



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

**DETECÇÃO DE ROTAVÍRUS, NOROVÍRUS E VÍRUS DA
HEPATITE A EM AMOSTRAS DE ÁGUA DO MAR E DE RIOS
NO MUNICÍPIO DE SALVADOR - BAHIA**

André Mário Mendes da Silva

SALVADOR – BAHIA

2018

ANDRÉ MÁRIO MENDES DA SILVA

**DETECÇÃO DE ROTAVÍRUS, NOROVÍRUS E VÍRUS DA
HEPATITE A EM AMOSTRAS DE ÁGUA DO MAR E DE RIOS
NO MUNICÍPIO DE SALVADOR - BAHIA.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal da Bahia/Rede Nordeste de Biotecnologia (RENORBIO) como parte dos requisitos para obtenção do Título de Doutor em Biotecnologia.

Orientador: Gúbio Soares Campos

Co-orientadora: Sílvia Inês Sardi

SALVADOR – BAHIA

2018

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema Universitário de Bibliotecas (SIBI/UFBA),
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Silva, André Mário Mendes da
Detecção de rotavírus, norovírus e vírus da hepatite A
em amostras de água do mar e de rios no município de
Salvador - Bahia / André Mário Mendes da Silva. --
Salvador, 2018.
92 f. : il

Orientador: Prof. Dr. Gúbio Soares Campos.
Coorientadora: Profa. Dra. Silvia Ines Sardi.
Tese (Doutorado - Programa de Pós-graduação em
Biotecnologia - RENORBIO) -- Universidade Federal da
Bahia, Instituto de Ciências da Saúde, 2018.

1. Água. 2. Vírus entéricos. 3. RT-PCR. I. Campos,
Prof. Dr. Gúbio Soares. II. Sardi, Profa. Dra. Silvia
Ines . III. Título.

TERMO DE APROVAÇÃO

A TESE:

“Detecção de rotavírus, norovírus e vírus da hepatite A em amostras de água do mar e de rios no município de Salvador - Bahia”

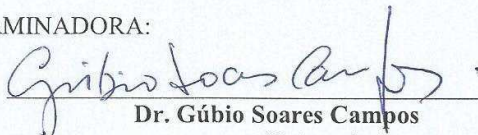
ELABORADA POR:

ANDRÉ MÁRIO MENDES DA SILVA

Foi aprovada por todos os membros da banca examinadora e aceita pelo Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Renorbio como requisito parcial à obtenção do título de
DOUTOR EM BIOTECNOLOGIA

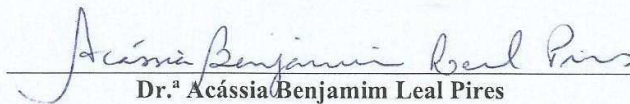
Salvador, Bahia, 25 de abril de 2018

BANCA EXAMINADORA:



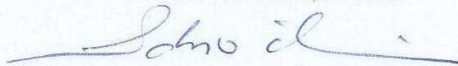
Dr. Gúbio Soares Campos
(Orientador)

Universidade Federal da Bahia



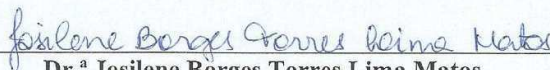
Dr.ª Acássia Benjamim Leal Pires

Universidade Estadual da Bahia



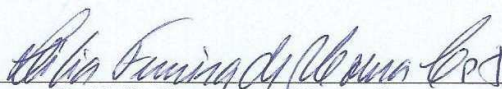
Dr. Fábio Alexandre Chinalia

Universidade Federal da Bahia



Dr.ª Josilene Borges Torres Lima Matos

Universidade Federal da Bahia



Dr.ª Lília Ferreira de Moura Costa

Universidade Federal da Bahia

Dedico este trabalho à minha família.

AGRADECIMENTOS

A Deus, o princípio inteligente criador de todas as coisas.

A minha família: minha amada mãe, Ivete das Dores Mendes da Silva, meu amado sobrinho, Heitor Mendes da Silva Lobo Esmera e minha amada irmã, Geisa Viviane Mendes da Silva.

Aos meus queridos familiares, que me rodeiam de carinho.

A minha co-orientadora, Dra. Silvia Ines Sardi, por seu exemplo como pesquisadora e sua amizade.

A Dr. Gubio Soares Campos por ter me dado a oportunidade de realizar este trabalho.

A Dra. Dellane Martins Tigre e ao Biotecnologista Ítalo Uzêda, meus irmãos, meus companheiros e meus amigos por toda a eternidade.

A todos os amigos do LabViro, aos estudantes de iniciação científica, de mestrado e de doutorado. Muito obrigado pela alegria, pela colaboração e pelo alento nos nossos dias de Labviro!

A minha querida irmã do coração, Sueli Santos (*in memorium*), por sua força de espírito e seu ombro amigo.

Aos amigos que fiz nesses anos de ICS: Fulvia, Neila, Maria Clara, Marinho, Anáide, Ivana, Terezinha, Seu Crispim, Seu Antônio e demais colegas, obrigado pelas palavras de conforto.

A Dra. Cláudia Valle, por sua amizade e por sempre me ajudar quando preciso.

A Dra. Cristina Quintela, por ter me ensinado a importância da inovação tecnológica. A Dra. Rejane Hughes Carvalho e Dra. Laura Tauro, por suas contribuições à realização deste trabalho.

Aos amigos Juscilene Guida e Itamar da Paixão, por nossa amizade que de tão grande não possuí tamanho, e aos amigos do Grupo Espírita Porto da Alegria, por terem me ensinado muito.

Aos meus alunos, razão pela qual existe a profissão de professor que eu tanto amo.

“Fundamental é mesmo o amor. É impossível ser feliz sozinho”.

Tom Jobim

SILVA, André Mário Mendes da. **Detecção de rotavírus, norovírus e vírus da hepatite A em amostras de água do mar e de rios no município de Salvador - Bahia.** 92f. 2018. Tese (Doutorado) - Instituto de Ciências da Saúde, RENORBIO/Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2018.

RESUMO

A contaminação microbiana da água continua sendo um problema de preocupação global, agravando-se devido à escassez de água potável e seu saneamento inadequado. As fontes de água subterrâneas e superficiais podem estar sujeitas à contaminação fecal de diversas origens. A importância do controle de qualidade da água tem motivado à necessidade do desenvolvimento de procedimentos analíticos adequados e sensíveis. O presente trabalho teve como objetivo a detecção de vírus entéricos em amostras de água do mar e de rios coletadas mensalmente em diferentes pontos do município de Salvador, estado da Bahia Brazil. Um total de 70 amostras de água do mar foram coletadas entre outubro de 2015 a abril de 2016 e de julho a setembro de 2016 e 24 amostras de água de rios foram coletadas no período de outubro de 2016 a janeiro de 2017. Todas as amostras foram submetidas a técnica de concentração por floculação orgânica e posteriormente submetidas a detecção de vírus entéricos (RVA, NoV e HAV) utilizando RT-PCR para RVA e RT-qPCR para NoV e HAV. Neste trabalho, também foi testado um novo composto orgânico para concentração de partículas virais em amostras de água comparando-o com uma técnica já padronizada com água do mar sintética. Os resultados obtidos revelam grande prevalência de contaminação viral nas praias da área litorânea de Salvador. Foram encontradas 50 amostras positivas (71,7%) para RVA e 64 amostras positivas (91,4%) para NoV. Nas análises realizadas em águas de rios, 20 amostras foram positivas (83,3%) para RVA e 18 positivas (66,7%) para NoV. O grande número de amostras positivas de água de rios para RVA e NoV aponta para a possibilidade de que a origem da contaminação existente nas praias seja a proximidade destas com a foz dos rios urbanos. Todavia, este estudo não encontrou amostras de água do mar ou de rios que fossem positivas para detecção de HAV. Por outro lado, o novo composto orgânico proposto para concentrar partículas virais em água apresentou melhor sensibilidade do que a realização de floculação orgânica através de formulação a base de leite em pó desnatado.

Palavras-chave: Água, vírus entéricos, RT-PCR.

SILVA, André Mário Mendes da. **Detection of rotavirus, norovirus and hepatitis A virus in seawater and rivers samples in the Salvador City, Bahia.** 92 f. 2018. Thesis (Doctorate degree) Instituto de Ciências da Saúde, RENORBIO/Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2018.

ABSTRACT

Microbial contamination of water remains a problem of global concern, aggravated by the scarcity of drinking water and inadequate sanitation. Groundwater and surface water sources may be subject to fecal contamination from a variety of sources. The importance of water quality control has motivated the need to develop adequate and sensitive analytical procedures. The present work had the objective of detecting enteric viruses in sea water's samples and from rivers collected monthly in different points of the city of Salvador, State of Bahia Brazil. A total of 70 seawater samples were collected between October 2015 to April 2016 and from July to September 2016 and 24 river water samples were collected from October 2016 to January 2017. All samples were submitted to concentration technique by organic flocculation and subsequently submitted to the detection of enteric virus (RVA, NoV and HAV) using RT-PCR for RVA and RT-qPCR for NoV and HAV. In this work, a new organic compound was also tested for concentration of viral particles in water samples, comparing it with a technique already standardized with synthetic sea water. The results obtained reveal a high prevalence of viral contamination on the beaches of the coastal area of Salvador. We found 50 positive samples (71.7%) for RAV and 64 positive samples (91.4%) for NoV. In the analyzes performed in river waters, 20 samples were positive (83.3%) for RAV and 18 positive (66.7%) for NoV. The large number of positive samples of river water for RVA and NoV points to the possibility that the source of contamination on the beaches is the proximity where urban rivers flow into the sea. However, this study did not find samples of seawater or rivers that were positive for HAV detection. On the other hand, the new organic compound proposed to concentrate viral particles in water presented better sensitivity than the organic flocculation through the formulation of skimmed milk powder.

Key-words: Water, enteric virus, RT-PCR.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Possíveis rotas da transmissão de vírus entéricos.....	22
Figura 2	Estimativa da incidência de óbitos causados pela rotavirose por 100.000 crianças menores de 5 anos de idade.....	25
Figura 3	Microscopia eletrônica do RV.....	27
Figura 4	Esquema da partícula do rotavírus.....	27
Figura 5	Microscopia eletrônica do NoV.....	30
Figura 6	Representações da estrutura do capsídeo viral do NoV.....	30
Figura 7	Esquema da partícula do HAV.....	33
Figura 8	Taxa de incidência/detecção de hepatites virais segundo agente etiológico e ano de notificação.....	35
Figura 9	Taxa de incidência de casos de hepatite A segundo região de residência e ano de notificação.....	35

MANUSCRITO 01

Fig. 1	Rivers and beaches' sampling. Representative map of Salvador City indicating collection points.....	75
---------------	---	----

MANUSCRITO 02

Figura 01	Esquema para contaminação experimental das amostras de água do mar artificial com RV para validação do novo método proposto.....	80
Figura 02	Cultura de Células MA-104 infectadas com RV.....	84
Figura 03	Imagem de gel de agarose 2% após produtos do nested-PCR de amostras contaminadas experimentalmente com RV serem submetidos à eletroforese.....	84

LISTA DE GRÁFICOS

MANUSCRITO 01

Fig. 2A	Distribution of RVA in seawater samples by month.....	75
Fig. 2B	Distribution of RVA in river water samples by month.....	76
Fig. 3A	Distribution of NoV in seawater samples by month.....	76
Fig. 3B	Distribution of NoV in river water samples by month.....	76

LISTA DE TABELAS

MANUSCRITO 01

Table 1	Geographic coordinates from beaches' sampling points.....	73
Table 2	Geographic coordinates from rivers' sampling points.....	73
Table 3	Oligonucleotide primers used to RT-PCR and Nested-PCR for RVA detection.....	73
Table 4	Primers and probes used to RT-qPCR for NoV and HAV detection.....	74
Table 5	RVA and NoV detection in seawater samples.....	74
Table 6	RVA and NoV detection in river water samples.....	74

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

cDNA	<i>Complementary DNA</i> (ácido desoxirribonucleico complementar)
D-MEM	<i>Dulbecco Modified Eagle Medium</i>
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> (ácido desoxirribonucleico)
DICT	Doses infectantes de cultura de tecidos
dsRNA	<i>Double-stranded RNA</i> (RNA de fita dupla)
EV	<i>Enterovirus</i> (enterovírus)
HAdV	<i>Human adenovirus</i> (adenovírus humano)
HAsV	<i>Human astrovirus</i> (astrovírus humano)
HAV	<i>Hepatitis A Virus</i> (Vírus da Hepatite A)
HEV	<i>Hepatitis E Virus</i> (Vírus da Hepatite E)
HNoV	<i>Human norovirus</i> (norovírus humano)
INEMA	Instituto do Meio Ambiente e Recursos Hídricos
Kb	<i>Kilobases</i>
NoV	<i>Norovirus</i> (norovírus)
NSP	<i>Nonstructural protein</i> (proteína não estrutural)
OMS	Organização Mundial de Saúde
ORF	<i>Open Reading Frames</i> (Região Aberta de Leitura)
PAGE	<i>Polyacrylamide gel electrophoresis</i> (eletroforese em gel de poliacrilamida)
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i> (Solução salina fosfatada)
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (Reação em cadeia de polimerase)
RNA	<i>Ribonucleic acid</i> (ácido ribonucleico)
RNAm	RNA mensageiro
RT	<i>Reverse transcriptase</i> (Transcriptase reversa)
RT-PCR	Reação da transcriptase reversa seguida da reação em cadeia da polimerase
RT-qPCR	<i>Real time quantitative PCR</i> (RT-qPCR em tempo real)
RV	<i>Rotavirus</i> (rotavírus)

RVA	Rotavírus do grupo A
SFB	<i>Serum fetal bovine</i> (Soro fetal bovino)
VP	<i>Virus protein</i> (proteína viral)
UV	Radiação ultravioleta

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	REVISÃO DE LITERATURA	18
2.1	CONTAMINAÇÃO DA ÁGUA POR VÍRUS.....	18
2.2	OS VÍRUS ENTÉRICOS.....	20
2.2.1	Rotavírus (RV)	24
2.2.2	Norovírus (NoV)	29
2.2.3	Vírus da Hepatite A (HAV)	32
2.3	METODOLOGIAS PARA DETECÇÃO DE VÍRUS NA ÁGUA.....	36
2.3.1	Concentração de Partículas Virais Presentes na Água	36
2.3.2	Detecção dos Vírus Entéricos na Água	38
	REFERÊNCIAS	40
3	OBJETIVOS	50
3.1	OBJETIVO GERAL.....	50
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	50
4	MANUSCRITO 01: DETECTION OF ROTAVIRUS, NOROVIRUS AND HEPATITIS A VIRUS IN SEAWATER AND RIVER WATER SAMPLES FROM SALVADOR CITY, BAHIA, BRAZIL	51
5	MANUSCRITO 02: NOVO MÉTODO PARA CONCENTRAÇÃO DE PARTÍCULAS VIRAIS EM AMOSTRAS DE ÁGUA	77
6	CONCLUSÕES	86
	ANEXOS	87

1 INTRODUÇÃO

A contaminação microbiana da água continua sendo um problema de preocupação global, agravando-se devido à escassez de água potável e seu saneamento inadequado, os quais são importantes fatores de risco para mortalidade e morbidade no que diz respeito às gastroenterites, especialmente nos países em desenvolvimento econômico (CHIGOR & OKOH, 2012). Em todo o mundo, a diarreia continua sendo a segunda causa de morte em crianças menores de cinco anos. Diferentes tipos de vírus, tais como rotavírus, norovírus, sapovírus, astrovírus e adenovírus, notoriamente estão associados a essas doenças (KHAMRIN *et al.*, 2011; RABONI *et al.*, 2014).

Os impactos ambientais de origem antrópica geralmente estão relacionados à ocupação do espaço físico, à extração de recursos naturais como fator de produção e às descargas residuais poluentes (OLIVEIRA, 2017). As fontes de água subterrâneas e superficiais podem estar sujeitas à contaminação fecal de diversas origens, incluindo efluentes de plantas de tratamento de esgotos, descargas de tratamento de resíduos sépticos no local, deslizamento de terras de áreas urbanas, agrícolas e aterros sanitários. Conseqüentemente, milhões de pessoas em todo o mundo não têm acesso à água microbiologicamente segura para uso doméstico, recreativo e outros fins (SIBANDA & OKOH, 2013).

As exigências por água potável de alta qualidade conduziram as políticas de saúde pública e ambiental no sentido de aumentarem a rigorosidade na garantia da segurança microbiológica da água. Para reduzir o risco à saúde humana advindos de doenças provocadas pelo consumo de água ou relacionadas à sua utilização, a Organização Mundial da Saúde (OMS) estabeleceu padrões de qualidade que são adotados por diversos países (ALBINANA-GIMENEZ *et al.*, 2009a).

A vigilância de águas costeiras, tanto para recreação como para cultivo de marisco ou outras atividades com relevância para a saúde humana, inclui o monitoramento da ocorrência de poluição fecal. Embora qualquer tipo de poluição seja um risco para a saúde dos seres humanos, a contaminação com fezes humanas apresenta um risco em particular, uma vez que pode conter patógenos que especificamente infectam seres humanos (CALGUA *et al.*, 2008).

Os marcadores biológicos e químicos clássicos para a poluição ambiental não necessariamente indicam a presença ou ausência de ameaças emergentes à saúde pública, tais como vírus transmitidos pela água e genotóxicos. Embora os indicadores convencionais de

poluição fecal sejam *Escherichia coli* e enterococos intestinais, a ocorrência de indicadores bacterianos não necessariamente correlaciona-se com a presença de patógenos virais que são mais estáveis no ambiente, nem fornecem informações sobre a origem potencial da contaminação (BERGAMASCHI *et al.*, 2015; CALGUA *et al.*, 2008).

Existem relatos da ocorrência de surtos de gastroenterites virais provocados pelo contato dos pacientes com água contaminada ou pelo consumo de marisco obtidos em regiões costeiras cuja água está contaminada. O saneamento básico desempenha papel fundamental no controle da disseminação dos vírus entéricos no ambiente, diminuindo os riscos de transmissão. Diversos estudos demonstraram as correlações entre a falta de saneamento, incluindo acesso à água potável e esgotamento sanitário, com o aumento das taxas de morbidade e mortalidade por doenças infecciosas (DA PAZ *et al.*, 2012; PRADO & MIAGOSTOVICH, 2014; RASELLA, 2013).

A virologia ambiental abrange um extenso campo de pesquisa, correlacionando-se com políticas públicas específicas, tais como: saneamento, recursos hídricos, gerenciamento costeiro, vigilância sanitária e epidemiológica (MACHADO *et al.*, 2012).

O desenvolvimento de técnicas eficientes para a detecção de vírus tornou-se uma alternativa para o monitoramento confiável da contaminação das águas costeiras. Diferentes métodos de concentração de vírus em amostras de água estão sendo empregados atualmente (MORESCO *et al.*, 2012).

A detecção de vírus em amostras ambientais pode ser realizada com métodos de cultura de células ou com técnicas moleculares. Como alguns vírus são difíceis ou mesmo impossíveis de cultivar, as técnicas moleculares são ferramentas úteis para a detecção. Embora estas técnicas não discriminem os vírus quanto à sua viabilidade, elas são úteis para o monitoramento da presença desses vírus em amostras ambientais. Esses dados podem ser utilizados para determinar um possível risco após exposição à água contaminada quando o RNA ou o DNA destes vírus ainda são detectados nestas amostras (LODDER *et al.*, 2010).

A concentração das partículas virais é a primeira etapa na realização da análise virológica da água. É necessário recuperar e concentrar o maior número possível dessas partículas, ou mesmo reter material genético em suspensão. Geralmente, os vírus estão presentes em baixas concentrações nas amostras de águas ambientais. Dessa forma, a concentração é uma etapa crítica, trabalhosa e onerosa, sendo necessária a coleta de amostras volumosas (variando de um a 1.000 litros ou mais, dependendo da origem da água a ser

analisada) que serão reduzidas a volumes menores, podendo inviabilizar a sua aplicação em rotina de monitoramento ambiental (TAVARES *et al.*, 2005; SILVA *et al.*, 2011).

Por esta razão, a detecção da presença de vírus entéricos em águas costeiras, as quais são utilizadas tanto para o turismo como para o cultivo de espécies marinhas para a alimentação, é de grande importância, pois permitirá a obtenção de dados sobre a qualidade destas reservas hídricas ambientais, a possibilidade de sua contaminação com resíduos de esgoto e a qualidade dos produtos alimentícios delas originados.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 CONTAMINAÇÃO DA ÁGUA POR VÍRUS

A maioria da população mundial reside ao longo das regiões costeiras, incluindo a população brasileira. Nessas regiões, o despejo de resíduos de afluentes não tratados ocorre de forma inadequada e os impactos ambientais ocasionados são incalculáveis (GRIFFIN *et al.*, 2003).

A poluição das reservas hídricas é uma preocupação primordial no que concerne à proteção dos recursos naturais, pois as fontes de água que possam estar contaminadas por fezes é um potencial fator de risco para doenças gastrointestinais, especialmente aquelas que estão associadas às infecções virais (MIAGOSTOVICH *et al.*, 2014).

Atualmente, as questões relacionadas à contaminação de ambientes aquáticos e de recursos hídricos globais têm provocado grande apreensão, principalmente devido à escassez mundial de água potável. A contaminação de águas litorâneas por vírus e outros contaminantes são causadas pelo despejo de resíduos de origem fecal, tais como matérias-primas ou tratamento de esgoto e compromete a qualidade da água usada para fins recreativos, pesca e cultivo de mariscos (MORESCO *et al.*, 2012).

Apesar do aperfeiçoamento da tecnologia do tratamento de diversas fontes de água, as doenças provocadas pelo consumo de água contaminada ainda estão correlacionadas às questões sanitárias e socioeconômicas nos países economicamente desenvolvidos ou em desenvolvimento. De acordo com a OMS, a cada ano há aproximadamente 2,2 milhões de mortes relacionadas a problemas de saneamento básico e higiene, e milhões de indivíduos sofrem vários episódios de diarreia não-fatal (HAMZA *et al.*, 2011).

Uma prática que tem sido adotada ultimamente nas grandes cidades do país é o tamponamento dos rios das áreas urbanas (BRASIL, 2015). Aparentemente, essa manobra é interessante, pois esconde dos olhos da população a grave situação da poluição da bacia hidrográfica do seu município, além de criar novas áreas recreativas e de circulação de pedestres sobre a região tamponada que antes era um desagradável rio poluído a céu aberto (RAGONHA & CORRÊA, 2016). Durante anos, os rios urbanos foram conceitualmente tratados como um problema de saneamento e não como um patrimônio ambiental (MORAES *et al.*, 2012). No

entanto, diversos estudiosos acreditam que essa medida é temerária, pois apenas esconde para debaixo do tapete os produtos da poluição que inevitavelmente terminarão contaminando os recursos ambientais (ar, solo e água) (RAGONHA & CORRÊA, 2016). No período de alta pluviosidade, o escoamento superficial promove o aumento dos níveis de esgoto sanitário que são despejados nas praias e nos rios urbanos. Dentre os fatores que podem afetar a distribuição e ocorrência de vírus entéricos em um ambiente estuarino estão: variação dos regimes de maré, salinidade, pH, presença de nutrientes, temperatura da água, intensidade da luz solar, agregação com sólidos suspensos e outras variáveis ambientais (FONG & LIPP, 2005).

