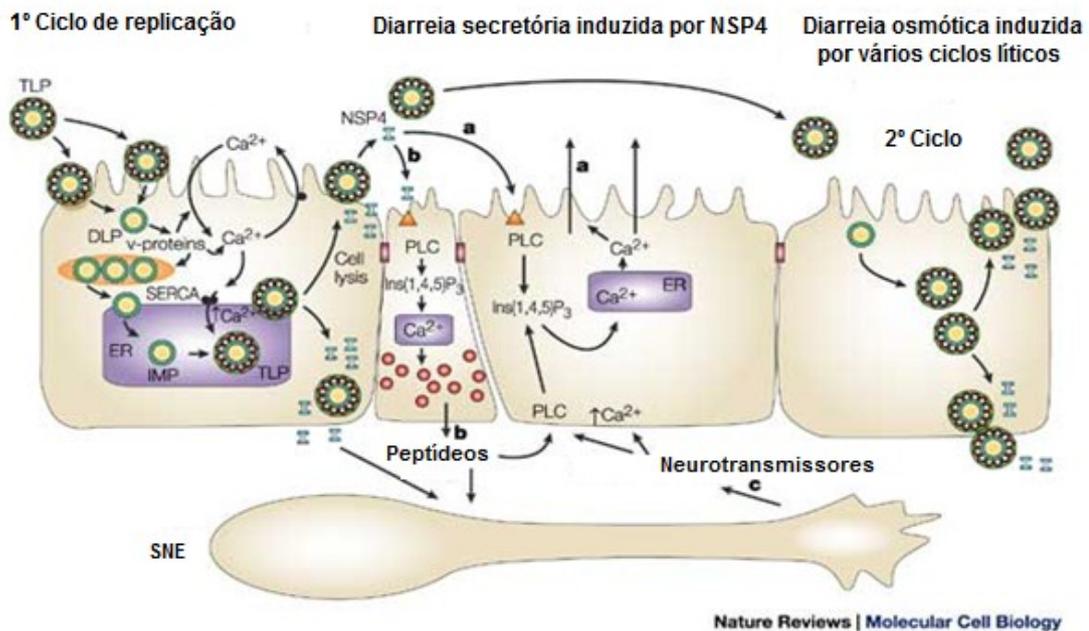
## 2.5 Patogenia

Os RV são transmitidos pela via fecal-oral, no entanto, continuam existindo suspeitas sobre eventuais casos de contaminação pela via respiratória. Tais suspeitas são baseadas em evidências circunstanciais, observadas numa proporção de doentes com rotavirose, como a rápida aquisição de anticorpos contra o vírus nos primeiros anos de vida, independentemente das normas de higiene, além da ocorrência de sintomas respiratórios (PARASHAR et al., 1998; ESTES e KAPIKIAN, 2007).

A carga infectante necessária para estabelecer a infecção é de apenas dez partículas viáveis (virions), demonstrando sua elevada infecciosidade, principalmente quando se considera que as partículas virais são excretadas em concentrações de até um trilhão por mililitro (mL) de fezes, na fase aguda da doença (COSTA, CARDOSO e GRISI, 2005; DENNEHY, 2005).

Do ponto de vista fisiopatológico, a diarreia por RV tem sido atribuída a diferentes mecanismos (Figura 4), incluindo: má absorção secundária à destruição dos enterócitos, isquemia das vilosidades, ação de enterotoxina viral (NSP4) e ativação do sistema nervoso entérico (SNE) (LUNDGREN e SVENSSON, 2003, citado por ESTES e KAPIKIAN, 2007).

Os RV infectam os enterócitos maduros das vilosidades intestinais, causando a atrofia das mesmas, fato que desencadeia uma repopulação compensatória com células secretoras imaturas. Deste modo, ocorre um desequilíbrio entre os processos de absorção (comprometida pela destruição de enterócitos maduros) e secreção (aumentada pela proliferação de células da crista). Simultaneamente, a permeabilidade intestinal a macromoléculas como a lactose é reduzida, o que aumenta a osmolaridade intestinal e as perdas líquidas, resultando na diarreia osmótica. Também ocorrem alterações vasculares que levam à isquemia das microvilosidades e alterações inflamatórias na mucosa intestinal (WILHELMI, ROMAN e SÁNCHEZ-FAUQUIER, 2003; RAMIG, 2004; COSTA, CARDOSO e GRISI, 2005).



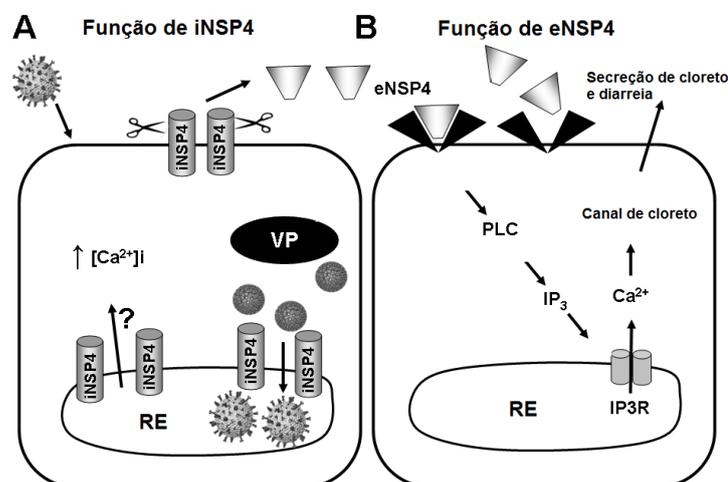
**Figura 4:** Diagrama ilustrando os mecanismos de patogênese da rotavirose. A síntese de proteínas virais aumenta a permeabilidade da membrana plasmática ao cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) intracelular, induzindo a lise celular, com liberação de proteínas virais e da progênie viral. A NSP4 atua em células não infectadas, induzindo a diarreia secretora através da: (A) ativação da fosfolipase C (PLC, do inglês *phospholipase C*) que aumenta concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  nas células intestinais; (B) secreção de peptídeos e aminas dependente de  $\text{Ca}^{2+}$  para estimular o SNE; e (C) ativação de mais células epiteliais através da secreção de cloreto ( $\text{Cl}^-$ ) pelo SNE (Adaptada de Bomsel e Alfsen, 2003).

O fato de animais infectados com RV exibirem diarreia profusa, sem lesões histopatológicas no intestino estimulou a busca por outros mecanismos de indução de diarreia. Descobriu-se então, que a NSP4, inicialmente sintetizada como uma glicoproteína integrada na membrana do RE, sofre transformações adquirindo funções intracelulares (iNSP4) e extracelulares (eNSP4) (RAMIG, 2004; COSTA, CARDOSO e GRISI, 2005; ESTES e KAPIKIAN, 2007; DESSELBERGER et al., 2009; HYSER e ESTES, 2009).

Na célula infectada, a iNSP4 (Figura 5A) apresenta atividades fundamentais para a replicação dos RV, atuando no aumento do cálcio intracelular e facilitando a montagem do vírus. O mecanismo de como iNSP4 altera a homeostase do cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) é desconhecido, mas uma ideia atraente é o aumento da permeabilidade da membrana plasmática por ação da iNSP4, possivelmente pela formação de canais de cálcio. Por outro lado, a montagem das partículas é facilitada, à medida que a iNSP4 presente na membrana do RE se liga a proteína VP6 de DLPs imaturas, facilitando o brotamento de partículas para dentro do RE (HYSER e ESTES, 2009).

Quando a iNSP4 atravessa a membrana plasmática da célula infectada, ela é clivada por ação de proteases, gerando a eNSP4 (Figura 5B), que possui atividade de enterotoxina. Esta por sua vez, liga-se a receptores celulares e inicia uma cascata de sinalização em células não infectadas. Esta sinalização ativa a fosfolipase C (PLC), culminando com a liberação de cálcio do RE e consequente aumento do seu nível intracelular, perturbando o equilíbrio eletrolítico da célula (ESTES e KAPIKIAN, 2007; DESSELBERGER et al., 2009; HYSER e ESTES, 2009).

Se a eNSP4 atuar no enterócito, um dos efeitos é a ruptura da junção celular resultando em permeabilidade paracelular, ou seja, entre as células. Por outro lado, se a eNSP4 atuar nas células da crista, ocorre um aumento nos níveis de cálcio mediado por um transportador de cloreto ( $\text{Cl}^-$ ), aumentando a secreção em um processo chamado de diarreia secretória (RAMIG, 2004; COSTA, CARDOSO e GRISI, 2005; ESTES e KAPIKIAN, 2007; DESSELBERGER et al., 2009; HYSER e ESTES, 2009).



**Figura 5:** Funções da NSP4: intracelular (A) e extracelular (B).  $\text{Ca}^{2+}$ : cálcio; VP: viroplasma; RE: retículo endoplasmático; PLC: fosfolipase C;  $\text{IP}_3$ : trifosfato de inositol (Adaptada de Hyser e Estes, 2009).

Após muitos estudos, descobriu-se que os RV também seriam capazes de induzir a secreção intestinal de líquidos e eletrólitos por ativação direta do SNE, localizado imediatamente abaixo do epitélio das vilosidades (LUNDGREN et al.,

2000; WILHELMI, ROMAN e SÁNCHEZ-FAUQUIER, 2003; COSTA, CARDOSO e GRISI, 2005).

A patogênese da rotavirose é baseada principalmente em trabalhos com modelos animais. Em geral, as alterações patológicas são limitadas ao intestino delgado e associadas com poucas lesões visíveis, como a perda e a vacuolização dos enterócitos ou com alterações histopatológicas significativas, como a hiperplasia das criptas. O processo inflamatório é leve, se comparado ao observado para outros patógenos intestinais, principalmente os bacterianos (ESTES e KAPIKIAN, 2007).

Diante de todas estas informações verifica-se que a diarreia por RV é multifatorial, resultante de efeitos diretos da infecção pelo vírus e dos efeitos indiretos da resposta do hospedeiro (RAMIG, 2004).

## **2.6 Manifestações clínicas**

A gastroenterite causada pelos RV inicia, abruptamente, após um período de incubação de 2 a 4 dias, com um quadro clínico clássico: vômito, febre, dor abdominal e diarreia, que podem se manifestar juntos ou isolados e podem desencadear rapidamente à desidratação (COSTA, CARDOSO e GRISI, 2005; DESSELBERGER et al., 2009).

A diarreia inicia de forma súbita, com uma média de dez episódios de fezes liquefeitas ao dia, com ocorrência mais rara de quadro disentérico. Uhnoo, Olding-Stenkvis e Kreuger (1986) registraram uma duração média do quadro diarreico de 5,9 dias, onde 21% das crianças apresentaram mais de 10 episódios diarreicos por dia e somente 1% evoluiu com fezes disentéricas. Costa e colaboradores (2004) observaram uma média de 9,3 evacuações por dia, com duração média do quadro de 6,3 dias. Em pacientes internados, a diarreia foi observada por Ribeiro e colaboradores (2008) em 92,6% dos casos positivos para RV, com média de 5,5 dias de hospitalização.

O vômito é uma manifestação clínica importante que ocorre 12 a 24 horas antes dos episódios diarreicos, com duração média de dois dias e meio. Um estudo realizado no Rio de Janeiro por Ribeiro e colaboradores (2008), registrou a ocorrência de vômitos em 86% dos casos, portanto, dentro da faixa prevista na

literatura que varia de 58 a 96% (UHNOO, OLDING-STENKVIST e KREUGER, 1986; COSTA, CARDOSO e GRISI, 2005).

A febre geralmente é alta, apresentando uma duração média de 2,6 dias. Costa e colaboradores (2004) detectaram febre nos pacientes com RV em 80,5% dos casos e a temperatura identificada foi igual ou superior a 39°C, em 37,7% dos mesmos, concordando com o estudo realizado por Uhnoo, Olding-Stenkvisst e Kreuger (1986), que detectou febre em 84% dos casos com temperaturas maiores que 39°C, em 42% dos casos.

O grau de severidade da doença causada por RV varia de infecções subclínicas, muito frequentes, à diarreia moderada a grave e potencialmente fatal. Os RV podem produzir infecção crônica sintomática em crianças imunodeficientes, representando uma ameaça especial para imunodeprimidos que receberam transplante de medula óssea (ESTES e KAPIKIAN, 2007; DESSELBERGER et al., 2009).

## 2.7 Epidemiologia

Após a descoberta dos RV, estudos epidemiológicos desenvolvidos em todo o mundo os destacaram como o maior agente etiológico da doença diarreica aguda infantil (ESTES e KAPIKIAN, 2007). Nos países desenvolvidos, a diarreia por RV ocorre com grande frequência, gerando altas taxas de morbidade, no entanto, poucos casos evoluem a óbito, devido às boas condições nutricionais e a acessibilidade aos serviços de saúde. Nestes países, a baixa mortalidade está associada, também, à terapia de reposição de fluídos e eletrólitos, desenvolvida na década de 40 e utilizada rotineiramente. Para ilustrar esta situação podemos citar pesquisas realizadas nos Estados Unidos da América (EUA), onde a rotavirose ocasiona, anualmente, mais de 3 milhões de episódios diarreicos, 500 mil visitas médicas, 60 a 70 mil hospitalizações e 20 a 40 mortes (ESTES e KAPIKIAN, 2007; FISCHER, BRESEE e GLASS, 2004; GLASS et al., 2005a).

Em contrapartida, nos países em desenvolvimento, os RV representam grande ameaça à vida de crianças menores de 5 anos, estando associados a mais de 100 milhões de episódios diarreicos, 25 milhões de visitas médicas e mais de 611

mil mortes anuais (PARASHAR et al., 2006). Estima-se que 80% de todas as mortes causadas por RV ocorram em alguns países da África subsaariana e do sul asiático, com destaque para China, Índia e Paquistão (GLASS et al., 2005b).

De modo geral, todas as crianças de até 5 anos de idade, sejam de países desenvolvidos ou em desenvolvimento, apresentam, ao menos, um episódio de diarreia por RV, no entanto, as consequências desta infecção entre estas crianças são notadamente distintas (FISCHER, BRESEE e GLASS, 2004; PARASHAR et al., 2006).

O fator que mais afeta a evolução clínica da infecção é a idade (GREENBERG e ESTES, 2009), de modo que, os recém-nascidos infectados com RV, raramente, tem a doença sintomática, pois estão protegidos por anticorpos maternos transferidos através da placenta. Crianças de 6 a 24 meses de idade são susceptíveis aos casos mais graves, que exigem internação, pois os níveis de anticorpos maternos encontram-se reduzidos e o sistema imune ainda é imaturo (BISHOP, 1996; ESTES e KAPIKIAN, 2007).

Os adultos parecem experimentar comumente a infecção por RV, no entanto, as manifestações clínicas são mínimas ou ausentes, conhecidas como infecções subclínicas. Surtos já foram registrados em pacientes geriátricos (inclusive com algumas fatalidades) e em pacientes e funcionários de hospitais, mas estes casos não atingem grandes proporções, uma vez que adultos adquirem altas taxas de imunidade contra os RV, logo após as primeiras infecções (ESTES e KAPIKIAN, 2007). Por outro lado, Anderson e Weber (2004), reforçam a importância dos RV como um agente patogênico em adultos, sobretudo quando se considera a ocorrência de doença endêmica, surto epidêmico, infecção relacionada com viagens e doença resultante da transmissão criança - adulto.

No Brasil, embora a taxa de mortalidade associada à diarreia aguda, em menores de cinco anos, tenha sido reduzida de 10,8% a 3,9% no período de 1990 a 2006, esta, ainda é um importante indicador epidemiológico. Variações significativas ocorrem entre as taxas das cinco regiões geográficas, com índices maiores nas regiões Nordeste e Norte (BRASIL, 2012). Segundo Linhares (2000), investigações desenvolvidas no Brasil, no âmbito hospitalar e ambulatorial, entre crianças menores de cinco anos, resultaram em índices de prevalência de diarreia por RV que variam de 12% a 42%. Tamanha amplitude pode ser justificada pela diversidade metodológica e temporal observada nos estudos realizados até então. Outros

estudos salientam a importância destes vírus como causa de internação hospitalar, com taxas variando de 14% para 48% (CARDOSO et al., 2003, CARVALHO-COSTA et al., 2006; CDC, 2011).

Um estudo reuniu 124 publicações sobre a distribuição global de sorotipos e genótipos de RV, entre 1989 e 2004, em 52 países nos cinco continentes. De acordo com este levantamento, os genótipos G1 a G4 representaram 97,5% de todas as infecções por RV na Ásia, América do Norte e Europa e 83,5% a 90,4% na América do Sul, África e Austrália. O G1 foi o genótipo detectado com maior frequência em cada um dos continentes, enquanto G5, G8 e G9 apareceram de modo pontual, em diversas áreas (SANTOS e HOSHINO, 2005).

Os RV exibem um padrão sazonal de infecção em países de clima temperado, apresentando picos epidêmicos nos meses mais frios do ano (PARASHAR et al., 1998; DESSELBERGER et al., 2009). Nos países tropicais, por outro lado, a infecção ocorre durante todo o ano, com tendências sazonais em algumas regiões (ESTES e KAPIKIAN, 2007; VALENCIA-MENDOZA et al., 2008; DESSELBERGER et al., 2009). No Brasil, a distribuição sazonal das gastroenterites por RV assume duas configurações distintas, pois as regiões Centro-Oeste, Sudeste e Sul apresentam um nítido perfil sazonal, com expressiva ocorrência das infecções no período mais frio e seco do ano (maio a setembro) (CARDOSO et al., 2001; ROSA E SILVA, NAVECA e CARVALHO, 2001; ARAUJO et al., 2002; ROSA E SILVA, CARVALHO e GOUVEA, 2002; COSTA et al., 2004; CARVALHO-COSTA et al., 2006), enquanto as regiões Norte e Nordeste do país registram casos ao longo de todo o ano (LINHARES et al., 1989; STEWIEN et al., 1991).

## **2.8 Diagnóstico e métodos de detecção**

O diagnóstico da gastroenterite provocada por RV não pode ser determinado com base apenas nas manifestações clínicas, uma vez que estas são semelhantes às aquelas causadas por outros enteropatógenos. Neste contexto, o diagnóstico laboratorial assume um papel importante na confirmação do agente etiológico envolvido (ESTES e KAPIKIAN, 2007; ANDREASI, 2008).

Para pesquisas de vírus em amostras clínicas são utilizadas algumas técnicas imunológicas, como: ensaio imunoenzimático (EIE), aglutinação de partículas em látex (AL) e IME, sendo as duas primeiras utilizadas em laboratórios de análises clínicas, em função da rapidez e da sensibilidade das mesmas (kits comerciais). Também podem ser utilizadas técnicas não imunológicas, como a ME, separação eletroforética dos segmentos genômicos em gel de poliacrilamida e métodos moleculares, como a reação em cadeia da polimerase precedida de transcrição reversa (do inglês - *reverse transcript polymerase chain reaction* - RT-PCR). Estas técnicas não imunológicas são amplamente aplicadas em laboratórios de pesquisas para investigações científicas, não sendo empregadas no diagnóstico clínico em decorrência do custo elevado e da dificuldade de execução das mesmas.

Por outro lado, a circulação de agentes virais no ambiente vem estimulando estudos na área de virologia ambiental, com intuito de investigar a presença destes patógenos em águas e superfícies, bem como determinar sua caracterização molecular. No entanto, para investigar a presença de vírus em amostras ambientais, os métodos de detecção viral devem estar associados a métodos de concentração, capazes de recuperar os vírus disseminados no ambiente. Inicialmente, os métodos de concentração viral foram associados a métodos de detecção baseados em cultivo celular, o que restringia os estudos apenas à pesquisa de vírus cultiváveis (FARRAH et al., 1977; IJZERMAN, DAHILILNG e FOUT, 1997; GRIFFIN et al., 2003; FONG e LIPP, 2005). No entanto, os avanços obtidos no diagnóstico molecular viabilizaram as pesquisas de vírus entéricos considerados fastidiosos ou que não dispõem de um cultivo celular para replicação. Deste modo, a amplificação de material genético por PCR é considerada, atualmente, a metodologia mais adequada para detecção de vírus em ambientes aquáticos (FONG e LIPP, 2005).

Diferentes técnicas de concentração viral podem ser aplicadas, baseadas no tamanho e na massa molecular dos vírus, como os métodos de ultrafiltração ou ultracentrifugação (WYN-JONES e SELLWOOD, 2001; FONG e LIPP, 2005; GARCIA, 2006). Outra metodologia descrita é a de adsorção e eluição, fundamentada nas propriedades físico-químicas da partícula viral, que conferem às mesmas a capacidade de adsorção em membranas carregadas positiva ou negativamente, com posterior eluição (GANTZER et al., 1998; QUEIROZ et al., 2001; KATAYAMA, SHIMASAKI e OHGAKI, 2002; ALBINANA-GIMENEZ et al., 2006; HARAMOTO et al., 2009). Cada um destes procedimentos tem suas

vantagens e desvantagens, sendo importante ressaltar que a escolha do melhor método depende do tipo água analisada e da presença de inibidores (BOSCH et al., 2008).

O método de adsorção e eluição, em membranas carregadas positivamente, foi, amplamente, utilizado para a recuperação de vírus em amostras ambientais, dispensando a adição de sais e o tratamento com ácido (KATAYAMA, SHIMASAKI e OHGAKI, 2002; MEHNERT et al., 1997; QUEIROZ et al., 2001; FONG e LIPP, 2005). Entretanto, a utilização do extrato de carne para eluição do concentrado nestes métodos, tem sido apontada como um fator inibidor da PCR (IJZERMAN, DAHILILNG e FOUT, 1997).

Por outro lado, os protocolos que envolvem a adsorção em membranas carregadas negativamente, com posterior eluição em soluções inorgânicas, tem favorecido a detecção de vírus utilizando a PCR, de modo que inúmeros pesquisadores tem relatado a presença de vírus entéricos, em diferentes matrizes aquáticas (FERREIRA et al., 2009; KATAYAMA, SHIMASAKI e OHGAKI, 2002; MIAGOSTOVICH et al., 2008; VICTORIA et al., 2009; VIEIRA et al., 2012).

Neste protocolo, a redução do pH e adição de cátions, como o cloreto de magnésio, são fundamentais para a adsorção inicial das partículas virais à membrana carregada negativamente (KATAYAMA, SHIMASAKI e OHGAKI, 2002). A etapa ácida do protocolo, por sua vez, mantém a ligação dos vírus à membrana negativa, além de auxiliar a remoção de cátions e outros inibidores. Estas etapas adicionais aumentaram a eficiência da técnica que utiliza membrana de carga negativa na recuperação viral, a partir de água do mar e de águas com alta turbidez, quando comparadas com as membranas carregadas positivamente (LUKASIK et al., 2000; KATAYAMA, SHIMASAKI e OHGAKI, 2002; FONG e LIPP, 2005).

Assim, no que diz respeito à pesquisa ambiental de RV, sua presença já foi comprovada em diversos estudos realizados em diferentes matrizes de água, como esgoto, águas superficiais, águas subterrâneas, águas potáveis e águas marinhas, utilizando diferentes metodologias de concentração (MEHNERT e STEWIEN, 1993; KITTIGUL et al., 2001; ESPINOSA et al., 2008; HAMZA et al., 2009; FUMIAN et al., 2010; PRADO et al., 2011).

## 2.9 Tratamento e controle

Como não existe um tratamento antiviral específico para a infecção por RV, os pacientes são tratados com base na sintomatologia. O tratamento da diarreia não difere do que em geral se preconiza nos casos de gastroenterite aguda de outra etiologia, fundamentando-se na reposição hidroeletrólítica, de preferência pela via oral (MASCARENHAS, 2006; ESTES e KAPIKIAN, 2007).

Considerando-se que a via de transmissão desses vírus é fecal-oral, era de se esperar que medidas higiênicas clássicas, como a lavagem das mãos, os cuidados com a água e os alimentos, além da destinação adequada de dejetos humanos e animais, fossem capazes de exercer impacto no controle e na profilaxia das infecções por RV. No entanto, nos países desenvolvidos ocorrem epidemias, anualmente, apesar dos elevados padrões de saneamento e higiene. Neste cenário, ficou clara a necessidade de contar com o recurso de uma vacina eficaz contra os RV-A (MASCARENHAS, 2006; ESTES e KAPIKIAN, 2007; ANDREASI, 2008).

