

Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

AUTOR (a): Fabiana Fioretti Martins Ferreira

Detecção e Caracterização Molecular de Rotavírus Grupo A em Igarapés da Cidade de Manaus, Amazônia Central

ORIENTADOR (ES): Dra. Marize Pereira Miagostovich

Dr. José Paulo Gagliardi Leite

Aprovada em: 28 / 05 / 07

Examinadores:

Dr. Christian Maurice Gabriel Niel - IOC - Presidente

Dra. Constança Felícia De Paoli de Carvalho Britto - IOC

Dr. Marcos Bryan Heinemann - UFMG

Rio de Janeiro, 28 de maio de 2007

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Ficha catalográfica elaborada pela
Biblioteca de Manguinhos / CICT / FIOCRUZ - RJ

F383 Ferreira, Fabiana Fioretti Martins

Detecção e caracterização molecular de rotavírus grupo A em igarapés da cidade de Manaus, Amazônia Central / Fabiana Fioretti Martins Ferreira. – Rio de Janeiro, 2007.

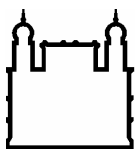
xv, 75 f. : il. ; 30 cm.

Dissertação (mestrado) – Instituto Oswaldo Cruz, Biologia Celular e Molecular, 2007.

Bibliografia: f. 55-74.

1. Rotavírus – Manaus. 2. Rotavírus – Manaus – Classificação.
3. Rotavírus – Manaus – Genética. 4. Água. 5. Genótipo. I. Título.

CDD: 579.254



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

AUTOR (a): Fabiana Fioretti Martins Ferreira

Detecção e Caracterização Molecular de Rotavírus Grupo A em Igarapés da Cidade de Manaus, Amazônia Central

ORIENTADOR (ES): Dra. Marize Pereira Miagostovich

Dr. José Paulo Gagliardi Leite

Aprovada em: 28 / 05 / 07

Examinadores:

Dr. Christian Maurice Gabriel Niel - IOC - Presidente

Dra. Constança Felícia De Paoli de Carvalho Britto - IOC

Dr. Marcos Bryan Heinemann - UFMG

Rio de Janeiro, 28 de maio de 2007

“Porque os anjos têm asas como as aves. Porque os homens têm pêlos como os bichos. E todos nós temos almas como Deus”.

São Francisco de Assis

Dedico mais esta conquista aos meus pais,
Mucio e ***Angelica***, e às minhas irmãs,
Fernanda e ***Flavia***.

AGRADECIMENTOS

- À minha orientadora, Dra. Marize P. Miagostovich, por suas dicas, incentivos, palavras de conforto, confiança, carinho e amizade. Além de excelente profissional, mostrou-se uma mãe ao longo dessa jornada. Sua ajuda foi essencial em cada etapa deste trabalho;
- Ao meu orientador Dr. José Paulo G. Leite, pelo carinho e confiança. Foram indispensáveis suas críticas e conselhos para a finalização desta dissertação;
- Ao Dr. Christian Niel, à Dra. Constança Britto e ao Dr. Marcos Bryan por aceitarem o convite de participar como membros titulares da banca examinadora; e às Dras. Márcia Terezinha de Moraes e Souza e Flávia dos Santos por aceitarem participar como suplentes da banca examinadora;
- À Dra. Márcia Terezinha de Moraes e Souza pela excelente revisão e críticas construtivas;
- À Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular do Instituto Oswaldo Cruz – FIOCRUZ;
- Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (Processo nº 472112/20040), à Vice-Presidência de Serviço de Referência e Ambiente e à FIOCRUZ pelo suporte financeiro;
- Ao Instituto Leônidas e Maria Deane/ FIOCRUZ/ AM e ao Instituto de Pesquisas da Amazônia pelo apoio as coletas e desenvolvimento deste projeto;
- À Dra. Márcia Terezinha de Moraes e Souza e à Dra. Ana Carolina de Góes (Biomanguinhos/ Fiocruz/ RJ) pela orientação e colaboração na etapa de clonagem;
- À Dra. Ana Gaspar e aos colegas Leonardo Diniz e Dra. Vanessa de Paula (Instituto Oswaldo Cruz/ Fiocruz/ RJ) e ao Dr. Sérgio Bessa Luz (Fiocruz/ AM) pelo apoio imprescindível nas coletas de campo;