A qualidade da água é afetada pela presença de microrganismos patogênicos derivados de resíduos de esgoto tratados inadequadamente e eliminados no meio ambiente, sendo considerados, dessa forma, como contaminantes ambientais. As doenças infecciosas relacionadas à qualidade da água estão entre as principais causas de mortalidade e morbidade em todo o mundo (ALBINANA-GIMENEZ *et al.*, 2009b; RUSIÑOL *et al.*, 2015).

Entre os grupos de patógenos encontrados em águas residuais, os vírus apresentam o maior risco de causarem surtos porque geralmente ocorrem em grandes concentrações e possuem uma infectividade muito maior (ou seja, maior probabilidade de infecção em um determinado caso de exposição), se forem comparados às bactérias e aos protozoários (GERBA *et al.*, 2017). Os surtos de infecções provocadas por vírus entéricos transmitidos pela água estão entre os maiores problemas que podem afetar à saúde pública. Mesmo a presença de pequenas quantidades de partículas virais em um grande volume de água potável representa uma ameaça para a saúde da população. Mais de 140 tipos de vírus que causam uma grande variedade de doenças em seres humanos podem ser encontrados na água, sendo provenientes da contaminação por esgoto (HAMZA *et al.*, 2009).

Vírus entéricos são excretados em grandes quantidades nas fezes de pacientes com gastroenterites virais e nas fezes de portadores saudáveis. O tratamento convencional de águas residuais não remove completamente os vírus que são excretados pela população, os quais podem ser detectados em diversas regiões no meio ambiente (ALBINANA-GIMENEZ *et al.*, 2009b; RUSIÑOL *et al.*, 2015).

Os vírus entéricos podem ser introduzidos em ambientes aquáticos por meio de diversas atividades humanas e animais, tais como eliminação de esgotos, uso incorreto de sistemas sépticos; atividades agrícolas e pecuárias, dentre outros fatores. Entre os principais vírus entéricos que podem ser responsáveis por gastroenterites ou outras manifestações clínicas, o Adenovírus Humano (HAdV), as espécies de Rotavírus do grupo A (RVA), os Vírus da

Hepatite A e E (HAV e HEV, respectivamente), o Astrovírus Humano (HAstV), o Norovírus Humano (HNoV) e os Enterovírus (EV) são os mais frequentemente detectados no ambiente aquático. Todos esses vírus são bastante resistentes aos tratamentos de água e esgoto porque são capazes de adsorverem rapidamente partículas sólidas e, portanto, se protegerem de fatores de inativação. Além disso, estudos recentes mostraram que vírus emergentes (klassevirus, poliomavírus das células de Merkel e poliomavírus humanos KI e WU) também podem estar presentes em água contaminada com esgoto (CALGUA *et al.*, 2013a; FONGARO *et al.*, 2015).

2.2 OS VÍRUS ENTÉRICOS

Os quadros clínicos de diarreia estão entre as principais causas de mortalidade e morbidade em todo o mundo, resultando da contaminação de água e alimentos ou sendo transmitida devido a condições precárias de higiene. De acordo com a OMS, a doença diarreica é a segunda principal causa de morte entre crianças menores de 5 anos de idade. O impacto da doença é maior em países em desenvolvimento, onde representa uma das principais causas de mortalidade infantil (WHO, 2013; PORTES *et al.*, 2017).

Os casos de gastroenterite aguda são definidos clinicamente pela ocorrência de três ou mais evacuações líquidas ou de pouca consistência em um período de 24 horas, acompanhadas ou não de dois ou mais episódios de vômito ao dia, mas podem ser agravadas com a intensificação dos sintomas e levar à desidratação e morte. A doença é causada por agentes infecciosos que aderem ou invadem a mucosa intestinal, assim como pela ação de enterotoxinas produzidas por esses agentes (RODRIGUEZ-BAEZ *et al.*, 2002).

Segundo o Ministério da Saúde, a doença diarreica aguda é reconhecida como importante causa de morbimortalidade no Brasil, mantendo relação direta com as precárias condições de vida e saúde dos indivíduos, em consequência da falta de saneamento básico e da desnutrição crônica, entre outros fatores (BRASIL, 2010). No ano de 2013, foram notificados 4.380.256 casos de doença diarreica aguda no Brasil (BRASIL, 2014a). Esta situação, provavelmente, relaciona-se à escassez de chuvas, especialmente nas regiões Nordeste e Sudeste no ano de 2013. Esse fenômeno influenciou na redução da oferta de água nos reservatórios, causando intermitência ou interrupção no fornecimento de água à população. A água destinada ao consumo humano, quando não ofertada em quantidade suficiente e em qualidade adequada, representa o principal veículo de transmissão de doenças como diarreia,

cólera, hepatites virais, entre outras. A disponibilidade de água potável é a medida mais efetiva na prevenção dessas doenças. Dos casos notificados de doença diarreica aguda no ano de 2013, a faixa etária mais acometida foi a de 10 anos ou mais (57,59%), seguidas por 1 a 4 anos (22,01%), 5 a 9 anos (12,07%) e menor de 1 ano (7,18%) (BRASIL, 2014a).

Os vírus entéricos são considerados a principal causa de doenças transmitidas pela água e têm sido responsáveis por 30 a 90% das gastroenterites em todo o mundo. O termo “vírus entérico” compreende todos aqueles que estão presentes no trato gastrointestinal humano e podem ser eliminados nas fezes durante o período de replicação. Eles são representados por diversas famílias comumente estudadas: Picornaviridae (poliovírus, enterovírus, coxsakievírus, vírus da hepatite A, e echovírus), Adenoviridae (adenovírus), Caliciviridae (norovírus e sapovírus), Astroviridae (astrovírus) e Reoviridae (rotavírus) (BOSCH *et al.*, 2008; BORGES, 2009; ALIDJINOU *et al.*, 2017).

Os vírus entéricos são comumente excretados em altas concentrações nas fezes de humanos e animais (na ordem de 10^8 a 10^{11} partículas virais por grama de fezes), sendo capazes de contaminar direta ou indiretamente águas destinadas ao consumo humano e água do mar que recebe esgoto, sobrevivendo no ambiente com relativa estabilidade e ocasionando ocorrência de surtos de doenças em indivíduos susceptíveis (BOSCH *et al.*, 2008; MORESCO *et al.*, 2012).

Os vírus de disseminação entérica podem ser transmitidos por contato direto entre os indivíduos, por fômites, pelo consumo de alimentos contaminados, pelo consumo de água contaminada, pelo contato com águas de recreação ou pelo contato com a pele e inalação das partículas virais. O conhecimento acerca do comportamento destes agentes no ambiente aquático é de grande importância para a conscientização do público e para as ações das autoridades responsáveis pelo monitoramento do uso e do tratamento da água (WYN-JONES & SELLWOOD, 2001).

No entanto, a contaminação das superfícies parece desempenhar um papel importante na disseminação dos vírus entéricos através de fômites, especialmente em estabelecimentos como hospitais, creches e asilos. Muitos vírus entéricos foram associados a infecções provocadas por procedimentos nosocomiais e transmitidas por mãos e superfícies contaminadas. Várias superfícies como alças de portas, roupas, telefones, assentos de sanitários, paredes, termômetros, luvas e papéis podem ser contaminados e servem como veículos para o vírus (ALIDJINOU *et al.*, 2017). A figura 1 apresenta as principais rotas de transmissão dos agentes virais entéricos (BOSCH *et al.*, 2008).

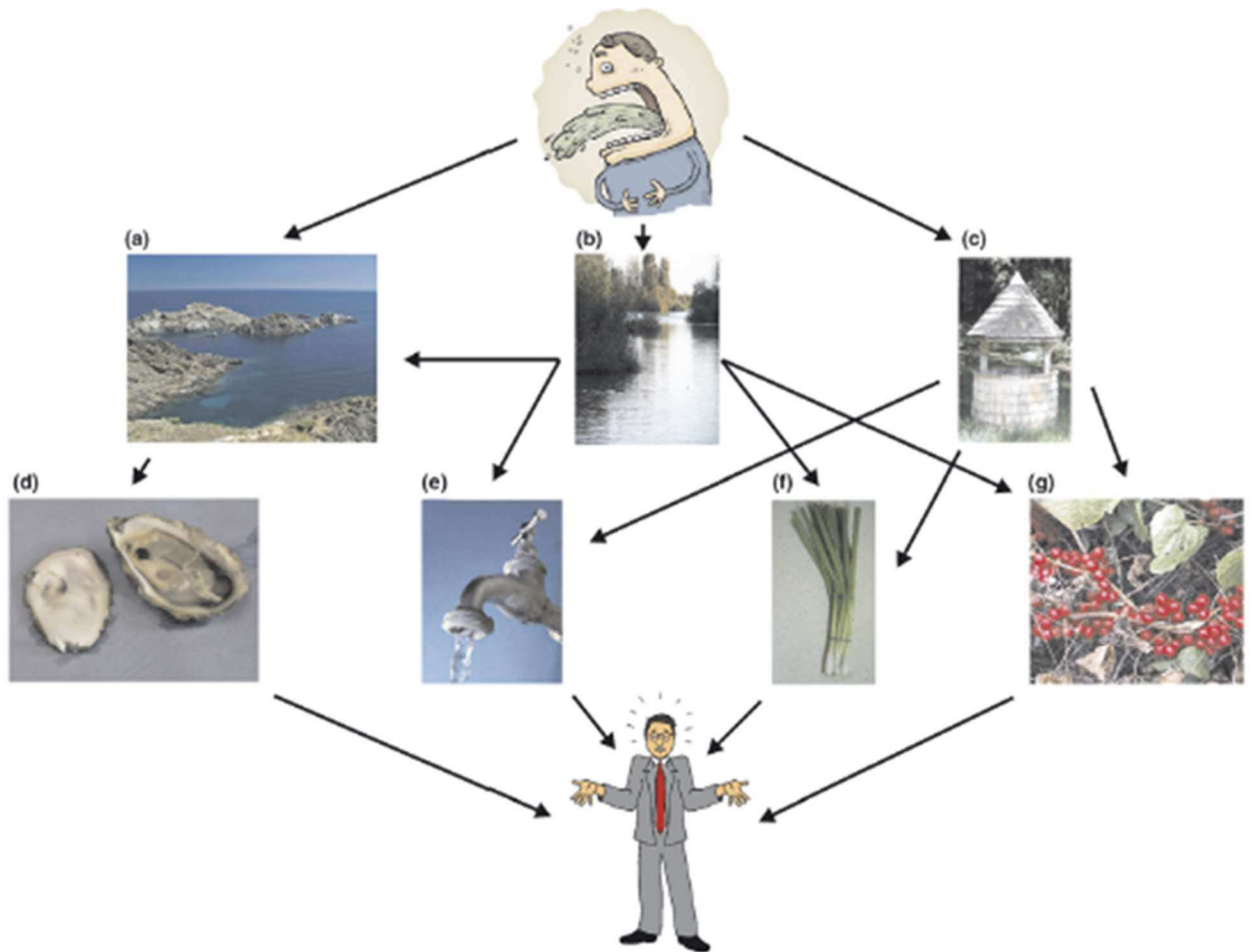


Figura 1: Possíveis rotas da transmissão de vírus entéricos. Os vírus são eliminados nas fezes e vômitos de indivíduos infectados e introduzidos no ambiente através do despejo de resíduos tratados e não tratados. Em consequência, os patógenos virais contaminam o ambiente marinho (a), água fresca (b) e águas subterrâneas (c). A humanidade é exposta a vírus entéricos através de várias rotas: marisco cultivado em águas poluídas (d), água potável contaminada (e), vegetais cultivados, como folháceos (f) e frutas (g), em terras irrigadas com água contaminada com esgoto e/ou fertilizadas com esgoto (Adaptado de Bosch *et al.*, 2008).

Muitos desses vírus causam infecções subclínicas e por isso a sua prevalência é difícil de estimar. O aumento da urbanização e a alta frequência de viagens globais favorecem o surgimento e ressurgimento de patógenos entéricos, bem como surtos de infecções gastrointestinais. A distribuição e a prevalência desses patógenos são variáveis nas diversas regiões do mundo porque dependem do perfil epidemiológico da comunidade, das condições geográficas, dos padrões de sazonalidade, das condições sócio-econômicas e ambientais específicas (HELLMÉR *et al.*, 2014).

Evidências epidemiológicas sugerem que os vírus entéricos são os agentes etiológicos mais comuns transmitidos pelo consumo de mariscos. Estes vírus estão associados a várias patologias que vão desde infecções oculares e respiratórias até gastroenterite, hepatite, miocardite e meningite asséptica (SINCERO *et al.*, 2006).

Os vírus entéricos podem permanecer viáveis (potencialmente infectantes) durante vários meses na água, embora não se multipliquem por serem parasitas intracelulares obrigatórios. Esses patógenos são estudados pela sua elevada resistência às condições ambientais adversas, desfavoráveis ou letais para outros microrganismos, tais como níveis extremos de pH, temperaturas elevadas, salinidade, radiação ultravioleta (UV) pela luz solar, dentre outros fatores (GRIFFIN *et al.*, 2008).

Os vírus entéricos podem ser detectados em amostras de água originadas de diversas fontes durante todas as estações do ano e alguns deles podem ainda resistir a processos de tratamento de água e de esgoto aplicados no controle bacteriano. Além disso, a detecção de vírus entéricos não apresenta correlação em termos qualitativos e quantitativos com os atuais indicadores bacterianos de contaminação de águas. Desta forma, os vírus entéricos apresentam vantagens em relação às bactérias como marcadores de eficiência do processo de descontaminação da água e da contaminação ambiental por efluentes da rede de esgoto (TAVARES *et al.*, 2005). A detecção de vírus entéricos presentes em amostras ambientais é sistematicamente subestimada devido ao fato desses patógenos não poderem ser cultivados de forma eficiente por métodos de cultura de células *in vitro* (SINCERO *et al.*, 2006).

2.2.1 Rotavírus (RV)

As infecções por RV são a principal causa de diarreia grave em todo o mundo, resultando em cerca de 114 milhões de episódios de gastroenterite, 24 milhões de consultas médicas e 2,4 milhões de hospitalizações anualmente. Em 2008, a OMS estimou que ocorreram, aproximadamente, 453.000 mortes entre crianças das diversas faixas etárias devido à rotavirose. Esses óbitos corresponderam a 5% de todos os óbitos de crianças, com um índice de mortalidade de 86 mortes por 100.000 crianças menores de 5 anos de idade. Aproximadamente 90% desses óbitos ocorreram em países pobres na África e Ásia e estão associados a um atendimento médico precário (Figura 2) (CHANDRAN *et al.*, 2010; TATTE *et al.*, 2014; SANTOS *et al.*, 2015; WHO, 2011).

No Brasil, a infecção por RV foi relatada pela primeira vez em 1976 e, antes da introdução da vacina, era detectada entre 12% a 42% das doenças diarreicas em crianças menores de cinco anos em diferentes regiões do país, possuindo variação climática e sazonal (LINHARES, 1997; LINHARES, 2000; MUNFORD *et al.*, 2007). Nos anos de 1999, 2000 e 2002, a infecção por RV foi considerada como a principal causa de diarreia aguda em crianças hospitalizadas em Salvador, Bahia (SERRAVALLE *et al.*, 2007).

Duas vacinas contendo RVA atenuado estão licenciadas e amplamente disponíveis para uso em todo o mundo: a vacina Rotarix® (humana, monovalente P[8]G1, produzida por GlaxoSmithKline) e a vacina RotaTeq® (bovino-humana, pentavalente P[8] G1-4, produzida por Merck Sharp & Dohme). Ambas mostraram ser imunogênicas e conferiram proteção contra os genótipos heterólogos à cepa vacinal, principalmente para os casos graves de doença diarreica por RVA (SOARES *et al.*, 2014; TIKU *et al.*, 2014). A vacina Rotarix® foi introduzida no calendário vacinal do Brasil a partir de março de 2006. Sua administração é feita em duas doses, em crianças com 2 a 4 meses, com intervalo de 4 a 8 semanas, podendo ser aplicada concomitantemente com as demais vacinas (BRASIL, 2006).

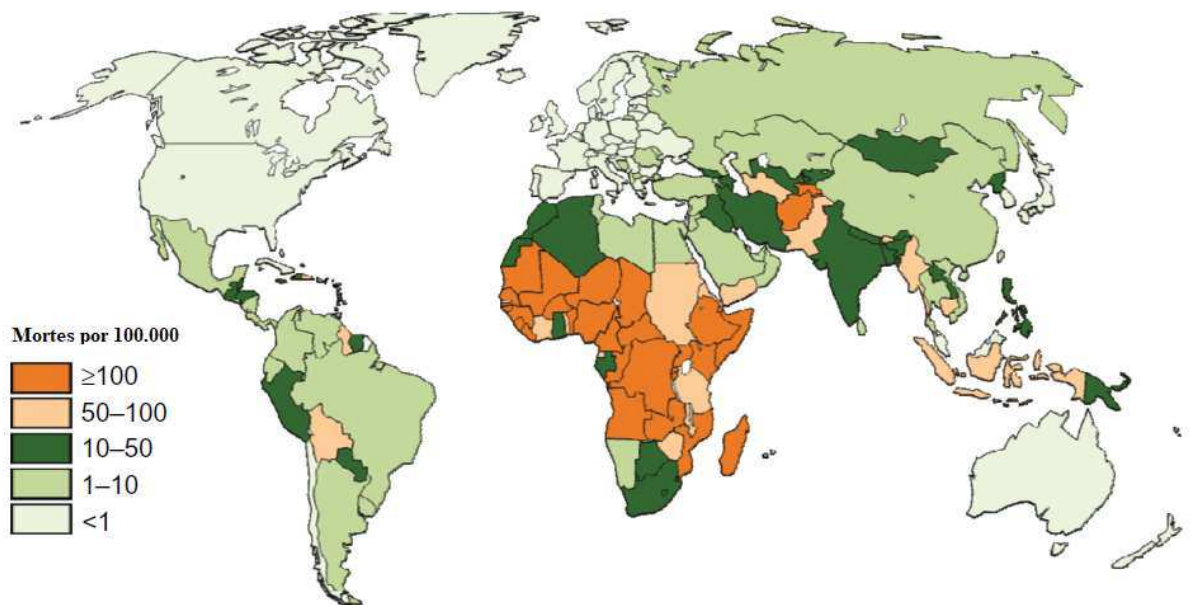


Figura 2: Estimativa da incidência de óbitos causados pela rotavirose por 100.000 crianças menores de 5 anos de idade (adaptada de Chandran *et al.*, 2010).

RVA pertencem à família *Reoviridae*, e possuem uma estrutura proteica disposta em três camadas (Figura 3 e 4). O seu genoma, localizado no interior do nucleocapsídeo, é composto de 11 segmentos de RNA de cadeia dupla (dsRNA), codificando seis proteínas estruturais (VPs) e seis não estruturais (NSPs). Duas proteínas externas do capsídeo, as proteínas VP4 (codificadas pelo segmento genômico 4) e VP7 (codificadas pelos segmentos 7, 8 ou 9), induzem a produção de anticorpos neutralizantes sorotipos específicos e suas sequências de genes são usadas para classificar os rotavírus em genótipos/sorotipos G e P, respectivamente, em uma base de classificação binária. Essas informações são importantes para o estabelecimento de ações epidemiológicas e também para o desenvolvimento e monitoramento de vacinas utilizadas na prevenção e no controle das diarreias neonatais (FREITAS *et al.*, 2011; IANIRO *et al.*, 2014, MIJATOVIC-RUSTEMPASIC *et al.*, 2014).

A partícula do RV mede aproximadamente 100 nm de diâmetro, incluindo as espículas, e não possui envelope. O capsídeo possui simetria icosaédrica e contém todas as enzimas necessárias à síntese do seu RNA. O vírion apresenta três camadas proteicas distintas formadas por VP2, VP6 e VP7 (Figura 4). A camada mais interna é formada pela VP2, que interage com VP1 e VP3. As VP1 (RNA polimerase-RNA dependente) e VP3 (responsável pelo capping do RNAm) ligam-se diretamente aos segmentos do RNA genômico (SANTOS *et al.*, 2015).

A infecção provocada por RV é mais comumente caracterizada por um quadro clínico de gastroenterite. Após um período de incubação de 1 a 3 dias, as infecções por rotavírus apresentam sintomas comuns a muitos patógenos entéricos: diarreia aquosa profusa, vômitos e febre. A gravidade dos sintomas varia, sendo frequentemente mais grave do que a infecção por outros agentes patogênicos entéricos virais, pois em 25% a 40% dos casos de diarreia há necessidade de hospitalização. As infecções por rotavírus não são invasivas e não provocam uma resposta inflamatória destrutiva (CHANDRAN *et al.*, 2010).

O uso de técnicas imunológicas, como o ensaio imunoenzimático, e métodos moleculares, como a reação em cadeia da polimerase (PCR), possibilitam a determinação das características antigênicas e moleculares das cepas de rotavírus (GOUVEA *et al.*, 1990). Estudos epidemiológicos moleculares sobre infecções causadas por rotavírus utilizam diversos marcadores virais para caracterização das cepas. Os marcadores mais frequentemente usados são o padrão de migração eletroforética dos 11 segmentos de RNA de cadeia dupla (dsRNA) do genoma do rotavírus quando separados por eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE), a especificidade do antígeno do subgrupo VP6 e os sorotipos dos importantes antígenos externos de neutralização do capsídeo (ESONA *et al.*, 2004).

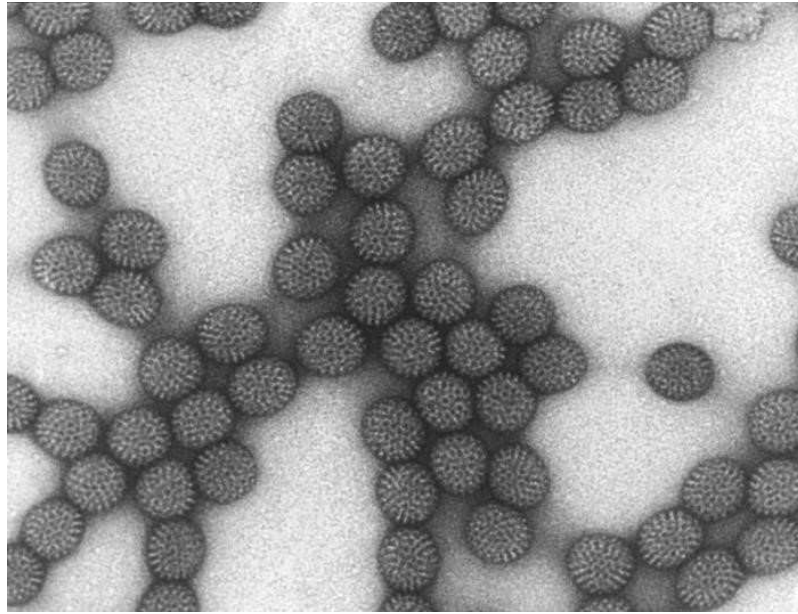


Figura 3: Microscopia eletrônica do RV. Fonte: <http://www.cdc.gov/rotavirus>. Acessado em 04/09/2017.