Diferente de outras viroses como sarampo, caxumba, rubéola e varicela, que conferem proteção completa após o primeiro contato, os RV conferem imunidade parcial após algumas infecções, o que reduz a severidade dos episódios diarreicos posteriores, mas não impede a reinfecção. Com base nestes dados, muitas estratégias vacinais foram pesquisadas ao longo das duas últimas décadas, de modo a elaborar vacinas, que ofereçam ampla cobertura antigênica para os tipos de RV mais importantes, ou seja, aqueles que circulam globalmente ou regionalmente (ANDRADE-GÓES, 2005; MASCARENHAS, 2006; ESTES e KAPIKIAN, 2007).

A vacina monovalente produzida a partir do vírus humano G1P[8] atenuado, amostra RIX4414 (Rotarix<sup>®</sup> - GlaxoSmithKline, Rixensart, Belgium) foi licenciada no Brasil, pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária, em 2005, estando disponível, inicialmente, em clínicas pediátricas privadas. Somente, em março de 2006, a vacina oral de RV humano (VORH) foi incluída no Programa Nacional de Imunização (PNI), estando a partir de então, disponível no Sistema Único de Saúde (BRASIL, 2005).

O esquema de proteção consiste na administração de duas doses orais entre a 6<sup>a</sup> e 16<sup>a</sup> semana de vida, com intervalo de no mínimo um mês, de modo que a vacinação completa seja realizada, impreterivelmente, antes da criança completar 24 semanas (BRASIL, 2005). Vale ressaltar que o vírus vacinal é atenuado e, portanto,

potencialmente replicado nos enterócitos. Consequentemente, as partículas virais são excretadas nas fezes de crianças vacinadas, fato que merece atenção especial.

O estudo de fase III da Rotarix® realizado em doze países (Argentina, Brasil, Chile, Colômbia, República Dominicana, Honduras, México, Nicarágua, Panamá, Peru, Venezuela e Finlândia) demonstrou eficácia de 92% contra a gastroenterite severa provocada pelo genótipo G1P[8] de RV-A e 87% para o pool de genótipos G9P[8], G3P[8] e G4P[8]. Embora a avaliação da eficácia contra G2P[4] tenha sido prejudicada pela baixa circulação deste genótipo durante a pesquisa, um estudo europeu mostrou a importância da vacina na resposta cruzada contra os tipos não G1P[8], que induziu uma proteção de 82% contra G2P[4] (MASCARENHAS, 2006; RUIZ-PALACIOS et al., 2006; ESTES e KAPIKIAN, 2007; VESIKARI et al., 2007; DENNEHY, 2008;).

A partir da introdução da vacina no PNI, vários estudos estão sendo desenvolvidos para caracterizar os genótipos dos RV circulantes nos períodos pré e pós-vacinação, com objetivo de avaliar a eficácia da vacina (GURGEL, CORREIA e CUEVAS, 2008; GURGEL et al., 2008; LEITE, CARVALHO-COSTA e LINHARES, 2008; MORILLO et al., 2010). Os primeiros resultados já apontaram para reduções significativas da taxa de detecção de RV-A, atribuídas à vacina (CARVALHO-COSTA et al.; 2009; MORILLO et al., 2010).

Pesquisas iniciais realizadas no Brasil, após a introdução da vacina Rotarix®, demonstraram a predominância de G2P[4] em populações vacinadas, sugerindo que a vacina criou uma condição de vantagem seletiva deste genótipo sobre os demais. No entanto, uma análise mais atenta, alerta para o fato de que o possível ressurgimento de G2P[4] não esteja totalmente associado à vacinação, pois nestes estudos, amostras caracterizadas como G2P[4] foram coletadas logo após a introdução da vacina, quando muitas crianças incluídas nos estudos não tinham recebido o esquema completo de vacinação (GURGEL et al., 2008; LEITE, CARVALHO-COSTA e LINHARES, 2008; CARVALHO-COSTA et al.; 2009; MORILLO et al., 2010).

Alternativamente, o aumento da detecção do genótipo G2P[4] pode ser explicado pela tendência, descrita por Bishop, Unicomb e Barnes (1991), de que o genótipo G2 reaparece em intervalo de 10 anos. Como o padrão de variação temporal dos genótipos no Brasil, ainda não está claramente definido, Leite, Carvalho-Costa e Linhares (2008) reuniram um número representativo de estudos

brasileiros sobre genotipagem de RV, publicados de 1988 a 2007, para avaliar esta questão. Eles demonstraram que este intervalo, também, ocorre em nosso país, pois a detecção do genótipo G2 começou a diminuir após 1996 e ressurgiu posteriormente em 2006, coincidindo com a introdução da vacina.

O ressurgimento de G2P[4] também parece refletir um fenômeno continental, visto que casos recentes de diarreia por RV-A, com uma incidência elevada deste genótipo, foram relatados em países sul-americanos que fazem fronteira com o Brasil, nos quais a vacina Rotarix®, ainda não tinha sido introduzida (LEITE, CARVALHO-COSTA e LINHARES, 2008; CARVALHO-COSTA et al.; 2009).

Neste cenário, a dinâmica de surgimento e desaparecimento de genótipos virais, denuncia uma possível necessidade de ajuste constante na formulação das vacinas já existentes, a fim de adequá-las à realidade de cada região, país, ou continente. Para tanto, é essencial a realização de trabalhos de levantamento que atualizem o conhecimento sobre as amostras de RV-A circulantes nas diferentes comunidades, no Brasil e no mundo (LINHARES, 2000; SANTOS e HOSHINO, 2005).

No município de Juiz de Fora, os estudos de detecção de vírus entéricos realizados no Laboratório de Virologia da Universidade Federal de Juiz de Fora, tem revelado uma queda significativa na prevalência de RV-A no período pós vacinal (2007-2011), principalmente na faixa etária de 0 a 36 meses, bem como uma redução na circulação de genótipos não-G2 no município, após a implantação da VORH no PNI (dados em fase de publicação). No entanto, não é possível afirmar que estas mudanças se devem exclusivamente à vacina, sendo imprescindível dar continuidade aos estudos de vigilância epidemiológica.

## **2.10 Disseminação de vírus na água**

Os vírus entéricos são geralmente transmitidos pela via fecal oral e replicam no trato gastrointestinal do hospedeiro, sendo eliminados em número muito elevado nas fezes de indivíduos infectados, normalmente entre  $10^5$  e  $10^{11}$  partículas de vírus por grama de fezes (FONG e LIPP, 2005). Deste modo, o despejo de esgoto não tratado em corpos de água superficiais pode contribuir diretamente para a introdução

dos vírus entéricos nos ambientes aquáticos, contaminando os corpos receptores. Tal situação representa uma ameaça frente ao uso recreativo deste manancial ou até mesmo para fins de cultivo de moluscos bivalves (ostras e mexilhões) e produtos agrícolas (CARTER, 2005; RUGGERI e FIORE, 2012).

Além disso, mesmo que o tratamento de efluentes seja realizado, existe a possibilidade dos RV-A e de outros vírus entéricos, sofrerem apenas uma pequena redução de sua carga, resistindo no efluente que será devolvido ao corpo hídrico receptor (CARTER, 2005; RODRÍGUEZ-DIAZ et al., 2009). A situação torna-se mais crítica, quando se atenta para o fato de que, estes mananciais, em algum momento, serão captados e tratados para uso como água potável e, que novamente, existe a possibilidade dos vírus resistirem ao processo de cloração aplicado ao controle da população bacteriana (CARTER, 2005).

Outro aspecto que deve ser analisado na disseminação de RV-A é a ocorrência comum de infecção assintomática, uma vez que estes indivíduos também liberam partículas virais em suas fezes, contribuindo para a circulação do mesmo no ambiente. Em adição, os adultos, geralmente, assintomáticos também podem transmitir o vírus para crianças suscetíveis (RUGGERI e FIORE, 2012). Neste contexto, deve-se considerar, ainda, a participação dos RV animais na contaminação ambiental, o que pode favorecer a introdução de amostras virais atípicas na população humana, comprometendo, inclusive, a eficácia das vacinas (RUGGERI e FIORE, 2012).

Vale ressaltar que a chance de se estabelecer uma infecção, pela ingestão de água contaminada com vírus entéricos, chega a ser até dez mil vezes maior do que a exposição similar com bactérias patogênicas (HASS et al., 1993). Em adição, no ambiente, estes agentes podem resistir a uma ampla variação de pH (pH 3 a 10) e a extensos períodos a baixas temperaturas, podendo permanecer infectantes por até 130 dias em água do mar, 120 dias em água doce e esgoto e 100 dias em solo com temperaturas de 20 a 30°C (FONG e LIPP, 2005).

Diante deste cenário e considerando o uso da água para diversas finalidades, pesquisas de detecção de vírus entéricos em ambiente aquático foram impulsionadas, demonstrando o envolvimento destes patógenos em surtos de doenças de veiculação hídrica. Entre estes, os RV-A são reconhecidos como um dos mais importantes agentes etiológicos da doença diarreica aguda e, portanto tem sido

considerado para o monitoramento ambiental (MORESCO et al., 2012; VIEIRA et al., 2012).

A grande questão é que em muitos países, incluindo o Brasil, a qualidade microbiológica da água é determinada exclusivamente pela contagem de indicadores bacterianos, como coliformes termotolerantes e coliformes totais. Entretanto, o uso destes parâmetros como indicadores de presença viral na água, vem sendo questionado e tem se mostrado inadequado, em função das diferenças existentes entre estes grupos de microrganismos. Diversos trabalhos demonstraram ausência de associação entre contaminação bacteriana e viral, de modo que águas que não sofrem nenhum tratamento sanitário ou sofrem tratamento ineficiente, podem conter vírus, apesar de serem consideradas próprias, de acordo com os parâmetros bacterianos (SKRABER et al., 2004; JIANG, 2006; ROSE et al., 2006; VILLAR et al., 2007; MIAGOSTOVICH et al., 2008; ESPINOSA et al., 2009; FERGUSON et al., 2012; MORESCO et al., 2012; VIEIRA et al., 2012).

No Brasil, a Resolução do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) nº 357, de 17 de Março de 2005, dispõe sobre a classificação dos corpos d'água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, determinando os valores limites estabelecidos para os parâmetros microbiológicos (coliformes termotolerantes) e físico-químicos de qualidade da água (CONAMA, 2005). De acordo com esta resolução, todas as matrizes aquáticas (doces, salinas e salobras) do território nacional são enquadradas em 13 classes distintas em função de sua destinação final ou segundo seu uso preponderante, sendo as águas doces (com salinidade igual ou inferior a 0,5%), agrupadas em 5 classes diferentes conforme apresentado na tabela 2.

Com relação aos padrões microbiológicos, a resolução CONAMA nº357/2005 determina que não deve ser excedido, no parâmetro coliformes termotolerantes, um limite de 200 NMP por 100 mililitros (número mais que provável/100 mL), em 80% ou mais de, pelo menos, 6 amostras coletadas, durante o período de um ano, com frequência bimestral, em água doce enquadrada na Classe 1. Enquanto, para água doce de Classe 2, não deve ser excedido um limite de 1000 NMP/100mL, nas mesmas condições anteriores de análise (CONAMA, 2005).

**Tabela 2:** Classificação das águas doces, segundo Resolução nº357/2005 do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA).

<i>Classes</i>	<i>Destinação</i>
Especial	Abastecimento para consumo humano, com desinfecção; Preservação do equilíbrio natural das comunidades aquáticas; Preservação dos ambientes aquáticos em unidades de conservação de proteção integral;
Classe 1	Abastecimento para consumo humano, após tratamento simplificado; Proteção das comunidades aquáticas; Recreação de contato primário, tais como natação, esqui aquático e mergulho, conforme Resolução CONAMA nº 274, de 2000; Irrigação de hortaliças que são consumidas cruas e de frutas que se desenvolvam rentes ao solo e que sejam ingeridas cruas sem remoção de película; Proteção das comunidades aquáticas em Terras Indígenas;
Classe 2	Abastecimento para consumo humano, após tratamento convencional; Proteção das comunidades aquáticas; Recreação de contato primário, tais como natação, esqui aquático e mergulho, conforme Resolução CONAMA nº 274, de 2000; Irrigação de hortaliças, plantas frutíferas e de parques, jardins, campos de esporte e lazer, com os quais o público possa vir a ter contato direto; Aquicultura e à atividade de pesca.
Classe 3	Abastecimento para consumo humano, após tratamento convencional ou avançado; Irrigação de culturas arbóreas, cerealíferas e forrageiras; Pesca amadora; Recreação de contato secundário; Dessedentação de animais;
Classe 4	Navegação; Harmonia paisagística;

Fonte: Resolução CONAMA nº 357, de 17 de Março de 2005 (Capítulo II, Seção I, Artigo 4º).

Por outro lado, os limites de coliformes determinados para águas destinadas à balneabilidade e ao consumo humano constam respectivamente, na resolução CONAMA nº 274 de 29 de novembro de 2000 e na Portaria do Ministério da Saúde nº2914 de 12 de dezembro de 2011 (CONAMA, 2001; BRASIL, 2011).

Em relação à pesquisa de vírus entéricos em mananciais aquáticos, após a introdução da vacina anti-RV-A, estudos realizados no Chile e na Nicarágua mostraram que a detecção de RV-A foi reduzida em comparação com os norovírus (BUCARDO et al., 2011; O'RYAN, LUCERO e VIDAL, 2012).

No Brasil, um monitoramento realizado em uma estação de tratamento de esgoto no Rio de Janeiro, investigou a presença destes vírus em esgoto bruto e tratado, visto que o primeiro pode conter partículas, que foram eliminadas por

indivíduos infectados e o segundo pode conter partículas virais resistentes ao tratamento. Os RV-A selvagem foram detectados em todas as amostras, no entanto, nenhuma sequência específica do vírus vacinal foi encontrada. Estes resultados sugerem a disseminação dos vírus selvagem no ambiente, que foram eliminados em decorrência de uma infecção natural e mostraram-se resistentes ao tratamento do esgoto (FUMIAN et al., 2011).

Em conjunto, esses resultados tem fortalecido a pesquisa de agentes virais no ambiente aquático, que passa a ser uma importante ferramenta para avaliar o impacto da vacinação na comunidade e também a qualidade da água de acordo com parâmetros virológicos.

### 3 JUSTIFICATIVA

Atualmente, a contaminação de ambientes aquáticos e conseqüentemente dos recursos hídricos, vem assumindo grande importância, frente à preocupação crescente com a escassez da água. Diariamente, diferentes tipos de reservatórios de águas estão sendo saturados por contaminantes das mais diversas fontes, tornando as águas impróprias para consumo, para o desenvolvimento de atividades agrícolas e para recreação. Esta contaminação atinge, diretamente, a parcela da população que não tem acesso ao tratamento adequado de água e efluentes, aumentando a transmissão de doenças de veiculação hídrica. Destaca-se, neste contexto o papel desempenhado pelos vírus entéricos, responsáveis pela maioria de casos das doenças diarreicas, no mundo.

O impacto direto do processo desordenado de urbanização sobre as bacias hidrográficas tem motivado o desenvolvimento de estudos de virologia ambiental, estimulando a realização de investigações de patógenos virais em corpos d'água. No Brasil, estas pesquisas já foram realizadas em diferentes estados, das regiões norte, sul e sudeste. Neste cenário, a inexistência de dados sobre a presença de tais vírus em mananciais aquáticos no estado de Minas Gerais, motivou o desenvolvimento do presente estudo, realizado na Bacia Hidrográfica do Córrego São Pedro (BHCSF), localizada no município de Juiz de Fora. Esta bacia apresenta duas áreas bem demarcadas, sendo uma delas não urbanizada, que compreende o reservatório de captação de água da represa de São Pedro, o qual tem sido ameaçado pelo assoreamento decorrente da construção de rodovias, em seu entorno. A água nesta área mais preservada da BHCSF é utilizada, também, para criação de animais, irrigação de hortaliças e frutas. Por outro lado, a bacia também abrange uma área urbanizada que, atualmente, passa por um intenso e diferenciado processo de expansão urbana, o qual tem comprometido seriamente a qualidade de suas águas, pelo lançamento, *in natura*, de todo o esgoto doméstico, produzido nas comunidades localizadas dentro de sua bacia de contribuição.

A avaliação da contaminação viral das águas desta bacia é pioneira e resultante da associação de metodologias de concentração viral e técnicas moleculares que permitem a detecção de RV-A. Desta forma, será possível avaliar a

disseminação de RV-A neste ecossistema alertando para o possível risco de infecção pela exposição a agentes virais, especialmente pelo contato primário e pela ingestão de hortaliças e frutas irrigadas com estas águas.

## 4 OBJETIVOS

### 4.1 Objetivo geral

Investigar a presença de RV-A em águas superficiais da BHCSP, bem como avaliar a influência de parâmetros microbiológicos e físico-químicos de qualidade da água, na detecção dos mesmos.

### 4.2 Objetivos específicos

- Detectar RV-A nos concentrados obtidos a partir das amostras de água coletadas na BHCSP, ao longo do estudo, avaliando a sensibilidade das técnicas utilizadas na investigação da presença do vírus.
- Verificar a influência da área da BHCSP e da época em que foram realizadas as coletas, na detecção e quantificação de RV-A.
- Avaliar se houve associação/correlação entre os parâmetros microbiológicos e físico-químicos, oficialmente utilizados para determinar a qualidade da água, e a detecção/quantificação de RV-A.

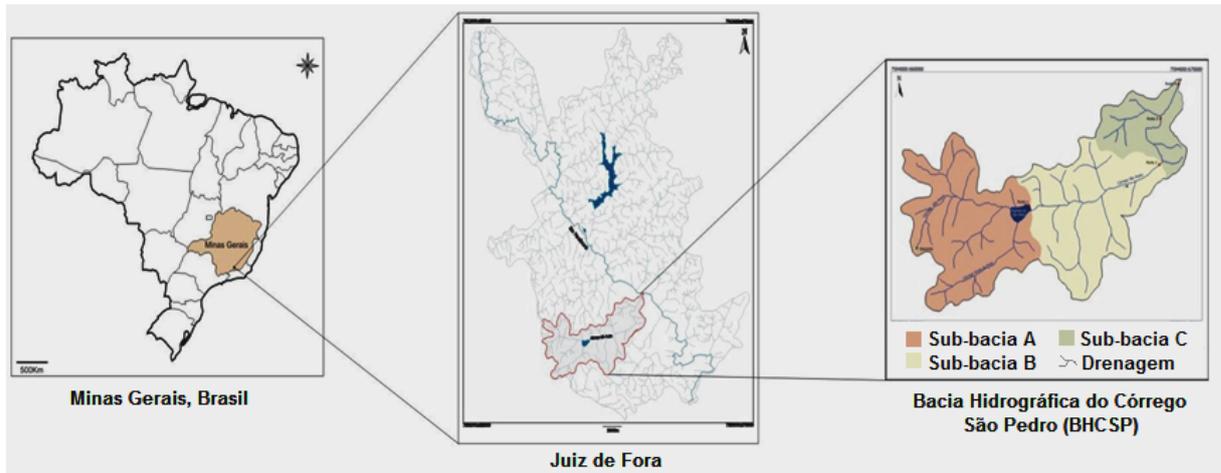
## 5 METODOLOGIA E ESTRATÉGIAS DE AÇÃO

### 5.1 Área de estudo

Este trabalho foi realizado na cidade de Juiz de Fora, situada na Zona de Mata Mineira, com uma população de, aproximadamente, 516 mil habitantes. Em entrevista recente, o chefe do Departamento de Articulação e Integração de Políticas Setoriais, da Secretaria de Planejamento e Desenvolvimento Econômico do município, Heber de Souza Lima, declarou que, 90% do esgoto gerado na cidade são despejados, diretamente no Rio Paraibuna, sem qualquer tipo de tratamento, embora haja duas estações de tratamento de esgoto em funcionamento na cidade (VALENTE, 2012).

O clima é tropical de altitude, apresentando duas épocas bem definidas: a seca (maio a setembro) que apresenta temperaturas mais baixas e menores índices pluviométricos e a úmida (outubro a abril) que apresenta temperaturas mais elevadas e maiores precipitações pluviométricas (UFJF, 2012).

A BHCSF é uma das 156 sub-bacias que drenam a área urbana de Juiz de Fora. Está localizada na região sudoeste da cidade e apresenta uma importante amplitude altimétrica, que varia desde os 1.077m no Pico da Grota até os 680m de sua foz no Rio Paraibuna. Em sua área total de 29,84Km<sup>2</sup> estão inseridas, total ou parcialmente, vários bairros, como Borboleta, Morro do Imperador, Nossa Senhora de Fátima, São Pedro, Cruzeiro de Santo Antônio, Nova Califórnia, Novo Horizonte, Aeroporto, Fábrica, Santa Catarina, Vale do Ipê, Mariano Procópio e Jardim Glória, com uma população de aproximadamente 31.400 habitantes (MACHADO, 2010). Devido à sua significativa heterogeneidade interna, a BHCSF é dividida em três sub-bacias, designadas A, B e C (Figura 6).



**Figura 6:** Localização da Bacia Hidrográfica do Córrego São Pedro (BHCSPP), indicando suas sub-bacias (Adaptado de LATUF, 2004).

A sub-bacia A ocupa uma área de 12,98 Km<sup>2</sup>, que corresponde às áreas de nascentes da bacia e compreende a represa de São Pedro, também conhecida como Represa dos Ingleses ou Cruzeiro de Santo Antônio. Estende-se da nascente do Córrego São Pedro até a barragem da represa, constituindo a bacia de contribuição desse manancial (LATUF, 2004).

A represa de São Pedro está localizada a aproximadamente 8 km de distância da malha urbana da cidade e possui um espelho d'água de 0,04 Km<sup>2</sup>. Este manancial represa e regulariza as águas dos Córregos São Pedro e Grota do Pinto (MACHADO, 2010), de modo que a estação de tratamento de água instalada neste local produz cerca de 120 litros de água por segundo, respondendo pelo abastecimento de 8% da população urbana da cidade (CESAMA, 2012).

Nesta sub-bacia a densidade de ocupação humana é baixa, caracterizando-se como uma área não urbanizada, mas, ainda assim, a especulação imobiliária encontra-se em alta, devido ao fácil acesso ao centro da cidade, à proximidade da Rodovia BR040 e do Centro de Convenções Expominas BR 040, baixo preço do solo inicialmente e dos atrativos naturais, como vegetação ainda protegida e clima mais ameno. (MACHADO, 2010). No entanto, as obras de construção da rodovia BR040, também tiveram um efeito negativo, uma vez que, a movimentação de terras, cortes e aterros impactaram diretamente a represa, ao gerar processos erosivos e consequente aumento do assoreamento, que reduziu, substancialmente, a capacidade armazenadora deste manancial (MACHADO, 2010). Do mesmo modo, a construção da rodovia BR440, com objetivo de interligar a BR040 à BR267,

reforçou a preocupação dos ambientalistas em relação a este impacto e, embora, recentemente, a obra tenha sido paralisada por ordem do Tribunal de Contas da União, a viabilidade desta represa permanece ameaçada (BR440, 2012).

As sub-bacias B e C encontram-se em área urbanizada. A sub-bacia B estende-se da barragem da Represa de São Pedro até o início da Cachoeira do Vale do Ipê (exclusive), abrangendo uma área de 12,08Km<sup>2</sup>. Uma característica marcante desta área é o contraste socioeconômico, onde convivem lado a lado, bairros antigos e consolidados, habitados por população de baixa renda e condomínios fechados, voltados para uma população de alta renda. Nesta sub-bacia encontra-se o Campus da UFJF, o que contribuiu de forma decisiva, para a ocupação desta área (MACHADO, 2010).

A sub-bacia C se estende do alto da Cachoeira do Vale do Ipê (inclusive) até a foz do Córrego de São Pedro, no Rio Paraibuna, ocupando uma área de 4,78Km<sup>2</sup>. Esta queda de água é um grande marco divisor desta bacia, isolando a Cidade Alta da Cidade Baixa, cujo desnível, de aproximadamente 84 metros, é vital para a reoxigenação das águas do Córrego de São Pedro (LATUF, 2004).