- Aos meus colegas do grupo de pesquisa da Virologia Ambiental do Laboratório de Virologia Comparada: Flávia Guimarães, Túlio Fumian, Carmem Vieira e Matias Montero. Sem a ajuda de vocês eu não teria chegado ao fim. Obrigada pelo companheirismo e pelo espírito de equipe;
- Aos companheiros do Laboratório de Virologia Comparada: Alexandre Fialho, Alexandre Pina, Ana Maria Pinto, Edson Filho, Eduardo Volotão, Francisca dos Santos, Gilmar Alcântara, Irene Araújo, Joeler Vargas, Ludmila Rocha, Luis Fernando López, Maria da Penha Xavier, Marilda Almeida, Mônica Ferreira, Regianne Guedes, Rosane Assis e Tatiana Robaina pela ajuda e agradáveis momentos de descontração;
- À Carmen Vieira e Marcelle da Silva pela amizade e impagáveis momentos de diversão;
- Aos meus pais, Mucio e Angelica, sempre confiantes, corujas e grandes incentivadores da minha pesquisa. A satisfação de vocês me mantém viva, o amor de vocês me sustenta; vocês são meu porto seguro. Agradeço a Deus por tê-los como pais todos os dias. Esta dissertação reflete as inúmeras horas de atenção a mim dedicada por todos esses anos. Obrigada pela educação que me deram, pela compreensão, pelas críticas e pelo amor incondicional;
- Às minhas irmãs Fernanda e Flavia pela companhia e torcida em todas as horas. Vocês são meu orgulho;
- Aos todos os meus amigos pelas lamentações ouvidas e pelos incentivos;
- Aos meus familiares (primos e tios) pela presença e preocupação. À minha tia Ana, em especial, que mesmo não sendo minha madrinha, sempre teve as qualidades de uma;
- Aos meus avós, que mesmo ausentes, me ajudaram a trilhar este caminho com luz. Obrigada Vó Ida;
- E por último, mas certamente não menos importante, à Deus.

SUMÁRIO

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS.....	XI
LISTA DE FIGURAS.....	XIV
LISTA DE QUADROS	XV
LISTA DE TABELAS.....	XV
RESUMO	1
ABSTRACT	2
1 INTRODUÇÃO.....	3
1.1 Generalidades.....	3
1.2 Ferramentas para detecção viral a partir de amostras de água.....	5
1.3 Os rotavírus	6
1.3.1 Histórico e classificação	6
1.3.2 Partícula viral.....	7
1.3.3 Epidemiologia.....	9
1.3.4 Propriedades físico-químicas	12
1.3.5 Genoma e diversidade genética.....	12
1.3.6 Replicação	14
1.3.7 Imunidade	15
1.3.8 Diagnóstico laboratorial	16
1.3.9 Tratamento e profilaxia.....	17
2 JUSTIFICATIVA	19
3 OBJETIVOS	21

3.1 Objetivo Geral	21
3.2 Objetivos Específicos	21
4 MATERIAL E MÉTODOS	22
4.1 Área de estudo	22
4.2 Período de coletas	25
4.3 Iniciadores de cadeia	26
4.4 Padronização do método de qPCR	27
4.4.1 Estabelecimento da curva padrão	27
4.4.2 Condições da reação de quantificação	31
4.5 Detecção de rotavírus grupo A na área de estudo	32
4.5.1 PCR e <i>semi-nested</i> PCR para detecção e genotipagem dos genes que codificam as proteínas VP4 e VP7	34
4.5.2 Detecção e quantificação do gene que codifica a proteína VP6	36
4.5.3 Sequenciamento parcial do gene que codifica a proteína VP6 (nt 747 – 1126)	36
4.5.4 Análise filogenética das sequências das sequências parciais do gene 6	37
4.6 Análise estatística	37
4.7 Determinação da eficiência do método de concentração viral	37
5 RESULTADOS	39
5.1 Padronização da qPCR	39
5.2 Detecção e genotipagem dos genes que codificam as proteínas VP4 e VP7 de por RT-PCR e <i>semi-nested</i> PCR	41