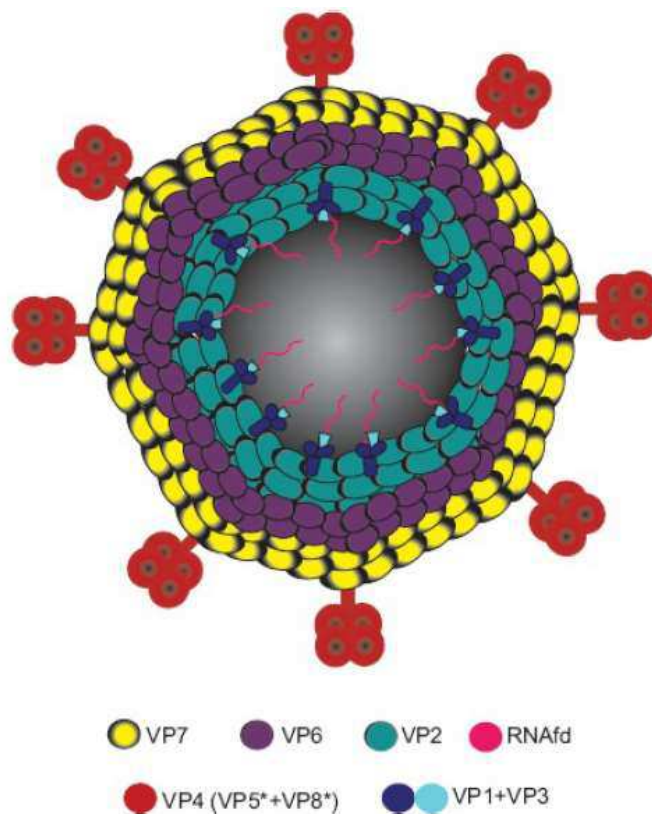


Figura 4: Esquema da partícula do rotavírus. A partícula é formada por 3 camadas de proteínas (VP2, VP6 e VP7, mostradas em verde, roxo e amarelo, respectivamente) e espículas da proteína VP4 (vermelho), que atravessam as camadas de VP6 e VP7 e se estendem para fora da partícula. As proteínas VP1 (azul-escuro) e VP3 (azul-claro) formam complexo da polimerase e ficam localizadas abaixo da camada de VP2 (SANTOS *et al.*, 2015).

A análise dos diferentes perfis de migração eletroforética juntamente com a análise antigênica da proteína VP6 permitiram classificar o RV em 7 grupos, que foram denominados de A a G. Os grupos A, B e C são responsáveis por causar infecção em humanos e animais, enquanto que os grupos de D a G foram identificados exclusivamente em animais. O RVA é responsável por mais de 90% das infecções em humanos (ICHIHARA *et al.*, 2014).

As proteínas VP4 e VP7 estão envolvidas na neutralização do vírus e na imunidade protetora à medida que provocam a produção de anticorpos de neutralização no hospedeiro. Os sorotipos G ou P são determinados pela reatividade do vírus em ensaios de neutralização com base nas proteínas do capsídeo: a VP4 (sensível a protease) e a VP7 (glicoproteína), respectivamente. Os genótipos P ou G são determinados por sequenciamento, amplificação ou hibridização dos genes 4 ou 9 que codificam as proteínas VP4 ou VP7 (KAPIKIAN & CHANOCK, 1996). RVA tem uma grande diversidade genética devido a quase 60 sorotipos (G e P) e as cepas mais comuns são: G1P[8], G2P[4], G3P[8], G4P[8] e G9P[8] (ESONA *et al.*, 2004; ICHIHARA *et al.*, 2014).

Os rotavírus dos genótipos G e P encontrados em diferentes espécies de animais foram estudados a fim de projetar vacinas eficazes e avaliar a infectividade cruzada das espécies de rotavírus. Mais comumente os rotavírus humanos pertencem ao genótipo/sorotipo G (1 ao 4), enquanto os rotavírus bovinos mais comumente pertencem ao genótipo/sorotipo G (6, 8 e 10) e aos genótipos P ([1], [5] ou [11]). À medida que os rotavírus foram caracterizados em diversos locais em todo o mundo, a especificidade das espécies hospedeiras dos genótipos P e G tornou-se menos distinta. Os rotavírus pertencentes aos genótipos G (subtipos 6, 8 e 10), uma vez considerado como específico para o gado, já foram encontrados em seres humanos (EL-ATTAR *et al.*, 2002).

A grande quantidade de partículas virais eliminadas nas fezes dos indivíduos infectados (até 10^{12} partículas virais/g) e a resistência das partículas aos diversos fatores do meio ambiente facilitam a contaminação ambiental e o ciclo de infecção. Além da resistência da partícula viral, aspectos ligados ao ambiente, manejo, nutrição e estado imune dos animais são considerados como fatores de risco para a propagação do rotavírus (REYNOLDS *et al.*, 1986).

2.2.2 Norovírus (NoV)

O norovírus (NoV) é o principal causador de surtos de gastroenterite aguda de origem não bacteriana em todo o mundo, sendo responsável por mais de 95% dos casos nos Estados Unidos e Europa. Este patógeno está geralmente envolvido em surtos de origem alimentar (Figura 5) (ASANAKA et al., 2005; RABONI et al., 2014). No período dos meses de junho e julho de 2006, ocorreu o primeiro surto no estado da Bahia, Brasil, onde o NoV foi identificado como o principal agente etiológico em adultos jovens hospitalizados com sintomas de gastroenterite aguda (CAMPOS *et al.*, 2008).

O NoV, membro da família *Caliciviridae*, é um vírus não-envelopado que apresenta um nucleocapsídeo arredondado com simetria icosaédrica, mede aproximadamente 27 a 35 nm de diâmetro e seu ácido nucleico é uma fita simples de RNA de polaridade positiva com tamanho de 7,5 a 7,7kb (Figura 6). O seu genoma possui três regiões: a primeira codifica uma grande poliproteína que, após a tradução, é clivada em proteínas não estruturais, enquanto a segunda e a terceira codificam proteínas do capsídeo viral. Devido a diferenças nas sequências gênicas da RNA polimerase, e de proteínas do capsídeo, o NoV é dividido em cinco genogrupos. Os genogrupos I e II contêm a maioria das cepas que infectam os humanos. O NoV permanece estável no ambiente por longos períodos e a carga viral necessária para causar infecção é baixa, o que facilita o aparecimento dos surtos (CASTILHO *et al.*, 2006; FIORETTI *et al.*, 2011; LEE *et al.*, 2013).

O NoV é principalmente transmitido pela ingestão de alimentos e água contaminados com fezes. No entanto, a infecção também pode ocorrer através de contato pessoa-pessoa, fômites ou por aerossóis produzidos durante o vômito. A higiene correta das mãos e dos alimentos é a forma mais importante para prevenir a infecção por NoV. O saneamento básico adequado também contribui para reduzir as rotas de disseminação desses vírus no meio ambiente. (FIORETTI *et al.*, 2011).

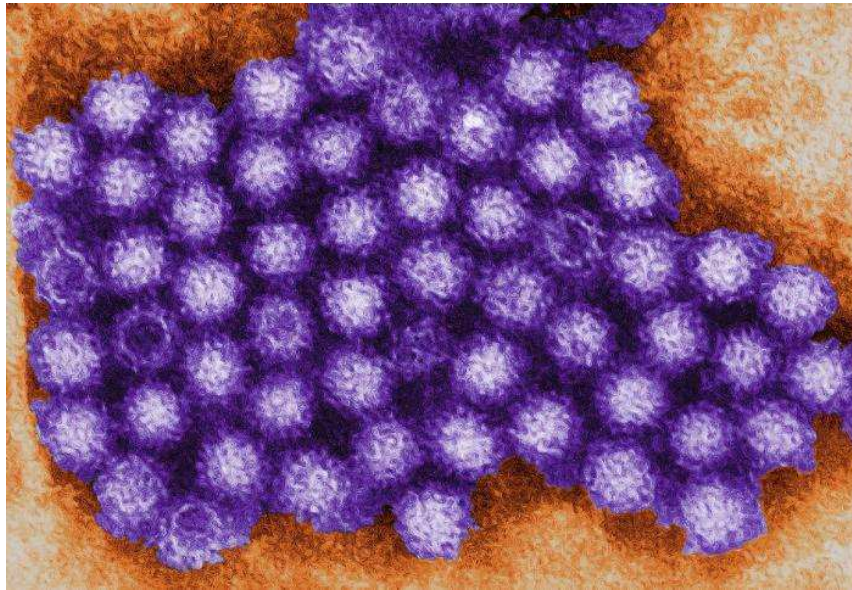


Figura 5: Microscopia eletrônica do NoV. Fonte: <http://www.cdc.gov/norovirus>. Acessado em 05/09/2017.

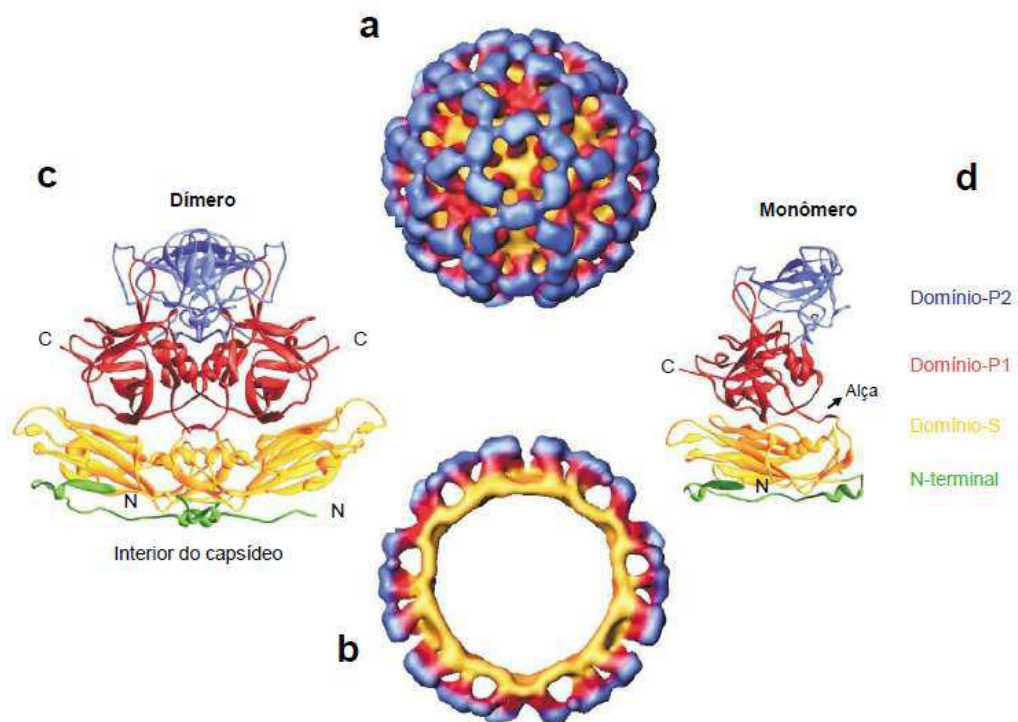


Figura 6: Representações da estrutura do capsídeo viral do NoV. (A) Superfície; (B) corte transversal; (C) dímero da proteína do capsídeo. Noventa dímeros formam toda a proteína da cápside; (D) cada proteína monomérica da cápside é organizada em domínios e subdomínios (adaptada de SCIPIONE *et al.*, 2008).

As infecções por NoV são caracterizadas por diarreia e vômito. Essas manifestações podem estar acompanhadas por náusea, câimbras abdominais, cefaléia, febre e mialgia. A gastroenterite viral aguda causada pelo NoV é autolimitada e seus sintomas aparecem de 20 a 50 horas após o consumo de água e/ou alimentos contaminados, durando cerca de 1 a 8 dias e afetando indivíduos de todas as faixas etárias. Dados epidemiológicos demonstraram uma predominância desta infecção durante o inverno (KAPIKIAN *et al.*, 1996; APPLETON, 2000; BORCHARDT *et al.*, 2003).

Geralmente, a gastroenterite viral provocada por NoV se apresenta de forma mais grave nos idosos, nos indivíduos imunocomprometidos e nas crianças. Em países industrializados, o NoV destaca-se como o segundo agente viral mais comum de gastroenterite em crianças menores de cinco anos de idade, perdendo o primeiro lugar para o rotavírus (DONALDSON *et al.*, 2008).

As partículas virais de NoV mantêm a infectividade em pH 2,7 por até três horas em temperatura ambiente e é ácido-resistente, com a capacidade de sobreviver à ação do suco gástrico. A viabilidade também é verificada após o tratamento com éter 20%, a 4°C durante 18 horas, ou ainda à incubação a 60°C por 30 minutos. Os NoVs são resistentes à inativação após tratamento com 3,75 a 6,25 mg/L de cloro (o cloro residual livre usualmente encontrado na água distribuída pelo sistema de abastecimento é de 0,5 a 1,0mg/L), facilitando sua transmissão através da água para consumo, das águas recreacionais, do gelo produzido para distribuição comercial e de alimentos como ostras cozidas e cruas (CANNON *et al.*, 1991; GREEN, 2007). Os moluscos são altamente apreciados na culinária de alguns países e podem ser contaminados com patógenos humanos quando cultivados em águas contaminadas por esgotos, podendo provocar gastroenterites quando consumidos crus ou malcozidos (WESTRELL *et al.*, 2010).

A baixa carga viral necessária para ser estabelecida a infecção, a eliminação prolongada de partículas nas fezes, a estabilidade no ambiente e sua capacidade de resistir aos tratamentos por cloração e à grande variação de temperatura (0 a 60°C), a grande diversidade genética e a baixa imunidade contribuem para a propagação do NoV e explicam a disseminação rápida e extensa de surtos de gastroenterite em ambientes de uso coletivo ou de confinamento, tais como: hospitais, escolas, restaurantes, clínicas geriátricas, penitenciárias, cruzeiros e estabelecimentos militares, afetando indivíduos de todas as faixas etárias (ROCKX *et al.*, 2002; VIEIRA *et al.*, 2012; BERT *et al.*, 2014).

Ainda não foram desenvolvidas vacinas e/ou medicações específicas para combater as infecções causadas pelos NoV. Além disso, alguns aspectos sobre a biologia destes vírus ainda

não estão totalmente elucidados. A principal razão é que, até o momento, os HNoVs não foram isolados em cultura celular e por este motivo não é possível determinar sua sorotipagem direta utilizando anticorpos neutralizantes. A transcrição reversa seguida da reação em cadeia pela polimerase (RT-PCR) e o sequenciamento genômico têm demonstrado que esses vírus são genética e antigenicamente diversos. A RT-PCR tem se mostrado o método mais sensível e específico para a detecção de NoV, além de ser de rápida execução (ZHENG *et al.*, 2006).

2.2.3 Vírus da Hepatite A (HAV)

O HAV pertence à família *Picornaviridae* e é o único representante do gênero *Hepatovirus*. O vírion não é envelopado, mede aproximadamente 27 a 32 nm de diâmetro e morfologicamente é indistinguível de outros picornavírus (Figura 7). O genoma viral consiste em uma molécula de RNA de fita simples de polaridade positiva 7,5 kb de tamanho e uma única sequência de leitura aberta (ORF, *open reading frame*) que codifica para todas as proteínas virais (SANTOS *et al.*, 2015).

O RNA genômico está associado covalentemente à proteína VPg na extremidade 5' não codificante, a qual possui papel importante na iniciação da transcrição viral (forma o sítio de entrada do ribossoma) (PEREIRA & GONÇALVES, 2003). Esse genoma é dividido em três regiões: uma região 5' não codificadora; uma longa ORF codificadora de 11 proteínas, algumas estruturais (VP1, VP2, VP3, VP4, 2A, 3B) e outras não estruturais (2B, 2C, 3A, 3C, 3D), e uma região 3' não codificadora (TAVARES *et al.*, 2005).

As proteínas estruturais principais são a VP1, a VP2, a VP3 e a VP4, as quais são originadas da proteína primária por clivagem pela protease 3C, codificada na região P3, que também codifica a proteína VPg associada ao RNA (PEREIRA & GONÇALVES, 2003).

A replicação do HAV *in vivo* ocorre em sua maioria nos hepatócitos e nas células epiteliais do trato gastrointestinal e *in vitro* em outros tipos de células não hepáticas (CUTHBERT, 2001). O HAV é um vírus com genoma bastante conservado, sendo que as suas diferentes cepas correspondem a um único sorotipo e estão classificadas em sete genótipos, com base em análises filogenéticas das sequências dos nucleotídeos da região VP1/2A. A maioria das cepas que causam infecção em humanos pertence aos genótipos I, II, III e VII (ROBERTSON *et al.*, 1992; YILMAZ *et al.*, 2017).

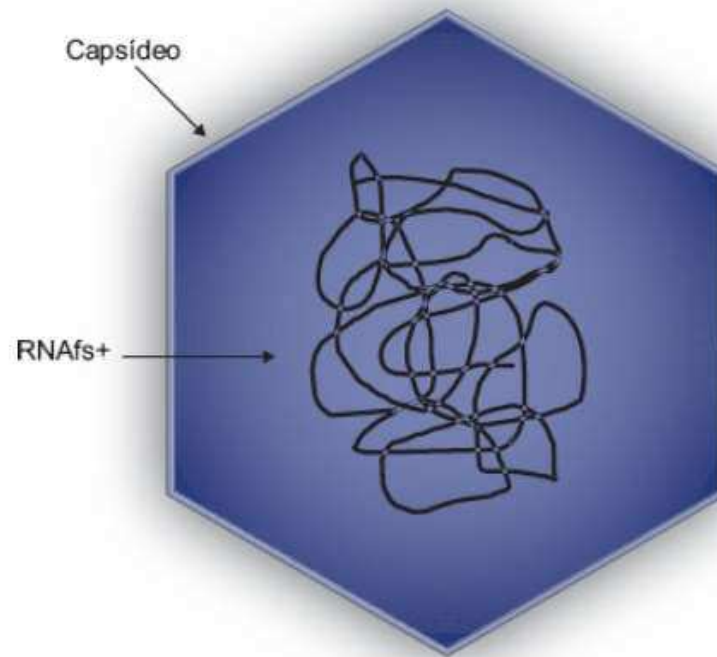


Figura 7: Esquema da partícula do HAV. O vírion possui capsídeo de simetria icosaédrica com diâmetro de 27 a 32 nm e não possui envelope (SANTOS *et al.*, 2015).

A infecção pelo vírus da hepatite A (HAV) causa uma doença altamente contagiosa que pode levar a uma grave morbidade e mortalidade ocasional. Clinicamente, a infecção pelo HAV não pode ser distinguida de outras formas de hepatite viral (KOENIG *et al.*, 2017). O HAV é transmitido principalmente pela via fecal-oral, pelo contato pessoa-pessoa ou pela ingestão de água e alimentos contaminados. Ao chegar no trato gastrintestinal, o HAV passa para corrente sanguínea e através do sistema porta-hepático propaga-se para infectar as células parenquimais do fígado. O vírus replica-se nos hepatócitos e nas células de Kupfer, é excretado na bile e eliminado pelas fezes, podendo apresentar-se como hepatite icterícia ou anictérica, ou desenvolver-se de forma inaparente ou subclínica, o que acontece em 80% dos casos (TAVARES *et al.*, 2005). Os sintomas da infecção por HAV, nos pacientes adultos, se caracterizam por febre, náuseas, desconforto abdominal e icterícia. Todavia, em pacientes infantis, a infecção por HAV costuma ser assintomática (PINTO *et al.*, 2010).

Grandes quantidades do HAV são eliminadas nas fezes dos indivíduos infectados (até 10^{11} partículas virais/g). Condições precárias de higiene e saneamento facilitam a transmissão do HAV devido à sua alta resistência em ambiente aquático e estão frequentemente associadas à ocorrência de surtos (VIEIRA *et al.*, 2012).

O HAV é resistente ao tratamento com uso de cloração e não é encontrado na forma inativada em águas consideradas potáveis que apresentam níveis de cloreto livre variando de 0,5 a 1,5 mg/L. Porém, o HAV é inativado após tratamento com cloro em concentração de 5mg/L durante um minuto e tem sua infectividade reduzida após exposição a hipoclorito de sódio, glutaraldeído a 2% e compostos amônios quartenários (APPLETON, 2000; TAVARES *et al.*, 2005).

A distribuição mundial da ocorrência de infecções por HAV está diretamente relacionada com as condições sanitárias e socioeconômicas das populações (VILLAR *et al.*, 2006). Entre os anos de 2003 e 2007, no Brasil, a taxa de incidência de hepatite A era superior às das demais etiologias (B, C e D); entretanto, após 2007, apresentou uma importante queda, atingindo 0,6/100 mil habitantes em 2016 (Figura 8). Os casos de hepatite A concentram-se, em sua maioria, nas regiões Nordeste e Norte do país, que representam juntas 56,6% de todos os casos confirmados no período de 1999 a 2016 (Figura 9) (BRASIL, 2017).

No ano de 2016, foram notificados 58 casos confirmados de Hepatite A no estado da Bahia, representando uma taxa de 0,4/100 mil habitantes. Nesse mesmo ano, foram notificados 12 casos confirmados de Hepatite A na cidade de Salvador (BRASIL, 2017).

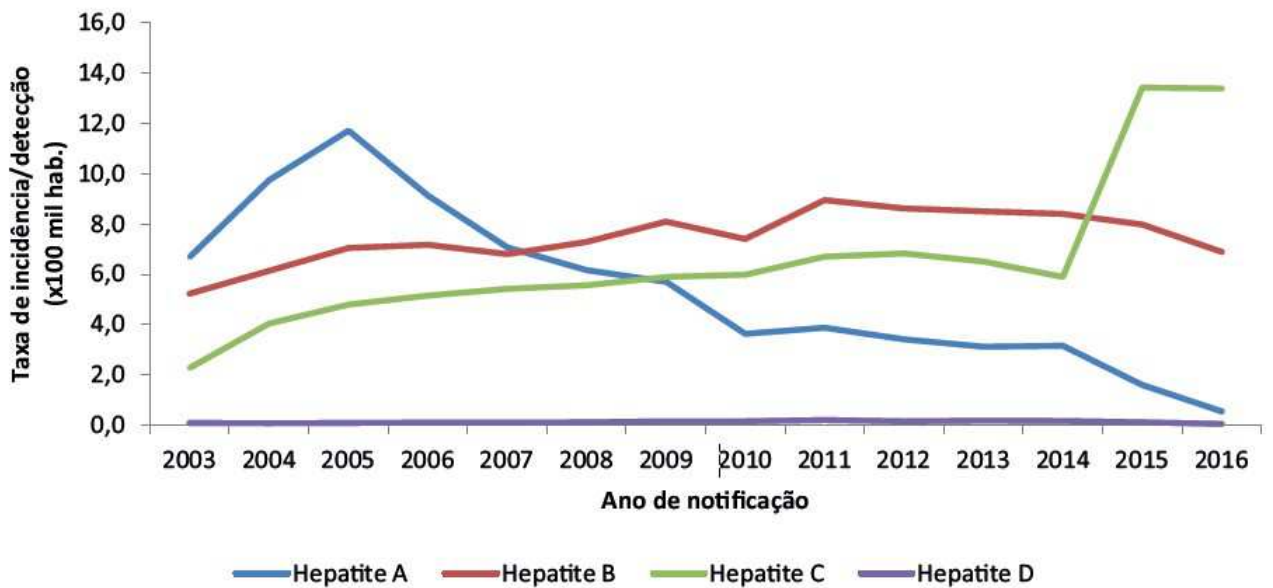


Figura 8: Taxa de incidência/detecção de hepatites virais segundo agente etiológico e ano de notificação. Brasil, 2003 a 2016. (BRASIL, 2017).