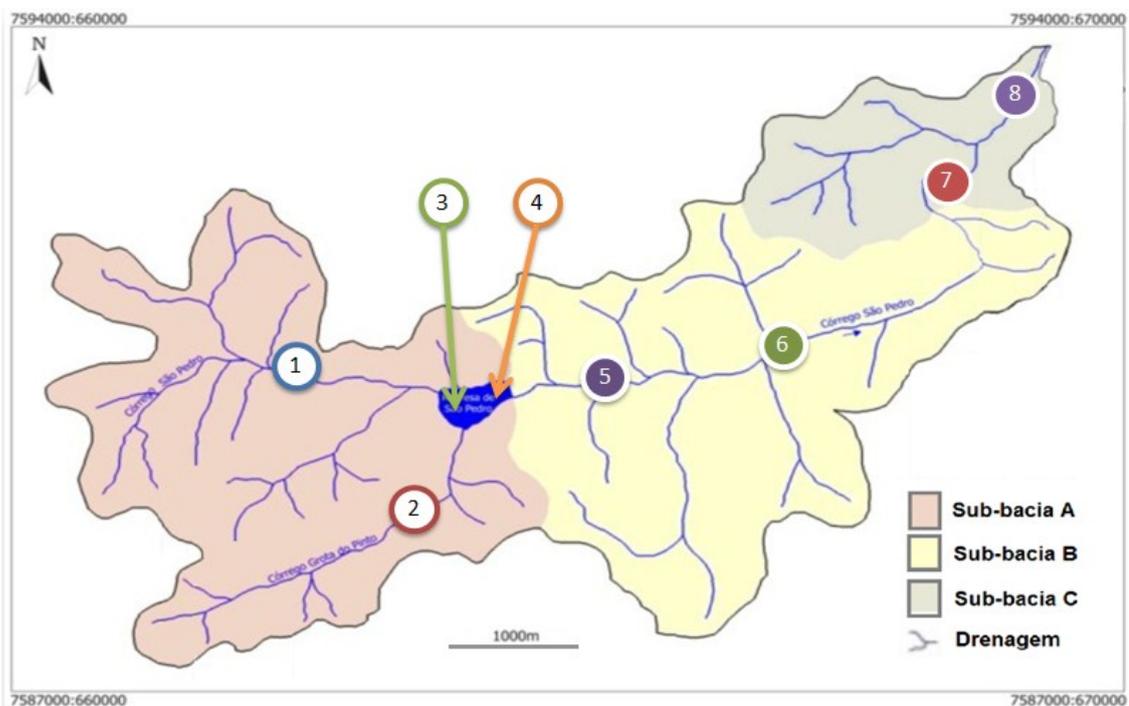
De um modo geral, a BHCSF é cortada pela rodovia BR-040 e pela aglomeração urbana, que se intensifica sentido a sua jusante, de tal forma que, 41,85% de sua área total, já apresenta ocupação urbana. A existência de vários núcleos habitacionais implantados e em expansão compromete, sanitariamente, esta bacia, que sofre com a ocupação e uso desordenado do solo, urbanização crescente, desmatamentos e utilização, sem critérios técnicos, para as construções às margens do manancial (MACHADO, 2010).

De acordo com a Deliberação Normativa do Conselho Estadual de Políticas Ambientais (COPAM) nº16 de 24 de setembro de 1996, as águas da BHCSF foram enquadradas, da nascente até o ponto de captação de água da represa de São Pedro, como Classe 1 (COPAM, 1996). Os pontos a jusante da represa, entretanto, foram classificados, como Classe 2, segundo o artigo 42 da Resolução CONAMA nº 357/2005, que afirma que enquanto não forem aprovados os respectivos enquadramentos, as águas doces serão consideradas de classe 2. Considerando esta classificação, os valores obtidos nos parâmetros microbiológicos e físico-químicos analisados foram comparados aos padrões de qualidade das águas estabelecidos para cada substância em cada classe, conforme resolução CONAMA nº357/2005.

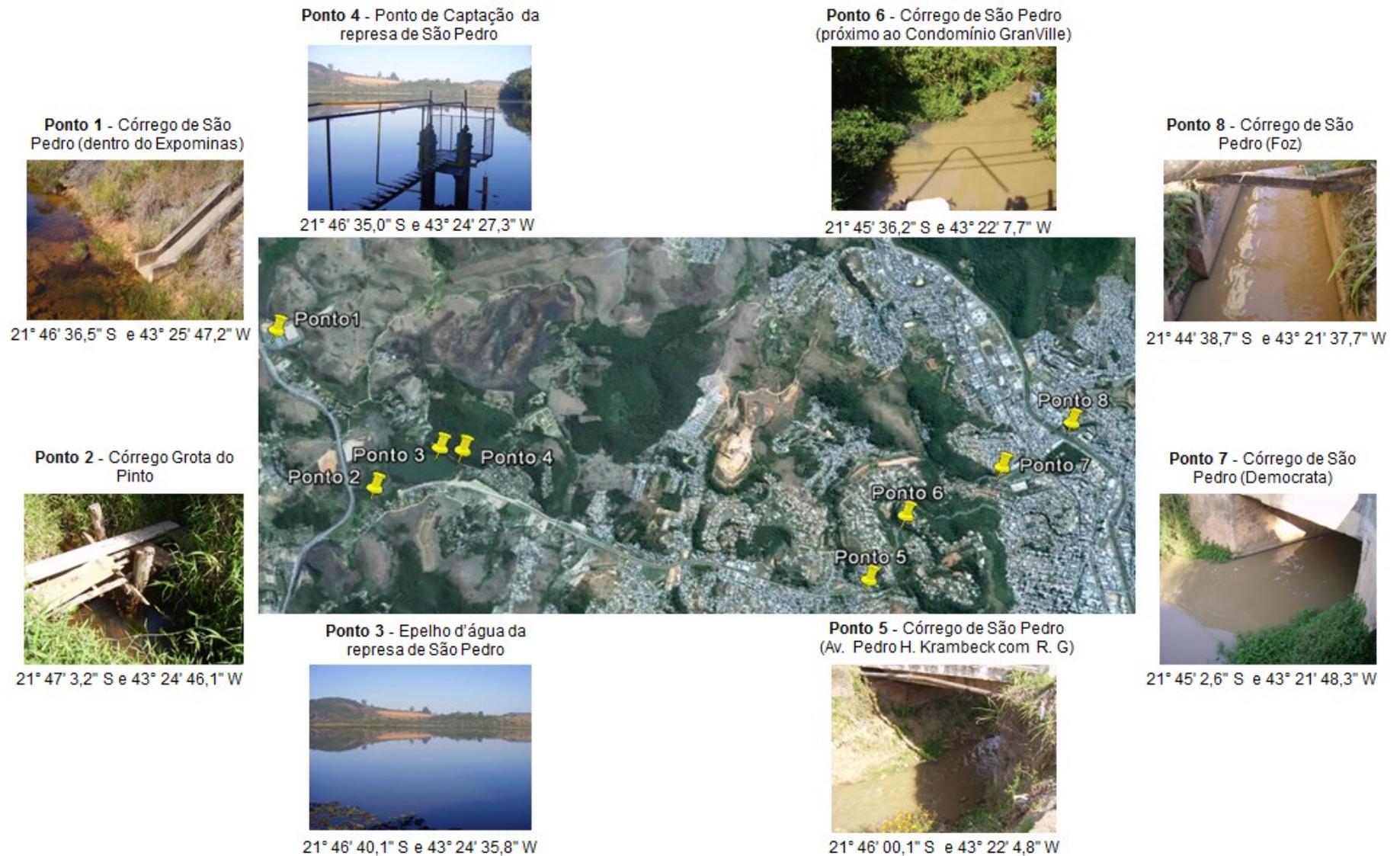
## 5.2 Coletas

Para a realização deste trabalho foram escolhidos oito pontos de amostragem de modo a representar toda a bacia, buscando avaliar a influência da urbanização na detecção de RV-A (Figura 7A). Todos os pontos foram georreferenciados, utilizando-se o navegador *Garmin® eTrex Legend® HCx* (Figura 7B).

Os pontos de 1 a 4 estão localizados na área não urbanizada (sub-bacia A), sendo que os pontos 1 (Córrego Grota do Pinto) e 2 (Córrego de São Pedro) estão localizados a montante da represa, bem próximos às nascentes, enquanto os pontos 3 e 4, encontram-se no reservatório da represa, sendo o primeiro no espelho d'água (região central) e o último no ponto de captação. Na área urbanizada, onde pode ser observado o lançamento de esgoto doméstico, *in natura*, os pontos 5 e 6 representam a sub-bacia B, enquanto os pontos 7 e 8 correspondem a sub-bacia C.



**Figura 7A:** Distribuição dos pontos de coleta na Bacia Hidrográfica do Córrego São Pedro (BHCS) (Adaptado de LATUF, 2004).



**Figura 7B:** Mapa geográfico da Bacia Hidrográfica do Córrego São Pedro, localizada no município de Juiz de Fora, MG, com destaque para os pontos de coleta georreferenciados. Fonte: Google Earth. Fotos: Andrêssa e Maria Luzia, 2011.

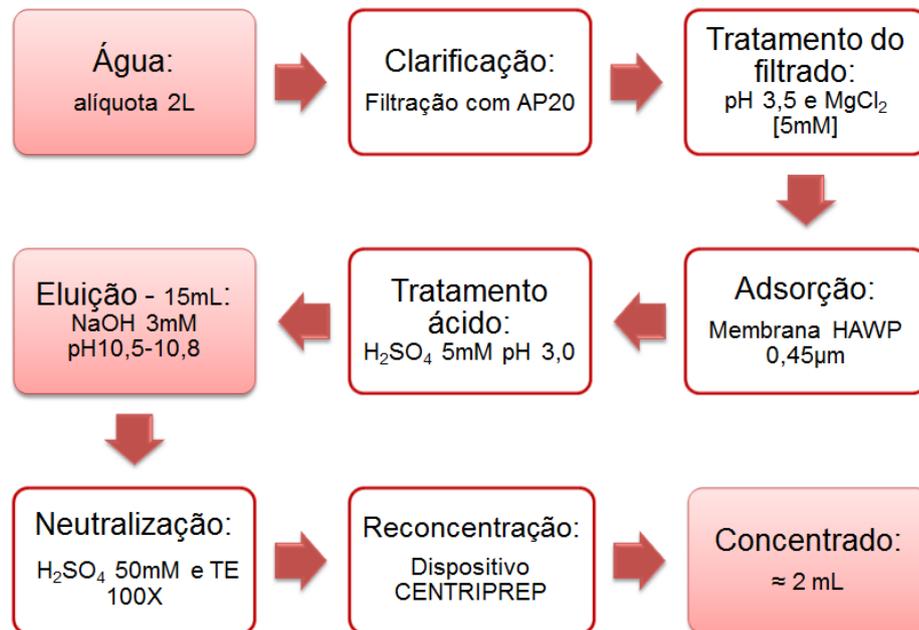
Foram realizadas seis coletas na BHCSF, distribuídas de julho de 2011 a maio de 2012, com o objetivo de averiguar a influência da pluviosidade na detecção viral, uma vez que as chuvas aumentam o volume de água nos rios, podendo interferir na quantidade de partículas virais presentes nestes corpos hídricos.

A ordem de amostragem nos pontos foi, previamente, planejada, buscando seguir dos pontos de “água mais limpa” para os de “água mais suja”. Um único balde foi utilizado para as coletas, sendo que, em cada ponto o mesmo foi rinsado com água do local, antes de ser colhido o volume total de água para as alíquotas necessárias aos experimentos. De cada ponto foram utilizados 2L de água superficial para concentração, 100 mL para análise de parâmetros microbiológicos (contagem de coliformes termotolerantes) e 100 mL para a determinação laboratorial de parâmetros físico-químicos de qualidade da água, como cloreto, dureza, ferro, fósforo e nitrogênio amoniacal. No momento da coleta foram mensurados os parâmetros condutividade, pH, salinidade, temperatura, oxigênio dissolvido, cloro livre e turbidez.

Para determinar a eficiência do método de concentração utilizado, a recuperação de RV-A foi determinada em amostras representativas das áreas não urbanizada (Represa – ponto 4) e urbanizada (Foz – ponto 8). Assim, em cada um destes pontos foi obtida mais uma alíquota de 4L de água, colhida, especificamente, para esta finalidade. Neste experimento, 2L de água foram contaminados com 50  $\mu$ L de uma suspensão fecal positiva para RV-A, contendo título de  $6,39 \times 10^7$  cópias de genoma (cg), previamente determinado pela reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR). Os outros 2L foram utilizados para controle negativo, logo sem a adição da suspensão viral.

### **5.3 Concentração viral**

Para investigar a presença de RV-A, as alíquotas de 2L de água, acima citadas, foram filtradas e concentradas no Laboratório de Análise de Resíduos da EMBRAPA Gado de Leite de Juiz de Fora, de acordo com a metodologia de adsorção e eluição dos vírus em membrana carregada negativamente, descrita por Katayama, Shimasaki e Ohgaki (2002), conforme a figura 8.



**Figura 8:** Fluxograma com as etapas realizadas para concentração viral.

Inicialmente, a amostra foi clarificada para remoção dos resíduos grosseiros, por filtração com pré-filtro AP-20<sup>®</sup> (membrana de 142 mm de diâmetro, malha Millipore<sup>®</sup>), utilizando um Sistema de Filtração Millipore<sup>®</sup>, constituído por uma bomba de vácuo, um recipiente de pressão e um suporte para membrana (Figura 9).



**Figura 9:** Sistema de filtração Millipore<sup>®</sup>. 1 - Bomba de vácuo com manômetros; 2 - Recipiente de pressão; 3 - Suporte de membranas.

Após a clarificação, o pH da amostra foi ajustado em 3,5 com ácido clorídrico (HCl) 6 N, seguido da adição de 5 mL de uma solução de cloreto de magnésio ( $\text{MgCl}_2$ ) 2 M (concentração final 5 mM). Esta etapa é muito importante para o sucesso da etapa posterior, visto que o pH ácido e a presença do cátion divalente ( $\text{Mg}^{2+}$ ) atuam sobre as partículas virais, carregando-as positivamente.

Na sequência, a amostra foi filtrada em membrana HAWP carregada negativamente (142 mm de diâmetro, malha de 0,45  $\mu\text{m}$ , Millipore®). Esta etapa proporcionou a adsorção da partícula viral carregada positivamente à membrana de carga negativa, enquanto o filtrado, contendo a água, supostamente, livre de vírus, foi descartado.

A membrana HAWP foi rinsada com 350 mL de uma solução de ácido sulfúrico ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) 5 mM (pH 3,0), para manter o pH na faixa ácida e assegurar a retenção das partículas virais, uma vez que os cátion divalentes foram lavados na etapa anterior. Em seguida, a membrana HAWP foi colocada numa placa de Petri contendo 15 mL de hidróxido de sódio (NaOH) 3 mM (pH 10,5-10,8) e homogeneizada por 10 minutos, para eluição das partículas virais adsorvidas, possibilitando a concentração viral. Em pH básico as partículas virais ficam carregadas negativamente e, por repulsão, se desligam da membrana carregada negativamente.

A suspensão obtida (15 mL), contendo as partículas virais, foi transferida para um dispositivo de concentração Centriprep® YM 50 (Millipore) (Figura 10) e neutralizado com 50  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  50 mM e 50  $\mu\text{L}$  de tampão Tris-EDTA 100x (pH 8,0). Posteriormente, este dispositivo foi centrifugado a 3000 rotações por minutos (rpm) por 10 minutos a 4°C (*Centrifuga Sorvall RC 5B Plus, DuPont, EUA; Rotor Sorvall GSA, r=155mm*), para obtenção de um volume final de 2 mL.



**Figura 10:** Concentrador Centriprep® YM-50, Millipore®.

## 5.4 Detecção de rotavírus do grupo A

### 5.4.1 Extração do ácido nucléico

Todos os concentrados obtidos na etapa anterior foram submetidos à técnica de extração do ácido nucléico, segundo a metodologia descrita por Boom e colaboradores (1990). Para tanto, nos microtubos identificados, foram adicionados 400 µL do concentrado de água, 1 mL de tampão de lise (L6) e 20 µL de suspensão de sílica. Em seguida, esses microtubos foram submetidos ao processo de agitação por 30 minutos a 110 rpm em agitador de Kline (Modelo 108/2, Nova ética). Logo após, foram realizadas lavagens sucessivas do sedimento, com tampão de lavagem (L2), etanol 70% e acetona padrão primário (P.A.), sempre descartando o sobrenadante após centrifugação a 13.000 rpm por 1 minuto a 4°C (*Jouan CR3i Multifunction Centrifuge, Thermo Electron Corporation; AC 2.14 Microvolume Rotor, raio=84mm*). Após a última lavagem, os microtubos foram aquecidos por 15 minutos a 56°C e acrescido de 60 µL de água livre de DNase e RNase, passando por novo aquecimento (56°C/15minutos). O sobrenadante contendo o RNA total foi recolhido, após centrifugação a 14.000 rpm por 3 minutos (*Jouan CR3i Multifunction Centrifuge, Thermo Electron Corporation; AC 2.14 Microvolume Rotor, raio=84mm*) e, posteriormente, estocado a -20°C.

Em todos os experimentos de extração foram utilizados controles positivo e negativo. Como controle positivo, utilizou-se a suspensão fecal JF43A positiva para RV-A, previamente, sequenciada. O controle negativo, por sua vez, foi realizado com adição de água livre de DNase e RNase. Para garantir que não houvessem contaminações, o RNA extraído destes controles foram submetidos à reação de síntese de cDNA, e posteriormente, a amplificação por PCR.

#### 5.4.2 Síntese de DNA complementar (cDNA)

Para a síntese do cDNA, o sobrenadante contendo o RNA total foi submetido à reação de RT-PCR, utilizando-se iniciadores aleatórios (Invitrogen, EUA), como descrito a seguir. Em microtubos de 0,2 mL, 10 µL de RNA extraído foram adicionados a 2 µL de dimetil sulfoxido (DMSO) e, posteriormente, incubados a 97°C por 7 minutos para desnaturação, seguida de resfriamento a 4°C por 2 minutos. Na sequência, os microtubos foram adicionados de 38 µL da mistura de reagentes (Quadro 2) e submetidos ao programa: 25° por 5 minutos, 50° por 1 hora e 70°C por 20 minutos. Ao final, o cDNA obtido foi armazenado a -20°, até o momento da reação em cadeia da polimerase (PCR).

**Quadro 2:** Reagentes utilizados na reação da transcrição reversa para a síntese de cDNA a partir do RNA total extraído.

Reagentes	Volume (µL)
Água livre de DNase/RNase *	20,9
Tampão de PCR sem MgCl <sub>2</sub> (10X) * <sup>1</sup>	5,0
dNTP (2,5mM) * <sup>2</sup>	4,0
MgCl <sub>2</sub> (50mM) * <sup>1</sup>	1,5
RT Superscript III (200U/µL) * <sup>1</sup>	1,0
Random Primer (25U)* <sup>1</sup>	4,0
DTT (100mM) * <sup>1</sup>	1,0
RNAse out (40U/µL) *	0,6
Total	38,0

\* Life Technologies®, Califórnia, EUA; \*<sup>1</sup> Invitrogen®, Califórnia, EUA; \*<sup>2</sup> Promega®, Madison, EUA.

#### 5.4.3 Amplificação parcial do gene que codifica para a proteína VP6 de rotavírus do grupo A

A presença de RV-A foi investigada pela PCR convencional (cPCR), de acordo com o protocolo estabelecido por Iturriza-Gómara e colaboradores (2002), para a amplificação parcial do gene que codifica a proteína VP6 (Quadro 3). Em todos os experimentos foram empregados controles positivo e negativo. Como

controle positivo, utilizou-se o cDNA proveniente da amostra fecal JF43A positiva para RV-A, previamente, sequenciada. O controle negativo, por sua vez, foi realizado com adição de água livre de DNase e RNase.

**Quadro 3:** Sequência de iniciadores de cadeia utilizados na cPCR para amplificação parcial do gene que codifica para a proteína VP6 de rotavírus do grupo A.

Proteína alvo	Iniciadores	Nucleotídeos (posição - pb)	Fragmento (pb)	Sequência (5'-3')
VP6	VP6 - F (+)	747 – 766	379	gac ggv gcr act aca tgg t*
	VP6 - R (-)	1126 – 1106		gtc caa ttc atn cct ggt gg*

\* Código IUB (União Internacional de Bioquímica): N = A/C/G/T, R = A/G, V = G/A/C

Para a reação, 3 µL de cDNA foram adicionados a 22 µL da mistura da reação (Quadro 4), a seguir submetidos ao programa de desnaturação inicial de 94°C por 2 minutos; 40 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos, hibridização dos iniciadores de cadeia a 58°C por 30 segundos e amplificação a 72°C por 1 minuto, finalizando com extensão a 72°C por 7 minutos.

**Quadro 4:** Reagentes utilizados na cPCR para detecção do gene que codifica para a proteína VP6 de rotavírus do grupo A.

Reagentes	Volume (µL)
Água livre de DNase/RNase *	14,125
Tampão de PCR sem MgCl <sub>2</sub> (10X) * <sup>1</sup>	2,5
dNTP (2,5mM) * <sup>2</sup>	2,0
MgCl <sub>2</sub> (50mM) * <sup>1</sup>	1,25
Iniciadores VP6-F e VP6-R (pool 20µL) * <sup>3</sup>	2,0
Taq Polimerase Platinum (5U/µL) * <sup>1</sup>	0,125
Total	22,0

\* Life Technologies®, Califórnia, EUA; \*<sup>1</sup> Invitrogen®, Califórnia, EUA; \*<sup>2</sup> Promega®, Madison, EUA; \*<sup>3</sup> Eurofins MWG Operon®, Ebersberg, Alemanha.

#### 5.4.4 *Nested* PCR do gene que codifica para a proteína VP6 de rotavírus do grupo A

Para aumentar a sensibilidade de detecção de RV-A, os produtos obtidos no cPCR, a partir de todos os concentrados, foram a seguir utilizados como molde, na reação de *Nested* PCR. Esta etapa foi realizada de acordo com o protocolo estabelecido por Gallimore e colaboradores (2006), utilizando iniciadores específicos (Quadro 5), que hibridizam em sequências internas dos produtos obtidos no cPCR, dando origem a fragmentos menores de DNA.

Controles positivo e negativo foram empregados em todos os experimentos, utilizando-se a amostra fecal JF43A, como controle positivo para RV-A e a água livre de DNase e RNase, como controle negativo.

**Quadro 5:** Sequência de iniciadores de cadeia utilizados na *Nested*-PCR para amplificação parcial do gene que codifica para a proteína VP6 de rotavírus do grupo A.

Proteína alvo	Iniciadores	Fragmento (pb)	Sequência (5'-3')
VP6	VP6 - NF (+)	155	gcw aga aat ttt gat aca*
	VP6 - NR (-)		gat tca caa act gca ga

\*Código IUB (União Internacional de Bioquímica): W = AT

Em microtubos de 0,2 mL, 1 µL do produto obtido na reação de cPCR foi adicionado a 49 µL da mistura da reação de *Nested* PCR (Quadro 6). Os mesmos foram submetidos ao programa de desnaturação inicial de 94°C por 5 minutos; seguido de 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos, hibridização dos iniciadores de cadeia a 42°C por 30 segundos e amplificação a 72°C por 30 segundo, finalizando com extensão a 72°C por 5 minutos.

**Quadro 6:** Reagentes utilizados na *Nested*-PCR para detecção do gene que codifica para a proteína VP6 de rotavírus do grupo A.

Reagentes	Volume (µL)
Água livre de DNase/RNase *	35,3
Tampão de PCR sem MgCl <sub>2</sub> (10X) * <sup>1</sup>	5,0
dNTP (2,5mM) * <sup>2</sup>	4,0
MgCl <sub>2</sub> (50mM) * <sup>1</sup>	2,5
Iniciadores VP6-NF e VP6-NR ( <i>pool</i> 20µL) * <sup>3</sup>	2,0
<i>Taq</i> Polimerase Platinum (5U/µL) * <sup>1</sup>	0,2
Total	49,0

\* Life Technologies<sup>®</sup>, Califórnia, EUA; \*<sup>1</sup> Invitrogen<sup>®</sup>, Califórnia, EUA; \*<sup>2</sup> Promega<sup>®</sup>, Madison, EUA; \*<sup>3</sup> Eurofins MWG Operon<sup>®</sup>, Ebersberg, Alemanha.

#### 5.4.5 Análise dos produtos por eletroforese em gel de agarose

Os produtos amplificados foram separados por eletroforese (100 volts por 1 hora) em gel de agarose a 1,5% (Promega<sup>®</sup>, Madison, EUA), incorporado com solução de brometo de etídio (0,5µg/mL – Sigma Aldrich<sup>®</sup>, Brasil), utilizando-se uma cuba horizontal (HMEDI 10-BUV, Biosystems<sup>®</sup>) com tampão Tris-Borato EDTA (TBE) 1X, pH 8,4.