5.3 Detecção e caracterização molecular do gene que codifica a proteína VP6 pela RT-PCR e por sequenciamento nucleotídico	42
5.4 Análise combinada dos métodos qualitativos de amplificação genômica para detecção de rotavírus grupo A.....	44
5.5 Detecção do gene que codifica a proteína VP6 pela qPCR.....	44
5.6 Determinação da eficiência do método de concentração viral	45
6 DISCUSSÃO	47
6.1 Eficiência do método de concentração viral.....	47
6.2 Detecção, quantificação e caracterização molecular de rotavírus grupo A.....	48
7 CONCLUSÕES.....	53
8 PERSPECTIVAS	54
9 REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICAS.....	55
10 ANEXOS.....	7

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

- – polaridade negativa
+ – polaridade positiva
 μL – microlitro
 μM – micromolar
A – adenina
 A_{260} – absorbância a 260nm
aa – aminoácido
AS – ácido siálico
C – citosina
 Ca^{++} - íon cálcio
CGLab – Coordenação Geral de Laboratórios
CMA – Comando Militar da Amazônia
CPRM – Companhia de Pesquisas de Recursos Minerais
DLPs – *double layered particles* (partículas imaturas, com duplo capsídeo)
DNA – ácido desoxiribonucleico
dXTP – desoxiribonucleotídeo
EDTA – ácido etilenodiamino tetracético
EGPA – eletroforese em gel de poliacrilamida
EGTA - ácido etileno glicol-bis b-aminoetileter N,N,N,N-tetraacético
EUA – Estados Unidos da América
f.d. – fita dupla
USFDA – *US Food and Drug Administration*
FIOCRUZ – Fundação Oswaldo Cruz
g – grama
G – guanina
GPS – Sistema de Posicionamento Global
GSK - GlaxoSmithKline
h - horas
HAV – vírus da hepatite A
HCl – ácido clorídrico
IBAM – Instituto Brasileiro de Administração Municipal

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
INPA – Instituto de Pesquisas da Amazônia
IOC – Instituto Oswaldo Cruz
kDa - kilodalton
LVC – Laboratório de Virologia Comparada
MAbs – anticorpos monoclonais
ME – microscopia eletrônica
mg – miligrama
MgCl₂ – cloreto de magnésio
mL – mililitro
mM – milimolar
mm – milímetros
NaOH – hidróxido de sódio
NCBI - *National Center for Biotechnology Information*
ng – nanograma
nm – nanômetro
NSP – proteína não estrutural
°C – graus centígrados
OMS – Organização Mundial de Saúde
ORF – fase de leitura aberta
P.A. – pró análise
pb – pares de base
PCR – reação em cadeia pela polimerase
pH – potencial hidrogeniônico
q.s.p. – quantidade suficiente para
RER – retículo endoplasmático rugoso
RFAD – Reserva Florestal Adolpho Ducke
RNA – ácido ribonucleico
RNAm – ácido ribonucléico mensageiro
RT-PCR - reação em cadeia pela polimerase precedida de transcrição reversa
RV – rotavírus
sp – espécie
SVS-MS – Secretaria de Vigilância em Saúde