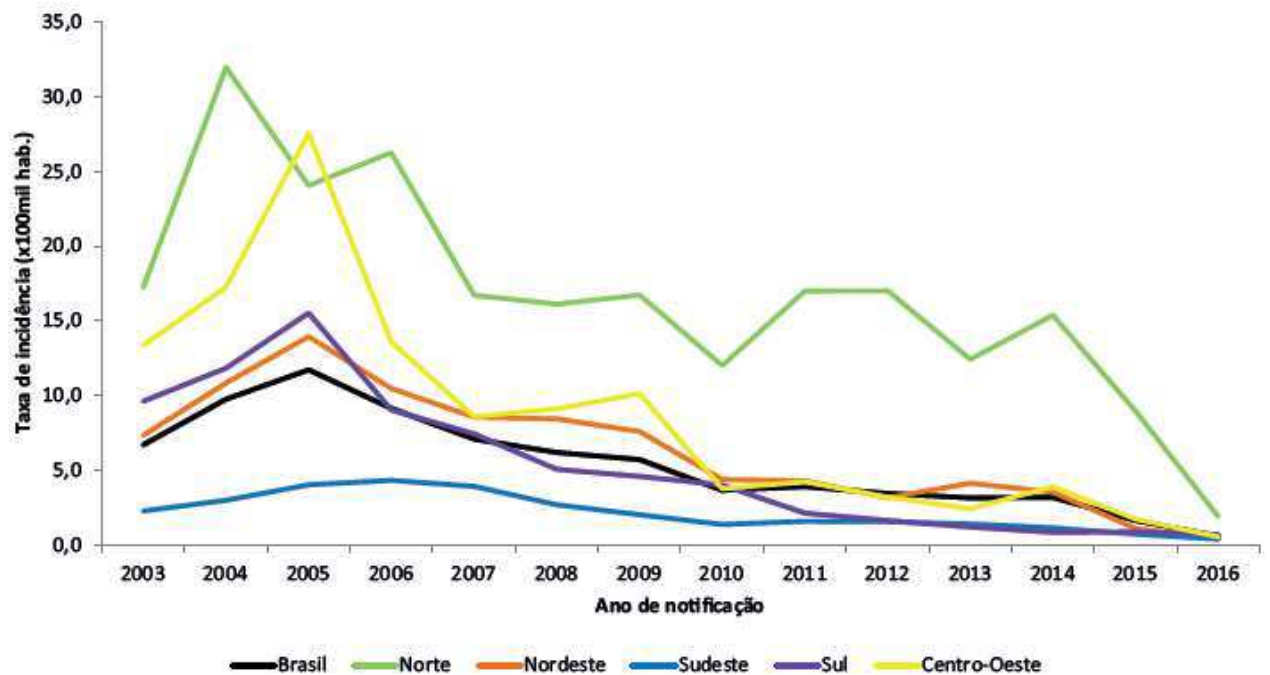


Figura 9: Taxa de incidência de casos de hepatite A segundo região de residência e ano de notificação. Brasil, 2003 a 2016. (BRASIL, 2017).

A primeira vacina contra hepatite A foi comercializada em 1992. Desde então várias vacinas de vírus inteiros inativados foram comercializadas. Vírus adaptados em cultura de células (atenuados) são produzidos por crescimento em fibroblastos humanos, purificados e inativados por formalina (BRASIL, 2012). No ano de 2014, o Ministério da Saúde introduziu no calendário nacional de vacinação a imunização contra a Hepatite A, a qual passou a ser ofertada para crianças a partir de 12 meses até menores de 2 anos (1 ano, 11 meses e 29 dias). A vacina de hepatite A purificada é uma vacina injetável, de vírus inteiro e inativado (BRASIL, 2014b).

O principal aspecto epidemiológico resultante da diminuição da prevalência do HAV é o aumento do número de indivíduos de idade avançada suscetíveis à infecção. Como resultado, observa-se um aumento na frequência de casos mais graves da infecção aguda por HAV, além da possibilidade da ocorrência de surtos da doença (CUTHBERT, 2001; VIEIRA *et al.*, 2012).

2.3 METODOLOGIAS PARA DETECÇÃO DE VÍRUS NA ÁGUA

2.3.1 Concentração de Partículas Virais Presentes na Água

A investigação da contaminação por vírus em águas ambientais é um processo complexo, pois esses agentes encontram dispersos em grandes volumes de água e adsorvidos a biossólidos. Um dos pontos principais na detecção de vírus no ambiente aquático se refere ao volume da amostra a ser analisada. Um eficiente método de concentração deve apresentar os seguintes critérios: ser uma técnica simples, possuir alta taxa de recuperação de partículas virais, produzir um concentrado de pequeno volume e não ser muito caro (BOSCH *et al.*, 2008).

Diversas técnicas de concentração de partículas virais têm sido utilizadas como etapa preliminar das análises da presença de vírus entéricos em amostras de água. Esses procedimentos de concentração podem apresentar eficiências similares ou significativamente diferentes a depender de variáveis como o tipo de amostra de água (água de rios, água do mar, água de esgoto, água de torneira, água engarrafada, etc.), o tipo de vírus que pretende ser encontrado, a quantidade de vírus presente nesta amostra e a técnica de biologia molecular utilizada para detecção do vírus (RT-PCR, PCR, Nested-PCR, RT-qPCR ou qPCR) (HARAMOTO *et al.*, 2018).

A carga elétrica dos vírus se altera em função do pH, composição e força iônica da solução a ser usada na eluição. A escolha de um método de concentração de partículas mais adequado ao tipo de vírus a ser investigado é crucial para a posterior fase de detecção viral por técnicas de biologia molecular, sendo que alguns métodos apresentam um limite de sensibilidade de detecção diferente de acordo com a origem e a composição da amostra (SILVA *et al.*, 2011).

Dentre alguns dos procedimentos empregados para a concentração de vírus em amostras de água provenientes do ambiente aquático, estão aqueles que são baseados em troca iônica (filtração em membranas carregadas positiva e/ou negativamente), métodos químicos (precipitação, floculação orgânica, polietilenoglicol), métodos físicos (ultracentrifugação, ultrafiltração) e métodos de imunoafinidade (BOSCH *et al.*, 2008).

Steyer *et al.* (2015) realizaram a detecção de vírus entéricos em águas residuais provenientes de plantas de tratamento de esgoto, onde a concentração de partículas virais das amostras de água utilizou a fase estacionária de uma coluna cromatográfica monolítica de metacrilato. Kunze *et al.* (2015) desenvolveram uma técnica de alta performance para concentração de partículas virais em amostras de água potável através da combinação de métodos de ultrafiltração, ultracentrifugação e filtração monolítica em etapas distintas.

Apesar dos vírus serem concentrados por diferentes metodologias com sucesso, os rotavírus são mais sensíveis às variações de pH durante o processamento das amostras e a outros compostos químicos que possam estar presentes na água, o que dificulta a recuperação dessas partículas virais (TAVARES *et al.*, 2005).

Em 2008, pesquisadores descreveram um novo procedimento para a concentração de adenovírus a partir de amostras de água do mar. A técnica envolvia a adsorção das partículas virais às proteínas de leite desnatado presentes numa formulação que era adicionada às amostras de água, permitindo que os flocos sedimentassem por gravidade e, após centrifugação, fossem dissolvidos em tampão fosfato. As partículas virais concentradas podiam ser detectadas por técnicas de PCR convencional após extração de ácidos nucleicos. A utilidade do método foi demonstrada durante uma pesquisa de detecção de adenovírus em amostras de água do mar obtidas no litoral da região metropolitana de Barcelona. Todavia, o leite em pó desnatado possui outras moléculas além da caseína (proteínas do soro como a lactoglobulina, lactose e lipídios residuais) que não são interessantes ao processo de floculação orgânica, podendo diminuir a eficiência da técnica (CALGUA *et al.*, 2008).

Em 2013, foi desenvolvido um método para a concentração de partículas virais em amostras de água de esgoto para detecção de vírus por PCR convencional quantitativo. Nessa nova técnica, a amostra é diluída em uma solução tampão de glicina (0,25N) sob rápida agitação e posteriormente sofre centrifugação. O sobrenadante é coletado e processado conforme o método de floculação utilizando leite em pó desnatado citado anteriormente. Esse procedimento foi executado paralelamente com os métodos de ultrafiltração, liofilização e ultracentrifugação, para que uma comparação pudesse ser realizada. Os resultados demonstraram que o método proposto possui sensibilidade semelhante aos demais, além de ser menos dispendioso e de execução relativamente simples. Ainda assim, além de uma etapa adicional utilizando uma solução tampão de glicina como tratamento prévio à floculação orgânica, o método ainda utiliza o leite desnatado como principal agente de adsorção das partículas virais (CALGUA *et al.*, 2013b).

A utilização de métodos de concentração de partículas virais por meio de floculação orgânica com leite em pó desnatado (ou outras substâncias similares), aplicados na detecção de vírus em amostras de águas ambientais por técnicas de biologia molecular, ainda é preterida comparando-se à preferência pelos métodos mais sensíveis e sofisticados, como a ultrafiltração e a ultracentrifugação (CALGUA *et al.*, 2008, CALGUA *et al.*, 2013b).

2.3.2 Detecção dos Vírus Entéricos na Água

Com a expansão do uso de técnicas de biologia molecular, a partir da década de 1990, como a transcrição reversa seguida da reação em cadeia pela polimerase (RT-PCR), ocorreu novos avanços na detecção de vírus entéricos presentes na água. Comparada com a utilização de cultura de células para a detecção de vírus, a RT-PCR possui as vantagens do tempo de execução ser mais reduzido e de dispender menores custos. No entanto, uma desvantagem é a suscetibilidade do ensaio aos inibidores (cátions, ácidos, metais, etc.) comumente encontrados em ambientes aquáticos. Além disso, a RT-PCR convencional não permite a distinção entre partículas virais viáveis de partículas não infecciosas nas amostras analisadas (FONG & LIPP, 2005; TAVARES *et al.*, 2005).

Outras variações da técnica de PCR qualitativa têm sido empregadas para detectar vírus em análises de amostras de água. A reação de nested-PCR (utilização de um segundo par de iniciadores flanqueando uma região previamente amplificada pela primeira PCR) é uma das

mais utilizadas para detecção de vírus entéricos em amostras ambientais, aumentando a sensibilidade da reação por introduzir uma etapa extra de amplificação gênica, permitindo a detecção de um menor número de partículas virais nas amostras (PUIG *et al.*, 1994; RIGOTTO *et al.*, 2005; TAVARES *et al.*, 2005; SILVA *et al.*, 2011).

Os métodos de quantificação de viral, tal como PCR quantitativo ou em tempo real, têm sido cada vez mais utilizados. É uma variação da PCR pela utilização de compostos fluorescentes (fluoróforos) que, simultaneamente amplifica, quantifica e analisa a expressão gênica. Esta técnica possui alta sensibilidade para a detecção rápida e quantificação precisa de microrganismos patogênicos em amostras clínicas e ambientais (BROOKS *et al.*, 2005; ALBINANA-GIMENEZ *et al.*, 2009a; TAVARES *et al.*, 2005; SILVA *et al.*, 2011).

REFERÊNCIAS

ALBINANA-GIMENEZ, N.; MIAGOSTOVICH, M. P.; CALGUA, B.; HUGUET, J. M.; MATIAC, L.; GIRONES, R. Analysis of adenoviruses and polyomaviruses quantified by qPCR as indicators of water quality in source and drinking-water treatment plants. **Water Research**, 43, p. 2011-2019, 2009a.

ALBINANA-GIMENEZ, N.; CLEMENTE-CASARES, P.; CALGUA, B.; HUGUET, J. M.; COURTOIS, S.; GIRONES, R. Comparison of methods for concentrating human adenoviruses, polyomavirus JC and noroviruses in source waters and drinking water using quantitative PCR. **Journal of Virological Methods**, 158, p. 104-109, 2009b.

ALIDJINOU, E. K.; SANE, F.; FIRQUET, S.; LOBERT, P. E.; HOBER, D. Resistance of Enteric Viruses on Fomites. **Intervirology**, 2017. doi: 10.1159/000448807

APPLETON, H. Control of food-borne viruses. **Br Med Bull**, v.56, n.1, p.172-183, 2000.

ASANAKA, M.; ATMAR, R. L.; RUVOLO, V.; CRAWFORD, S. E.; NEILL, F. H.; ESTES, M. K. Replication and packing of Norwalk vírus RNA in cultured mammalian cells. **Proce Nat Acad Sciences**, 102, p. 10327-10332, 2005.

BERGAMASCHI, B.; RODRIGUES, M. T.; SILVA, J. V. S.; KLUGE, M.; LUZ, R. B.; FLECK, J. D.; BIANCHI, E.; SILVA, L. B.; SPILKI, F. R. Moving beyond classical markers of water quality: detection of enteric viruses and genotoxicity in water of the Sinos River. **Braz. J. Biol.**, 75(2), p. 63-67, 2015.

BERT, F.; SCAIOLI, G.; GUALANO, M. R.; PASSI, S.; SPECCHIA, M. L.; CADEDDU, C.; VIGLIANCHINO, C.; SILIQUINI, R. Norovirus outbreaks on commercial cruise ships: a systematic review and new targets for the public health agenda. **Food Environ. Virol.**, 6(2), p. 67-74, 2014.

BORGES, C. R. **Aplicação de métodos moleculares e de cultivo celular no monitoramento de vírus entéricos no ambiente aquático**. 2009. 125 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia). Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, UFSC, Florianópolis, SC, 2009.

BOSCH, A.; GUIX, S.; SANO, D.; PINTO, R. M. New tools for the study and direct surveillance of viral pathogens in water. **Current Opinion in Biotechnology**, v.19, p. 295-301, 2008.

BORCHARDT, M. A.; BERTZ, P. D.; SPENCER, S. K.; BATTIGELLI, D. A. Incidence of enteric viruses in groundwater from household wells in Wisconsin. **Appl Environ Microbiol**, v.69, n.2, p.1172-1180, 2003.

BRASIL. Ministério da Saúde. Informe Técnico: Doença Diarréica por Rotavírus: Vigilância Epidemiológica e Prevenção pela Vacina Oral de Rotavírus Humano - VORH . Brasília, 01 de março de 2006.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Capacitação em monitorização das doenças diarreicas agudas – MDDA: manual do treinando**. Brasília: Editora Ministério da Saúde, 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Vacina de Hepatite A**. Brasília: Editora Ministério da Saúde, 2012.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Saúde Brasil 2013: uma análise da situação de saúde e das doenças transmissíveis relacionadas à pobreza**. Brasília: Ministério da Saúde, 2014a.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Coordenação Geral do Programa Nacional de Imunizações. **Informe técnico da introdução da vacina adsorvida hepatite A (inativada)**. Brasília: Ministério da Saúde, 2014b.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. **Sustentabilidade urbana: impactos do desenvolvimento econômico e suas conseqüências sobre o processo de urbanização em países emergentes: textos para as discussões da Rio+20: volume 3 - habitação social e sustentabilidade** / Tarcisio Nunes..., [et al]. Brasília: MMA, 2015.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde – Departamento de Vigilância, Prevenção e Controle das IST, do HIV/Aids e das Hepatites Virais (DIAHV). **Boletim Epidemiológico, volume 48, N° 24**. Brasília: Editora Ministério da Saúde, 2017.

BROOKS, H. A.; GERSBERG, R. M; DHAR, A. K. Detection and quantification of hepatitis A virus in seawater via real-time RT-PCR. **J. Virological. Methods.**, 127, p. 109-118, 2005.

CALGUA, B.; MENGEWEIN, A.; GRUNERT, A.; BOFILL-MAS, S.; CLEMENTE-CESARES, P.; HUNDES, A.; WYN-JONES, A. P.; LÓPEZ-PILA, J. M.; GIRONES, R. Development and application of a one-step low cost procedure to concentrate viruses from seawater samples. **Journal of Virological Methods**, 153, p. 79-83, 2008.

CALGUA, B.; FUMIAN, T.; RUSIÑOL, M.; RODRIGUEZ-MANZANO, J.; MBAYED, V. A.; BOFILL-MAS, S.; MIAGOSTOVICH, M.; GIRONES, R. Detection and quantification of

classic and emerging viroses by skimmed-milk flocculation and PCR in river water from two geographical areas. **Water Research**, 47, p. 2797-2810, 2013a.

CALGUA, B.; RODRIGUEZ-MANZANO, J.; HUNDESA, A.; SUÑEN, E.; CALVO, M.; BOFILL-MAS, S.; GIRONES, R. New methods for the concentration of viruses from urban sewage using quantitative PCR. **Journal of Virological Methods**, 187, p 215–221, 2013b.

CAMPOS, G. S.; MOREAU, V. H.; BANDEIRA, A.; BARBERINO, G.; ALMEIDA, P. F.; AMADOR, D. M.; LIMA, M. O.; SARDI, S. I. Molecular detection and genetic diversity of norovirus in hospitalized young adults with acute gastroenteritis in Bahia, **Brazil. Arch Virol**, 153, p. 1125–1129, 2008.

CANNON, R. O.; POLINER, J. R.; HIRSCHHORN, R. B.; RODEHEAVER, D. C.; SILVERMAN, P. R.; BROWN, E. A.; TALBOT, G. H.; STINE, S. E.; MONROE, S. S.; DENNIS, D. T.; GLASS, R. I. A multistate outbreak of Norwalk virus gastroenteritis associated with consumption of commercial ice. **The Journal of Infectious Diseases**, v.164, n.5, p.860-863, 1991.

CASTILHO, J. G.; MUNFORD, V.; RESQUE, H. R.; FAGUNDES-NETO, U.; VINJÉ, J.; RÁCZ, M. L. Genetic diversity of Norovirus among children with gastroenteritis in São Paulo state, Brazil. **Journal of Clinical Microbiology**, v.44, n.11, p. 3947-3953, 2006.

CHANDRAN, A.; FITZWATER, S.; ZHEN, A.; SANTOSHAM, M. Prevention of rotavirus gastroenteritis in infants and children: rotavirus vaccine safety, efficacy, and potential impact of vaccines. **Biologics: Targets & Therapy**, 4, p. 213-229, 2010.

CHIGOR, V. N.; OKOH, A. I. Quantitative RT-PCR Detection of Hepatitis A Virus, Rotaviruses and Enteroviruses in the Buffalo River and Source Water Dams in the Eastern Cape Province of South Africa. **Int. J. Environ. Res. Public Health**, 9, p. 4017-4032. 2012.

CUTHBERT, J. A. Hepatitis A: old and new. **Clinical Microbiology Reviews**, v.14, p. 38-58, 2001.

DA PAZ, M. G. A.; ALMEIDA, M. F.; GUNTHER, W. M. R. Diarrhea in children and sanitation and housing conditions in periurban areas in the city of Guarulhos, SP. **Rev Bras Epidemiol**, 15, P. 188-197, 2012.

DONALDSON, E. F.; LINDESMITH, L. C.; LOBUE, A. D.; BARIC, R. S. Norovirus pathogenesis: mechanisms of persistence and immune evasion in human populations. **Immunological Reviews**, 225, p. 190-211, 2008.

EL-ATTAR, L.; DHALIWAL, W.; ITURRIZA-GÓMARA, M.; BRIDGER, J. C. Identification and Molecular Characterization of a Bovine G3 Rotavirus Which Causes Age-Independent Diarrhea in Cattle. **Journal of Clinical Microbiology**, v.40, n.3, p. 937-942, 2002.

ESONA, M. D.; ARMAH, G. E.; ANNELESE GEYER, A.; STEELE, A. D. Detection of an Unusual Human Rotavirus Strain with G5P[8] Specificity in a Cameroonian Child with Diarrhea. **Journal of Clinical Microbiology**, v.42, n.1, p. 441-444, 2004.

FIORETTI, J. M.; FERREIRA, M. S. R.; VICTORIA, M.; VIEIRA, C. B.; XAVIER, M. P. T. P.; LEITE, J. P. G.; MARIZE PEREIRA MIAGOSTOVICH, M. P. Genetic diversity of noroviruses in Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v.106, n.8, p. 942-947, 2011.

FONG, T. T.; LIPP, E. K. Enteric Viruses of Humans and Animals in Aquatic Environments: Health Risks, Detection, and Potential Water Quality Assessment Tools. **Microbiology and molecular biology reviews**, v.69, p. 357-371, 2005.

FONGARO, G.; SILVA, H. D.; ELMAHDY, E. M.; MAGRI, M. E.; SCHISSI, C. D.; MOREIRA, M.; LANNA, M. C. S.; SILVEIRA-LACERDA, E. P.; BARARDI, C. R. M. Enteric Viruses As Contaminants And Bioindicators In Environmental Samples. **Virus Reviews & Research**, v.20, n.2, p. 1-12, 2015.

FREITAS, P. P. S.; UYEMURA, S. A.; SILVA, D. G.; SAMARA, S. I.; BUZINARO, M. G. Rotavírus bovino: fatores de risco, prevalência e caracterização antigênica de amostras em rebanhos leiteiros no estado de São Paulo. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.63, n.4, p. 820-827, 2011.

GERBA, C. P.; BETANCOURT, W. Q.; KITAJIMA, M. How much reduction of virus is needed for recycled water: a continuous changing need for assessment? **Water Research**, 108 (1), p. 25-31, 2017.

GOUVEA, V.; GLASS, R. I.; WOODS, P. KOKI TANIGUCHI, K.; CLARK, H. F.; FORRESTER, B.; FANG, Z. Polymerase chain reaction amplification and typing of rotavirus nucleic acid from stool specimens. **Journal of Clinical Microbiology**, v.28, p. 276-282, 1990.

GREEN, K. Y. *Caliciviridae: The Noroviruses*. In: KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M. **Fields Virology**, ed.5, Lippincott Williams & Wilkins, p.949-980, 2007.

GRIFFIN, D.W.; DONALDSON, K.A.; PAUL, J.H.; ROSE, J.B. Pathogenic human viruses in coastal waters. **Clinical Microbiology Reviews**, v.16, p. 129-143, 2003.

GRIFFIN, J. S.; PLUMMER, J. D.; LONG, S. C. Torque teno virus: an improved indicator for viral pathogens in drinking waters. **Journal Virology**, v. 5, p. 112, 2008.

HAMZA, I. A.; LARS 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, p. 2657-2668, 2009.