Em cada poço, foram aplicados 10 µL do produto da reação, somados a 2 µL do corante *blue orange loading dye* (Promega<sup>®</sup>, Madison, EUA). Como referência para o tamanho do produto foi utilizado um padrão de tamanho de DNA de 100 pb (Life Technologies<sup>®</sup>, Califórnia, EUA).

Os produtos obtidos foram visualizados em transiluminador de luz ultravioleta (GE HEALTH CARE, UNITED KINGDON) e o registro feito em sistema de captura de imagem (IMAGE QUANT 100 – GE HEALTH CARE, UNITED KINGDON), para posterior análise. Foram consideradas positivas, as amostras que apresentaram produtos com, aproximadamente, 379pb na cPCR e 155pb na *Nested* PCR.

## 5.5 Quantificação de rotavírus do grupo A

Para a determinação da carga viral, todos os concentrados de água obtidos foram submetidos à técnica de PCR em tempo real (qPCR), conforme descrito por Zeng e colaboradores (2008), utilizando-se oligonucleotídeos iniciadores para amplificação parcial do gene que codifica a proteína viral não estrutural NSP3 (Quadro 7). Além de quantificar, esta técnica, por ser mais sensível, pode detectar a presença de uma quantidade menor do genoma, não detectada nas técnicas anteriormente utilizadas.

**Quadro 7:** Sequência de iniciadores de cadeia e sonda, utilizados na qPCR para amplificação parcial do gene que codifica para a proteína não estrutural NSP3 de rotavírus do grupo A.

Proteína alvo	Iniciadores	Nucleotídeos (posição - pb)	Fragmento (pb)	Sequência (5'-3')
NSP3	NSP3 - F (+)	963 - 988	87	acc atc twc acr tra ccc tct atg ag*
	NSP3 - R (-)	1028 - 1049		ggg cac ata acg ccc cta tag c
	Sonda NSP3	995 - 1017		VIC-agt taa aag cta aca ctg tca aa-MGB <sup>1</sup>

\*Código IUB: R = A/G, W = A/T. <sup>1</sup>Sonda marcada com fluoróforo VIC e bloqueada pelo grupo MGB (*Minor Groove Binder*).

O quadro 8 apresenta a mistura da reação de qPCR, que foi submetida ao seguinte programa: 50°C por 2 minutos, 95°C por 10 minutos, seguido de 45 ciclos a 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto. O sistema utilizado foi o TaqMan da Applied Biosystems e as amostras foram aplicadas em duplicatas, em uma microplaca de 96 cavidades (MicroAmp<sup>®</sup>, Applied Biosystems, Califórnia, EUA), usando a plataforma ABI (Applied Biosystem, Califórnia, EUA). Esta etapa foi desenvolvida em parceria com o Laboratório de Virologia Comparada e Ambiental da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), no Rio de Janeiro.

**Quadro 8:** Reagentes utilizados no qPCR para amplificação parcial do segmento que codifica para a proteína NSP3 de rotavírus do grupo A.

Reagentes	Volume (µL)
Água livre de DNase/RNase *	5,0
TaqMan Universal PCR Master Mix * <sup>1</sup>	12,5
Iniciador NSP3-F (10µM) * <sup>2</sup>	1,0
Iniciador NSP3-R (10µM)* <sup>2</sup>	1,0
Sonda NSP3 FAM-MGB (0,5µM)* <sup>1</sup>	0,5
cDNA	5,0
Total	25,0

\* Life Technologies®, Califórnia, EUA; \*<sup>1</sup> Applied Biosystems, EUA; \*<sup>2</sup> Eurofins MWG Operon®, Ebersberg, Alemanha.

### 5.5.1 Determinação da eficiência do método de concentração viral

Após a contaminação de alíquotas representativas das áreas não urbanizada (Ponto4) e urbanizada (Ponto 8) com 50µL de suspensão fecal positiva para RV-A, contendo  $6,39 \times 10^7$  cópias de genoma, as mesmas foram submetidas ao protocolo de concentração viral. Os concentrados obtidos foram extraídos e empregados na síntese de cDNA, que por sua vez, foram utilizados na reação de qPCR para finalizar o experimento de determinação da eficiência do método de concentração viral.

O cálculo do percentual de recuperação foi realizado comparando-se o número de cópias genômicas de RV-A inoculadas e recuperadas. Como os resultados de qPCR são reportados em cópias por reação, foi necessário utilizar a seguinte fórmula matemática para converter o resultado no número exato de cópias inoculadas e recuperadas:

$$N_{\text{cópias total}} = (N_{\text{cópias/reação}} \times [V_{f_{\text{cDNA}}} / V_{\text{cDNA}}]) \times (V_{f_{\text{RNA}}} / V_{\text{RNA}}) \times (V_{\text{total}} / V_{\text{ext}})$$

Onde:

- $V_{\text{total}}$  = volume total da amostra (50µL para o cálculo do nº de cópias do genoma de RV-A no inoculo e 2000 µL para o cálculo do nº de cópias do genoma de RV-A no concentrado de água)

- $V_{ext}$  = volume de amostra submetido à extração de RNA (400 $\mu$ L)
- $V_{f_{RNA}}$  = volume final de RNA extraído (60 $\mu$ L)
- $V_{RNA}$  = volume de RNA aplicado na reação de cDNA (10 $\mu$ L)
- $V_{f_{cDNA}}$  = volume final da reação de cDNA (50 $\mu$ L)
- $V_{cDNA}$  = volume de cDNA aplicado na reação de qPCR (5 $\mu$ L)
- $N_{c\acute{o}pias/rea\c{c}\tilde{a}o}$  = número de cópias por reação obtido pelo qPCR (valor bruto)
- $N_{c\acute{o}pias\ total}$  = número de cópias total inoculado ou recuperado

O percentual de recuperação, que avalia a eficiência do método de concentração viral, foi calculado a partir do número total de cópias do genoma, inoculadas e recuperadas, utilizando-se a fórmula abaixo:

$$\% \text{ Recuperação} = N_{c\acute{o}pias\ recuperadas} \times 100 / N_{c\acute{o}pias\ inoculadas}$$

Onde:

- $N_{c\acute{o}pias\ recuperadas}$  = número total de cópias do genoma de RV-A recuperadas
- $N_{c\acute{o}pias\ inoculadas}$  = número total de cópias do genoma de RV-A inoculadas
- % Recuperação = percentual de recuperação do método

## 5.6 Determinação dos parâmetros microbiológicos

A análise de coliformes termotolerantes foi realizada em parceria com o Laboratório de Análises de Água da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Juiz de Fora. Para esta finalidade, as alíquotas de água, coletadas em frascos apropriados, foram mantidas refrigeradas e encaminhadas, no mesmo dia da coleta. No laboratório responsável foram processadas, de acordo com os métodos padrões estabelecidos para análise de água (APHA, 2005), sendo os resultados expressos em NMP/100mL.

## 5.7 Determinação dos parâmetros físico-químicos

Uma parte dos parâmetros físico-químicos investigados foi mensurada no momento da coleta. As medidas de condutividade, pH, salinidade e temperatura foram obtidas por meio da Sonda Multiparâmetro HI9828 (*Hanna Instruments*, Noruega); o oxigênio dissolvido, segundo metodologia descrita por Hermes e Silva (2004) utilizando-se o Ecokit (Alfakit, Brasil); o cloro livre, por meio do fotocolorímetro portátil (Medidor de cloro livre - AlfaKit, Brasil) e a turbidez, utilizando-se o turbidímetro (Turbidímetro Plus – AlfaKit, Brasil).

No Laboratório de Análise de Resíduos da Embrapa Gado de Leite - Juiz de Fora, no mesmo dia da coleta, foram realizadas as análises de cloreto, dureza, ferro, fósforo e nitrogênio amoniacal nas alíquotas de água colhidas, exclusivamente, para esta finalidade. Para estas análises, também foi utilizado o Ecokit.

## 5.8 Análise estatística

Os dados obtidos (detecção e quantificação de RV-A, parâmetros microbiológicos e físico-químicos, época de coleta e área de coleta) foram armazenados em um banco de dados criado no programa SPSS (versão 13.0). A partir deste, foi realizada estatística descritiva com cálculos de média  $\pm$  desvio-padrão e valores mínimo e máximo.

Para verificar a existência de associação entre a detecção de RV-A e a área de coleta (não urbanizada e urbanizada) foi realizado o teste qui-quadrado ( $\chi^2$ ) com correção de *Yates*, considerando valores de  $p < 0,05$ , como significativo. O mesmo foi realizado para avaliar a associação entre a detecção deste vírus e a época de coleta (seca ou úmida).

Os resultados de detecção de RV-A nos concentrados obtidos, utilizando as técnicas de cPCR e qPCR, também foram comparados pelo teste acima citado. Em adição, a associação da carga viral com a área e a época de coleta foi verificada pelo teste de Mann Whitney.

A análise dos parâmetros microbiológicos e físico-químicos foi realizada considerando-se a legislação em vigor, referente à qualidade da água. Para tanto, o teste de  $\chi^2$  com correção de *Yates* foi utilizado, também, para verificar a associação entre a detecção de RV-A e o fato da amostra estar dentro ou fora dos limites indicados na Resolução CONAMA nº357 (CONAMA, 2005). Assim, esta análise foi realizada, apenas para alguns parâmetros, cujos valores limites são determinados na legislação, como coliformes termotolerantes, ferro, fósforo, oxigênio dissolvido, nitrogênio amoniacal, pH e turbidez, conforme descrito no quadro 9.

Para aqueles parâmetros físico-químicos que apresentam limite estabelecido na legislação, mas para os quais, as amostras analisadas estiveram todas dentro (salinidade, cloreto) ou todas fora (cloro) destes limites, bem como para os parâmetros que não possuem valores determinados na legislação (temperatura da água, condutividade e dureza), foram feitas análises de correlação com a carga viral, utilizando-se o teste de correlação de *Pearson*, sem considerar a classificação do corpo hídrico.

**Quadro 9:** Valores limites estabelecidos para os parâmetros abaixo relacionados, nas águas de classes 1 e 2, pela Resolução nº357/2005 do Conselho Nacional do meio Ambiente (CONAMA).

Parâmetros avaliados	Classe 1	Classe 2
Cloreto (mg/L)	250	
Cloro (mg/L)	<0,01	
Coliformes termotolerantes (NMP/100mL)	< 200	< 1000
Ferro (mg/L)	0,3	
Fósforo (mg/L)	0,1	
Oxigênio dissolvido (mg/L)	> 6	> 5
Nitrogênio amoniacal (mg/L)	3,7 para pH $\leq$ 7,5	
	2,0 para 7,5 < pH $\leq$ 8,0	
pH	entre 6,0 e 9,0	
Salinidade (%)	<0,5%	
Turbidez (UNT)	< 40,0	<100

## 6 RESULTADOS

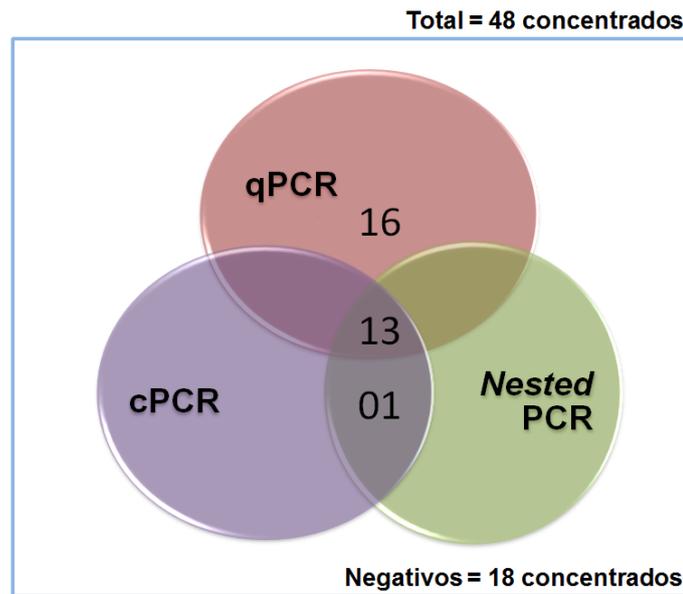
Para detectar a presença de RV-A e determinar sua quantificação, foram analisados, em primeiro lugar, os ensaios experimentais realizados para avaliar a eficiência do método de concentração viral (Tabela 3). Os resultados mostraram um percentual de recuperação de 2,2% na amostra representativa da área urbanizada e 3,9%, na não urbanizada.

**Tabela 3:** Eficiência do método de concentração viral na detecção de rotavírus do grupo A.

Amostra de água analisada	RV-A		
	Cópias de genomas inoculadas	Cópias de genomas recuperadas	Taxa de Recuperação (%)
Área não urbanizada (Ponto 4)	6,39 X 10 <sup>7</sup>	2,50 X 10 <sup>6</sup>	3,9
Área urbanizada (Ponto 8)		1,38 X 10 <sup>6</sup>	2,2

### 6.1 Detecção e quantificação de rotavírus do grupo A

Os RV-A foram detectados em 62,5% (30/48) dos concentrados analisados, considerando-se os resultados obtidos pelas técnicas de cPCR, *Nested* PCR e qPCR (Figura 11). Pela cPCR foram detectadas 29,1% (14/48) de concentrados positivos e todos foram confirmados pela *Nested* PCR. No entanto, a utilização da técnica de qPCR permitiu a detecção de RV-A em um número, consideravelmente, maior de concentrados (60,4% = 29/48), mostrando ter sido a técnica mais sensível ( $p = 0,001$ ), dentre as utilizadas neste estudo.



**Figura 11:** Detecção de rotavírus do grupo A nos 48 concentrados obtidos, utilizando-se as metodologias de PCR convencional, Nested PCR e PCR em tempo real.

Os resultados de detecção de RV-A, por área, ponto e época de coleta (Tabela 4), mostraram que na área não urbanizada, 16,7% (08/48) dos concentrados foram positivos, sendo 10,4% (05/48) detectados no reservatório da represa de São Pedro (pontos 3 e 4). Na área urbanizada, a detecção de RV-A foi mais expressiva (22/48 = 45,8%), com destaque para os pontos 5 e 8 (06/48 = 12,5%), nos quais todos os concentrados foram positivos para este vírus. A análise estatística mostrou uma associação significativa entre a detecção de RV-A e a área de coleta ( $p < 0,001$ ), entretanto, no que diz respeito à época das coletas, os resultados mostraram que concentrados positivos para RV-A foram detectados tanto na época seca (27,1% = 13/48) quanto na época úmida (35,4% = 17/48), sem diferença estatisticamente significativa entre ambas ( $p = 0,371$ ).

**Tabela 4:** Detecção de rotavírus do grupo A nos concentrados obtidos na Bacia Hidrográfica do Córrego São Pedro, por área, ponto e época de coleta.

Áreas	Pontos de coleta	Período de coleta						Positivas/Total (%)	
		Época Seca			Época Úmida				
		Maio	Julho	Agosto	Dezembro	Fevereiro	Abril		
Área não urbanizada	1	-	+	-	+	+	-	03/48 (6,25%)	
	Sub-bacia A	2	-	-	-	-	-	-	-
		3	-	+	-	+	+	-	03/48 (6,25%)
		4	-	-	-	+	+	-	02/48 (4,2%)
Área urbanizada	Sub-bacia B	5	+	+	+	+	+	+	06/48 (12,5%)
		6	+	+	-	+	+	+	05/48 (10,4%)
	Sub-bacia C	7	+	+	+	-	+	+	05/48 (10,4%)
		8	+	+	+	+	+	+	06/48 (12,5%)
<b>Positivas/Total (%)</b>		13/48 (27,1%)			17/48 (35,4%)			30/48 (62,5%)	

Na tabela 5 podem ser observados os dados da carga viral por área, ponto e época do ano. Um número maior de cópias do genoma foi encontrado na área urbanizada, tendo sido observada uma associação significativa entre a carga viral e a área de coleta ( $p < 0,001$ ). No entanto, o mesmo não foi observado com relação à carga viral e a época da coleta ( $p = 0,297$ ), de modo que, o volume maior ou menor de água, proveniente das chuvas, não influenciou na carga viral.

**Tabela 5:** Carga viral dos concentrados positivos para rotavírus do grupo A por área, ponto e época de coleta.

Área	Pontos de coleta	Carga viral (cg/L*)					
		Época Seca			Época Úmida		
		Maio	Julho	Agosto	Dezembro	Fevereiro	Abril
Área não urbanizada	1	-	$2,19 \times 10^3$	-	$5,65 \times 10^3$	$1,53 \times 10^3$	-
	2	-	-	-	-	-	-
	3	-	$6,27 \times 10^3$	-	$1,72 \times 10^3$	-	-
	4	-	-	-	$7,44 \times 10^2$	$5,61 \times 10^2$	-
Área urbanizada	5	$1,75 \times 10^4$	$8,95 \times 10^3$	$1,92 \times 10^3$	$8,32 \times 10^3$	$2,16 \times 10^3$	$2,92 \times 10^4$
	6	$1,49 \times 10^4$	$3,09 \times 10^3$	-	$7,77 \times 10^2$	$1,66 \times 10^3$	$1,54 \times 10^4$
	7	$4,74 \times 10^2$	$3,41 \times 10^3$	$2,67 \times 10^3$	-	$2,32 \times 10^4$	$1,78 \times 10^4$
	8	$2,59 \times 10^3$	$6,70 \times 10^2$	$3,76 \times 10^3$	$5,46 \times 10^3$	$6,36 \times 10^4$	$1,16 \times 10^4$

\* Carga viral = número de cópias do genoma por litro (cg/L)

## 6.2 Parâmetros microbiológicos

Os valores de coliformes termotolerantes, determinados em todas as amostras obtidas, ao longo do estudo, estão apresentados na tabela 6, com destaque, em amarelo, para os pontos em que foram detectados RV-A. A contagem de coliformes foi limitada ao valor de 1600 NMP/100mL em razão da alta concentração dos mesmos na amostra. Entretanto, o laboratório terceirizado para a realização desta etapa do trabalho, não considerou a realização de uma metodologia capaz de indicar o número exato destes microrganismos.

**Tabela 6:** Contagem de coliformes termotolerantes nas amostras coletadas na Bacia Hidrográfica do Córrego São Pedro, nas diferentes áreas, pontos e época de coleta.

Época de Coleta	Coliformes termotolerantes (NMP <sup>*1</sup> /100mL)							
	Área não urbanizada				Área urbanizada			
	Classe 1 <sup>*2</sup> : valor limite ≤ 200NMP/100mL				Classe 2 <sup>*2</sup> : valor limite ≤ 1000NMP/100mL			
	Ponto1	Ponto 2	Ponto 3	Ponto 4	Ponto 5	Ponto 6	Ponto 7	Ponto 8
Seca	50	80	33	22	170	170	34	≥1600
	22	300	13	7	1600	1600	1600	350
	30	500	23	110	≥1600	≥1600	≥1600	≥1600
Úmida	≥1600	≥1600	170	26	≥1600	≥1600	1600	≥1600
	≥1600	≥1600	≥1600	≥1600	≥1600	350	350	280
	140	350	50	14	≥1600	≥1600	≥1600	≥1600

\*1 NMP: numero mais que provável. \*2 Classificação da água, segundo Resolução CONAMA n°357/2005.

De acordo com a legislação em vigência, os pontos de 1 a 4 são classificados como água doce de classe 1 e, portanto, devem apresentar um limite máximo para coliformes termotolerantes de 200 NPM/100mL, enquanto os pontos de 5 a 8 correspondem a água doce de classe 2, devendo apresentar no máximo 1000 NPM/100mL de coliformes termotolerantes. Seguindo estes critérios, apenas 45,8% (22/48) das amostras de água se enquadraram nos valores limites determinados na legislação e, ainda assim, 50% (11/22) destas, foram positivas para RV-A. Por outro lado, 54,2% das amostras de água se apresentaram fora do limite estabelecido e, nestas, os RV-A foram detectados em 73,1% (19/26). A análise estatística dos resultados apresentados acima mostrou que não houve associação significativa

entre a presença de RV-A e a classificação da água, segundo a análise de coliformes termotolerantes ( $p = 0,178$ ).

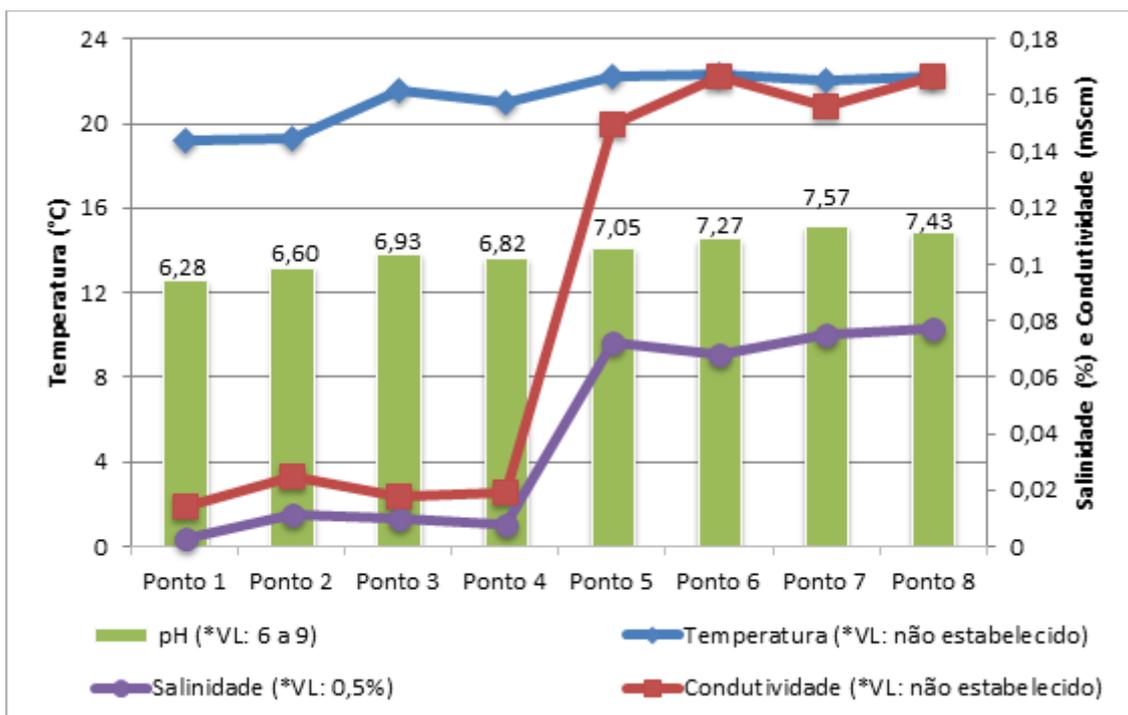
#### **6.4 Parâmetros físico-químicos**

Com relação aos parâmetros físico-químicos, a tabela 7 apresenta os valores médios  $\pm$  desvio padrão, valores mínimo e máximo de cloreto (mg/L), cloro (mg/L), condutividade (mS/cm), dureza (mg/L), ferro (mg/L), fósforo (mg/L), oxigênio dissolvido (mg/L), nitrogênio amoniacal (mg/L), pH, salinidade (%), temperatura da água ( $^{\circ}\text{C}$ ) e turbidez (UNT), obtidos em todos os pontos do estudo.

**Tabela 7:** Valores médios  $\pm$  desvio padrão, valores mínimo e máximo dos parâmetros físico-químicos analisados nas 48 amostras de água obtidas na Bacia Hidrográfica do Córrego São Pedro, no período de julho de 2011 a maio de 2012.