T – timina

UNT – unidade nefelométrica de turbidez

UNESCO - Organização das Nações Unidas para a Educação, a Ciência e a Cultura

USEPA – *United States Environmental Protection Agency*

UTR – região não traduzida

VORH – vacina oral para rotavírus humano

VP – proteína estrutural

LISTA DE FIGURAS

FIGURAS

Figura 1.1	Vias de transmissão pela água de vírus entéricos.....	4
Figura 1.2	Estrutura da partícula de rotavírus (SA-11). Localização e mobilidade eletroforética das proteínas estruturais e não-estruturais e ácido nucléicos.....	7
Figura 1.3	Esquema representativo dos eletroferotipos dos diferentes grupos de rotavírus em gel de poliacrilamida.....	14
Figura 4.1	Mapa das bacias hidrográficas da cidade de Manaus, Amazônia Central.....	23
Figura 4.2	Localização dos pontos de coleta situados na cidade de Manaus. A) Mapa e Foto de satélite da cidade de Manaus. B) Fotos dos 13 pontos de coleta.....	24
Figura 4.3	Gráfico ilustrando a variação no nível de água do Rio Negro, de 1999 a 2001.....	26
Figura 4.4	Etapas do método de concentração viral a partir de amostras de água utilizado no estudo.....	32
Figura 4.5	Sistema de Filtração Millipore®	33
Figura 4.6	Concentrador Centriprep® YM-50, Millipore®	33
Figura 5.1	Gráfico ilustrativo da curva padrão utilizada na qPCR obtida de diluições seriadas do clone plasmidial 8200.....	39
Figura 5.2	Gráfico ilustrativo da curva de dissociação das concentrações de 5×10^2 a 5×10^6 cópias/reação do clone plasmidial 8200 gerada pela qPCR utilizando o sistema SYBR® Green.....	40
Figura 5.3	Gráfico ilustrativo da curva de dissociação do fragmento do gene 6 de uma amostra positiva para rotavírus grupo A amplificado pela qPCR utilizando o sistema SYBR® Green.....	40
Figura 5.4	Dendograma construído a partir de um fragmento do gene que codifica a proteína VP6 de rotavírus grupo A provenientes de amostras de água utilizando métodos Kimura 2 parâmetros e <i>neighbor-joining</i>	43

LISTA DE QUADROS

Quadro 4.1	Características dos pontos de coleta de água em igarapés de Manaus...	25
Quadro 4.2	Seqüência de iniciadores de cadeia utilizados nas PCRs para detecção e caracterização dos genes que codificam as proteínas VP4, VP6 e VP7.....	27
Quadro 4.3	Reagentes utilizados para reação de transcrição reversa do RNA.....	28
Quadro 4.4	Reagentes utilizados na PCR para detecção do gene que codifica a proteína VP6 de rotavírus grupo A.....	29
Quadro 4.5	Reagentes utilizados na qPCR para detecção do gene que codifica a proteína VP6 de rotavírus grupo A.....	31
Quadro 4.6	Reagentes utilizados na PCR para detecção dos genótipos G e P de rotavírus grupo A.....	34
Quadro 4.7	Reagentes utilizados na <i>semi-nested</i> PCR para detecção de genótipos G de rotavírus grupo A.....	35
Quadro 4.8	Reagentes utilizados na <i>semi-nested</i> PCR para detecção de genótipos P de rotavírus grupo A.....	35
Quadro 4.9	Reagentes utilizados na reação de sequenciamento.....	36

LISTA DE TABELAS

Tabela 5.1	Detecção e genotipagem dos genes que codificam as proteínas VP4 e VP7 de rotavírus grupo A pela RT-PCR e pela <i>semi-nested</i> PCR nas amostras estudadas.....	41
Tabela 5.2	Resultados obtidos a partir da RT-PCR para detecção do gene que codifica a proteína VP6 de rotavírus grupo A nas amostras estudadas.....	42
Tabela 5.3	Detecção do gene que codifica a proteína VP6 de rotavírus por SYBR® Green PCR em tempo real em amostras positivas e negativas por PCR convencional.....	45
Tabela 5.4	Eficiência do método de concentração viral por filtração em membranas carregadas negativamente descrito por Katayama e colaboradores (2002) na detecção de rotavírus grupo A.....	46