HAMZA, I. A.; JURZIK, L.; ÜBERLA, K.; WILHELM, M. Methods to detect infectious human enteric viruses in environmental water samples. **International Journal of Hygiene and Environmental Health**, 214, p. 424-436, 2011.

HARAMOTO, E.; KITAJIMA, M.; HATA, A.; TORREY, J. R.; MASAGO, Y.; SANO, D.; KATAYAMA, H. A review on recent progress in the detection methods and prevalence of human enteric viruses in water. *Water Research*, v.135, p. 168-186, 2018.

HELLMÉR, M.; PAXÉUS, N.; MAGNIUS, L.; ENACHE, L.; ARNHOLM, B.; JOHANSSON, A.; BERGSTRÖM, T.; NORDER, H. Detection of Pathogenic Viruses in Sewage Provided Early Warnings of Hepatitis A Virus and Norovirus Outbreaks. **Applied and Environmental Microbiology**, v.80, n.21, p. 6771-6781, 2014.

IANIRO, G.; DELOGU, R.; BONOMO, P.; CASTIGLIA, P.; RUGGERI, F. M.; FIORE, L. Molecular characterization of human G8P[4] rotavirus strains in Italy: Proposal of a more complete subclassification of the G8 genotype in three major lineages. **Infection, Genetics and Evolution**, 21, p. 129-133, 2014.

ICHIHARA, M. Y. T.; RODRIGUES, L. C.; SANTOS, C. A. S. T.; TEIXEIRA, M. G. L. C.; JESUS, S. R.; MATOS, S. M. A.; LEITE, J. P. G.; BARRETO, M. L. Effectiveness of rotavirus vaccine against hospitalized rotavirus diarrhea: A case-control study. **Vaccine**, 32, p. 2740-2747, 2014.

KAPIKIAN, A. Z.; CHANOCK, R. M. Rotaviruses. In: **Virology**, p. 1657-1708. FIELDS, B. N.; KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M.; CHANOCK, R. M.; MELNICK, J. L.; MONATH, T. P.; ROIZMAN, B.; STRAUS, S. E. (eds). 3 ed. Vol.2. Philadelphia, USA: Lippincott-Raven, 1996.

KHAMRIN, P.; OKAME, M.; THONGPRACHUM, A.; NANTACHIT, N.; NISHIMURA, S.; OKITSU, S.; MANEEKARN, N.; USHIJIMA, H. A single-tube multiplex PCR for rapid detection in feces of 10 viruses causing diarrhea. **Journal of Virological Methods**, 173, p. 390-393, 2011.

KOENIG, K. L.; SHASTRY, S.; BURNS, M. J. Hepatitis A Virus: Essential Knowledge and a Novel Identify-Isolate-Inform Tool for Frontline Healthcare Providers. **Western Journal of Emergency Medicine**, 18(6), p.1000-1007, 2017.

KUNZE, A.; PEI, L.; ELSÄSSER, D.; NIESSNER, R.; SEIDEL, M. High performance concentration method for viruses in drinking water. **Journal of Virological Methods**, 222, p. 132–137, 2015.

LEE, B.-R.; LEE, S.-G.; PARK, J.-H.; KIM, K.-Y.; RYU, S.-R.; RHEE, O.-J.; PARK, J.-W.; LEE, J.-S.; PAIK, S.-Y. Norovirus Contamination Levels in Ground Water Treatment Systems Used for Food-Catering Facilities in South Korea. **Viruses**, 5(7), p. 1646–1654, 2013.

LINHARES, A. C. Rotavirus infection in Brazil: Epidemiology, immunity, and potential vaccination. **Braz J Infec Dis**, 1, p. 284-93, 1997.

LINHARES, A. C. Epidemiologia das infecções por rotavírus no Brasil e os desafios para o seu controle. **Cad. Saúde Pública**, v.16, n.3, p. 629-646, 2000.

LODDER, W. J.; VAN DEN BERG, H. H. J. L.; RUTIES, S. A.; RODA HUSMAN, A. M. Presence of Enteric Viruses in Source Waters for Drinking Water Production in the Netherlands. **Applied and Environmental Microbiology**, v.76, n.17, p. 5965-5971, 2010.

MACHADO, C. J. S.; MIAGOSTOVICH, M. P.; VILANI, R. M. Colaboração entre sociologia e virologia ambiental para a implementação de políticas públicas nacionais. In: MACHADO, C. J. S. (Org.). **Ciências, políticas públicas e sociedade sustentável**. Rio de Janeiro: E-papers, 2012, p. 191-241.

MIAGOSTOVICH, M. P.; GUIMARÃES, F. R.; VIEIRA, C. B.; FUMIAN, T. M.; GAMA, N. P.; VICTORIA, M.; OLIVEIRA, J. M.; MENDES, A. C. O.; GASPAR, A. M. C.; LEITE, J. P. G. Assessment of Water Quality in a Border Region Between the Atlantic Forest and an Urbanised Area in Rio de Janeiro, Brazil. **Food Environ Virol**, 6, p. 110–115, 2014.

MIJATOVIC-RUSTEMPASIC, S.; TEEL, E. N.; KERIN, T. K.; HULL, J. J.; ROY, S.; WEINBERG, G. A.; PAYNE, D. C.; PARASHAR, U. D.; GENTSCH, J. R.; BOWEN, M. D. Genetic analysis of G12P[8] rotaviruses detected in the largest U.S. G12 genotype outbreak on record. **Infection, Genetics and Evolution**, 21, p. 214–219, 2014.

MORAES, L. R. S.; ÁLVARES, M. L. P.; SANTOS, F. P.; COSTA, N. C. A. Saneamento e Qualidade das Águas dos Rios em Salvador, 2007-2009. **RIGS revista interdisciplinar de gestão social**, v.1, n.1, p. 47-60, 2012.

MORESCO, V.; VIANCELLI, A.; NASCIMENTO, M. A.; SOUZA, D. S. M.; RAMOS A. P. D.; GARCIA L. A. T.; SIMÕES, C. M. O.; BARARDI, C. R. M. Microbiological and physicochemical analysis of the coastal Waters of southern Brazil. **Marine Pollution Bulletin**, 64, p. 40-48, 2012.

MUNFORD, V.; SOUZA, E. C.; CARUZO, T. A. R.; MARTINEZ, M. B.; RÁCZ, M. L. Serological and molecular diversity of human rotavirus in São Paulo, Brazil. **Braz J Microbiol**, 38, p. 459-66, 2007.

OLIVEIRA, K. T. L. L. De Estação de Cura à Balneabilidade Duvidosa: Análise Ambiental das Praias do Bairro Rio Vermelho, Salvador, Bahia. **Geografia, Ensino & Pesquisa**, v.21, n.1, p. 190-205, 2017.

PEREIRA, F. E. L.; GONÇALVES, C. S. Hepatite A. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 36, p. 387-400, 2003.

PINTO, R. M.; COSTAFREDA, M. I.; PÉREZ-RODRIGUEZ, F. J.; D'ANDREA, L.; BOSCH, A. Hepatitis A Virus: State of the Art. **Food Environmental Virology**, v. 2, p.127–135, 2010.

PORTES, S. A. R.; CARVALHO-COSTA, F. A.; ROCHA, M. S.; FUMIAN, T. M.; MARANHÃO, A. G.; DE ASSIS, R. M.; XAVIER, M. D. P. T. P.; ROCHA, M. S.; MIAGOSTOVICH, M. P.; LEITE, J. P. G.; VOLOTÃO, E. M.. Enteric viruses in HIV-1 seropositive and HIV-1 seronegative children with diarrheal diseases in Brazil. **Plos One**, v.12, n.8, 2017. doi: 10.1371/journal.pone.0183196

PRADO, T; MIAGOSTOVICH, M. P. Virologia ambiental e saneamento no Brasil: uma revisão narrativa. **Cad. Saúde Pública**, 30(7), p. 1367-1378, 2014.

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**, v. 60, n. 8, p. 2963-2970, 1994.

RABONI, S. M. R.; DAMASIO, G. A. C.; FERREIRA, C. E. O.; PEREIRA, L. A.; NOGUEIRA, M. B.; VIDAL, L. R.; CRUZ, C. R.; ALMEIDA, S. M. Acute gastroenteritis and enteric viruses in hospitalised children in southern Brazil: aetiology, seasonality and clinical outcomes. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v.109, n.4, p. 428-435, 2014.

RAGONHA, J.; CORRÊA, L. Infraestrutura verde-azul na bacia do alto Mandaqui: conectando fragmentos verdes através do caminho das águas. **Revista LABVERDE**, n°12, p. 42-68, 2016.

RASELLA, D. Impacto do Programa Água para Todos (PAT) sobre a morbimortalidade por diarreia em crianças do Estado da Bahia, Brasil. **Cad. Saúde Pública**, 29(1), p. 40-50, 2013.

REYNOLDS, D.J.; MORGAN, J.H.; CHANTER, N.; JONES, P. W.; BRIDGER, J. C.; DEBNEY, T. G.; BUNCH, K. J. Microbiology of calf diarrhoea in southern Britain. **Vet. Rec.**, v.12, p. 34-39, 1986.

ROBERTSON, B. H.; et al. Serological approaches to distinguish immune response to hepatitis A vaccine and natural infection. **Vaccine**, v.10, Suppl 1, p. 106-109, 1992.

ROCKX, B.; DE WIT, M.; VENNEMA, H.; VINJE, J.; DE BRUIN, E.; VAN DUYNHOVEN, Y.; KOOPMANS, M. Natural history of human calicivirus infection: a prospective cohort study. *Clin Infect Dis*, 35, P. 246-253, 2002.

RODRIGUEZ-BAEZ, N.; O'BRIEN, R.; QIU, S. Q.; BASS, D. M. Astrovirus, adenovirus, and rotavirus in hospitalized children: prevalence and association with gastroenteritis. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, 35, p. 64-68, 2002.

RIGOTTO, C.; SINCERO, T. C. M.; SIMÕES, C. M. O.; BARARDI, C. R. M. Detection of Adenovirus in shellfish by means of conventional-PCR, nested PCR, and integrated cell culture PCR (ICC/PCR). **Water Research**, , v.39, p. 297-304, 2005.

RUSIÑOL, M.; FERNANDEZ-CASSI, X.; TIMONEDA, N.; CARRATALÀ, A.; ABRIL, J. F.; SILVERA, C.; FIGUERAS, M. J.; GELATI, E.; RODÓ, X.; KAY, D.; WYN-JONES, P.; BOFILL-MAS, S.; GIRONES, S. Evidence of viral dissemination and seasonality in a Mediterranean river catchment: Implications for water pollution management. **Journal of Environmental Management**, 159, p. 58-67, 2015.

SERRAVALLE, K.; SANTOS, N.; SARDI, S. I.; SILVA, S. P.; RIBEIRO JUNIOR, H. C.; MATTOS, A. P.; CAMPOS, G. S. Molecular characterization of group A rotavirus isolates obtained from hospitalized children in Salvador, Bahia, Brazil. **Braz J Infect Dis.**, v.11, n.1, p. 35-39, 2007.

SANTOS, N. S. O.; ROMANOS, M. T. V; WIGG, M. D. **Virologia Humana**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2015.

SCIPIONE, A.; MAUROY, A.; VINJÉ, J.; THIRY, E. Animal noroviruses. **The Veterinary Journal**, v.178, p. 32-45, 2008.

SIBANDA, T.; OKOH, A. I. Real-time PCR quantitative assessment of hepatitis A virus, rotaviruses and enteroviruses in the Tyume River located in the Eastern Cape Province, South Africa. **Water AS**, v.39, n.2, p. 295-304, 2013.

SILVA, H. D.; ANUNCIACÃO, C. E.; SANTOS, S. F. O.; GARCÍA-ZAPATA, M. T. Análise virológica da qualidade da água: uma revisão das metodologias de concentração e detecção viral. **R. bras. Bioci.**, v.9, n.3, p. 405-415, 2011.

SINCERO, T. C. M.; LEVIN, D. B.; SIMÕES, C. M. O.; BARARDI, C.R.M. Detection of hepatitis A virus (HAV) in oysters (*Crassostrea gigas*). **Water Research**, 40, p. 8957-902, 2006.

SOARES, L. S.; GUERRA, S. F. S.; OLIVEIRA, A. S. L.; FABIOLA DA SILVA DOS SANTOS, F. S.; MENEZES, E. M. F. C.; MASCARENHAS, J. D. P.; LINHARES, A. C. Diversity of rotavirus strains circulating in Northern Brazil after introduction of a rotavirus vaccine: high prevalence of G3P[6] genotype. **Journal of Medical Virology**, 86, p. 1065–1072, 2014.

STEYER, A.; GUTIÉRREZ-AGUIRRE, I.; RAČKI, N.; GLASER, S. B.; HUMAR, B. B.; STRAŽAR, M.; ŠKRJANC, I.; POLJŠAK-PRIJATELJ, M.; RAVNIKAR, M.; RUPNIK, M. The Detection Rate of Enteric Viruses and *Clostridium difficile* in a Waste Water Treatment Plant Effluent. **Food Environ Virol.**, 2015. DOI 10.1007/s12560-015-9183-7

TATTE, V. S.; CHOTHE, N. S.; CHITAMBAR, S. D. Characterisation of rotavirus strains identified in adolescents and adults with acute gastroenteritis highlights circulation of non-typeable strains: 2008–2012. **Vaccine**, 32S, p. A68–A74, 2014.

TAVARES, T. M.; CARDOSO, D. D. P.; BRITO, W. M. E. D. Vírus entéricos veiculados por água: aspectos microbiológicos e de controle de qualidade de água. **Revista de Patologia Tropical**, v.34, n.2, p. 85-104, 2005.

TIKU, V. R.; SHARMA, S.; VERMA, A.; KUMAR, P.; RAGHAVENDHAR, S.; ANEJA, S.; PAUL, V. K.; BHAN, M. K.; RAY, P. Rotavirus diversity among diarrheal children in Delhi, India during 2007–2012. **Vaccine**, 11(32), Suppl 1, p. A62-67, 2014.

VIEIRA, C. B.; MENDES, A. C. O.; OLIVEIRA, J. M.; GASPAR, A. M. C; LEITE, J. P. G.; MIAGOSTOVICH, M. P. Vírus entéricos na Lagoa Rodrigo de Freitas. **Oecol. Aust.**, v.16, n.3, p. 540-565, 2012.

VILLAR, L. M.; MORAIS, L. M.; ALOISE, R.; MELO, M. M.; CALADO, I. A.; LAMPE, E.; GASPAR, A. M. Co-circulation of genotypes IA and IB of hepatitis A virus in Northeast Brazil. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.39, p. 873-881, 2006.

WESTRELL, T.; DUSCH, V.; ETHELBERG, S.; HARRIS, J.; HJERTQVIST, M.; JOURDAN-DA SILVA, N.; KOLLER, A.; LENGLET, A.; LISBY, M.; VOLD, L. Norovirus outbreaks linked to oyster consumption in the United Kingdom, Norway, France, Sweden and Denmark, 2010. **Euro Surveill.**, v.15, n.12, pii=19524, 2010.

WHO. **Weekly epidemiological record**, v.18, n.86, p. 173-176, 2011.

WHO. **Diarrhoeal disease.** Fact sheet no. 220, April 2013. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs330/en/index.html>. Acessado em 04/09/2017.

WYN-JONES, A. P.; SELLWOOD. J. Enteric viruses in the aquatic environment. A Review. **Journal of Applied Microbiology**; 91, p. 945-962, 2001.

YILMAZ, H.; KARAKULLUKCU, A.; TURAN, N.; CIZMECIGIL, U. Y.; YILMAZ, A.; OZKUL, A. A.; AYDIN, O.; GUNDUZ, A.; METE, M.; ZEYREK, F. Y.; KIRAZOGLU, T. T.; RICHT, J. A.; KOCAZEYBEK, B. Genotypes of hepatitis a virus in Turkey: first report and clinical profile of children infected with sub-genotypes IA and IIIA. **BMC Infectious Diseases**, 17:561, 2017. doi: 10.1186/s12879-017-2667-3.

ZHENG, D. P.; ANDO, T; FANKHAUSER, R. L.; BEARD, R. S.; GLASS, R. I.; MONROE, S. S. Norovirus classification and proposed strain nomenclature. **Virology**, 346, p. 312-323, 2006.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVOS GERAIS

Detectar virus entéricos (RVA, NoV e HAV) em água do mar e de rios coletadas no município de Salvador, Bahia, utilizando técnicas de concentração de partículas virais.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Concentrar partículas virais das amostras de água do mar e de rios por método de floculação orgânica utilizando leite em pó desnatado;
- Detectar RVA em amostras de água do mar e de rios coletadas mensalmente no município de Salvador utilizando técnicas de RT-PCR e nested-PCR (qualitativo);
- Detectar NoV e HAV em amostras de água do mar e de rios coletadas mensalmente no município de Salvador utilizando técnicas de RT-qPCR;
- Utilizar um composto orgânico (caseína micellar) para concentrar partículas virais em água do mar sintética, dessa forma aperfeiçoando a técnica de floculação.
- Comparar a eficiência do composto orgânico (caseína micellar) com a utilização do leite em pó na concentração de partículas virais em água do mar sintética por meio da floculação.

4 MANUSCRITO 01

Submetido a Food and Environmental Virology

DETECTION OF ROTAVIRUS, NOROVIRUS AND HEPATITIS A VIRUS IN SEAWATER AND RIVER WATER SAMPLES FROM SALVADOR CITY, BAHIA, BRAZIL.

André Mario Mendes da Silva*^{1,2}, Gúbio Soares Campos², Dellane Martins Tigre^{1,3}, Ítalo Santos Uzeda² and Silvia Ines Sardi²

1 Health Sciences Center, Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (UFRB), Santo Antonio de Jesus, Brazil.

2 Laboratory of Virology, Institute of Health Science, Universidade Federal da Bahia (UFBA), Salvador, Brazil.

3 Department of Biologic Science, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB), Jequie, Brazil.

Corresponding Author:

* André Mario Mendes da Silva: Tel.: +55 71 3283 8897; fax: +55 71 3283 8899. E-mail address: andremendes@ufrb.edu.br

Abstract

Microbial contamination of water remains a problem of global concern, heightened by lack of potable water and poor sanitation. Ground and surface water sources may be subjected to fecal contamination from a variety of sources. The general demand for high quality drinking water has increased the pressure on environmental and public health agencies to develop more rigorous control policies, to ensure the microbiological safety of water. The importance of water quality control has motivated the need to develop adequate and sensitive analytical procedures. This work investigated the presence of rotavirus, norovirus and hepatitis A virus in seawater and river samples from Salvador City. Obtained results confirm the presence these virus in beaches as well as in rivers located in the urban area.

Keywords: Water, enteric virus, RT-PCR.

Introduction

Microbial contamination of water remains a problem of global concern. Absence of safe water and poor sanitation are significant risk factors for mortality and morbidity, including diarrheal diseases, especially in the developing world (Chigor and Okoh 2012). Worldwide, diarrhea remains the second principal cause of death in children younger than five years. Different types of viruses such as rotavirus, norovirus, sapovirus, astrovirus, and adenovirus have been known to correlate with these diseases (Khamrin et al. 2011; Raboni et al. 2014; Portes et al., 2017).

Despite the progress in water and wastewater treatment technology, waterborne diseases still have public health and socioeconomic implications in both the developed and developing world. According to the World Health Organization (WHO), every year there are 2.2 million deaths related to unsafe water, sanitation and hygiene, and millions more suffer multiple episodes of non-fatal diarrhea (Hamza et al., 2011).

Fecal pollution is a primary health concern in the environment, with contaminated water being a potential source of gastrointestinal diseases, especially those associated with viral infections (Miagostovich et al., 2014). Ground and surface water sources may be exposed to fecal contamination from a variety of origins, including sewage effluents, septic waste treatment emission, land runoff from urban, agricultural and natural areas, and leachates from sanitary landfills. Therefore, millions of people throughout the world do not have access to microbiologically safe water for domestic, recreational and other general uses (Sibanda and Okoh, 2013).

While detection of the usual fecal pollution markers, *E. coli* and intestinal enterococci, is straightforward, incidence of bacterial indicators does not necessarily associate with the occurrence of viral pathogens that are more stable than bacteria in the environment, nor do bacterial indicators offer data on the potential source of the contamination (Bergamaschi et al. 2015; Calgua et al., 2008). The development of competent tools for virus finding in

environmental samples has become an alternative strategy for more trusty surveillance of contamination in coastal waters (Moresco et al. 2012).

Basic sanitation has an important role in enteric viruses spread control into the environment, reducing the transmission risk. Studies have demonstrated the correlation between sanitation lack, including access to safe drinking water and sanitary sewage, with increased morbidity and mortality rates to infectious diseases (Prado and Miagostovich, 2014). Contamination of environmental surfaces seems to play an important role in the spread of these infections, especially in indoor establishments such as hospitals, nurseries, day care centers, and institutions for the elderly (Alidjinou et al., 2017).

The term “enteric viruses” refers to an important but complex community of viruses found in the intestinal tract of humans and animals. Viruses are a major cause of water-related disease. The most common viral gastrointestinal illness are rotavirus and norovirus diarrhea in the infantile and adult population, respectively (Bosch et al., 2008).

Group-A Rotaviruses (RVA) are the most important etiologic agents of acute gastroenteritis in infants and young children, worldwide. Globally, RVA infections account for 37% of all cases of diarrhea in children under the age of 5 years (Tatte et al., 2014). RVA, members of the *Reoviridae* family, possess a genome of 11 double-stranded RNA (dsRNA) segments that encode 6 viral structural proteins (VP1–VP4, VP6 and VP7) and 6 nonstructural proteins (NSP1–NSP6) (Mijatovic-Rustempasic et al., 2014). RVA vaccines, Rotateq® and Rotarix®, have been licensed in several countries worldwide. Although they have been highly successful in reducing RVA related hospital admissions in developed countries, their efficacy has been rather low in developing countries (Tiku et al., 2014).

Norovirus (NoV) has been recognized as the major causes of non-bacterial acute gastroenteritis in all age groups in industrialized countries and are frequently associated with food and water-borne outbreaks (Raboni et al., 2014). NoVs are members of the *Caliciviridae*

family and have a positive-sense, single-stranded RNA. NoVs can genetically be classified into five different genogroups (GI to GV). GI, GII and GIV infect humans, whereas GIII infects bovine species, and GV infects mice (Lee et al., 2013). This virus has a widespread distribution and causes outbreaks, especially in closed communities such as nursing homes, hospitals, dormitories, and cruise ships (Bert et al., 2014).

Infection with hepatitis A virus (HAV) causes a highly contagious illness that can lead to serious morbidity and occasional mortality. Clinically, HAV infection cannot be distinguished from other forms of viral hepatitis (Koenig et al., 2017). HAV is a non-enveloped RNA virus with positive polarity and the only member of genus *Hepatovirus* in the family *Picornaviridae*. Complete genome sequence analysis show that HAV can be divided into seven genotypes. Genotypes I, II, III and VII have been associated with hepatitis in humans (Yilmaz et al., 2017).

Thus, detection of the presence of enteric virus in coastal waters, which are used both for tourism and for cultivation of marine species for food production, is very important, allowing obtainment of data about water environmental reserves quality, the possibility of their contamination possibility with sewage residues and food products quality originating from them.