Parâmetros	Ponto 1	Ponto 2	Ponto 3	Ponto 4	Ponto 5	Ponto 6	Ponto 7	Ponto 8
<b>Cloreto (mg/L)</b>	33,50 $\pm$ 18,87 (20,0-65,0)	25,00 $\pm$ 13,01 (16,0-50,0)	33,17 $\pm$ 30,55 (16,0-95,0)	26,67 $\pm$ 16,52 (16,0-60,0)	36,00 $\pm$ 16,78 (24,0-68,0)	38,00 $\pm$ 21,28 (24,0-80,0)	45,33 $\pm$ 26,01 (24,0-84,0)	39,00 $\pm$ 16,86 (24,0-70,0)
<b>Cloro (mg/L)</b>	0,127 $\pm$ 0,107 (0,030-0,300)	0,133 $\pm$ 0,088 (0,040-0,280)	0,122 $\pm$ 0,054 (0,040-0,200)	0,220 $\pm$ 0,114 (0,100-0,410)	2,473 $\pm$ 2,121 (0,100-5,720)	1,047 $\pm$ 1,130 (0,100-2,940)	1,885 $\pm$ 1,782 (0,100-5,060)	1,840 $\pm$ 1,90 (0,100-5,380)
<b>Condutividade (mS/cm)</b>	0,014 $\pm$ 0,005 (0,009-0,022)	0,025 $\pm$ 0,012 (0,014-0,046)	0,018 $\pm$ 0,004 (0,015-0,024)	0,019 $\pm$ 0,008 (0,013-0,034)	0,150 $\pm$ 0,033 (0,118-0,189)	0,167 $\pm$ 0,050 (0,112-0,240)	0,156 $\pm$ 0,035 (0,126-0,208)	0,167 $\pm$ 0,037 (0,135-0,219)
<b>Dureza (mg/L)</b>	39,50 $\pm$ 14,53 (24,0-65,0)	34,67 $\pm$ 14,24 (24,0-60,0)	32,50 $\pm$ 30,72 (16,0-95,0)	35,50 $\pm$ 24,46 (20,0-85,0)	72,00 $\pm$ 37,35 (44,0-120,0)	76,00 $\pm$ 42,71 (44,0-140,0)	81,33 $\pm$ 45,02 (40,0-148,0)	63,33 $\pm$ 23,65 (40,0-100,0)
<b>Ferro (mg/L)</b>	0,583 $\pm$ 0,465 (0,25-1,50)	1,208 $\pm$ 1,880 (0,25-5,00)	0,208 $\pm$ 0,102 (0,00-0,25)	0,208 $\pm$ 0,102 (0,00-0,25)	1,167 $\pm$ 0,931 (0,50-3,00)	0,958 $\pm$ 0,635 (0,25-2,00)	0,916 $\pm$ 0,376 (0,50-1,50)	0,500 $\pm$ 0,273 (0,25-1,00)
<b>Fósforo (mg/L)</b>	0,163 $\pm$ 0,400 (0,00-0,980)	0,040 $\pm$ 0,098 (0,000-0,240)	0,040 $\pm$ 0,098 (0,00-0,240)	0,040 $\pm$ 0,098 (0,000-0,240)	0,476 $\pm$ 0,336 (0,240-1,000)	0,545 $\pm$ 0,517 (0,240-1,500)	0,309 $\pm$ 0,264 (0,000-0,800)	0,476 $\pm$ 0,335 (0,240-1,000)
<b>Oxigênio dissolvido (mg/L)</b>	6,4 $\pm$ 1,9 (4,4-9,2)	5,8 $\pm$ 2,1 (3,0-8,6)	8,0 $\pm$ 1,2 (6,0-9,0)	7,5 $\pm$ 1,7 (4,6-9,0)	3,8 $\pm$ 2,7 (1,0-7,4)	5,0 $\pm$ 2,9 (1,0-8,0)	6,7 $\pm$ 2,4 (2,8-10,0)	5,1 $\pm$ 3,2 (1,4-10,0)
<b>Nitrogênio amoniacal (mg/L)</b>	0,579 $\pm$ 0,910 (0,121-2,430)	0,293 $\pm$ 0,219 (0,100-0,610)	0,287 $\pm$ 0,216 (0,121-0,610)	0,421 $\pm$ 0,308 (0,121-1,000)	3,868 $\pm$ 0,555 (3,640-5,000)	3,642 $\pm$ 0,000 (3,642-3,642)	3,118 $\pm$ 1,282 (0,500-3,642)	3,642 $\pm$ 0,000 (3,642-3,642)
<b>pH</b>	6,28 $\pm$ 0,57 (5,61-7,18)	6,60 $\pm$ 0,42 (5,98-7,22)	6,93 $\pm$ 0,64 (6,33-7,91)	6,82 $\pm$ 0,65 (6,04-7,84)	7,05 $\pm$ 0,26 (6,63-7,32)	7,27 $\pm$ 0,21 (6,97-7,48)	7,57 $\pm$ 0,23 (7,23-7,87)	7,43 $\pm$ 0,20 (7,15-7,69)
<b>Salinidade (%)</b>	0,003 $\pm$ 0,005 (0,000-0,010)	0,011 $\pm$ 0,004 (0,010-0,020)	0,010 $\pm$ 0,000 (0,010-0,010)	0,008 $\pm$ 0,004 (0,000-0,010)	0,072 $\pm$ 0,017 (0,050-0,090)	0,068 $\pm$ 0,018 (0,050-0,090)	0,075 $\pm$ 0,016 (0,060-0,100)	0,076 $\pm$ 0,018 (0,060-0,100)
<b>Temperatura da água (°C)</b>	19,18 $\pm$ 2,88 (15,86-22,16)	19,34 $\pm$ 2,63 (16,35-22,37)	21,56 $\pm$ 3,32 (18,08-26,92)	21,03 $\pm$ 3,18 (18,60-26,91)	22,21 $\pm$ 2,01 (19,70-25,31)	22,31 $\pm$ 2,10 (19,56-25,52)	22,01 $\pm$ 2,07 (19,57-25,07)	22,22 $\pm$ 2,14 (19,82-25,43)
<b>Turbidez (UNT)</b>	7,64 $\pm$ 2,55 (3,78-11,34)	18,59 $\pm$ 19,24 (3,20-56,00)	8,99 $\pm$ 1,84 (6,44-11,34)	12,83 $\pm$ 6,36 (7,00-25,20)	477,58 $\pm$ 284,29 (52,28-903,70)	179,91 $\pm$ 157,97 (45,5-424,06)	332,27 $\pm$ 238,80 (36,4-764,82)	299,85 $\pm$ 219,61 (38,92-702,24)

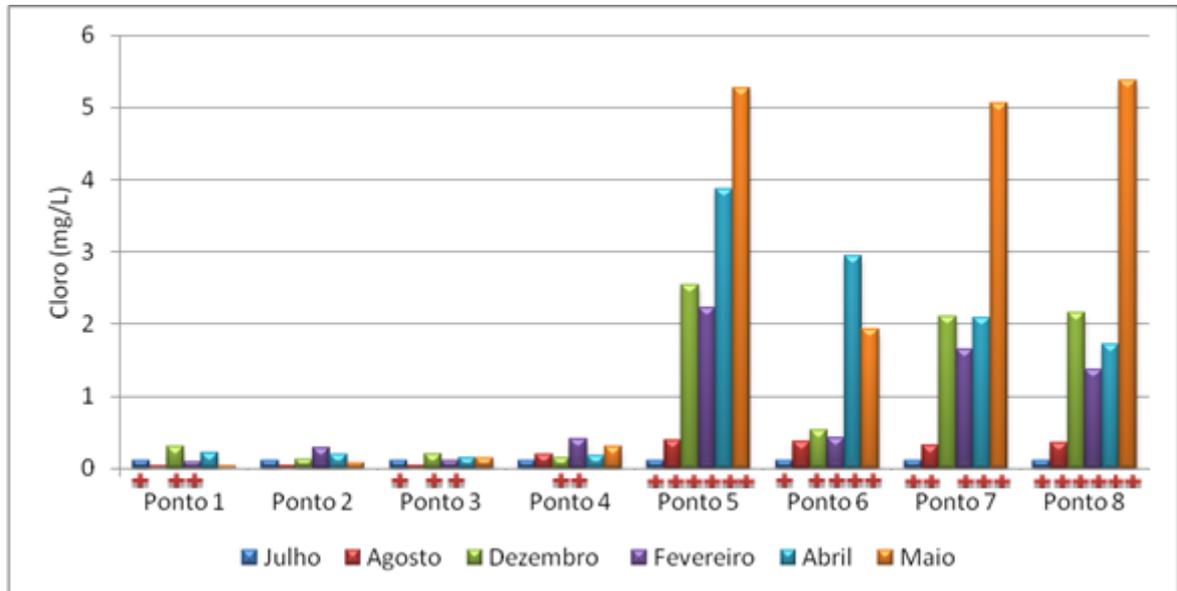
A figura 12 apresenta a média dos valores de pH, temperatura (°C), salinidade (%) e condutividade (mS/cm) da água em cada um dos pontos de coleta. Todas as médias obtidas para o parâmetro pH encontravam-se de acordo com o exigido pela legislação, para água doce (6,0 a 9,0), no entanto, valores pontuais menores do que 6,0 foram registrados nos pontos 1 e 2. Os valores de temperatura da água não apresentaram grandes variações, entretanto, um ligeiro aumento foi identificado na área urbanizada (ponto 5 ao 8). Os valores de salinidade confirmaram as características da matriz estudada, uma vez que em água doce, esse parâmetro deve ser menor que 0,5%. No parâmetro condutividade, os valores obtidos na área não urbanizada foram baixos e bem próximos entre si, ao contrário do que foi observado na área urbanizada, onde os resultados mantiveram-se mais altos, variando de 0,150 e 0,247mS/cm.



**Figura 12:** Média dos valores dos parâmetros físico-químicos – pH, temperatura, salinidade e condutividade, em todos os pontos analisados. \*VL: valor limite estabelecido pela legislação.

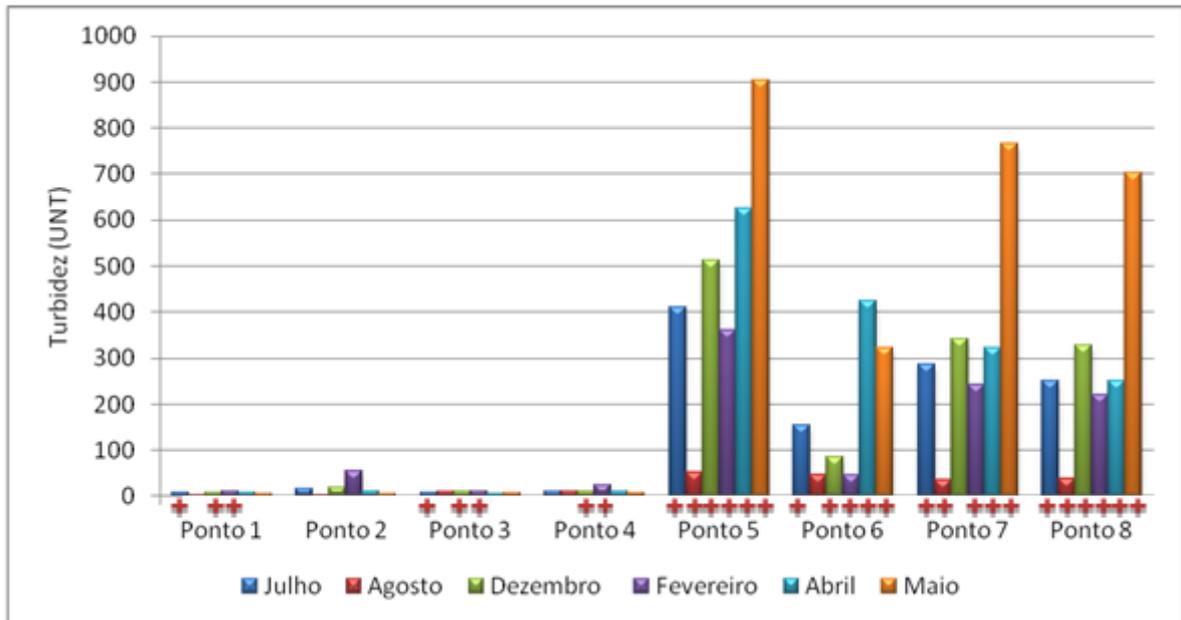
Os valores de cloro e turbidez apresentaram maior oscilação entre os pontos analisados. Para o cloro (Figura 13), todas as amostras apresentaram valores maiores que 0,01mg/L, que é o limite estabelecido para todas as classes de água

doce, destacando-se os altos valores observados na área urbanizada (pontos 5 ao 8).



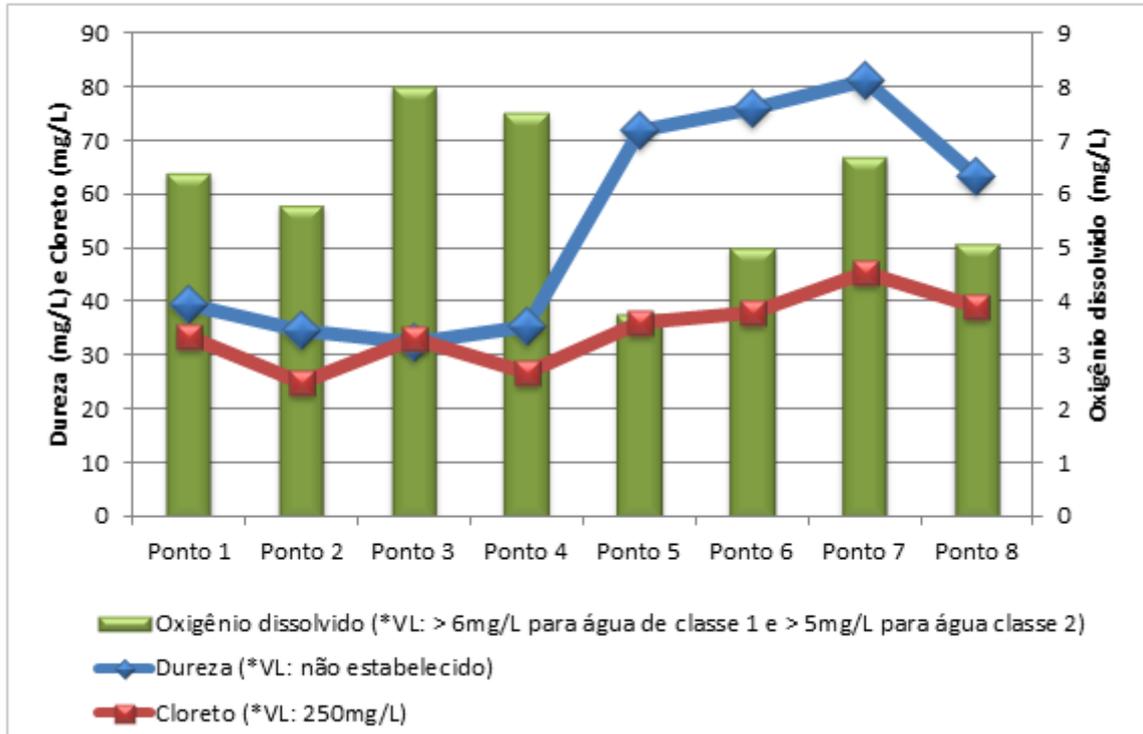
**Figura 13:** Valores de cloro (mg/L) por ponto, obtidos em cada coleta, no período de julho de 2011 a maio de 2012. O sinal positivo (+) indica as amostras positivas para RV-A.

Em relação ao parâmetro turbidez, as oscilações, também, ocorreram a partir do ponto 5 (Figura 14). Na área não urbanizada (ponto 1 ao 4), quase todos os valores obtidos encontraram-se dentro do exigido pela legislação (< 40 UNT em águas de classe 1), com exceção do resultado obtido no ponto 2, na coleta de fevereiro (56 UNT). Na área urbanizada (ponto 5 ao 8), apenas 16,7% (4/24) das amostras de água encontraram-se dentro do valor aceitável pela legislação em vigor (< 100 UNT para águas de classe 2), ou seja, 83,3% (20/24) das amostras obtidas, apresentaram-se fora do limite estabelecido.



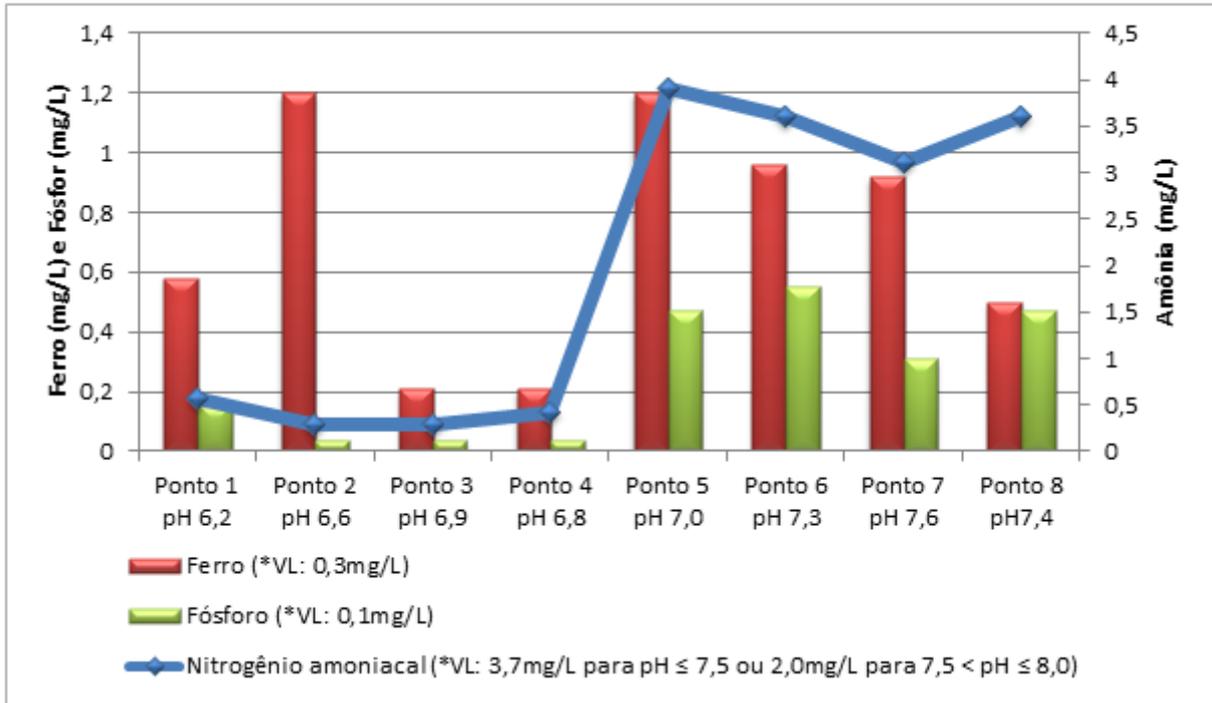
**Figura 14:** Valores de turbidez (UNT) por ponto, obtidos em cada coleta, no período de julho de 2011 a maio de 2012. O sinal positivo (+) indica as amostras positivas para RV-A.

A figura 15 apresenta os valores médios de oxigênio dissolvido (mg/L), dureza (mg/L) e cloreto (mg/L), obtidos na água, por ponto de coleta. Os dados de oxigênio dissolvido apresentaram uma variação ao longo dos pontos, com destaque para valores médios menores do que o indicado pela legislação nos pontos 5 e 6 (limite mínimo de 5 mg/L para água de classe 2) e no ponto 2, onde esperava-se valores maiores do que 6 mg/L (limite mínimo indicado para água de classe 1). Para o parâmetro dureza, as médias obtidas se mantiveram próximas nos quatro primeiros pontos (32,5 a 39,5 mg/L), mas apresentaram-se elevadas nos últimos quatro pontos (área urbanizada), variando de 63,3 a 81,3 mg/L. Com relação ao parâmetro cloreto, todos os resultados obtidos estavam de acordo com o exigido pela legislação em água doce (< 250 mg/L), no entanto, médias maiores, também, foram observadas na área urbanizada (36 a 45,3 mg/L).



**Figura 15:** Média dos valores dos parâmetros físico-químicos –oxigênio dissolvido, dureza e cloreto em todos os pontos analisados. \*VL: valor limite estabelecido pela legislação.

As médias obtidas para o parâmetro ferro, também apresentaram variações ao longo dos pontos estudados, de modo que apenas nos pontos 3 e 4 os valores encontravam-se de acordo com o limite estabelecido ( $< 0,3\text{mg/L}$ ), como mostra a figura 16. Neste mesmo gráfico é possível verificar, ainda, que os valores médios de fósforo se apresentaram dentro dos limites indicados nos pontos de 2 a 4, com variações de 0,309 a 0,545 mg/L, a partir do ponto 5 (área urbanizada). No que diz respeito ao nitrogênio amoniacal, o limite estabelecido na legislação vigente está relacionado ao valor do pH, sendo de, no máximo, 3,7 mg/L para amostras com pH menor ou igual a 7,5 e de 2,0 mg/L, quando o pH da amostra se encontra entre 7,5 e 8,0. Considerando essas informações, apesar dos valores aumentados na área urbanizada (ponto 5 ao 8), apenas as médias dos pontos 5 ( $\text{pH} < 7,5$ ) e 7 ( $7,5 < \text{pH} < 8,0$ ) se encontravam fora do limite estabelecido.



**Figura 16:** Média dos valores dos parâmetros físico-químicos – ferro, fósforo e nitrogênio amoniacal em todos os pontos analisados.

Nas análises estatísticas, considerando-se a classificação do corpo hídrico pela Resolução CONAMA n°357, foi observada uma associação significativa entre a detecção de RV-A e a turbidez ( $p = 0,005$ ). O mesmo foi observado para os parâmetros nitrogênio amoniacal ( $p < 0,001$ ) e fósforo ( $p < 0,001$ ), diferentemente do observado para pH ( $p = 0,644$ ), ferro ( $p = 0,281$ ) e oxigênio dissolvido ( $p = 0,504$ ).

Nas análises de correlação, nas quais não foi levada em consideração a classificação do corpo hídrico pela Resolução CONAMA n°357, não houve associação significativa entre a condutividade da água e o número de cópias genômicas de RV-A detectadas ( $p = 0,780$ ), o que foi observado, também, em relação aos parâmetros cloreto ( $p = 0,489$ ), cloro ( $p = 0,726$ ) e dureza ( $p = 0,886$ ). Entretanto, foi observada uma correlação positiva, embora fraca entre a carga viral e os parâmetros, salinidade ( $p = 0,024$ ;  $r = 0,325$ ) e temperatura da água ( $p = 0,027$ ;  $r = 0,320$ ).

## 7 DISCUSSÃO

Um dos grandes obstáculos para a pesquisa de vírus em águas superficiais é a dispersão das partículas virais presente nas mesmas, o que exige o emprego de protocolos de concentração viral antes da utilização de técnicas moleculares de detecção (RUGGERI e FIORE, 2012).

A metodologia de adsorção e eluição em membrana carregada negativamente, com posterior ultrafiltração e detecção por PCR utilizada neste estudo, foi descrita inicialmente para a recuperação de poliovírus em águas do mar, quando os autores observaram taxas de recuperação que variaram de 50 a 73% (KATAYAMA, SHIMASAKI e OHGAKI, 2002). Outros pesquisadores, utilizando a mesma metodologia, descreveram a recuperação de norovírus com taxas de 1,6 a 6,0%, em diferentes matrizes aquáticas (VICTORIA et al., 2010). Alguns autores já haviam realizado modificações neste método, as quais permitiram a detecção de enterovírus em água doce e do mar com taxas de recuperação de 51% e 23%, respectivamente (FUHRMAN, LIANG e NOBLE, 2005). Entretanto, ao testar diferentes concentrações de vírus, os autores observaram que menores cargas virais refletiram nas taxa de recuperação dos mesmos, que se tornaram menores e mais variáveis.

Para água doce, o protocolo desenvolvido por Katayama e colaboradores (2002) utiliza uma etapa extra, que consiste na adição de  $MgCl_2$  numa concentração final de 25mM, necessário para a ligação inicial do vírus à membrana. A concentração de  $MgCl_2$  é um importante fator de interferência e deve ser estabelecida, em função do tipo de água analisada e do vírus a ser pesquisado, a fim de obter a melhor taxa de recuperação (VICTORIA et al., 2009). Assim, foi realizado um estudo para avaliar as melhores condições para recuperação de norovírus e astrovírus, em diferentes matrizes aquáticas (água de torneira, água mineral, água do mar e água de rio), onde foram testadas diferentes concentrações de  $MgCl_2$  (5mM, 25mM e 50mM). Os resultados mostraram que a estratégia mais eficiente, em água de rio, foi a que utilizou  $MgCl_2$  5mM, com taxas de recuperação de 17,8% e 42,7%, respectivamente, para os vírus testados (VICTORIA et al., 2009).

No que diz respeito aos RV-A, como não foi realizado estudo anterior para verificar qual a melhor estratégia de recuperação em água doce, neste trabalho, foi utilizada aquela que se mostrou mais eficiente para os norovírus e astrovírus, ou seja, adição de  $MgCl_2$  3mM (VICTORIA et al., 2009). Esta estratégia possibilitou a recuperação de RV-A em amostras representativas da BHCSP, porém foram observadas baixas taxas de recuperação viral, principalmente, nas águas provenientes da área urbana, que em razão do despejo de esgoto, apresentam-se bem turvas e com muito sedimento. Uma das explicações para a menor eficiência do método de concentração viral na área urbana pode ser a perda das partículas virais na primeira etapa de filtração, necessária para evitar a obstrução da membrana de carga negativa, quando as partículas virais agregadas ao sedimento ou adsorvidas aos materiais particulados podem ter ficado retidas no primeiro filtro, sendo eliminadas. Outra possibilidade é a presença da maior quantidade de inibidores na água, devido à descarga de esgoto doméstico, interferindo com as técnicas utilizadas para detecção viral.