The aim of this study was to determine the presence and frequency of RVA, NoV (GII) and HAV in seawater and rivers samples in the Salvador City, Bahia, Brazil using real-time RT-qPCR.

Materials and Methods

Samples Collection

Seawater samples. A total of 70 seawater samples (10 L each one) were collected monthly from seven beaches in urban area from Salvador City. Site descriptions are summarized in Fig1 and Table 1. Samples were collected monthly in two periods: from October 2015 to April 2016 and from July to September 2016. Selected sampling site was based on water quality evaluation of beaches from Salvador City, made by the Institute for Environment and Water Resources (Inema). Beach balneability is based on *E. coli* presence. The beaches that were often considered unsuitable for recreational were selected.

River water samples. A total of 24 river water samples (10 L each one) were collected monthly from four rivers mouth in urban area from Salvador City. Site descriptions are summarized in Fig1 and Table 2. The samples were collected monthly from October 2016 to January 2017. Selected sampling site was based on rivers who have their mouth closest from beaches where seawater samples were obtained.

Viral Concentration

Seawater and river water samples were concentrated by skimmed milk flocculation procedure described previously by Calgua et al. (2008). Pre-flocculated skimmed milk solution (1% (w/v)) was prepared by dissolving 10 g skimmed milk powder in 1 L sintética seawater and carefully adjusting pH to 3.5 with 1 N HCl. One hundred mL of this solution were added to each previously acidified (pH 3.5) 10 L seawater samples (final concentration of skimmed milk 0.01% (w/v)). Samples were stirred for 8 h at room temperature and flocs were allowed to sediment by gravity for another 8 h. Supernatants were carefully removed using vacuum pump without disturbing the sediment. Final volume of about 500 mL containing sediment was

transferred to a centrifuge flask and centrifuged at 7000×g for 30 min at 12 °C. Supernatant was carefully removed and pellet was resuspended in 2 mL of 0.2 M phosphate buffer at pH 7.5 and stored at –80 °C.

Nucleic acid extractions

Nucleic acids (RNA) were extracted using QIAamp Viral RNA kit (Qiagen, Germany) according to manufacturer's instructions, using 140 µL of viral concentrate or viral suspension and eluting extracted nucleic acid in 80 µL of elution buffer. Nucleic acid were analyzed immediately or stored at –80 °C until further analysis.

RT-PCR and Nested-PCR to RVA detection

RT-PCR amplification from dsRNA (first amplification). Reverse transcription (RT) reaction was initially performed with a mixture containing extracted RNA from water samples and primers to VP7 genes (Table 3) that was denatured at 97°C for 5 min and quickly chilled in ice for 2 min. Subsequently, mixture was added to tube containing AccessQuick™ RT-PCR System Master Mix and AMV Reverse Transcriptase enzyme (Promega, USA), according to manufacturer's instructions. Total reaction volume was 50µL. Reactions were carried out in a GeneAmp PCR System 2400 thermocycler, Perkin Elmer. RT-PCR conditions involved initial reverse transcription step at 42 °C for 45 min, PCR-activation step at 94 °C for 1 min, followed by 30 cycles each consisting of denaturation at 94 °C for 1 min, annealing at 42 °C for 2 min, and extension at 72 °C for 1 min, and then final extension step at 72 °C for 7 min (Gouvea et al., 1993). A negative control (blank / RNase-free water) and a positive control (RNA extracted from viral suspension obtained from production of RV in MA-104 culture cells) were also used for each RT-PCR assays.

Nested-PCR amplification from dsDNA (second amplification). Nested-PCR typing was also performed from the products obtained from the RT-PCR of VP7 genes. The product served as template for the second (nested) amplification, which was added to a reaction mix containing primers to VP7 genes (Table 3) and Go Taq® Green Master Mix (Promega, USA), according to manufacturer's instructions. Total reaction volume was 50µL. Nested-PCR conditions involved 25 cycles each consisting of denaturation at 94 °C for 1 min, annealing at 42 °C for 1 min, and extension at 72 °C for 1 min, and then final extension step at 72 °C for 7 min (Gouvea et al., 1993).

The Nested-PCR products were submitted to agarose gel electrophoresis (100V, 45 minutes). After electrophoresis, the gel was incubated in buffered solution with ethidium bromide (1µg/mL) for 10 minutes and then visualized under ultraviolet light transilluminator.

Real-time RT-qPCR to NoV and HAV detection

Real-time RT-qPCR was carried out in a mix containing extracted RNA from water samples, primers and probes (Table 4) and QuantiTect Probe RT-PCR (Qiagen), according to manufacturer's instructions. Procedures for detecting NoV and HAV were performed separately in a 7500 FAST Real Time PCR System thermocycler, Applied Biosystems. Total reaction volume was 25µL. Real-time RT-qPCR for both viruses was performed under following conditions: initial reverse transcription step at 50 °C for 30 min, initial denaturation/activation at 95 °C for 15 min, followed by 45 cycles of amplification with denaturation at 95 °C for 15 s and annealing and extension at 60 °C for 1 min. A negative control (Blank / RNase-free water) and a positive control (RNA extracted from norovirus-positive stool specimen obtained from a patient with gastroenteritis or viral suspension obtained from production of HAV in FRHK-4 culture cells) were also used for each Real Time RT-PCR assays.

Results

RVA Detection in seawater and river water samples

Results obtained by RT-PCR and Nested-PCR for RVA detection in seawater and river water samples are shown in Table 5 and 6, that shows the amount of samples that presented 257-bp fragment correspondent to the amplification of the VP7 gene.

RAV was detected in 71,7% of seawater samples. The highest percentage of positive samples was found in Patamares Beach (100%), followed by Corsário Beach (90%), Boca do Rio Beach (80%) and Pituba Beach (80%). Lowest percentage of positive samples was found in Ondina Beach (40%). Month distribution of RVA in seawater samples collected are show in Fig. 2A. RAV was detected in 100 % of seawater samples collected in February 2016.

RAV was detected in 83,3% of river water samples. Highest percentage of positive samples was found in Lucaia River (100%), followed by Seixos River (83,3%) and Pedras River (83,3%). Lowest percentage of positive samples was found in Jaguaribe River (66,6%). Month distribution of RVA in river water samples collected are show in Fig. 2B. RAV was detected in 100 % of seawater samples collected in September 2016 and December 2016.

NoV detection in seawater and river water samples

Results obtained by Real Time RT-PCR for NoV detection in seawater and river water samples are shown in Table 5 and 6. Detection limit of real-time RT-PCR cutoff were determined at cycle 35. Samples with Ct values ≥ 35 were therefore considered negative (Stals et al., 2009).

NoV was detected in 91,4% of seawater samples. Highest percentage of positive samples was found in Ondina Beach (100%), Pituba Beach (100%) and Patamares Beach (100%), followed by Boca do Rio Beach (90%) and Corsário Beach (90%). Lowest percentage of positive samples was found in Periperi Beach (80%) and Pedra Furada Beach (80%). Month

distribution of NoV in the collected seawater samples are show in Fig. 3A. NoV was detected in 100 % of seawater samples collected in December 2015, January 2016, July 2016, August 2016 and September 2016.

NoV was detected in 66,7% of river water samples. Highest percentage of positive samples was found in Pedras River (83%), followed by Lucaia River (66%) and Jaguaribe River (66%). Lowest percentage of positive samples was found in Seixos River (50%). Month distribution of NoV in river water samples collected are show in Fig. 3B. NoV was detected in 100 % of river water samples collected in August 2016 and September 2016.

HAV detection in seawater and river water samples

No positive sample was found in seawater and river samples analyzed for HAV detection by Real Time RT-PCR. Detection limit of real-time RT-PCR assays was determined to be 10 genomic equivalents achieved, with Ct value ≤ 35 . Samples with Ct values ≥ 35 were therefore considered negative (Chigor and Okoh 2012).

Discussion and Conclusion

Bahia State coast is a highly sought-after place for visiting, and Salvador City receives tourists from around the world, especially in Carnival (Silva et al., 2009). Salvador City urbanization and expansion, in a disorderly and unsustainable manner, results in precarious condition of urban rivers and their watersheds, compromising water quality (Oliveira, 2017).

There are several waterborne pathogens, such as bacteria, protozoa, helminths and especially viruses, which can be found in a variety of environments, from freshwater to geothermal areas (Djikeng et al., 2009). Among waterborne diseases, viral gastroenteritis is associated with lack of drinking water and inadequate access to basic sanitation (WHO & UNICEF, 2009).

Development of different methods to assess water quality has shown great relevance, because environmental contamination is increasing in large proportions due to uncontrolled pollution originating mainly in urban centers (Miagostovich et al., 2014). Efficient concentration method should fulfil several requirements: it should be technically simple, fast, provide high virus recoveries, be adequate for a wide range of enteric viruses, provide a small volume of concentrate, and be inexpensive (Bosch et al., 2008).

Main techniques used to viral particles concentration in water samples are based on physico-chemical methods containing two steps. First step occurs with virus adsorbing by filtration with glass fiber or neutral or positively or negatively charged filter membranes, and then elution with several solutions types. However, elution buffers use such as meat extract exhibits inhibitory effects on molecular detection. A second step is viral particles concentration from eluate by centrifugation or ultracentrifugation (Gerba et al., 2018).

The standardized viral concentration method chosen for concentration of enteric virus in this work is based on virus adsorption by organic flocculation with skimmed milk, which was developed by Calgua et al. (2008). This technique uses only one step, allowing less samples manipulation, preventing possible viral particles losses and less enzymatic assays inhibition (Calgua et al., 2008).

RVA, NoV and HAV presence in river water and seawater samples was investigated. Results revealed high viral contamination prevalence in rivers and beaches from Salvador City. This corroborate with current precarious conditions of sewage collection and waste destination without adequate treatment released daily in environment (Francisco, 2017).

High RVA prevalence in water samples is described by some authors, and this virus is the main cause of diarrhea worldwide (Gerba et al., 1996; Miagostovich et al., 2008). RVA can be detected with high prevalence in environment and survives from days to weeks depending on the environmental conditions (Gerba et al., 1996). A study carried out to evaluate water

quality in an urban river environment from Germany detected RVA and NoV presence in water samples. This evidences that water contamination problem in aquatic environments with discharge of untreated sewage is also a reality in economically developed countries (Mackowiak et al., 2018).

Another study carried out in Argentina evaluated viral contamination in freshwater from a dam (from January to December 2012) and from beaches located on its edge (from October 2013 to October 2015). RVA and NoV presence was detected in samples from dam body points and also in adjacent beaches. However, HAV occurrence was observed only in water samples from dam. Thus, it is possible to conclude that viral contamination of freshwater reserves results in viral contamination of seawater from beaches that receive these effluents (Masachessi et al., 2017).

O'Brien et al. (2017) carried out study in Uganda that demonstrated correlation of RVA and HAV presence in effluents from sewage treatment plants with viral contamination of surface waters that receive these effluents. Miagostovich et al. (2008) performed enteric virus detection in streams water samples from Manaus (Amazonas, Brazil) and observed high RVA prevalence (44,2% positive samples). Kluge et al. (2014) observed enteric viruses occurrence in tap water samples in several cities from Rio Grande do Sul (Brazil), where RVA positive samples were found. RVA presence has been detected in water samples from rivers, sewage, urban lagoons and polluted streams localized in urban centers with large population densities, such as São Paulo and Rio de Janeiro (Mehnert & Stewien, 1993; Fumian et al., 2011; Prado et al., 2011; Vieira et al. 2012).

In the present study, some water sampling points revealed high prevalence RVA viral contamination (100%), such as Patamares Beach, where all samples were positively detected for the presence of the virus. Lowest prevalence of RVA positive samples was observed in Ondina Beach (40%). Considering that the assay method used for detection of RVA

(conventional RT-PCR) in water samples was not the most sensitive currently available, results obtained may still be underestimated, masking a higher prevalence of aquatic environment contamination (Brooks et al., 2005; Albinana-Gimenez et al., 2009; Silva et al., 2011). Positive samples were obtained more frequently in the collection occurred from December 2015 to February 2016, during summer season, the hottest months the year.

High prevalence of positive river water samples for RVA detection may be caused their proximity to urban rivers mouths. Many positive samples are observed in collection points from Boca do Rio, Corsário and Patamares beaches, which are closer of Pedras River mouth and Jaguaribe River mouth (Moraes et al., 2012).

Outbreaks caused by NoV associated with use of contaminated water have been reported since late 1970s. Sinclair et al. (2009) recorded twenty-five NoV outbreaks caused by contact with contaminated water from 1977 to 2006. Zhu et al. (2018) detected NoV presence in all water samples points collected from Lake Poyang (China), indicating contamination by sewage disposal. These results demonstrate the need for additional indicator to improve water quality monitoring, since enteric virus presence does not always correlate with detection of fecal bacterial indicators (ZHU et al., 2018).

Recently, there have been two outbreaks of gastroenteritis in Finland caused by water consumption from underground sources contaminated by NoV and HAdV. Thus, viral contamination caused by sewage waste is not restricted to surface water sources, considering that pathogens can cross various subsoil layers and reach groundwater reserves (Kauppinen et al., 2017). In 2016, a large outbreak of gastroenteritis caused by NoV infection occurred in Catalonia (Spain), which was associated with bottled mineral water consumption. This work suggests that microbial risk management of commercially produced mineral waters could benefit from relevant viral pathogens detection such as NoV (Blanco et al., 2017).

NoV were detected in several Brazilian aquatic ecosystems, such as waste water from Rio de Janeiro (Prado et al., 2011; Fumian et al., 2013), Rodrigo de Freitas Lagoon (Vieira et al. 2012) and rivers from Amazonia (Miagostovich et al., 2008). Victoria et al. (2009) detected NoV presence when analyzing seawater samples during a one-year period (Santa Catarina, Brazil).

In this study, some water sampling points revealed high prevalence of NoV viral contamination (100%) in beaches such as Ondina, Pituba and Patamares, where all samples were positive for this virus. Lowest prevalence of RVA positive samples was observed in Periperi and Pedra Furada beaches (80%). Considering results obtained by RVA detection in seawater samples, the higher prevalence for NoV detection may be due to the use of a more advanced technique for investigation of this virus in seawater samples (qRT-PCR) (Brooks et al., 2005; Albinana-Gimenez et al., 2009; Silva et al., 2011). Positive samples were more frequently obtained when the collection occurred in two periods: from December 2015 to March 2016 (summer) and from July to September 2016 (winter).

Lower prevalence of positive river water samples for NoV detection, when comparing with results from RVA detection, since rivers are a great reservoirs for sewage dumping (Fong & Lipp, 2005), could be explained by the existence of inhibitors in the samples subjected to the RT-qPCR reaction. Nevertheless, NoV occurrence was found in more than 50% analyzed river water samples. In addition, forty-three seawater samples (61.4%) were positive for both RVA and NoV detection. Same trend was observed in river water samples, where fourteen samples were positive (58.3%) for both RVA and NoV detection.

HAV is known to be more resistant RNA virus in the aquatic environment, such as seawater, than other viruses that have single-stranded RNA (Rzezutka & Cook, 2004). Some studies found HAV presence in water samples from diverse origins. Borchardt et al. (2003) detected HAV in water samples from artesian wells (Wisconsin, USA). Rigotto et al. (2010)

found HAV presence in 16% environmental water samples from Florianópolis City (Santa Catarina, Brazil). Prado et al. (2012) found, in another study, 58% HAV positive sewage samples (Rio de Janeiro, Brazil).

No occurrence of positive samples for HAV may have two explanations. The first is that the technique may not be suitable for detection of this type of viral particles, because HAV size is considerably small. The second is that the current state of Brazilian population endemicity for HAV infections does not allow release of large HAV in feces from hosts (Villar et al., 2006).

Results obtained in this work reveal an alarming situation that compromises public health and urban environment quality in the city of Salvador. In addition it highlights the importance of the development of techniques with higher sensitivity for virus concentration and detection in aquatic environment, since enteric virus presence in environmental samples does not mean that they are still viable and have capacity to cause infection.

The detection of enteric virus in seawater and river waters carried out in this study reveals the precariousness of the sanitary sewage system from Salvador. These pathogens can be transmitted to population through seafood consumption obtained in this coastal region. All together may lead to the occurrence of serious public health problems (such as outbreaks by enteric virus).

Acknowledgments

The authors would like to thank the financial support given by FAPESB (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia) and Ministério da Saúde do Brasil/PPSUS and to Rejane Hughes Carvalho for language support.

References

- Albinana-Gimenez, N.; Miagostovich, M. P.; Calgua, B.; Huguet, J. M.; Matiac, L.; Girones, R. (2009). Analysis of adenoviruses and polyomaviruses quantified by qPCR as indicators of water quality in source and drinking-water treatment plants. *Water Research*, 43, 2011-2019.
- Alidjinou, E. K.; Sane, F.; Firquet, S.; Lobert, P. E.; Hober, D. (2017). Resistance of Enteric Viruses on Fomites. *Intervirology*. [https://doi: 10.1159/000448807](https://doi.org/10.1159/000448807)
- Bergamaschi, B.; Rodrigues, M. T.; Silva, J. V. S.; Kluge, M.; Luz, R. B.; Fleck, J. D.; et al. (2015). Moving beyond classical markers of water quality: detection of enteric viruses and genotoxicity in water of the Sinos River. *Braz. J. Biol.*, 75(2), 63-67.
- Bert, F.; Scaioli, G.; Gualano, M. R.; Passi, S.; Specchia, M. L.; Cadeddu, C.; et al. (2014). Norovirus outbreaks on commercial cruise ships: a systematic review and new targets for the public health agenda. *Food Environ. Virol.*, 6(2), 67-74.
- Blanco, A.; Guix, S.; Fuster, N.; Fuentes, C.; Bartolomé, R.; Cornejo, T.; et al. (2017). Norovirus in Bottled Water Associated with Gastroenteritis Outbreak, Spain, 2016. *Emerg Infect Dis.*, 23(9), 1531-1534.
- Borchardt, M. A.; Bertz, P. D.; Spencer, S. K.; Battigelli, D. A. (2003). Incidence of enteric viruses in groundwater from household wells in Wisconsin. *Applied Environmental Microbiology*, v. 69, 1172-1180.
- Bosch, A.; Guix, S.; Sano, D.; Pinto, R. M. (2008). New tools for the study and direct surveillance of viral pathogens in water. *Current Opinion in Biotechnology*, v.19, 295-301.
- Brooks, H. A.; Gersberg, R. M.; Dhar, A. K. (2005). Detection and quantification of hepatitis A virus in seawater via real-time RT-PCR. *J. Virological. Methods.*, 127, 109-118.

- Calgua, B.; Mengewein, A.; Grunert, A.; Bofill-Mas, S.; Clemente-Cesares, P.; Hundes, A.; et al. (2008). Development and application of a one-step low cost procedure to concentrate viruses from seawater samples. *Journal of Virological Methods*, 153, 79-83.
- Chigor, V. N. & Okoh, A. I. (2012). Quantitative RT-PCR Detection of Hepatitis A Virus, Rotaviruses and Enteroviruses in the Buffalo River and Source Water Dams in the Eastern Cape Province of South Africa. *Int. J. Environ. Res. Public Health*, 9, 4017-4032.
- Djikeng, A.; Kuzmickas, R.; Anderson, N. G.; Spiro, D. J. (2009). Metagenomic analysis of RNA viruses in a fresh water lake. *PLoS ONE*, 4(9), p. e7264.
- Fong, T. T. & Lipp, E. K. (2005). Enteric Viruses of Humans and Animals in Aquatic Environments: Health Risks, Detection, and Potential Water Quality Assessment Tools. *Microbiology and molecular biology reviews*, v.69, 357-371.
- Francisco, P. C. (2017). Sistemas condominiais de esgoto: difusão do tema. *SANEAS*, 61, 27-37.
- Fumian, T. M.; Leite, J. P. G.; Rose, T. L.; Prado, T.; Miagostovich, M. P. (2011). One year environmental surveillance of rotavirus specie A (RVA) genotypes in circulation after the introduction of the Rotarix vaccine in Rio de Janeiro, Brazil. *Water Research*, 45, 5755-5763.
- Fumian, T. M.; Vieira, C. B.; Leite, J. P. G.; Miagostovich, M. P. (2013). Assessment of burden of virus agents in urban sewage treatment plant in Rio de Janeiro, Brazil. *J Water Health*, 11, 110-119.
- Gerba, C. P.; Rose, J. B.; Haas, C. N.; Crabtree, K. D. (1996). Waterborne rotavirus: a risk assessment. *Water Research*, v.30, 2929-2940.
- Gerba, C. P.; Betancourt, W. Q.; Kitajima, M.; Rock, C. M. (2018). Reducing uncertainty in estimating virus reduction by advanced water treatment processes. *Water Research*, v.133, 282-288.

- Gouvea, V. (1993). PCR Detection of Rotavirus. In: PERSING, D. H. (Ed.). *Diagnostic Molecular Microbiology: Principles and Applications* (pp. 383-388). American Society for Microbiology.
- Hamza, I. A.; Jurzik, L.; Überla, K.; Wilhelm, M. (2011). Methods to detect infectious human enteric viruses in environmental water samples. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 214, 424-436.
- Kauppinen, A.; Pitkänen, T.; Miettinen, I. T. (2017). Persistent Norovirus Contamination of Groundwater Supplies in Two Waterborne Outbreaks. *Food Environ Virol.*, 2017. [https://doi: 10.1007/s12560-017-9320-6](https://doi.org/10.1007/s12560-017-9320-6).
- Khamrin, P.; Okame, M.; Thongprachum, A.; Nantachit, N.; Nishimura, S.; Okitsu, S.; et al. (2011). A single-tube multiplex PCR for rapid detection in feces of 10 viruses causing diarrhea. *Journal of Virological Methods*, 173, 390–393.
- Koenig, K. L.; Shastry, S.; Burns, M. J. (2017). Hepatitis A Virus: Essential Knowledge and a Novel Identify-Isolate-Inform Tool for Frontline Healthcare Providers. *Western Journal of Emergency Medicine*, 18(6),1000-1007.
- Kluge, M.; Fleck, J. D.; Soliman, M. C.; Luz, R. B.; Fabres, R. B.; Comerlato, J.; et al. (2014). Human adenovirus (HAdV), human enterovirus (hEV), and genogroup A rotavirus (GARV) in tap water in southern Brazil. *Journal of Water and Health*, v. 12, 526-532.
- Lee, B.-R.; Lee, S.-G.; Park, J.-H.; Kim, K.-Y.; Ryu, S.-R.; Rhee, O.-J.; et al. (2013). Norovirus Contamination Levels in Ground Water Treatment Systems Used for Food-Catering Facilities in South Korea. *Viruses*, 5(7), 1646–1654.
- Mackowiak, M.; Leifels, M.; Hamza, I. A.; Jurzik, L.; Wingender, J. (2018). Distribution of Escherichia coli, coliphages and enteric viruses in water, epilithic biofilms and sediments of an urban river in Germany. *Science of The Total Environment*, 626, 650-659.