Apesar das baixas taxas de recuperação, é importante ressaltar que foi possível detectar RV-A em 62,5% dos concentrados analisados neste estudo, um resultado que poderia ser ainda maior se o rendimento do método de concentração utilizado tivesse sido mais satisfatório. Taxas de recuperação baixas, também, foram encontradas em pesquisas de RV-A em água doce, no Rio de Janeiro, onde se utilizando  $MgCl_2$  25mM foi observada uma taxa de eficiência de 2,06%, a qual permitiu a detecção destes vírus em 25% dos concentrados testados (VIEIRA, 2010). Por outro lado, a mesma pesquisa realizada em igarapés de Manaus, registrou uma taxa de recuperação de 76,4%, quando o  $MgCl_2$  foi utilizado numa concentração final de 3mM, o que permitiu a detecção de RV-A em 63% das amostras (FERREIRA, 2007).

Portanto, é importante salientar que outros fatores podem interferir nas diversas etapas do processo de concentração viral influenciando diretamente na eficiência do método, como as substâncias químicas orgânicas (polissacarídeos, proteínas, ácido húmico e tânico) e inorgânicas (compostos metálicos), presentes em cada amostra de água (IJZERMAN, DAHLING e FOUT, 1997). Além disso, a manipulação da amostra durante as etapas subsequentes a concentração viral (extração, síntese de cDNA e reação de amplificação), pode gerar perdas de material genético, que não são consideradas no cálculo de eficiência do método.

As técnicas moleculares representaram um grande avanço no monitoramento ambiental de vírus, ao permitirem a detecção do genoma viral. Entretanto, estas técnicas não fornecem nenhuma informação sobre a infecciosidade da partícula viral, uma vez que o material genético encontrado pode ser oriundo de partículas infecciosas ou de vírus inativados e/ou defectivos (GASSILLOUD, SCHWARTZBROD e GANTZER, 2003; FONG e LIPP, 2005; HARAMOTO et al., 2007; HAMZA et al., 2009; GIRONES et al., 2010). No entanto, este assunto tem sido muito discutido, pois, considerando-se a instabilidade do RNA livre e o fato de que o método de concentração foi desenvolvido com base na estrutura da partícula viral, a detecção do genoma viral livre contribui tão substancialmente quanto a detecção da partícula (HARAMOTO et al., 2007). Neste sentido, Espinosa e colaboradores (2008) encontraram uma boa correlação entre a redução da infecciosidade viral e a persistência do material genético de RV-A e astrovírus, em águas superficiais, reforçando a ideia de que as técnicas moleculares podem ser utilizadas para indicar a contaminação viral.

Três protocolos diferentes (cPCR, *Nested* PCR e qPCR) foram empregados para detectar e quantificar RV-A em concentrados de água, tendo sido utilizados iniciadores específicos para amplificar regiões conservadas do genoma. A presença do vírus foi investigada, inicialmente, por cPCR pela amplificação parcial do gene que codifica a proteína VP6, que tem se mostrado mais eficiente na detecção de RV-A em amostras ambientais, quando comparada com VP4 e VP7 (FERREIRA et al., 2009). Em adição, outro protocolo de amplificação de VP6, empregando iniciadores internos (*Nested* PCR), foi utilizado nesta pesquisa, que em função de sua alta sensibilidade pode detectar concentrações muito pequenas do genoma viral em amostras ambientais (GALLIMORE et al., 2006). Ainda assim, no presente estudo, cPCR e *Nested* PCR apresentaram a mesma eficiência, permitindo a detecção de RV-A, exatamente, nas mesmas amostras. No entanto, Vieira (2010), relatou resultados mais satisfatórios na detecção deste mesmo vírus, quando utilizou a técnica de *Nested* PCR, o que permitiu um aumento no número de concentrados positivos.

Na literatura, vários protocolos foram descritos para detecção de RV-A por qPCR, utilizando diferentes genes como alvo de amplificação, dentre os quais VP2 (GUTIÉRREZ-AGUIRRE et al., 2008), VP4 (MIN et al., 2006), VP6 (SCHWARZ et al., 2002; KANG et al., 2004; LOGAN et al., 2006) e NSP3 (PANG et al., 2004;

ZENG et al., 2008), sendo os dois últimos, utilizados para amostras ambientais. Entretanto, pelo fato do gene que codifica para a proteína NSP3 ser mais conservado do que o que codifica para a proteína VP6, que apresenta uma elevada diversidade intragenotípica (MATTHIJNSSENS et al., 2008a), foi utilizada neste trabalho, a técnica de qPCR para amplificação de NSP3. A detecção de RV-A pelo qPCR apresentou resultados mais satisfatórios do que os obtidos pela técnica convencional (VP6), discordando de Vieira (2010) que, utilizando os mesmos protocolos, mostrou melhores resultados com a *Nested* PCR e corroborando outros estudos que apontam esta metodologia como a mais sensível para a detecção de RV-A (PANG et al., 2004; ZENG et al., 2008; MORESCO et al., 2012).

A inserção das bacias hidrográficas em áreas urbanas, em virtude do crescimento desordenado da população, aumenta a exposição destes mananciais aos dejetos humanos e, conseqüentemente, a contaminação por RV-A, cujas partículas virais são eliminadas em concentração extremamente elevada nas fezes. Além disso, a estabilidade deste vírus no ambiente aquático, podendo persistir por longos períodos de tempo e sua resistência aos processos aplicados durante o tratamento da água são características importantes que podem viabilizar sua transmissão ao homem (ESPINOSA et al., 2008; CARTER, 2005). Deste modo, a contaminação de águas superficiais, por este vírus, exerce um impacto direto na saúde pública, à medida que surtos de gastroenterites por RV-A podem ser decorrentes da utilização destes mananciais contaminados para consumo, recreação, irrigação e aquicultura (van ZYL et al., 2006; WYN-JONES e SELLWOOD, 2001).

O percentual de detecção de RV-A encontrado na BHCSF, sugere uma elevada contaminação deste manancial, no qual estão inseridos 13 bairros com uma população de aproximadamente 31 mil habitantes. A investigação de RV-A em água doce, realizada em diversos trabalhos no Brasil e no mundo, tem demonstrado diferentes níveis de contaminação deste ecossistema, com índices de positividade que variaram de 14 a 90% (van ZYL et al., 2006; MIAGOSTOVICH et al., 2008; MORESCO, 2008; HAMZA et al., 2009; FERREIRA et al., 2009; LODDER et al., 2010; LI et al., 2011a; VIEIRA et al., 2012).

Embora a presença de RV-A tenha sido menor na área não urbanizada, quando comparada com a área urbanizada da bacia, a detecção do vírus neste local indica a sua contaminação, que pode ser justificada pelo fato do córrego passar

dentro de propriedades particulares, possibilitando a utilização destas águas em diversas atividades, como a criação de animais, próximo a esses corpos d'água; pelo fácil acesso ao reservatório da represa, a partir do quintal de várias casas e lançamento de esgoto, oriundo das residências e até mesmo do Centro de Convenções Expominas, embora isso não seja visível.

A Portaria nº2914 de dezembro de 2011, que dispõe sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano, recomenda, no capítulo V, parágrafo 29, a inclusão de monitoramento de vírus entéricos no ponto de captação de água, proveniente de manancial superficial de abastecimento. Determina, ainda, no parágrafo 34 do mesmo capítulo, a manutenção obrigatória de, no mínimo, 0,2 mg/L de cloro residual livre, em toda a extensão do sistema de distribuição (reservatório e rede). Deste modo, a detecção de RV-A no reservatório da represa de São Pedro aliada a informações de que este vírus resiste a concentrações residuais de cloro, maiores do que a estabelecida pela legislação (ESPINOSA et al., 2008), deve ser encarada como um risco potencial à saúde pública. A presença de RV-A em reservatórios utilizados para produção de água de consumo, também, foi relatada em uma pesquisa desenvolvida na Holanda (LODDER et al., 2010) e surtos de doenças veiculadas pela água, envolvendo estes vírus, já foram descritos em vários países, como Estados Unidos (BORCHARD, HASS e HUNT, 2004), Itália (MARTINELLI et al., 2007); França (GALLAY et al., 2006) e Albânia (VILLENA et al., 2003a).

A maior fonte de contaminação da BHCSF, no entanto, deve-se ao lançamento expressivo de esgoto *in natura* na área urbanizada, onde a detecção de RV-A foi bastante expressiva, tendo sido encontrados em todos os pontos, em quase todas as coletas. Este resultado corrobora outros estudos realizados no Brasil (MEHNERT et al., 1997; BARELLA, 2008; FUMIAN et al., 2010; FUMIAN, et al., 2011; PRADO et al., 2011) e em outros países, como Alemanha, Egito, Espanha, Venezuela e Nicarágua (VILLENA et al., 2003b; HAMZA et al., 2009; RODRÍGUEZ-DÍAZ et al., 2009; BUCARDO et al., 2011), nos quais a presença deste vírus foi amplamente relatada, tanto no esgoto, quanto em águas contaminadas pelo mesmo.

A distribuição dos concentrados positivos para RV-A, bem como a determinação da carga viral dos mesmos, ao longo da bacia, foi, significativamente, associada ao local de coleta, apontando para uma probabilidade maior de encontrar amostras positivas e com carga viral mais elevada, na área urbanizada. Estes dados

demonstraram que a atividade humana nesta região resultou na diminuição da qualidade da água, principalmente, devido à descarga de esgoto sem tratamento em diversos pontos do Córrego de São Pedro, um dos principais afluentes da BHCSF. Em estudos conduzidos nos Igarapés de Manaus, os RV-A e os adenovírus também foram mais detectados em áreas urbanizadas, enquanto os astrovírus e os norovírus foram detectados, homoganeamente, nas áreas urbana, rural e florestal (MIAGOSTOVICH et al., 2008).

Contrariando o perfil de sazonalidade observado para os RV-A em amostras clínicas, este vírus foi detectado na BHCSF, tanto na época seca, quanto na época úmida, sem grandes variações na carga viral. Do mesmo modo, nenhum perfil de sazonalidade para RV-A e adenovírus foi encontrado no estudo realizado na África Ocidental, no qual amostras de água potável foram coletadas ao longo de quatro anos em 287 fontes, localizadas em 55 aldeias diferentes (VERHEYEN et al., 2009). A pesquisa deste vírus em amostras de esgoto, no Rio de Janeiro, também, não evidenciou distribuição diferencial ao longo do ano (FUMIAN et al., 2011). Entretanto, na China, alguns autores mostraram um predomínio de RV-A no outono e inverno, coincidindo com os meses de maior registro de casos de gastroenterite por este vírus, provavelmente, devido às baixas temperaturas, típicas do inverno, que favorecem a estabilidade das partículas (LI et al., 2011a). No Brasil, Miagostovich e colaboradores (2008), reportaram menor taxa de detecção viral em águas poluídas na época seca, provavelmente, em decorrência do menor volume de água nos corpos hídricos, o que pode acarretar na concentração de substâncias inibidoras, comumente, presentes nas amostras ambientais.

A qualidade da água é determinada por indicadores microbiológicos, que avaliam o nível de contaminação fecal da mesma, principalmente, pela contagem de coliformes termotolerantes. Entretanto, muito tem sido discutido sobre a adequação destes indicadores para avaliar a presença de vírus na água e, conseqüentemente, os potenciais riscos à saúde humana (SINCLAIR, JONES e GERBA, 2009; SILVA et al, 2010), uma vez que alguns estudos tem demonstrado a ausência de associação entre a presença de tais coliformes, dentro ou fora dos limites estabelecidos na legislação, e a detecção de RV-A (MIAGOSTOVICH et al., 2008; FERGUSON et al., 2012; VIEIRA et al., 2012). Estes dados foram corroborados pelos resultados desta pesquisa, na qual foi possível detectar RV-A em metade das amostras que se encontravam dentro dos limites estabelecidos pela resolução CONAMA n°357/2005.

Esta correlação, também, não foi observada anteriormente para astrovírus, hepatite A e norovírus (PUSCH et al., 2005; FERREIRA, 2007; GUIMARÃES, 2007; MORESCO et al., 2012). A contagem de coliformes termotolerante, bem acima do limite estabelecido pela legislação, já havia sido relatada em estudos anteriores realizados na BHCSP, demonstrando assim o alto grau de comprometimento da qualidade destas águas, principalmente, nas sub-bacias B e C, localizadas na área urbana. (LATUF, 2004; MACHADO, 2006).

Várias características, comuns aos coliformes, tornam inconveniente o seu uso como indicadores de contaminação, seja pela maior sensibilidade à luz solar e ao tratamento de desinfecção, aplicado em estações de tratamento de água e esgoto; pelo menor tempo de sobrevivência, quando comparados a outros patógenos; pelo fato de não serem encontrados, exclusivamente, nas fezes humanas, mas também em fezes animais e, naturalmente, no solo; pela capacidade de se multiplicarem em vários ambientes e, principalmente, pela baixa correlação encontrada entre sua contagem e a de vários agentes patogênicos (SCOTT et al., 2002; FONG e LIPP, 2005; SAVICHTCHEVA e OKABE, 2006). Frente a tantas limitações, alguns autores tem defendido a utilização de adenovírus e poliomavírus, como indicadores virais de contaminação fecal humana, apoiados nas seguintes características destes patógenos: alta estabilidade em esgotos domésticos e amostras ambientais, resistência aos processos de tratamento de água e esgoto e a alta prevalência em todas as áreas geográficas nas quais eles foram estudados (PUIG et al, 1994; PUSCH et al., 2005; BOFILL-MAS et al., 2006).

A transmissão potencial de doenças virais veiculadas pela água está vinculada à capacidade dos vírus de se manterem infecciosos, até que entrem em contato com um hospedeiro suscetível. Deste modo, estudos de monitoramento de fatores ambientais, bem como dos efeitos que os mesmos exercem na persistência de partículas virais, em diferentes tipos de água, tornam-se fundamentais para avaliar o risco potencial do uso da água à saúde pública (WARD et al, 1986; ESPINOSA et al, 2008).

Segundo dados disponíveis na literatura, a presença dos vírus em ambientes aquáticos está relacionada às características da água, sofrendo influência direta dos fatores físico-químicos e microbiológicos inerentes ao corpo hídrico, além da interferência de fatores externos do meio, como temperatura e exposição à luz (WARD et al, 1986; CARTER, 2005; FONG e LIPP, 2005). Para verificar a

associação destes fatores com a detecção de RV-A, neste estudo, foram mensurados diferentes parâmetros físico-químicos de qualidade da água, inclusive alguns, para os quais não existe nenhuma informação prévia em trabalhos de investigação viral, como cloreto, ferro, fósforo e nitrogênio amoniacal.

Neste estudo, a presença de RV-A não foi influenciada, significativamente, pelos valores de pH, de modo que estes vírus foram detectados em amostra de água que se encontravam dentro e fora dos limites estabelecidos na legislação em vigor. Esta correlação, também, não foi observada em amostras de água da Lagoa Rodrigo de Freitas/RJ e em águas utilizadas para irrigação no México (ESPINOSA et al., 2009; VIEIRA et al., 2012). No entanto, Pancorbo e colaboradores (1987) relataram que valores elevados de pH estão associados significativamente à redução da carga de RV-A, sugerindo que meios mais alcalinos induziriam a agregação viral, tornando-os mais susceptíveis a outros fatores virucidas presentes na água. O mesmo foi observado para os calicivírus, tendo sido encontrada uma correlação entre pH e a presença de norovírus, com relato de maior detecção deste vírus em amostras consideradas fora dos padrões de balneabilidade (VIEIRA et al., 2012).

Com relação à temperatura, acredita-se que os vírus sejam capazes de resistir por meses ou anos a baixas temperaturas ou ter sua infecciosidade diminuída quando expostos a altas temperaturas, provavelmente, por dano ao material genético e ao capsídeo viral, além da inativação de enzimas requeridas para a replicação (CARTER, 2005; FONG e LIPP, 2005). No entanto, alguns estudos tem mostrado que os RV são bem resistentes a temperaturas mais elevadas (CABALLERO et al., 2004; ESPINOSA et al., 2008; LI et al., 2011b). Espinosa e colaboradores (2008) observaram uma pequena redução da infecciosidade, em água doce, quando incubados a 20°C por 3 a 14 dias (ESPINOSA et al., 2008). Os resultados do presente trabalho mostraram que a detecção de RV-A na BHCSP apresentou uma correlação positiva e fraca com a temperatura da água, de modo que pequenos acréscimos de temperatura aumentaram a chance de detecção destes vírus. Entretanto, em outras pesquisas realizadas no México e no Rio de Janeiro, essa associação entre temperatura e detecção viral não foi verificada (ESPINOSA et al., 2009; VIEIRA, 2010).

Como era de se esperar, todas as amostras analisadas apresentaram valores de salinidade compatíveis com água doce (< 0,5%), embora as medidas na área

urbanizada da bacia tenham sido discretamente maiores nos concentrados positivos para RV-A, tendo sido encontrada uma correlação positiva e fraca entre o parâmetro salinidade e a detecção de RV-A. O mesmo não observado por Vieira e colaboradores (2012), que não encontraram correlação entre salinidade e a detecção de RV-A e norovírus, concordando com relatos anteriores, de ausência de efeito direto na salinidade, sobre a resistência dos vírus no ambiente (GANTZER et al, 1998).

A condutividade, definida como a capacidade que a água possui de conduzir corrente elétrica, está relacionada com a presença de íons dissolvidos, podendo variar de acordo com a temperatura e a concentração total de substâncias ionizadas dissolvidas (SOARES, 2007). Representa uma medida indireta da concentração de poluentes, sendo que níveis superiores a 0,100 mS/cm indicam impacto ambiental (CETESB, 2009). Considerando-se estas informações, este parâmetro representou bem o impacto da atividade humana a partir do ponto 5, revelando a maior concentração de íons na água, devido ao reviramento do fundo do córrego e o aumento de material particulado provenientes do despejo de esgoto, através dos canais de drenagem. Ainda assim, neste estudo, nenhuma correlação foi encontrada entre a detecção de RV-A e os valores registrados de condutividade, confirmando dados descritos por Espinosa e colaboradores (2009) no México.

O cloro, por sua ação bactericida e baixo custo, vem sendo amplamente empregado no processo de tratamento da água para consumo humano, por uma técnica conhecida como cloração. De acordo com a legislação vigente para potabilidade (Portaria nº2914/2011), a água tratada deve ser entregue ao consumidor com uma concentração mínima de 0,2 mg/L de cloro residual. Entretanto, Carter (2005) demonstrou que os RV-A foram inativados, apenas, diante de uma concentração de 3,75 mg/L de cloro, logo podendo resistir ao processo de desinfecção, aplicado nas estações de tratamento de água. Mais recentemente, Espinosa e colaboradores (2008) confirmaram a resistência, relativamente, maior dos RV-A frente a inativação pelo cloro e atribuíram a persistência da infecciosidade à agregação das partículas virais. Neste estudo, todas as amostras apresentaram valores de cloro acima do permitido pela resolução (<0,01mg/L) para água doce de classe 1 e 2 (Resolução CONAMA nº357/2005), com resultados muito elevados na área urbana, em decorrência do despejo de esgoto doméstico, *in natura*, e de resíduos industriais, nesta área. No entanto, mesmo diante de elevados teores de

cloro, foi possível detectar RV-A na área urbanizada, o que em parte deve-se a resistência do vírus, mas que também pode ser explicado pela maior concentração de matéria orgânica, neutralizando o efeito deste agente químico. A análise estatística revelou que não houve correlação entre os valores de cloro e a detecção de RV-A, sendo estes vírus detectados, aleatoriamente, em águas com diferentes níveis de cloro, confirmando assim, os resultados de Vieira (2010).

A turbidez é a medida da resistência da água à passagem de luz, devido à presença de sólidos em suspensão, detritos orgânicos, algas e bactérias (CETESB, 2009). Valores elevados de turbidez foram encontrados nas águas da área urbanizada, em função do lançamento de esgotos, ao contrário do que foi observado nas águas da área não urbanizada, onde apenas uma amostra encontrou-se fora do limite estabelecido. Uma associação significativa foi verificada entre a detecção de RV-A e a turbidez, com uma probabilidade maior de detecção deste vírus, em amostras consideradas fora do limite estabelecido pela legislação em vigor, confirmando resultado encontrado em águas da Lagoa Rodrigo de Freitas/RJ e no Canadá (VIEIRA, 2010; DAVIS, 2010). Esta relação poderia ser justificada pela adsorção dos vírus a materiais particulados, resultando em maior proteção contra os fatores de inativação presentes na água, tais como raios UV e enzimas (GANTZER et al, 1998; RZEZUTKA e COOK, 2004). Entretanto, RV-A já foram detectados em diversas matrizes aquáticas que apresentaram valores de turbidez baixos e altos (MIAGOSTOVICH et al, 2008; FERREIRA et al, 2009; HAMZA et al, 2009; RUTJES et al, 2009; VICTORIA et al, 2009).

O parâmetro oxigênio dissolvido é utilizado para estimar a disponibilidade de oxigênio na água, sendo a sua depleção uma indicação representativa de poluição do corpo hídrico, uma vez que resíduos orgânicos despejados nos mesmos são decompostos por microrganismos aeróbicos, mediante consumo de oxigênio (CETESB, 2009). Embora, apenas nos pontos 2, 5 e 6 os valores encontrados de oxigênio dissolvido tenham sido menores do que o estabelecido na legislação em vigor, valores maiores eram esperados na área não urbanizada, uma vez que nenhuma fonte visível de contaminação pode ser visualizada. Em adição, os valores registrados na área urbanizada estavam muito próximos do valor considerado crítico para proteção da comunidade aquática (4mg/L) e são justificados pelo despejo visível de esgoto *in natura*, em vários pontos desta área. A queda d'água da cachoeira do Vale do Ipê, localizada entre as sub-bacias B e C, proporciona a

reoxigenação das águas, sendo responsável pelo valores aumentados de oxigênio dissolvido no ponto 7. De modo geral, o cenário de degradação desta bacia vem sendo demonstrado a cada estudo de monitoramento realizado, sinalizando para a necessidade de medidas urgentes por parte do município, para recuperação deste corpo hídrico (LATUF, 2004; MACHADO et al., 2010).

Confirmando os dados de Espinosa e colaboradores (2008), neste estudo, não foi encontrada uma associação significativa entre a detecção de RV-A e as medidas de oxigênio dissolvido, de modo que estes vírus foram detectados, tanto em amostras que se encontravam dentro, quanto em amostras que se encontravam fora dos limites determinados para este parâmetro, em água doce classes 1 e 2.

A dureza da água é resultante da presença, principalmente, de sais alcalinos terrosos (cálcio e magnésio), ou de outros metais bivalentes e pode causar sabor desagradável (FUNASA, 2009). Para efeito de potabilidade, no Brasil, a portaria nº 2.914/2011, do Ministério da Saúde, estabelece o limite máximo de 500mg de carbonato de cálcio/L, no entanto, segundo a Resolução CONAMA nº357/2005, nenhum valor é estabelecido para água doce de classe 1 e 2. No que diz respeito aos cloretos, sua presença em águas superficiais pode ser decorrente, tanto da dissolução de minerais, quanto da descarga de esgoto sanitário, uma vez que cada pessoa excreta na urina cerca 4 g de cloreto por dia, o que representam cerca de 90 a 95% dos excretos humanos (WHO, 2003). Para estes dois parâmetros acima mencionados, nenhuma correlação foi encontrada com a detecção de RV-A, embora valores maiores de dureza e cloreto tenham sido registrados na área urbanizada. Pancorbo e colaboradores (1987) sugeriram que o aumento da dureza da água pode reduzir a infecciosidade viral, no entanto nenhuma explicação foi encontrada, principalmente, considerando-se evidências anteriores de que íons de cálcio podem manter a integridade da partícula de RV-A, por estabilizar a o capsídeo externo (SHIRLEY et al., 1981). Em relação ao parâmetro cloreto, nenhuma análise de correlação entre o mesmo e a detecção de RV-A foi encontrada na literatura.

O ferro, por sua vez, é um metal abundante na natureza e pode originar-se, tanto da dissolução de compostos do solo, quanto de despejos industriais (CETESB, 2009). Neste trabalho, não foi possível verificar uma associação significativa entre os teores de ferro e a detecção de RV-A, no entanto, também não foram encontrados relato na literatura sobre esta relação.

A descarga de esgoto em águas naturais constitui a principal fonte dos macronutrientes, como fósforo e nitrogênio, uma vez que ambos estão presentes na matéria orgânica fecal e na constituição de detergentes em pó utilizados, domesticamente (CETESB, 2009). De um modo geral, valores de fósforo e nitrogênio amoniacal encontraram-se, ligeiramente, aumentados na área urbanizada, onde a presença de RV foi predominante, tendo sido verificada uma associação significativa entre estes dois fatores e a detecção viral. No entanto, esta associação deve ser analisada cuidadosamente, uma vez que os processos de tratamento de esgotos empregados no Brasil, em sua maioria, não contemplam a remoção destes nutrientes. Logo os efluentes, tratados ou não, sempre lançaram elevadas concentrações de nitrogênio e fósforo nos corpos d'água (CETESB, 2009). Pesquisas anteriores realizadas na BHCSF também relataram maior aporte destes nutrientes na área urbanizada, atribuindo estes dados ao grau de poluição doméstica e industrial deste ecossistema (SOARES, 2007; SOUZA et al., 2011). Não foram encontrados dados na literatura, avaliando a presença de RV-A frente a variações do teor de fósforo, entretanto o parâmetro nitrito foi investigado por Ferguson e colaboradores (2012), que não encontraram correlação entre este parâmetro e a detecção de RV-A.

Os resultados obtidos nesta pesquisa complementam os estudos anteriores de determinação da qualidade da água da BHSCP, confirmando o comprometimento deste manancial, não apenas com base na avaliação dos usuais parâmetros microbiológicos e físico-químicos, mas também com dados da contaminação por RV-A e sua potencial disseminação. Assim, estes dados pioneiros em Juiz de Fora apontam para a necessidade de se estabelecer o monitoramento de contaminação por vírus entéricos em ecossistemas aquáticos, de um modo geral, a fim de aumentar a segurança da utilização destas águas para diversas finalidades, inclusive em face da inevitável escassez, no futuro não muito distante, deste recurso natural.

## 8 CONCLUSÕES

Os dados obtidos neste estudo levaram às seguintes conclusões:

- Os RV-A foram detectados em 62,5% dos concentrados de água obtidos na BHCSP, no entanto, estes dados podem ter sido subestimados, em função da baixa eficiência de recuperação do método de concentração viral utilizado.
- Dentre as técnicas utilizadas para detecção viral, a qPCR mostrou ser a mais sensível, permitindo a detecção de um maior número de concentrados positivos.
- A detecção de RV-A, assim como a carga viral foi, significativamente, maior na área urbanizada da bacia, não tendo sido observada associação com a época de coleta.
- Não foi encontrada associação entre a contagem de coliformes termotolerante e a detecção de RV-A, os quais foram detectados mesmo nas amostras de água que se encontravam dentro do limite estabelecido pela legislação vigente. Este fato comprova a ineficiência dos padrões utilizados, atualmente, como indicadores microbianos de qualidade da água e torna evidente a necessidade de se estabelecer outros indicadores de contaminação, incluindo indicadores virais.
- Dentre os parâmetros físico-químicos analisados, foi observado uma associação da detecção de RV-A com a turbidez, o teor de nitrogênio amoniacal e o de fósforo, não tendo sido encontrada relação significativa com pH, teor de ferro e de oxigênio dissolvido.
- Foram encontradas correlações positivas, porém fracas, entre a carga de RV-A e os parâmetros salinidade e temperatura da água e ausência de correlação com a condutividade, o teor de cloreto, de cloro e a dureza da água.

No conjunto, os resultados deste trabalho enfatizam a necessidade do estabelecimento de parâmetros virológicos para a avaliação da qualidade da água.

## REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

ABBASZADEGAN, M. Advanced detection of viruses and protozoan parasites in water. **Reviews in Biology and Biotechnology**, **1(2)**:21-26, 2001.

ADAMS WR, KRAFT LM. Epizootic diarrhea of infant mice: identification of the etiologic agent. **Science**, **141**:359-360, 1963.

ALBINANA-GIMENEZ N, CLEMENTE-CASARES P, BOFILL-MAS S, HUNDESA A, RIBAS F, GIRONES R. Distribution of human polyomaviruses, adenoviruses and hepatitis E virus in the environment and in a drinking-water treatment plant. **Environmental Science & Technology**, **40(23)**:7416–22, 2006.

ANDERSON EJ, WEBER SG. Rotavirus infections in adults. **The Lancet Infectious diseases**, **4(2)**:91-9, 2004.

ANDRADE-GÓES ACM. **Expressão, Isolamento, Purificação e Caracterização de proteínas recombinantes de Rotavírus e Astrovírus**. 2005. 269f. Tese (Doutorado em Ciências) - Instituto de Química, Universidade do Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2005.

ANDREASI MSA. **Detecção de vírus entéricos em crianças com gastroenterite aguda e idosos institucionalizados em Campo Grande, MS**. 2008. 86f. Tese (Doutorado em Ciências da Saúde) – Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde – Rede Centro-Oeste: Convênio Universidade de Brasília, Universidade Federal de Goiás e Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Goiânia, 2008.

ANTUNES GR. **Detecção e caracterização molecular de rotavírus circulantes, após a introdução da vacina rotarix®**. 2011. 61f. Monografia (Graduação em Farmácia). Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2011.

APHA, AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. **Standard methods for the examination of water and wastewater**. 21 th ed. Washington: APHA, 2005.

ARAUJO IT, FIALHO AM, DE ASSIS RM, ROCHA M, GALVÃO M, CRUZ CM, FERREIRA MS, LEITE JPG. Rotavirus strain diversity in Rio de Janeiro, Brazil: characterization of VP4 and VP7 genotypes in hospitalized children. **Journal of Tropical Pediatrics**, **48(4)**:214 -218, 2002.

ARIAS CF, DECTOR MA, SEGOVIA L, LÓPEZ T, CAMACHO M, ISA P, ESPINOSA R, LÓPEZ S. RNA silencing of rotavirus gene expression. **Virus Research**, **102(1)**:43-51, 2004.

BARELLA KM. **Detection of human enteric viruses in sewage sludge from two sewage treatment plants in São Paulo state**. 2008. 152f. Tese (Doutorado em Ciências). Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

BISHOP RF. Natural history of human rotavirus infection. **Archives of Virology Supplementum**, **12**:119-128, 1996.

BISHOP RF, UNICOMB LE, BARNES GL. Epidemiology of rotavirus serotypes in Melbourne, Australia, from 1973 to 1989. **Journal of Clinical Microbiology**, **29(5)**:862-868, 1991.

BISHOP RF, DAVIDSON GP, HOLMES IH, RUCK BJ. Virus particles in epithelial cells of duodenal mucosa from children with acute nonbacterial gastroenteritis. **The Lancet**, **302(7841)**:1281-1283, 1973.

BOFILL-MAS S, ALBINANA-GIMENEZ N, CLEMENTE-CASARES P, HUNDESA K, RODRIGUEZ-MANZANO J, ALLARD A, CALVO M, GIRONES R. Quantification and stability of human adenoviruses and polyomavirus JCPyV in wastewater matrices. **Applied and Environmental Microbiology**, **72(12)**:7894-6, 2006.

BOMSEL M., ALFSEN A. Entry of viruses through the epithelial barrier: pathogenic trickery. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, **4(1)**:57-68, 2003.

BOOM R, SOL CJA, SALIMANS MMM, JANSEN CL, WERTHEIM-VAN DILLEN PME and VAN DER NOORDAA J. Rapid and Simple method for purification of nucleic acids. **Journal of Clinical Microbiology**, **28(3)**:495-503, 1990.

BOSCH A, GUIX S, SANO D, PINTÓ RM. New tools for the study and direct surveillance of viral pathogens in water. **Current Opinion in Biotechnology**, **19(3)**:295-301, 2008.

BORCHARDT MA, HAAS NL, HUNT RJ. Vulnerability of Drinking-Water Wells in La Crosse, Wisconsin, to Enteric-Virus Contamination from Surface Water Contributions. **Applied and Environmental Microbiology**, **70(10)**: 5937-46, 2004.

BR-440: conclusão da ainda incerta. **Tribuna de Minas**, Juiz de Fora, MG, 15 de abril de 2012. Disponível em: < <http://www.tribunademinas.com.br/politica/conclus-o-da-br-440-ainda-incerta-1.1074234>>. Acesso em: 16 de maio de 2012.

BRASIL. Ministério da Saúde. Datasus. **Mortalidade proporcional por doença diarreica aguda em menores de 5 anos de idade**. Brasília, DF, 2012. Disponível em: <<http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?idb2008/c06.def>>. Acesso em: 25 jun. 2012.

BRASIL. Ministério da Saúde. Dispõe sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade. Portaria nº 2914, de 12 de dezembro de 2011. **Diário Oficial {da} República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 04 jan. 2012. Seção 1, p. 40-43.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretária de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Informe Técnico. **Doença diarreica por rotavírus: vigilância epidemiológica e prevenção pela vacina oral de rotavírus humano (VORH)**. Brasília, DF, 2005.

BUCARDO F, LINDGREN PE, SVENSSON L, NORDGREN J. Low prevalence of rotavirus and high prevalence of norovirus in hospital and community wastewater after introduction of rotavirus vaccine in Nicaragua. **Plos One** **6(10)**: e25962, 2011.

CABALLERO S, ABAD FX, LOISY F, LE GUYADER FS, COHEN J, PINTO RM, BOSCH A. Rotavirus virus-like particles as surrogates in environmental persistence and inactivation studies. **Applied and Environmental Microbiology**, **70(7)**:3904–9, 2004.

CARDOSO DD, SOARES CM, DIAS E SOUZA MB, DE AZEVEDO MS, MARTINS RM, QUEIROZ DA, DE BRITO WM, MUNFORD V, RACZ ML. Epidemiological features of rotavirus infection in Goiania, Goias, Brazil, from 1986 to 2000. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, **98(1)**:25-29, 2003.

CARDOSO DD, RÁCZ ML, AZEVEDO MS, MARTINS RM, SOARES CM. Genotyping of group A rotavirus samples from Brazilian children by probe hybridization. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, **34(4)**:471-473, 2001.

CARTER MJ. Enterically infecting viruses: pathogenicity, transmission and significance for food and waterborne infection. **Journal of applied microbiology** **98(6)**: 1354–80, 2005.

CARVALHO-COSTA FA, ARAÚJO IT, ASSIS RMS, FIALHO AM, MARTINS CMMA, BÓIA MN, LEITE JPG. Rotavirus genotype distribution after vaccine introduction, Rio de Janeiro, Brasil. **Emerging Infectious Diseases**, **15(1)**:95-7, 2009.

CARVALHO-COSTA FA, ASSIS RM, FIALHO AM, BÓIA MN, ALVES DP, MARTINS CM, LEITE JP. Detection and molecular characterization of group A rotavirus from hospitalized children in Rio de Janeiro, Brazil, 2004. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, **101(3)**:291-294, 2006.

CDC, CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Rotavirus Surveillance Worldwide, 2009. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, **60(16)**:514-516, 2011.

CESAMA, COMPANHIA DE SANEAMENTO MUNICIPAL. **Mananciais**: Represa de São Pedro. 2012. Disponível em <<http://www.cesama.com.br/?pagina=rsaopedro>>. Acesso em: 27 de janeiro de 2012.

CETESB, COMPANHIA AMBIENTAL DO ESTADO DE SÃO PAULO. **Significado ambiental e sanitário das variáveis de qualidade das águas e dos sedimentos e metodologias analíticas de amostragem** - apêndice A. Série relatórios, *CETESB*, 2009. 43p.

CONAMA, CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE. Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências. Resolução nº 357, de 17 de Março de 2005. **Diário Oficial {da} República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 18 de março de 2005, Seção 1, páginas 58-63.

CONAMA, CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE. Define os critérios de balneabilidade em águas brasileiras. Resolução CONAMA nº 274, de 29 de novembro de 2000. **Diário Oficial {da} República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, de 25 de janeiro de 2001, Seção 1, páginas 70-71.

COPAM, CONSELHO ESTADUAL DE POLÍTICAS AMBIENTAIS. Dispõe sobre o enquadramento das águas estaduais da bacia do rio Paraibuna. Deliberação normativa nº 16, de 24 de Setembro de 1996. **Diário do Executivo**, Minas Geria, 02 de outubro de 1996.

COSTA PSS, CARDOSO DDP, GRISI SJFE. Rotavirus A e sua profilaxia vacinal. **Revista de Patologia Tropical**, **34(1)**:1-16, 2005.

COSTA PSS, GRISI SJFE, CARDOSO DDP, FIACCADORI FS, SOUZA MBLD, SANTOS RAT. Manifestações clínicas e epidemiológicas das infecções por Rotavírus A. **Pediatria (São Paulo)**, **26(3)**:151-158, 2004.

CUADRAS MA, BORDIER BB, ZAMBRANO J, LUDERT JE, GREENBERG HB. Dissecting rotavirus particle-raft interaction with small interfering RNAs: insights into rotavirus transit through the secretory pathway. **Journal of Virology**, **80(8)**:3935-3946, 2006.

DAVIS BH. **Detection of Human Rotavirus in Southern Ontario Source Waters**. 2012. 82f. Thesis (Master of Science in Environmental Biology) - University of Guelph, Ontario, Canada, 2012.

DENNEHY PH. Rotavirus vaccines: an overview. **Clinical Microbiology Reviews**, **21(1)**:198-208, 2008.

DENNEHY PH. Rotavirus vaccines: an update. **Current Opinion in Pediatrics**, **17(1)**:88-92, 2005.

DESSELBERGER U, MANKTELOW E, LI W, CHEUNG W, ITURRIZA-GÓMARA M, GRAY J. Rotaviruses and rotavirus vaccines. **British Medical Bulletin**, **90(1)**:37-51, 2009.

ESPINOSA AC, ARIAS CF, SÁNCHEZ-COLÓN S, MAZARI-HIRIART M. Comparative study of enteric viruses, coliphages and indicator bacteria for evaluating water quality in a tropical high-altitude system. **Environmental Health**, **8**:49, 2009.

ESPINOSA AC, MAZARI-HIRIART M, ESPINOSA R, MARURI-AVIDAL L, MÉNDES E, ARIAS CF. Infectivity and genome persistence of rotavirus and astrovirus in groundwater and surface water. **Water Research**, **42(10-11)**:2618-28, 2008.

ESTES MK, KAPIKIAN AZ. Rotaviruses. In: Griffin DE, Knipe DM, Howley PM (eds.), **Fields Virology**, 5th. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2007. p.1917-1974.

FARRAH SR, GOYAL SM, GERBA CP, WALLIS C, MELNICK JL. Concentration of enteroviruses from estuarine water. **Applied and Environmental Microbiology**, **33(5)**:1192- 6, 1977.

FARTHING MJG. **Viruses and the Gut**. Welwyn Garden City, Hertfordshire: Smith Kline & French; 1989.p. 112.

FERREIRA, AS. **Caracterização de amostras de rotavírus circulantes em Juiz de Fora, MG, no período de 2005 a 2006**. 2010. 76f. Monografia (Graduação em Farmácia). Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2010.

FERREIRA FFM, GUIMARÃES FR, FUMIAN TM, VICTORIA M, VIEIRA CB, LUZ S, SHUBO T, LEITE JPG, MIAGOSTOVICH MP. Environmental dissemination of group A rotavirus: P-type , G-type and subgroup characterization. **Water Science and Technology** **60(3)**: 633–42, 2009.

FERREIRA FFM. **Deteção e caracterização molecular de rotavírus grupo A e igarapés da cidade de Manaus, Amazônia Central**. 2007. 75f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Curso de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Instituto Oswaldo Cruz – FIOCRUZ, Rio de Janeiro, 2007.

FERGUSON AS, LAYTON AC, MAILLOUX BJ, CULLIGAN PJ, WILLIAMS DE, SMARTT AE, SAYLER GS, FEIGHERY J, MCKAY LD, KNAPPETT PSK, ALEXANDROVA E, ARBIT T, EMCH M, ESCAMILLA V, AHMED KM, ALAM J, STREATFIELD PK, YUNUS M, van GEEN A. Comparison of fecal indicators with pathogenic bacteria and rotavirus in groundwater. **Science of the Total Environment** **431**: 314–22, 2012.

FISCHER TK, BRESEE JS, GLASS RI. Rotavirus vaccines and the prevention of hospital-acquired diarrhea in children. **Vaccine**, **22[Supplement 1]**:S49-S54, 2004.

FONG T-T, LIPP EK. Enteric viruses of humans and animals in aquatic environments: health risks, detection, and potential water quality assessment tools. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, **69(2)**:357-71, 2005.

FUHRMAN JA, LIANG X, NOBLE RT. Rapid Detection of Enteroviruses in Small Volumes of Natural Waters by Real-Time Quantitative Reverse Transcriptase PCR. **Applied and Environmental Microbiology**, **71(8)**: 4523–30, 2005.

FUMIAN TM, LEITE JPG, ROSE TL, PRADO T, MIAGOSTOVICH MP. One year environmental surveillance of rotavirus specie A (RVA) genotypes in circulation after the introduction of the Rotarix<sup>®</sup> vaccine in Rio de Janeiro, Brazil. **Water Research** **45(17)**: 5755–63, 2011.

FUMIAN TM, LEITE JPG, CASTELLO AA, GAGGERO A, CAILLOU MAL, MIAGOSTOVICH, MP. Detection of rotavirus A in sewage samples using multiplex qPCR and an evaluation of the ultracentrifugation and adsorption-elution methods for virus concentration. **Journal of Virological Methods**, **170**:42–6, 2010.

FUNASA, FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE. Ministério da Saúde. **Manual prático de análise de água**. 3ª ed. rev. Brasília, 2009. 144 p.

GALLAY A, DE VALK H, COURNOT M, LADEUIL B, HEMERY C, CASTOR C, BON F, MÉGRAUD F, LE CANN P, DESENCLOS JC. A large multi-pathogen waterborne community outbreak linked to faecal contamination of a groundwater system, France, 2000. **Clinical Microbiology and Infection**, **12(6)**:561-70, 2006.

GALLIMORE CI, TAYLOR C, GENNERY AR, CANT AJ, GALLOWAY A, ITURRIZAGÓMARA M, GRAY JJ. Environmental monitoring for gastroenteric viruses in a pediatric primary immunodeficiency unit. **Journal of Clinical Microbiology**, **44(6)**:395-99, 2006.

GANTZER C, DUBOIS E, CRANCE J-M, BILLAUDEL S, KOPECKA H, SCHWARTZBROD L, et al. Influence of environmental factors on the survival of enteric viruses in seawater. **Oceanologica Acta**, **21(6)**:983–92, 1998.

GARCÍA ME. Virus en aguas de consumo. **Higiene y Sanidad Ambiental**, **6**:173-89, 2006.

GASSILLOUD B, SCHWARTZBROD L, GANTZER C. Presence of Viral Genomes in Mineral Water: a Sufficient Condition To Assume Infectious Risk? **Applied and Environmental Microbiology** **69(7)**: 3965–69, 2003.

GIRONES R, FERRÚS MA, ALONSO JL, RODRIGUEZ-MANZANO J, CALGUA B, CORRÊA AB, HUNDESA A, CARRATALA A, BOFILL-MAS S. Molecular detection of pathogens in water - The pros and cons of molecular techniques. **Water research** **44(15)**: 4325–39, 2010.

GLASS RI, BRESEE JS, PARASHAR U, TURCIOS R, FISCHER TK, JIANG B, WIDDOWSON MA, GENTSCH J. Rotavirus vaccines: past, present, and future. **Archives de Pédiatrie**, **12(6)**:844-847, 2005a.

GLASS RI, BRESEE JS, TURCIOS R, FISCHER TK, PARASHAR UD, STEELE AD. Rotavirus Vaccines: Targeting the Developing World. **The Journal of Infectious Diseases**, **192[Supplement S1]**:S160-S166, 2005b.

GREENBERG HB, ESTES MK. Rotaviruses: From pathogenesis to vaccination. **Gastroenterology**, **136(6)**:1939-1951, 2009.

GRIFFIN DW, DONALDSON KA, PAUL JH, ROSE JB. Pathogenic human viruses in coastal waters. **Clinical Microbiology Reviews**, **16(1)**:129-43, 2003.

GUIMARÃES FR. **Aplicação de Metodologia de Concentração Viral para Detecção de Astrovírus em Águas Ambientais**. 2007. 92f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Curso de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle em Saúde, Instituto Oswaldo Cruz – FIOCRUZ, Rio de Janeiro, 2007.

GURGEL RQ, CORREIA JB, CUEVAS LE. Effect of rotavirus vaccination on circulating virus strains. **The Lancet**, **371(9609)**:301-302, 2008.

GURGEL RQ, CUNLIFFE NA, NAKAGOMI O, CUEVAS LE. Rotavirus genotypes circulating in Brazil before national rotavirus vaccination: a review. **Journal of Clinical Virology**, **43(1)**:1-8, 2008.

GUSMÃO RH, MASCARENHAS JD, GABBAY YB, LINS-LAINSON Z, RAMOS FL, MONTEIRO TA, VALENTE SA, FAGUNDES-NETO U, LINHARES AC. Rotavirus subgroups, G serotypes, and electrophoretotypes in cases of nosocomial infantile diarrhoea in Belem, Brazil. **Journal of Tropical Pediatrics**, **45(2)**:81-86, 1999.

GUTIERREZ-AGUIRRE I, STEYER A, BOBEN J, GRUDEN K, POLJSAK-PRIJATELJ M, RAVNIKAR M. Sensitive Detection of Multiple Rotavirus Genotypes with a Single Reverse Transcription-Real-Time Quantitative PCR Assay. **Journal of Clinical Microbiology** **46(8)**: 2547–54, 2008.

HAMZA IA, JURZIK L, STANG A, SURE K, UBERLA K, WILHELM M. Detection of human viruses in rivers of a densely-populated area in Germany using a virus adsorption elution method optimized for PCR analyses. **Water Research**, **43(10)**:2657-68, 2009.

HARAMOTO E, KATAYAMA H, UTAGAWA E, OHGAKI S. Recovery of human norovirus from water by virus concentration methods. **Journal of Virological Methods**, **160(1-2)**:206-9, 2009.

HARAMOTO E, KATAYAMA H, OGUMA K, OHGAKI S. Recovery of naked viral genomes in water by virus concentration methods. **Journal of virological methods** **142(1-2)**: 169–73, 2007.

HASS CN, ROSE JB, GERBA CP, REGLI R. Risk assessment of viruses in drinking water. **Risk analysis**, 13(5):545-52, 1993

HERMES LC, SILVA SA. **Avaliação da qualidade das águas**: manual prático. Brasília, DF: Emprapa Informações Tecnológica, 2004. 55p.

HYSER JM, ESTES MK. Rotavirus Vaccines and Pathogenesis: 2008. **Current Opinion in Gastroenterology**, 25(1):36-43, 2009.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Atlas de Saneamento 2011**. Rio de Janeiro, 2011. 268 p. Disponível em:

[http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/atlas\\_saneamento/default\\_zip.shtml](http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/atlas_saneamento/default_zip.shtml). Acesso em: 02 jan. 2013.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Plano Nacional de Saneamento Básico 2008**: Abastecimento de água chega a 99,4% dos municípios, coleta de lixo a 100%, e rede de esgoto a 55,2%. Disponível em:[http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/noticia\\_visualiza.php?id\\_noticia=1691&id\\_pagina=1](http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/noticia_visualiza.php?id_noticia=1691&id_pagina=1). Acesso em: 02 jan. 2013.

IJZERMAN MM, DAHILILNG DR, FOUT GS. A method to remove environmental inhibitors prior to the detection of waterborne enteric viruses by reverse transcription-polymerase chain reaction. **Journal of Virological Methods**, 63(1-2):145-53, 1997.

ITURRIZA-GÓMARA M, WONG C, BLOME S, DESSELBERGER U, GRAY J. Molecular characterization of VP6 genes of human rotavirus isolates: correlation of genogroups with subgroups and evidence of independent segregation. **Journal of Virology**, 76(13):6596-6601, 2002.

JIANG S. Human Adenoviruses in Water: Occurrence and Health Implications: A critical Review. **Environmental Science Technology**, 40(23):7132-40, 2006.