Masachessi, G.; Pisano, M. B.; Prez, V. E.; Martínez, L. C.; Michelena, J. F.; Martínez-Wassaf, M.; et al. (2017). Enteric viruses in surface waters from Argentina: molecular and viable virus detection. *Applied and Environmental Microbiology*. <https://doi: 10.1128/AEM.02327-17>.

Mehnert, D. U. & Stewien, K. E. (1993). Detection and distribution of rotavirus in raw sewage and creeks in São Paulo, Brazil. *Appl Environ Microbiol*, 59, 140-143.

Miagostovich, M. P.; Ferreira, F. F. M.; Guimarães, F. R.; Fumian, T. M.; Diniz-Mendes, L.; Luz, S. L. B.; et al. (2008). Molecular detection and characterization of gastroenteritis viruses occurring naturally in the stream waters of Manaus, Central Amazônia, Brazil. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 74, 375-382.

Miagostovich, M. P.; Guimarães, F. R.; Vieira, C. B.; Fumian, T. M.; Gama, N. P.; Victoria, M.; et al. (2014). Assessment of Water Quality in a Border Region Between the Atlantic Forest and an Urbanised Area in Rio de Janeiro, Brazil. *Food Environ Virol*, 6, 110–115.

Mijatovic-Rustempasic, S.; Teel, E. N.; Kerin, T. K.; Hull, J. J.; Roy, S.; Weinberg, G. A.; et al. (2014). Genetic analysis of G12P[8] rotaviruses detected in the largest U.S. G12 genotype outbreak on record. *Infection, Genetics and Evolution*, 21, 214–219.

Moraes, L. R. S.; Álvares, M. L. P.; Santos, F. P.; Costa, N. C. A. (2012). Saneamento e Qualidade das Águas dos Rios em Salvador, 2007-2009. *RIGS revista interdisciplinar de gestão social*, 1(1), 47-60.

Moresco, V.; Viancelli, A.; Nascimento, M. A.; Souza, D. S. M.; Ramos A. P. D.; Garcia L. A. T.; et al. (2012). Microbiological and physicochemical analysis of the coastal Waters of southern Brazil. *Marine Pollution Bulletin*, 64, 40-48.

O'Brien, E.; Nakyazze, J.; Wu, H.; Kiwanuka, N.; Cunningham, W.; Kaneene, J. B.; Xagorarakis, I. (2017). Viral diversity and abundance in polluted waters in Kampala, Uganda. *Water Research*, 127, 41-49.

- Oliveira, K. T. L. L. (2017). De Estação de Cura à Balneabilidade Duvidosa: Análise Ambiental das Praias do Bairro Rio Vermelho, Salvador, Bahia. *Geografia, Ensino & Pesquisa*, 21(1), 190-205.
- Portes, S. A. R.; Carvalho-Costa, F. A.; Rocha, M. S.; Fumian, T. M.; Maranhão, A. G.; De Assis, R. M.; et al. (2017). Enteric viruses in HIV-1 seropositive and HIV-1 seronegative children with diarrheal diseases in Brazil. *Plos One*, v.12, n.8. [https://doi: 10.1371/journal.pone.0183196](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0183196)
- Prado, T.; Silva, D. M.; Guilayn, W. C.; Rose, T. L.; Gaspar, A. M. C.; Miagostovich, M. P. (2011). Quantification and molecular characterization of enteric viruses detected in effluents from two hospital wastewater treatment plants. *Water Research*, 45, 1287-1297.
- Prado, T.; Fumian, T. M.; Miagostovich, M. P.; Gaspar, A. M. C. (2012). Monitoring the hepatitis A virus in urban wastewater from Rio de Janeiro, Brazil. *Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v.106, 104-109.
- Prado, T. & Miagostovich, M. P. (2014). Virologia ambiental e saneamento no Brasil: uma revisão narrativa. *Cad. Saúde Pública*, 30(7), 1367-1378.
- Raboni, S. M. R.; Damasio, G. A. C.; Ferreira, C. E. O.; Pereira, L. A.; Nogueira, M. B.; et al. (2014). Acute gastroenteritis and enteric viruses in hospitalised children in southern Brazil: aetiology, seasonality and clinical outcomes. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v.109, n.4, 428-435.
- Rigotto, C.; Victoria, M.; Moresco, V.; Kolesnikovas, C. K. M.; Correa, A. A.; Souza, D. S. M.; et al. (2010). Assessment of adenovirus, hepatitis A virus and rotavirus presence in environmental samples in Florianópolis, South Brazil. *Journal of Applied Microbiology*, v.109, 1979-1987.
- Rzezutka, A. & Cook, N. (2004). Survival of human enteric viruses in the environmental and food. *FEMS Microbiology Reviews*, v.28, 441-453.

- Sibanda, T. & Okoh, A. I. (2013). Real-time PCR quantitative assessment of hepatitis A virus, rotaviruses and enteroviruses in the Tyume River located in the Eastern Cape Province, South Africa. *Water AS*, v.39, n.2, 295-304.
- Silva, I. R.; Souza Filho, J. R.; Barbosa, M. A. L.; Rebouças, F.; Machado, R. A. S. (2009). Diagnóstico ambiental e avaliação da capacidade de suporte das praias do bairro de Itapoã, Salvador, Bahia. *Sociedade & Natureza*, 21(1), 71-84.
- Silva, H. D.; Anunciação, C. E.; Santos, S. F. O.; García-Zapata, M. T. (2011). Análise virológica da qualidade da água: uma revisão das metodologias de concentração e detecção viral. *R. bras. Bioci.*, 9(3), 405-415.
- Sinclair, R. G.; Jones, E. L.; Gerba, C. P. (2009). Viruses in recreational water-borne disease outbreaks: a review. *Journal of Applied Microbiology*, 107, 1769-1780.
- Stals, A.; Baert, L.; Botteldoorn, N.; Werbrouck, H.; Herman, L.; et al. (2009). Multiplex real-time RT-PCR for simultaneous detection of GI/GII noroviruses and murine norovirus 1. *Journal of Virological Methods*, 161, 247-253.
- Tatte, V. S.; Chothe, N. S.; Chitambar, S. D. (2014). Characterisation of rotavirus strains identified in adolescents and adults with acute gastroenteritis highlights circulation of non-typeable strains: 2008-2012. *Vaccine*, 32S, A68-A74.
- Tiku, V. R.; Sharma, S.; Verma, A.; Kumar, P.; Raghavendhar, S.; Aneja, S.; et al. Rotavirus diversity among diarrheal children in Delhi, India during 2007-2012. (2014). Rotavirus diversity among diarrheal children in Delhi, India during 2007-2012. *Vaccine*, 11(32), Suppl 1, A62-67.
- Victoria, M.; Guimaraes, F.; Fumian, T.; Ferreira, F.; Vieira, C.; Leite, J.P.; Miagostovich, M. P. (2009). Evaluation of an adsorption-elution method for detection of astrovirus and norovirus in environmental waters. *Journal of Virological Methods*, v.156, 73-76.

Vieira, C. B.; Mendes, A. C. O.; Guimarães, F. R.; Fumian, T. M.; Leite, J. P. G.; et al. (2012). Detection of enteric viruses in recreational waters of an urban lagoon in the city of Rio de Janeiro, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 107, 778-784.

Villar, L. M.; Morais, L. M.; Aloise, R.; Melo, M. M.; Calado, I. A.; et al. (2006). Co-circulation of genotypes IA and IB of hepatitis A virus in Northeast Brazil. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v.39, 873-881.

World Health Organization; UNICEF. (2009). *Diarrhoea: Why children are still dying and what can be done*.

Yilmaz, H.; Karakullukcu, A.; Turan, N.; Cizmecigil, U. Y.; Yilmaz, A.; Ozkul, A. A.; et al. (2017). Genotypes of hepatitis a virus in Turkey: first report and clinical profile of children infected with sub-genotypes IA and IIIA. *BMC Infectious Diseases*, 17(561). <https://doi:10.1186/s12879-017-2667-3>.

Zhu, H.; Yuan, F.; Yuan, Z.; Liu, R.; Xie, F.; Huang, L.; et al. (2018). Monitoring of Poyang lake water for sewage contamination using human enteric viruses as an indicator. *Virology Journal*, 15 (3). <https://doi:10.1186/s12985-017-0916-0>.

Table 1: Geographic coordinates from beaches' sampling points.

Sampling Point	Coordinates	
	Latitude	Longitude
1 - Periperi	S 12°52'0''	W 38°28'43''
2 - Pedra Furada	S 12°55'24''	W 38°30'49''
3 - Ondina	S 13°0'37''	W 38°30'36''
4 - Pituba	S 13°0'30''	W 38°27'39''
5 - Boca do Rio	S 12°58'50''	W 38°25'38''
6 - Corsário	S 12°58'31''	W 38°24'58''
7 - Patamares	S 12°58'2''	W 38°24'15''

Table 2: Geographic coordinates from rivers' sampling points.

Sampling Point	Coordinates	
	Latitude	Longitude
A - Seixos	S 12°59'42''	W 38°31'8''
B - Lucaia	S 13°0'52''	W 38°29'22''
C - Pedras	S 12°58'38''	W 38°25'19''
D - Jaguaribe	S 12°57'43''	W 38°23'57''

Table 3: Oligonucleotide primers used to RT-PCR and Nested-PCR for RVA detection.

Reaction	Primers	Nucleotide sequence (5'- 3')
RT-PCR	A1	GGC TTT AAA AGA GAG AAT TTC CGT CTG G
	A4	GGT CAC ATC ATA CAA TTC TAA TCT AAG
Nested-PCR	A2	GGA CCA AGA GAA AAC GTA GC
	A4	GGT CAC ATC ATA CAA TTC TAA TCT AAG

Table 4: Primers and probes used to RT-qPCR for NoV and HAV detection.

Virus	Primers and probes	Nucleotide sequence (5'- 3')	Reference
NoV	QNIF2	ATG TTC AGR TGG ATG AGR TTC TCW GA	Stals et al. (2009)
	COG2R	TCG ACG CCA TCT TCA TTC ACA	
	QNIFS	Texas Red-AGC ACG TGG GAG GGC GAT CG-BHQ-1	
HAV	HAV68	TCA CCG CCG TTT GCC TAG	Chigor & Okoh (2012)
	HAV240	GGA GAG CCC TGG AAG AAA G	
	HAV150	FAM-CCT GAA CCT GCA GGA ATT AA-MGBNFQ	

Table 5: RVA and NoV detection in seawater samples.

Beaches sampling	RVA %	NoV %
1 - Periperi	60 (6/10)	80 (8/10)
2 - Pedra Furada	50 (5/10)	80 (8/10)
3 - Ondina	40 (4/10)	100 (10/10)
4 - Pituba	80 (8/10)	100 (10/10)
5 - Boca do Rio	80 (8/10)	90 (9/10)
6 - Corsário	90 (9/10)	90 (9/10)
7 - Patamares	100 (10/10)	100 (10/10)

Table 6: RVA and NoV detection in river water samples.

Rivers sampling	RVA%	NoV%
A - Seixos	83 (5/6)	50 (3/6)
B - Lucaia	100 (6/6)	66 (4/6)
C - Pedras	83 (5/6)	83 (5/6)
D - Jaguaribe	66 (4/6)	66 (4/6)

Fig. 1: Rivers and beaches' sampling. Representative map of Salvador City indicating collection points.

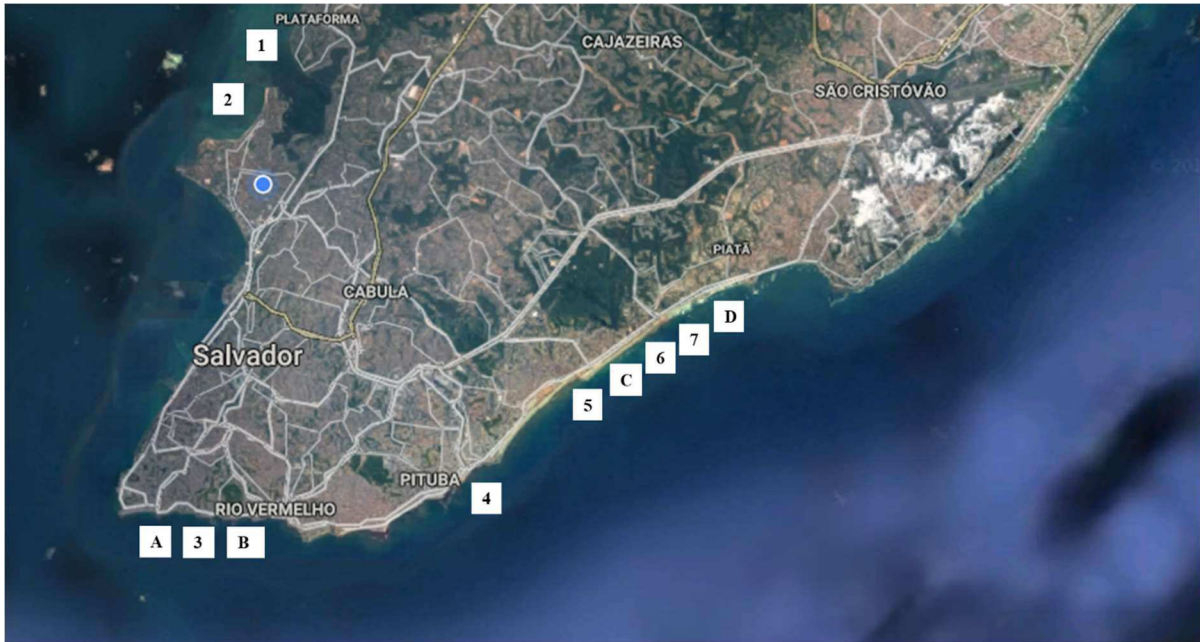


Fig. 2A: Distribution of RVA in seawater samples by month.

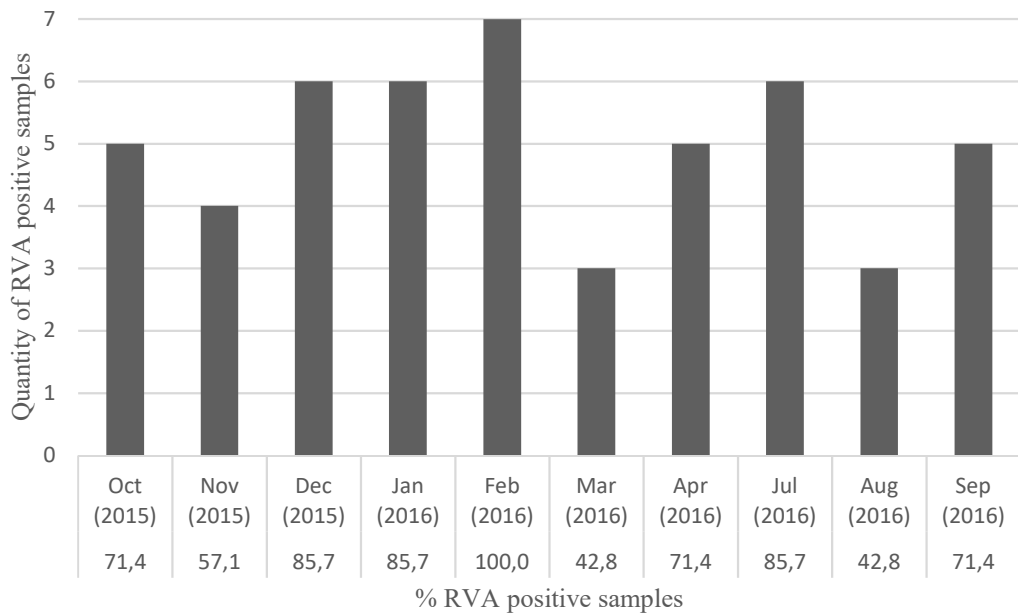


Fig. 2B: Distribution of RVA in river water samples by month.

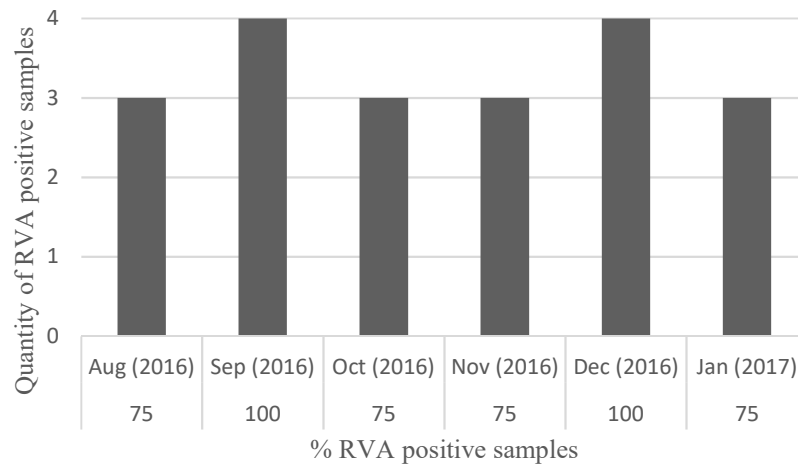


Fig. 3A: Distribution of NoV in seawater samples by month.

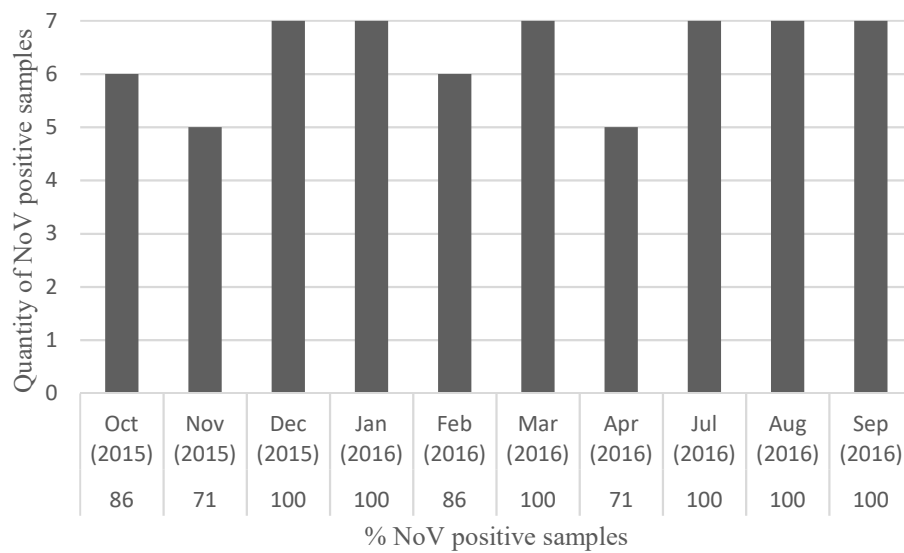
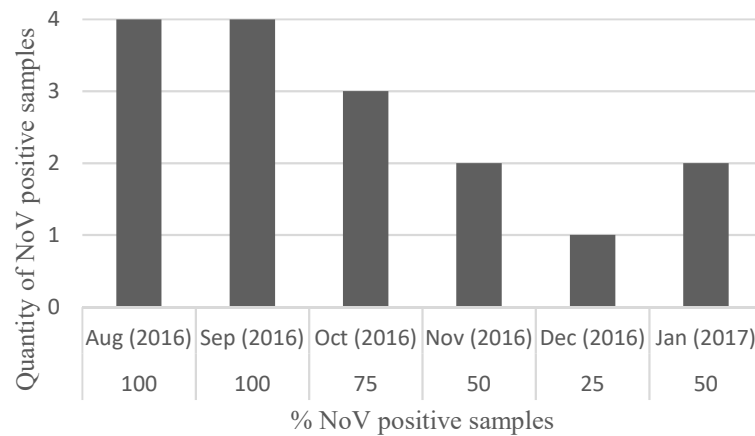


Fig. 3B: Distribution of NoV in river water samples by month.



5 MANUSCRITO 02

NOVO MÉTODO PARA CONCENTRAÇÃO DE PARTÍCULAS VIRAIS EM AMOSTRAS DE ÁGUA

5.1 INTRODUÇÃO

As técnicas utilizadas para avaliar a qualidade da água têm sido itens de controvérsia há bastante tempo. As bactérias são utilizadas como microrganismos preferenciais para a determinação dos critérios do monitoramento microbiológico da água, como por exemplo as bactérias heterotróficas e os coliformes. Entretanto, os métodos usualmente empregados para a detecção de coliformes fecais e *E. coli* não possuem capacidade para avaliar ocorrência de vírus entéricos na água (SILVA et al., 2011).

A importância do controle de qualidade da água tem motivado à necessidade do desenvolvimento de procedimentos analíticos adequados e sensíveis, apesar dos mesmos serem de alto custo e de difícil implantação. A realização de pesquisas para avaliar as várias técnicas de detecção de vírus em amostras de água, podendo ser testadas, comparadas e combinadas, permitirá grandes possibilidades de inovação nesse campo (CALGUA et al., 2008, CALGUA et al., 2013).

O presente trabalho tem como objetivo avaliar a eficiência do uso de uma formulação a base de caseína micelar concentrada em um método para concentração de partículas virais em água do mar através da floculação das moléculas de proteínas em meio ácido. Essa inovação propõe a substituição do uso de formulações a base de leite em pó desnatado nas técnicas de concentração de partículas virais através da floculação orgânica por uma formulação a base de caseína micelar concentrada adicionada às amostras de água do mar.

Um ensaio foi realizado com o intuito de observar a eficiência da utilização da caseína micelar na concentração de partículas virais em amostras de água contaminadas *in vitro* com rotavírus (RV) comparando-o com a técnica já padronizada por Calgua *et al.* (2008) que realiza a floculação orgânica utilizando uma solução de leite em pó desnatado 1% (w/v). Este novo método também se baseia na adsorção dos vírus às proteínas pela floculação orgânica.

5.2 METODOLOGIA

5.2.1 Cultivos celulares

Para a realização da contaminação experimental das amostras de água do mar sintética com RV com o intuito de avaliar a eficiência da caseína micelar, foi primeiramente necessária a produção de RV em cultura de células MA-104. Neste trabalho foi utilizada a cepa de referência Simian rotavirus (SA11).

As técnicas para a produção do RV foram realizadas em monocamadas confluentes de células de rim de macaco, pertencentes à linhagem MA-104. Para o cultivo das células da linhagem MA-104, foram utilizadas garrafas tipo Roux, mantendo as células em D-MEM (Meio Essencial Eagle) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB). Para o repique da cultura celular foi utilizada a técnica de desagregação enzimática com tripsina 0,25% (BLAKE & STACEY, 1999).

5.2.2 Produção do Vírus

A produção do RV foi realizada em monocamadas confluentes de células MA-104. As células foram lavadas com PBS para remoção do soro bovino e, após a ativação do vírus (obtido a partir da suspensão viral de cultivos anteriores na mesma linhagem) por 30 minutos a 37°C com tripsina (20 µg/ml de meio), seguiu-se a adsorção viral durante 1 hora a 37°C. Logo após o período de adsorção viral, a monocamada infectada foi incubada a 37°C com Meio Essencial Mínimo-Eagle (MEM-E) contendo tripsina 2µg/ml, até a observação do efeito citopático total (desprendimento da monocamada de células infectadas), geralmente ocorrido 48h após a infecção. Posteriormente, as garrafas foram submetidas a um ciclo de congelamento (-20°C) e descongelamento, e o sobrenadante e as células infectadas foram centrifugados a 10000g, durante 30 minutos a 4°C. O sobrenadante foi coletado e armazenado (-20°C) até seu posterior uso.

5.2.3 Titulação do Vírus

A titulação do vírus infeccioso se realizou por observação do efeito citopático em monocamadas de células MA-104 cultivadas em placas de 24 poços. A monocamada foi infectada com diluições logarítmicas (fator 10) do vírus em quadruplicata (0,1 ml) e incubada a 37°C em estufa com atmosfera de 5% de CO₂. A leitura do título do vírus foi realizada após 48 horas, observando-se o efeito citopático e calculando-se o título infeccioso em DICT50/ml (Dose Infecciosa em Cultivo de Tecidos) segundo o método de REED & MUENCH (1938).

5.2.4 Avaliação da eficiência do uso de caseína micelar na concentração de partículas virais

Amostras de água do mar sintética (contendo 10 litros cada uma) foram contaminadas em duplicata com os seguintes volumes de suspensão viral obtida a partir da produção de RV em cultura de células MA-104 ($10^{3.5}$ DICT50/mL): 1mL, 0.5 mL, 0.25 mL e 0.125 mL. As amostras foram concentradas pelo método proposto ou pelo método estabelecido por Calgua *et al.* (2008), posteriormente o RNA viral foi extraído e sua análise foi realizada por RT-PCR e nested-PCR convencionais com primers específicos para RVA. As duas técnicas foram realizadas em condições idênticas, apenas substituindo no procedimento do novo método o leite em pó desnatado por um outro composto a base de proteínas (Figura 01).

5.2.5 Concentração de partículas virais das amostras de água

As amostras de água do mar sintética foram processadas conforme o método de floculação orgânica desenvolvido por Calgua *et al.* (2008). A técnica consiste na concentração de vírus presentes na amostra de água em um volume final aproximadamente 10 vezes menor. Esta metodologia possui a vantagem de utilizar apenas um passo na concentração das amostras, economizando tempo, reagentes e evitando a manipulação excessiva das mesmas, o que pode provocar perdas nas recuperações virais.

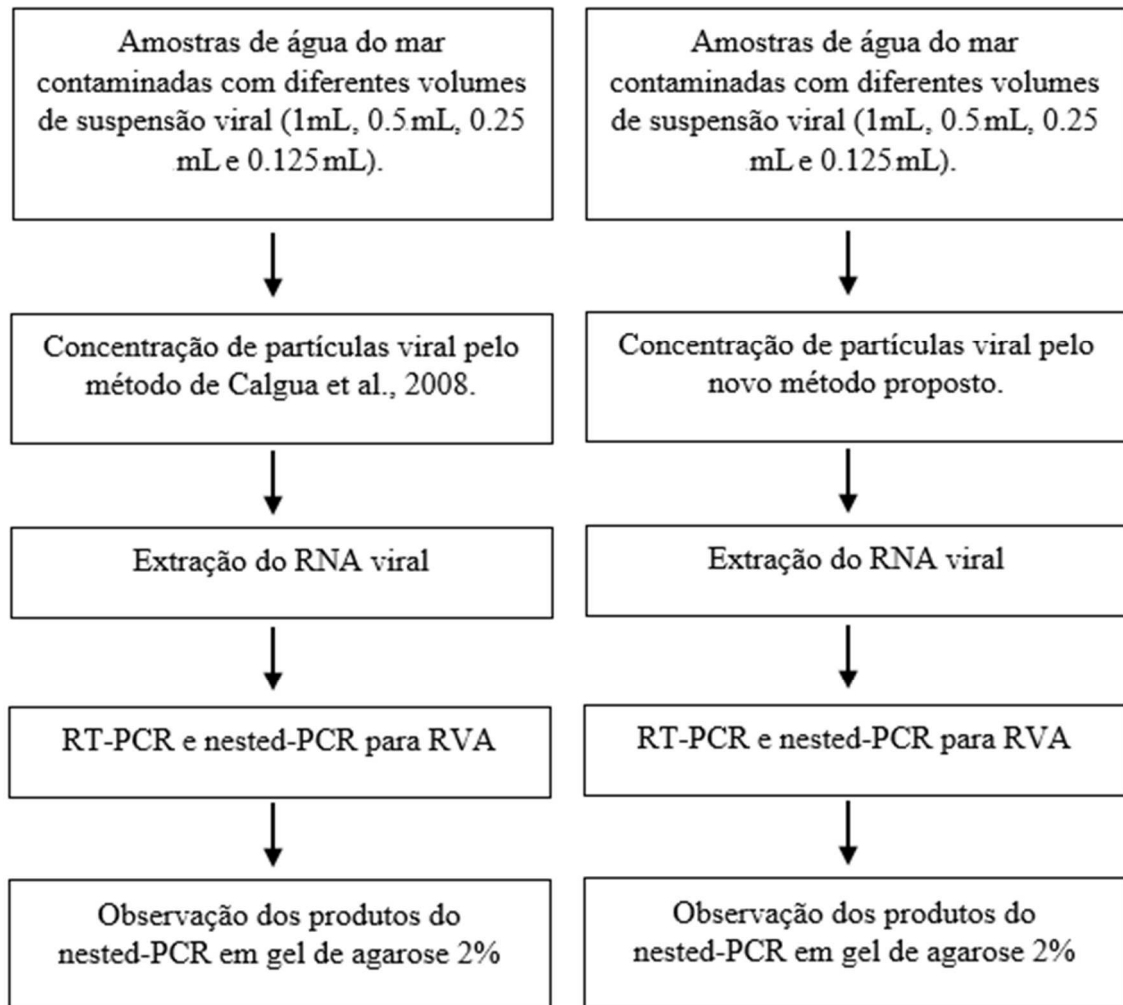


Figura 01: Esquema para contaminação experimental das amostras de água do mar sintética com RV para validação do novo método proposto.

O procedimento é descrito por meio da seguinte técnica:

- Etapa 1: Preparo de solução de água do mar sintética. Foi adicionado 33,33g de sal marinho em 500ml de água destilada e 500ml de água de torneira (ou 1 litro de água destilada).

- Etapa 2: Preparo da solução de leite em pó desnatado 1% (w/v). Adicionou-se 10g de leite em pó desnatado em 1000 mL de água do mar sintética e cuidadosamente o pH da solução foi ajustado para 3,5 com HCl 1N.

- Etapa 3: Concentração de partículas virais. Uma amostra de água com o volume de 10 litros teve inicialmente o seu pH ajustado para 3,5 com HCl 1N, sob agitação. Adicionou-se à amostra 100 mL de solução de leite em pó desnatado 1% (w/v). A amostra foi mantida sob agitação em temperatura ambiente durante 8 horas. Em seguida, a amostra foi mantida em repouso em temperatura ambiente durante 8 horas. Posteriormente, foi removido aproximadamente 9,5 litros do sobrenadante por meio de sucção sem ressuspender o sedimento, pois o mesmo será posteriormente centrifugado. O volume restante foi homogeneizado e em seguida centrifugado a 7000xg por 30 min a 4°C. O sobrenadante foi então cuidadosamente removido e o pellet obtido foi dissolvido em 2ml de PBS (pH 7,5) e estocado (-70°C) até ser analisado por técnicas de biologia molecular.

O novo método proposto para concentração de partículas virais foi realizado conforme o protocolo acima descrito, apenas substituindo no procedimento da nova técnica o leite em pó desnatado por um outro composto a base de caseína micelar.

5.2.6 Processamento das amostras para extração do RNA viral

O RNA viral foi extraído das amostras utilizando o kit QIAmp viral RNA (QIAGEN, Alemanha) segundo as instruções do fabricante. Após a extração, esse material foi submetido às técnicas de RT-PCR e nested-PCR (qualitativo) para detecção de RVA e de RT-PCR em tempo real (RT-qPCR) para detecção de NoV e HAV.

5.2.7 RT-PCR e Nested-PCR para detecção de RVA

O RNA viral foi, primeiramente, desnaturado a 97°C por 5 minutos na presença do par de iniciadores específicos para o segmento 9-VP7 (Gouvea, 1993), posteriormente resfriado em banho gelado por 5 minutos e em seguida foi adicionado ao tubo eppendorf contendo o kit AccessQuick™ RT-PCR System acrescido da enzima AMV Reverse Transcriptase (Promega, USA), segundo as instruções do fabricante. O volume final da reação foi de 50µL e as amplificações foram realizadas no termociclador GeneAmp PCR System 2400 (Perkin Elmer).

A amplificação do segmento 9 foi realizada sob as condições descritas por Gouvea (1993). Primeiramente, foi realizado ciclo de conversão do RNA em DNA a 42°C por 45 minutos, seguido de 94°C por 1 minuto. Após a reação de RT, iniciou-se a PCR com 30 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento a 42°C por 2 minutos e extensão a 72°C por 1 minuto, seguido de extensão final a 72°C por 7 minutos e conservação a 4°C.

Para a reação do nested-PCR, o cDNA obtido no RT-PCR foi adicionado a uma solução contendo o Go Taq® Green Master Mix (Promega, USA) e os iniciadores específicos do fragmento do segmento 9-VP7 para detecção de RVA (Gouvea, 1993), segundo as instruções do fabricante. O volume final da reação foi 50µL, e as amplificações foram realizadas no termociclador GeneAmp PCR System 2400 (Perkin Elmer).

A segunda amplificação foi realizada sob as condições descritas por Gouvea (1993), com 25 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento a 42°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 1 minuto, seguido de extensão final a 72°C por 7 minutos e conservação a 4°C.

O produto do nested-PCR foi submetido à corrida eletroforética em gel de agarose a 2%, a 100V por 45 minutos. Posteriormente o gel foi corado com Brometo de Etídeo durante 10 minutos e os fragmentos genômicos amplificados foram visualizados e fotografados no foto-revelador.

5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A observação da cultura das células da linhagem MA-104 infectadas com RV determinou a ocorrência do efeito citopático total (desprendimento da monocamada de células

infectadas), geralmente ocorrido 48h após a infecção (Figura 02). O título infeccioso obtido do vírus foi de $10^{3.5}$ DICT50/mL.

Os resultados da avaliação da eficiência da caseína micelar na concentração de partículas virais estão apresentados na Figura 03, demonstrando um gel de agarose a 2%, onde ocorreu a eletroforese dos produtos de amplificação das reações. A observação de bandas com 257pb foi considerada como resultado positivo, indicando a presença de rotavírus nas amostras.

Como mostra a Figura 03, o ensaio utilizando a formulação a base de caseína micelar obteve resultados positivos em todas as amostras de água do mar sintética contaminadas com suspensão viral nas diversas concentrações.

Ainda é possível observar na Figura 03 que o ensaio utilizando a formulação a base de leite em pó desnatado detectou a presença de RVA apenas nas amostras de água do mar sintética contaminadas com 1mL de suspensão viral. Porém, não foi detectada a contaminação nas demais amostras de água do mar sintética contaminadas com suspensão viral em menores concentrações.

A caseína micelar, produzida industrialmente por meio da separação do soro do leite por diversos processos, é uma das principais proteínas com funcionalidade tecnológica em alimentos e apresenta concentração de proteínas significativamente superior à do leite em pó desnatado (ROMAN & SGARBIERI, 2005). O alto teor de proteínas da caseína micelar pode aumentar a adsorção das partículas virais e dessa forma aumentar a eficiência da técnica.

A inovação referida neste estudo propõe o uso de uma formulação a base de caseína micelar concentrada visando aumentar a sensibilidade do método de concentração de partículas virais por meio de floculação orgânica que sejam aplicados na detecção de vírus em amostras de água por técnicas de biologia molecular, em substituição ao uso de composições a base de leite em pó desnatado.

5.4 CONCLUSÕES

A utilização de caseína micellar na concentração de partículas virais em água apresentou melhor sensibilidade do que a técnica de floculação orgânica que utiliza formulação a base de leite em pó desnatado.

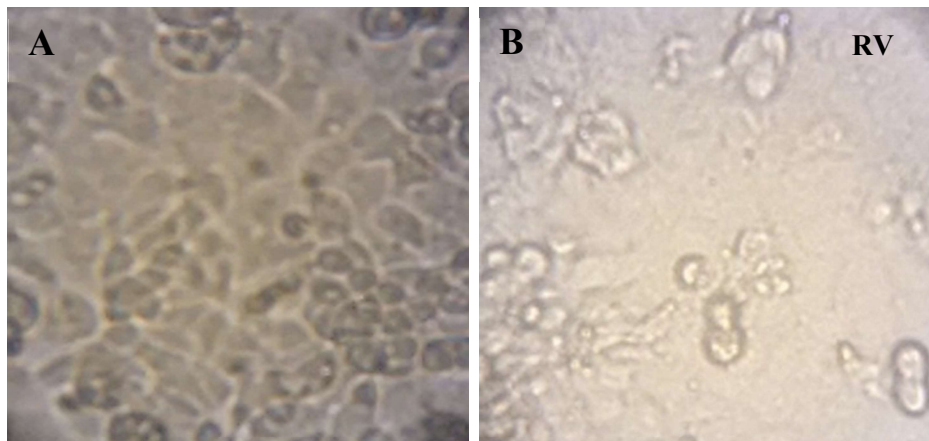


Figura 02: Cultura de Células MA-104 infectadas com RV. **A:** cultivo mock (células sem presença de RV); **B:** cultivo de MA104 infectadas com RV.

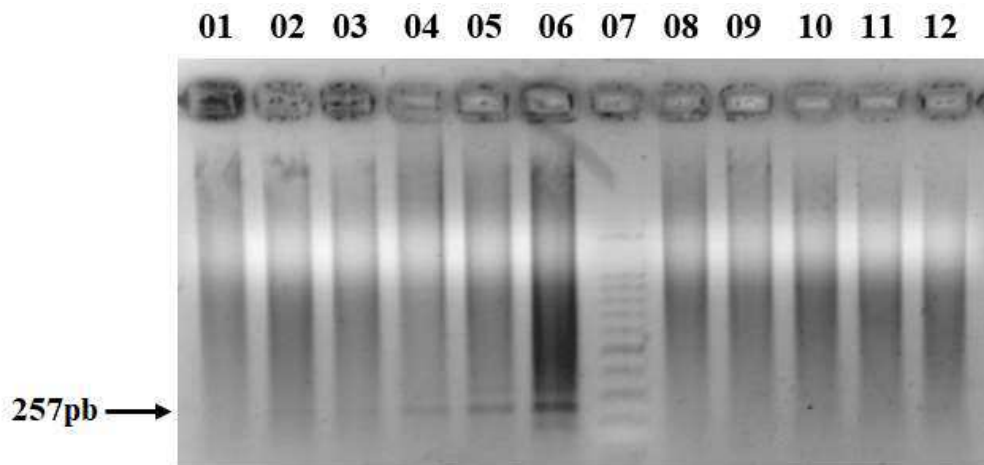


Figura 03: Imagem de gel de agarose 2% após produtos do nested-PCR de amostras contaminadas experimentalmente com RV serem submetidos à eletroforese. O tamanho do produto de nested-PCR esperado é de 257pb. Colunas 01 a 05: Resultados do ensaio para validação do novo método proposto. Coluna 01: controle negativo do ensaio; Colunas 02, 03, 04 e 05: amostras de água do mar sintética contaminadas com 0.125 mL, 0.25 mL, 0.5 mL e 1mL de suspensão viral, respectivamente. Coluna 06: controle positivo das reações de RT-PCR e nested-PCR. Coluna 07: marcador de peso molecular (100pb). Colunas 08 a 12: Resultados do ensaio utilizando formulação a base de leite em pó desnatado. Coluna 08: controle negativo do ensaio; Colunas 09, 10, 11 e 12: amostras de água do mar sintética contaminadas com 0.125 mL, 0.25 mL, 0.5 mL e 1mL de suspensão viral, respectivamente.

5.5 REFERÊNCIAS

BLAKE, K; STACEY, A. Cell Culture in **Virus Culture – A Practical Approach**. Oxford University Press, Nova York 1: 1-32, 1999.

CALGUA, B.; MENGEWEIN, A.; GRUNERT, A.; BOFILL-MAS, S.; CLEMENTE-CESARES, P.; HUNDES, A.; WYN-JONES, A. P.; LÓPEZ-PILA, J. M.; GIRONES, R. Development and application of a one-step low cost procedure to concentrate viruses from seawater samples. **Journal of Virological Methods**, 153, p. 79-83, 2008.

CALGUA, B.; RODRIGUEZ-MANZANO, J.; HUNDESA, A.; SUÑEN, E.; CALVO, M.; BOFILL-MAS, S.; GIRONES, R. New methods for the concentration of viruses from urban sewage using quantitative PCR. **Journal of Virological Methods**, 187, p. 215–221, 2013.

GOUVEA, V. **PCR Detection of Rotavirus**. In: PERSING, D. H. *Diagnostic Molecular Microbiology: Principles and Applications*. American Society for Microbiology, p. 383-388, 1993.

REED, L. J.; MUENCH, H. A. Simple method of estimating 50 per cent and point. **American Journal of Hygiene**, 27, p. 493-497, 1938.

ROMAN, J. A.; SGARBIERI, V. C. Obtenção e caracterização química e nutricional de diferentes concentrados de caseína. **Rev. Nutr.**, 18(1), p. 75-83, 2005.

SILVA, H. D.; ANUNCIACÃO, C. E.; SANTOS, S. F. O.; GARCÍA-ZAPATA, M. T. Análise virológica da qualidade da água: uma revisão das metodologias de concentração e detecção viral. **R. bras. Bioci.**, v.9, n.3, p. 405-415, 2011.

6 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos no presente trabalho demonstraram que a técnica de concentração de partículas virais por meio da floculação orgânica pelo leite em pó desnatado e acidificado é eficiente e viável para a detecção de vírus em amostras de águas ambientais.

Foi observado que existe um grande problema de contaminação ambiental por meio de despejo de resíduos de esgoto nas águas do mar e de rios e isto foi comprovado pela detecção de RVA e NoV em amostras de água obtidas das praias da costa litorânea bem como da foz de alguns rios localizados na área urbana do município de Salvador.

Este trabalho foi o primeiro estudo brasileiro que demonstrou que as águas oceânicas e fluviais da cidade de Salvador apresentam contaminações variadas de vírus de transmissão fecal-oral.

A reduzida quantidade de pesquisa científica no Brasil comprovando a existência de agentes virais patogênicos em águas ambientais torna este trabalho importante por alertar sobre a importância do monitoramento desses patógenos no meio ambiente.

A detecção de vírus entéricos nas águas do mar e de rios revela a precariedade do sistema de esgotamento sanitário do município de Salvador e que há grandes riscos da ocorrência de graves problemas na saúde pública. Além disso, esses patógenos podem ser transmitidos para a população através do consumo de animais marinhos obtidos nessa região costeira.

Por fim, três sugestões se apresentam nesse trabalho: (1) É necessário que o emprego da detecção virológica da água seja implementada nas práticas dos órgãos responsáveis pelo monitoramento das condições ambientais. (2) É muito importante que novas pesquisas sejam desenvolvidas na detecção de vírus entéricos nos ambientes aquáticos do estado da Bahia, com a expansão da investigação científica de mais pontos de coletas de água do mar e de rios. (3) É interessante que o novo método proposto neste trabalho para uma inovadora técnica de detecção viral em amostras de água seja utilizado em amostras obtidas nas fontes naturais de água do mar e de rios.

ANEXOS

Food and Environmental Virology

Detection of Rotavirus, Norovirus and Hepatitis A Virus in seawater and river water samples from Salvador City, Bahia, Brazil.

--Manuscript Draft--

Manuscript Number:					
Full Title:	Detection of Rotavirus, Norovirus and Hepatitis A Virus in seawater and river water samples from Salvador City, Bahia, Brazil.				
Article Type:	Original Research				
Keywords:	Water; enteric virus; RT-PCR				
Corresponding Author:	André Mário Mendes Silva Universidade Federal do Recôncavo da Bahia Santo Antonio de Jesus, Bahia BRAZIL				
Corresponding Author Secondary Information:					
Corresponding Author's Institution:	Universidade Federal do Recôncavo da Bahia				
Corresponding Author's Secondary Institution:					
First Author:	André Mário Mendes Silva				
First Author Secondary Information:					
Order of Authors:	André Mário Mendes Silva Gúbio Soares Campos Dellane Martins Tigre Ítalo Santos Uzeda Sílvia Ines Sardi				
Order of Authors Secondary Information:					
Funding Information:	<table border="1"><tr><td>Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia</td><td>Not applicable</td></tr><tr><td>Ministério da Saúde (PPSUS)</td><td>Not applicable</td></tr></table>	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia	Not applicable	Ministério da Saúde (PPSUS)	Not applicable
Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia	Not applicable				
Ministério da Saúde (PPSUS)	Not applicable				

DEPÓSITO DE PATENTE

**“PROCESSO PARA CONCENTRAÇÃO DE PARTÍCULAS VIRAIS
EM AMOSTRAS DE ÁGUA”**

**“PROCESSO PARA CONCENTRAÇÃO DE PARTÍCULAS VIRAIS
EM AMOSTRAS DE ÁGUA”**

RESUMO

A presente invenção refere-se a uma formulação a base de caseína micelar concentrada e sua utilização em um método para concentração de partículas virais em amostras de água através da floculação orgânica das moléculas de proteínas em meio ácido. As combinações da invenção têm como objetivo substituir o uso de formulações a base de leite em pó desnatado nas técnicas de concentração de partículas virais através da floculação orgânica por uma formulação a base de caseína micelar concentrada adicionada às amostras de água.



Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT

Número do Processo: BR 10 2017 018662 8

Dados do Depositante (71)

Depositante 1 de 1

Nome ou Razão Social: ANDRÉ MÁRIO MENDES DA SILVA

Tipo de Pessoa: Pessoa Física

CPF/CNPJ: 91860520553

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Professor do ensino superior

Endereço: Praça Mascarenhas de Moraes, 04, 1º andar, Vila Ruy Barbosa

Cidade: Salvador

Estado: BA

CEP: 40430145

País: Brasil

Telefone: (71) 33130664

Fax:

Email: andremendes@ufrb.edu.br



**SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
MINISTÉRIO DA INDÚSTRIA, COMÉRCIO EXTERIOR E SERVIÇOS
INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL**

EXAME PRELIMINAR

N.º do Pedido: BR102017018662-8 **N.º de Depósito PCT:**
Data de Depósito: 30/08/2017

O pedido atende formalmente as disposições legais, especialmente quanto ao Art. 19 da LPI e o Instrução Normativa nº 31/2013, estando apto a ser protocolado.

Condições do Pedido	S	N
Requerimento de depósito com os campos obrigatórios preenchidos	X	
Idioma Português	X	
Relatório Descritivo	X	
Reivindicações	X	
PI e C – Apresenta desenhos citados ou não cita nem apresenta desenhos. MU – Apresenta desenhos.	X	
Resumo	X	
Formatado no padrão exigido	X	
Valor correto de Recolhimento	X	

Rio de Janeiro, 12 de janeiro de 2018.

Bruno Hugo Cerqueira da Fonseca
Mat. Nº 1529020
DIRPA / COSAP/SEFOR