KANG G, ITURRIZA GM, WHEELER, JG, CRYSTAL P, MONICA, B, RAMANI S, PRIMROSE B, MOSES PD, GALLIMORE CI, BROWN DW, GRAY J. Quantitation of group A rotavirus by real-time reverse transcription polymerase chain reaction: correlation with clinical severity in children in South India. **Journal of Medical Virology**, 73(1):118–22, 2004.

KAPIKIAN AZ, HOSHINO Y, CHANOCK RM. Rotaviruses. In: Knipe DM, Howley PM, Griffin DE (eds.), **Fields Virology**. 4th. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2001. p.1787-1833.

KAPIKIAN AZ, WYATT RG, DOLIN R, THORNHILL TS, KALICA AR, CHANOCK RM. Visualization by immune electron microscopy of a 27 nm particle associated with acute infectious nonbacterial gastroenteritis. **Journal of Virology**, **10(5)**:1075-1081, 1972.

KATAYAMA H, SHIMASAKI A, OHGAKI S. Development of a virus concentration method and its application to detection of enterovirus and norwalk virus from coastal seawater. **Applied and Environmental Microbiology**, **68(3)**:1033-1039, 2002.

KITTIGUL L, KHAMOUN P, SUJIRARAT D, UTRARACHKIJ F, CHITPIROM K, CHAICHANTANAKIT N, et al. An improved method for concentrating rotavirus from water samples. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, **96(6)**:815-21, 2001.

LATUF, MO. Diagnóstico das águas superficiais do Córrego São Pedro, Juiz de Fora-MG. **Geografia (Londrina)**, **13(1)**:21-55, 2004.

LECLERC H, SCHWARTZBROD L, DEI-CAS E. Microbial agents associated with waterborne diseases. **Critical Reviews in Microbiology**, **28(4)**:371-409, 2002.

LEITE J P G, CARVALHO-COSTA F A, LINHARES A C. Group A rotavirus genotypes and the ongoing Brazilian experience - A Review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, **103(8)**: 745-753, 2008.

LI D, GU AZ, ZENG SY, YANG W, HE M, SHI HC. Monitoring and evaluation of infectious rotaviruses in various wastewater effluents and receiving waters revealed correlation and seasonal pattern of occurrences. **Journal of Applied Microbiology**, **110(5)**, 1129–37, 2011a.

LI D, GU AZ, ZENG S, YANG W, HE M, SHI H. Evaluation of the infectivity, gene and antigenicity persistence of rotaviruses by free chlorine disinfection. **Journal of Environmental Sciences (China)** **23(10)**: 1691-98, 2011b.

LINHARES AC. Epidemiologia das infecções por rotavírus no Brasil e os desafios para o seu controle. **Caderno de Saúde Pública**, **16(3)**:629-646, 2000.

LINHARES AC, GABBAY YB, FREITAS RB, TRAVASSOS DA ROSA ES, MASCARENHAS JDP, LOUREIRO ECB. Longitudinal study of rotavirus infections among children from Belem, Brazil. **Epidemiology and Infection**, **102(1)**:129-145, 1989.

LODDER W J, van DEN BERG HHJL, RUTJES SA, HUSMAN AMR. Presence of enteric viruses in source waters for drinking water production in The Netherlands. **Applied and Environmental Microbiology**, **76(17)**: 5965–71, 2010.

LOGAN C, O'LEARY JJ, O'SULLIVAN N. Real-time reverse transcription-PCR for detection of rotavirus and adenovirus as causative agents of acute viral gastroenteritis in children. **Journal of clinical microbiology**, **44(9)**: 3189–95, 2006.

LUKASIK J, SCOTT TM, ANDRYSHAK D, FARRAH SR. Influence of salts on virus adsorption to microporous filters. **Applied and Environmental Microbiology**, **66(7)**:2914-20, 2000.

LUNDGREN O, SVENSSON L. The enteric nervous system and infectious diarrhea. In: Desselberger U, Gray J (eds.), **Viral Gastroenteritis**. Amsterdam: Elsevier Science, 2003. p.51-68.

LUNDGREN O, PEREGRIN AT, PERSSON K, KORDASTI S, UHNOO I, SVENSSON L. Role of the enteric nervous system in the fluid and electrolyte secretion of rotavirus diarrhea. **Science**, **287(5452)**:491-495, 2000.

MACHADO PJO. **Diagnóstico físico-ambiental da bacia hidrográfica do córrego São Pedro**: um exercício acadêmico de gestão dos recursos hídricos. Ubá: Ed. Geographica, consultoria, estudos e projetos ambientais Ltda., 2010.

MACHADO PJO. **Uma metodologia para gestão de recursos hídricos – aplicação no manancial de São Pedro, Juiz de Fora/MG**. II Forum Ambiental da Alta Paulista, 25 a 28 Out. 2006, São Paulo, 21p., 2006.

MALHERBE H, HARWIN R. The cytopathic effects of vervet monkey viruses. **South African Medical Journal**, **37**:407-411, 1963.

MARQUES RG. **Ocorrência de coliformes e Salmonela 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.

MARTINELLI D, PRATO R, CHIRONNA M, SALLUSTIO A, CAPUTI G, CONVERSANO M, DEGLIATTI MC, D'ANCONA FP, GERMINARIO CA, QUARTO M. Large outbreak of viral gastroenteritis caused by contaminated drinking water in Apulia, Italy, May-October 2006. **Euro Surveillance**, **12(4)**:E070419.1, 2007.

MASCARENHAS JDP. **Caracterização molecular de genótipos de rotavírus do grupo A em Belém, Pará, no período de 1990 a 2003**: estudo em neonatos, crianças diarreicas de 0-3 anos e ensaio clínico com vacinas. 2006. 160f. Tese (Doutorado em Biologia Parasitária) - Curso de Pós-Graduação em Biologia Parasitária, Instituto Oswaldo Cruz – FIOCRUZ, Rio de Janeiro, 2006.

MATTHEWS REF. The classification and nomenclature of viruses. **Intervirology**, **11(3)**: 133-135, 1979.

MATTHIJNSSENS J, CIARLET M, MCDONALD SM, ATTOUI H, BÁNYAI K, BRISTER JR, BUESA J, ESONA MD, ESTES MK, GENTSCH JR, ITURRIZA-GÓMARA M, JOHNE R, KIRKWOOD CD, MARTELLA V, MERTENS PPC, NAKAGOMI O, PARREÑO V, RAHMAN M, RUGGERI FM, SAIF LJ, SANTOS N, STEYER A, TANIGUCHI K, PATTON JT, DESSELBERGER U, RANST MV. Uniformity of rotavirus strain nomenclature proposed by the Rotavirus Classification Working Group (RCWG). **Archives of Virology**, **156**:1397–1413, 2011.

MATTHIJNSSENS J, CIARLET M, HEIMAN E, ARIJS I, DELBEKE T, MCDONALD SM, PALOMBO EA, ITURRIZA-GOMARA M, MAES P, PATTON JT, RAHMAN M, VAN RANST M. Full Genome-Based Classification of Rotaviruses Reveals a Common Origin between Human Wa-Like and Porcine Rotavirus Strains and Human DS-1-Like and Bovine Rotavirus Strain. **Journal of Virology**, **82(7)**:3204–19, 2008a.

MATTHIJNSSENS J, CIARLET M, RAHMAN M, ATTOUI H, BÁNYAI K, ESTES MK, GENTSCH JR, ITURRIZA-GÓMARA M, KIRKWOOD CD, MARTELLA V, MERTENS PPC, NAKAGOMI O, PATTON JT, RUGGERI FM, SAIF LJ, SANTOS N, STEYER A, TANIGUCHI K, DESSELBERGER U, RANST MV. Recommendation for the classification of group A rotaviruses using all 11 genomic RNA segments. **Archives of Virology**, **153**:1621-1629, 2008b.

MEBUS C, UNDERDAHL N, RHODES M, et al. Calf diarrhea (scours): reproduced with a virus from a field outbreak. **University of Nebraska Research Bulletin**, **233**:1-16, 1969.

MEHNERT DU, STEWIEN KE, HARSÍ CM, QUEIROZ AP, CANDEIAS JM, CANDEIAS JA. Detection of rotavirus in sewage and creek water: efficiency of the concentration method. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, **92(1)**:97-100, 1997.

MEHNERT DU, STEWIEN KE. Detection and distribution of rotavirus in raw sewage and creeks in Sao Paulo, Brazil. **Applied and Environmental Microbiology**, **59(1)**:140-143, 1993.

MIAGOSTOVICH MP, FERREIRA FFM, GUIMARAES FR, FUMIAN TM, DINIZ-MENDES L, LUZ SLB, et al. Molecular Detection and Characterization of Gastroenteritis Viruses Occurring Naturally in the Stream Waters of Manaus, Central Amazonia, Brazil. **Applied and Environmental Microbiology**, **74(2)**:375-82, 2008.

MIN BS, NOH YJ, SHIN JH, BAEK SY, MIN KI, RYU SR, KIM BG, PARK MK, CHOI SE, YANG EH, PARK SN, HUR SJ, AHN BY. Assessment of the quantitative real-time polymerase chain reaction using a cDNA standard for human group A rotavirus. **Journal of Virological Methods**, **137(2)**:280–6, 2006.

MORESCO V, VIANCELLI A, NASCIMENTO MA, SOUZA DSM, RAMOS APD, GARCIA LAT, SIMÕES CMO, BARARDI CRM. Microbiological and physicochemical analysis of the coastal waters of southern Brazil. **Marine Pollution Bulletin**, **64(1)**:40–8, 2012.

MORESCO V. **Detecção de rotavírus em amostras de águas de superfície através de técnicas moleculares e de cultivo celular**. 2008. 48f. Monografia (Bacharel em Ciências Biológicas) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2008.

MORILLO SG, LUCHS A, CILLI A, COSTA FF, CARMONA RCC, TIMENETSKY MCST. Characterization of rotavirus strains from day care centers: pre- and post-rotavirus vaccine era. **Jornal de Pediatria**, **86(2)**:155-158, 2010.

O'RYAN ML, LUCERO Y, VIDAL R. Enteric viruses in waste- waters: an interesting approach to evaluate the potential impact of rotavirus vaccination on viral circulation. **Expert Review of Vaccines**, **11(4)**:419-22, 2012.

PANCORBO OC, EVANSHEN BG, CAMPBELL WF, LAMBERT S, CURTIS S, WOOLLEY T. Infectivity and antigenicity reduction rates of human rotavirus strain Wa in fresh waters. **Applied and Environmental Microbiology**, **53(8)**:1803–11, 1987.

PANG XL, LEE B, BOROUMAND N, LEBLANC B, PREIKSAITIS JK, YUIP CC. Increased detection of rotavirus using a real time reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) assay in stool specimens from children with diarrhea. **Journal of medical virology**, **72(3)**:496–501, 2004.

PARASHAR UD, GIBSON CJ, BRESEE JS, GLASS RI. Rotavirus and severe childhood diarrhea. **Emerging Infectious Diseases**, **12(2)**:304-306, 2006.

PARASHAR UD, BRESEE JS, GENTSCH JR, GLASS RI. Rotavirus. **Emerging Infectious Diseases**, **4(4)**:561-570, 1998.

PEREIRA HG, AZEREDO RS, LEITE JPG, ANDRADE ZP, DE CASTRO L. A combined enzyme immunoassay for rotavirus and adenovirus (EIARA). **Journal of Virological Methods**, **10(1)**: 21-28, 1985.

PORUCHYNSKY MS, ATKINSON PH. Rotavirus protein rearrangements in purified membrane-enveloped intermediate particles. **Journal of Virology**, **65(9)**:4720-4727, 1991.

PRADO T, SILVA DM, GUILAYN WC, ROSE TL, GASPAR AM, MIAGOSTOVICH MP. Quantification and molecular characterization of enteric viruses detected in effluents from two hospital wastewater treatment plants. **Water Research**, **45(3)**:1287-97, 2011.

PUIG M, JOFRE J, LUCENA F, ALLARD A, WADELL G, GIRONES R. Detection of adenoviruses and enteroviruses in polluted waters by nested PCR amplification. **Applied and Environmental Microbiology**, **60(8)**:2963-70, 1994.

PUSCH D, OH DY, WOLF S, DUMKE R, SCHRÖTER-BOBSIN U, HÖHNE M, RÖSKE I, SCHREIER E. Detection of enteric viruses and bacterial indicators in German environmental waters. **Archives of Virology**, **150(5)**: 929-47, 2005.

QUEIROZ AP, SANTOS FM, SASSAROLI A, HARSÍ CM, MONEZI TA, MEHNERT DU. Electropositive filter membrane as an alternative for the elimination of PCR inhibitors from sewage and water samples. **Applied and Environmental Microbiology**, **67(10)**:4614-8, 2001.

RAMIG RF. Pathogenesis of intestinal and systemic rotavirus infection. **Journal of Virology**, **78(19)**:10213-10220, 2004.

RIBEIRO LR, GIUBERTI RSO, BARREIRA DMPG, SAICK KW, LEITE JPG, MIAGOSTOVICH MP, SPANO LC. Hospitalization due to norovirus and genotypes of rotavirus in pediatric patients, state of Espírito Santo. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, **103(2)**:201-206, 2008.

RODRÍGUEZ-DÍAZ J, QUERALES L, CARABALLO L, VIZZI E, LIPRANDI F, TAKIFF H, BETANCOURT WQ. Detection and characterization of waterborne gastroenteritis viruses in urban sewage and sewage-polluted river waters in Caracas, Venezuela. **Applied and Environmental Microbiology**, **75(2)**:387-94, 2009.

ROSA E SILVA ML, CARVALHO IP, GOUVEA V. 1998–1999 rotavirus seasons in Juiz de Fora, Minas Gerais, Brazil: detection of an unusual G3P4 epidemic strain. **Journal of Clinical Microbiology**, **40(8)**:2837-2842, 2002.

ROSA E SILVA ML, NAVECA FG, CARVALHO IP. Epidemiological aspects of rotavirus infection in Minas Gerais, Brasil. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, **5(4)**:215-222, 2001

ROSE MA, DHAR AK, BROOKS HA, ZECCHINI F, GERSBERG RM. Quantitation of hepatitis A virus and enterovirus levels in the lagoon canals and Lido beach of Venice, Italy, using real-time RT-PCR. **Water Research**, **40(12)**:2387-96, 2006.

RUGGERI MF, FIORE L. Vaccine preventable viral diseases and risks associated with waterborne transmission. **Annali dell'Istituto Superiore di Sanità**, **48(4)**:460–72, 2012.

RUIZ-PALACIOS GM, PEREZ-SCHAEEL I, VELAZQUEZ FR, ABATE H, BREUER T, et al. Safety and efficacy of an attenuated vaccine against severe rotavirus gastroenteritis. **The New England Journal of Medicine**, **354(1)**:11-22, 2006.

RUTJES SA, LODDER WJ, van LEEUWEN AD, HUSMAN, AMR. Detection of infectious rotavirus in naturally contaminated source waters for drinking water production. **Journal of Applied Microbiology**, **107(1)**: 97–105, 2009.

RZEZUTKA A, COOK N. Survival of human enteric viruses in the environment and food. **FEMS Microbiology Reviews**, **28(4)**:441–53, 2004.

SANTOS N, HOSHINO Y. Global distribution of rotavirus serotypes/genotypes and its implication for the development and implementation of an effective rotavirus vaccine. **Reviews in Medical Virology**, **15(1)**:29-56, 2005.

SAVICHTCHEVA O, OKABE S. Alternative indicators of fecal pollution: relations with pathogens and conventional indicators, current methodologies for direct pathogen monitoring and future application perspectives. **Water Research**, **40(13)**:2463–76, 2006.

SCHWARZ B, BANGE R, VAHLENKAMP TW, JOHN R, MULLER H. Detection and quantitation of group A rotaviruses by competitive and real-time reverse-transcription polymerase chain reaction. **Journal of Virological Methods**, **105(2)**:277–85, 2002.

SCOTT TM, ROSE JB, JENKINS TM, FARRAH SR, LUKASIK J. Microbial Source Tracking: Current Methodology and Future Directions. **Applied and Environmental Microbiology**, **68(12)**:5796–803, 2002.

SHIRLEY JA, BEARDS GM, THOULESS ME, FLEWETT TH. The influence of divalent cations on the stability of human rotavirus. **Archives of Virology**, **67(1)**:1-9, 1981.

SILVA A, VIEIRA H, MARTINS N, GRANJA A, VALE M, VALE F. Viral and bacterial contamination in recreational waters: a case study in the Lisbon bay area. **Applied and Environmental Microbiology**, **108(3)**:1023–31, 2010.

SINCLAIR RG, JONES EL, GERBA CP. Viruses in recreational water-borne disease outbreaks: a review. **Journal of Applied Microbiology**, **107**:1769-80, 2009.

SKRABER S, GASSIOLLOU B, SCHWARTZBROD L, GANTZER C. Survival of infectious Poliovirus-1 in river water compared to the persistence of somatic coliphages, thermotolerant coliforms and Poliovirus-1 genome. **Water Research**, **38(12)**:2927-33, 2004.

SOARES, DC. **Aspectos limnológicos do córrego São Pedro Juiz de Fora – Minas Gerais**. 2007. 108f. Dissertação (Mestre em Ecologia) - Programa de Pós-Graduação em Ecologia, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2007.

SOUZA, FFC. **A qualidade da água em reservatório de abastecimento público, reflexo do uso do solo**. In: X CONGRESSO DE ECOLOGIA DO BRASIL, 16 a 22 de Setembro de 2011, São Lourenço, MG. Disponível em: < <http://www.seb-ecologia.org.br/xceb/resumos/1254.pdf>>. Acesso em 20 abr. 2012.

SOUZA EC, MARTINEZ MB, TADDEI CR, MUKAI L, GILIO AE, RACZ ML, SILVA L, EJZENBERG B, OKAY Y. Etiologic profile of acute diarrhea in children in Sao Paulo. **Jornal de Pediatria** (Rio de Janeiro), **78(1)**:31-38, 2002.

STEWIEN KE, CUNHA LC, ALVIM A DE C, REIS FILHO AS, ALVIM MA, BRANDÃO AA, et al. Rotavirus associated diarrhea during infancy in the city of S. Luis (MA) Brazil: a two-year longitudinal study. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, **33(6)**:459-464, 1991.

STRAUB, T M, CHANDLER, DP. Towards a unified system for detecting waterborne pathogens. **Journal of Microbiological Methods**, **53(2)**:185-197, 2003.

UFJF, Universidade Federal de Juiz de Fora. Laboratório de climatologia geográfica e análise ambiental, UFJF. **Estação climatológica principal de Juiz de Fora**. Centro de Pesquisas Sociais. Banco de dados do Departamento de Geociências, 2012.

UHNOO I, OLDING-STENKVIST E, KREUGER A. Clinical features of acute gastroenteritis associated with rotavirus enteric adenovirus and bacteria. **Archives of Disease in Childhood**, **61(8)**:732-738, 1986.

VALENCIA-MENDOZA A, BERTOZZI SM, GUTIERREZ JP, ITZLER R. Cost-effectiveness of introducing a rotavirus vaccine in developing countries: The case of México. **BMC Infectious Diseases**, **8**:103, 2008.

VALENTE, E. **JF falha em política de saneamento básico**. Jornal Tribuna de Minas, Juiz de Fora, 14 de novembro de 2012. Disponível em: <[www.tribunademinas.com.br/cidade/jf-falha-em-politica-de-saneamento-basico-1.1186246](http://www.tribunademinas.com.br/cidade/jf-falha-em-politica-de-saneamento-basico-1.1186246)>. Acesso em: 30 janeiro 2013.

van ZYL WB, PAGE NA, GRABOW WOK, STEELE AD, TAYLOR MB. Molecular epidemiology of group A rotaviruses in water sources and selected raw vegetables in southern Africa. **Applied and Environmental Microbiology**, **72(7)**: 4554–60, 2006.

VERHEYEN J, TIMMEN-WEGO M, LAUDIEN R, BOUSSAAD I, SEN S, KOC A, UESBECK A, MAZOU F, PFISTER H. Detection of adenoviruses and rotaviruses in drinking water sources used in rural areas of Benin, West Africa. **Applied and Environmental Microbiology**, **75(9)**: 2798–801, 2009.

VESIKARI T, KARVONEN A, PRYMULA R, SCHUSTER V, TEJEDOR JC, COHEN R, MEURICE F, HAN HH, DAMASO S, BOUCKENOOGHE A. Efficacy of human rotavirus vaccine against rotavirus gastroenteritis during the first 2 years of life in European infants: randomised, double-blind controlled study. **The Lancet**, **370(9601)**:1757–1763, 2007.

VICTORIA M, RIGOTTO C, MORESCO V, CORRÊA AA, KOLESNOKOVAS C, LEITE JPG, MIAGOSTOVICH MP, BARARDI CRM. Assessment of norovirus contamination in environmental samples from Florianópolis City, Southern Brasil. **Journal of Applied Microbiology**, **209(1)**:231-8, 2010.

VICTORIA M, GUIMARÃES F, FUMIAN T, FERREIRA F, VIEIRA C, LEITE JP, MIAGOSTOVICH M. Evaluation of an adsorption-elution method for detection of astrovirus and norovirus in environmental waters. **Journal of virological methods**, **156(1-2)**:73–6, 2009.

VIEIRA CB, MENDES ACDO, GUIMARÃES FR, FUMIAN TM, LEITE JPG, GASPAR AMC, MIAGOSTOVICH MP. Detection of enteric viruses in recreational waters of an urban lagoon in the city of Rio de Janeiro, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, **107(6)**: 778–84, 2012.

VIEIRA CB. **Deteccção, quantificação e caracterização molecular de vírus gastroentéricos na lagoa Rodrigo de Freitas, 2007-2008**. 2010. 101f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Curso de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Instituto Oswaldo Cruz – FIOCRUZ, Rio de Janeiro, 2010.

VILLAR LM, DE PAULA VS, DINIZ-MENDES L., GUIMARÃES FR, FERREIRA FF, SHUBO TC, MIAGOSTOVICH MP, LAMPE E, GASPAR AM. Molecular detection of hepatitis A virus in urban sewage in Rio de Janeiro, Brazil. **Letters in Applied Microbiology**, **45(2)**:168–73, 2007.

VILLENA C, GABRIELI R, PINTO RM, GUIX S, DONIA D, BUONOMO E, PALOMBI L, CENKO F, BINO S, BOSCH A, DIVIZIA M. A large infantile gastroenteritis outbreak in Albania aused by multiple emerging rotavirus genotypes. **Epidemiology and Infection**, **131(3)**: 1105–10, 2003a.

VILLENA C, EL-SENOUSY WM, ABAD FX, PINTO RM, BOSCH A. Group A rotavirus in sewage samples from Barcelona and Cairo: emergence of unusual genotypes. **Applied and Environmental Microbiology**, **69**:3919–23, 2003b.

VON SPERLING, M. **Introdução ao tratamento das águas e ao tratamento de esgotos**. Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental – UFMG. 1 ed. Belo Horizonte; 2005.

WARD RL, MCNEAL MM, STEELE AD. Alternative rotavirus vaccines. **Therapeutics and Clinical Risk Management**, **4(1)**:49-63, 2008.

WARD RL, KNOWLTON DR, WINSTON PE. Mechanism of inactivation of enteric viruses in fresh water. **Applied and environmental microbiology**, **52(3)**:450–9, 1986.

WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Progress on Drinking Water and Sanitation: 2012 Update**. WHO/UNICEF Joint Monitoring Programme for Water Supply and Sanitation. New York, 2012.

WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Chloride in Drinking-water**. WHO, Geneva, 2003. Disponível:<  
[http://www.who.int/water\\_sanitation\\_health/dwq/chloride.pdf](http://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/chloride.pdf)>. Acesso em: 04 Fev. 2013.

WILHELMI I, ROMAN E, SÁNCHEZ-FAUQUIER A. Viruses causing gastroenteritis. **Clinical Microbiology and Infection**, **9(4)**:247-262, 2003.

WYN-JONES, AP, SELLWOOD J. Enteric viruses in the aquatic environment. **Journal of Applied Microbiology**, **91(6)**:945-962, 2001.

ZENG SQ, HALKOSALO A, SALMINEN M, SZAKAL ED, PUUSTINEN L, VESIKARI T. One-step quantitative RT-PCR for the detection of rotavirus in acute gastroenteritis. **Journal of Virology Methods**, **153(2)**:238-240, 2008.

ZHENG DP, ANDO T, FANKHAUSER RL, BEARD RS, GLASS RI, MONROE SS. Norovirus classification and proposed strain nomenclature. **Virology**, **346(2)**:312-23, 2006.