RESUMO

Os rotavírus grupo A (RV-A) são a causa mais comum de diarreia grave na infância em todo o mundo e estão associados a milhares de mortes ocorridas anualmente, principalmente em países em desenvolvimento. Estes vírus são transmitidos pela via fecal-oral, sendo excretados em altas quantidades nas fezes, podendo contaminar águas superficiais pelo contínuo despejo de esgotos domésticos. O processo de urbanização desordenada, ocorrido na cidade de Manaus, Amazônia Central, ocasionou inúmeros problemas no âmbito da saúde pública, como diminuição nas condições de saneamento básico, refletindo no aumento de doenças de veiculação hídrica como as diarreias. Com o objetivo de investigar a presença de RV-A em águas de igarapés de Manaus foi estabelecido uma metodologia de concentração viral associada a diferentes protocolos de detecção molecular. No período de agosto de 2004 a junho de 2005, quatro campanhas de coletas de água foram realizadas em 13 pontos georeferenciados definidos de acordo com diferentes graus de influência antrópica. As amostras de água foram concentradas pelo método de adsorção-eluição utilizando membrana de filtro carregada negativamente e concentrador Centriprep® YM-50. Diferentes protocolos qualitativos de reação em cadeia da polimerase precedida de transcrição reversa (RT-PCR) foram utilizados para detecção dos genes que codificam para as principais proteínas do capsídeo (VP4, VP6 e VP7). A análise conjunta dos resultados de RT-PCR demonstrou que 63% (33/52) das amostras foram positivas para RV-A, 75% destas provenientes de igarapés situados nas áreas urbanas. Dez amostras foram caracterizadas como G1, 15 como P[8], sendo uma mista P[4], P[8]. O subgrupo II, caracterizado pelo seqüenciamento parcial do gene 6, foi o único encontrado. A técnica de SYBR Green® PCR quantitativo em tempo real para detecção e quantificação de RV-A foi estabelecida, permitindo avaliar a eficiência do método de recuperação viral, que variou de 13% a 86% em diferentes matrizes aquáticas. A análise comparativa dos métodos de PCR qualitativo e quantitativo demonstrou que este último foi significativamente mais sensível na detecção de RV-A em águas de igarapé. Este estudo, pioneiro no Brasil na avaliação da contaminação por RV-A em águas de igarapés, demonstrou a eficiência das metodologias de concentração, detecção e caracterização molecular utilizadas, abrindo novas perspectivas para a avaliação da qualidade da água no Brasil, assim como para estudos de epidemiologia molecular de RV-A.

ABSTRACT

Rotavirus group A (RV-A) are the most common cause of severe diarrhea in young children all over the world and are associated to million deaths per year, especially in developing countries. These viruses are transmitted by the fecal-oral route, being excreted in high numbers in feaces, and may pollute superficial waters by the continue dump of domestic sewage. The disordered urbanization process that occurred in the city of Manaus, Central Amazon, caused many issues in the public health scope, like reduction in basic sanitary conditions, which reflected an increase in waterborne diseases such as diarrhea. In order to investigate the presence of RV-A in Manaus stream waters a viral concentration method was established and associated to different protocols of molecular detection. During august 2004 and june 2005, four collection periods were established in 13 georeferenced points defined according to different levels of anthropic influence. The water samples were concentrated by the adsorption-elution method using membrane filter negatively charged and concentrator Centriprep YM-50. Different qualitative protocols of polymerase chain reaction preceded by reverse transcription (RT-PCR) were used to detect the coding genes of the main structural capsid proteins (VP4, VP6 and VP7). The joint analyzes of the RT-PCR results showed that 63% (33/52) samples were positive for RV-A, 75% of those from urban streams. Ten samples were characterized as G1, 15 as P[8], being one mixed P[4], P[8]. The subgroup II, characterized by the partial sequencing of gene 6, was the only found. A SYBR Green[®] real time quantitative PCR technique for detection and quantification of RV-A was established, allowing the efficiency evaluation of the viral recovery method, that varied from 13% to 86% in different aquatic matrices. The comparative analysis of the qualitative and quantitative PCR methods demonstrated that the quantitative was significantly more sensitive in detecting RV-A from stream waters. This study, the first in Brazil in evaluating the RV-A contamination in stream waters demonstrated the efficiency of the concentration, detection and molecular characterization methodologies used, opening new perspectives for evaluation of water quality in Brazil, as for RV-A molecular epidemiology studies.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Generalidades

A água é um ingrediente essencial à vida, e talvez o recurso mais importante que a terra fornece à humanidade. Representa $\frac{3}{4}$ da superfície terrestre, sendo que destes, 97% estão em água do mar, 2,2% em geleiras e 0,8% em água doce (97% água subterrânea e 3% água superficial). Segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), o Brasil possui 168.870m^3 de recursos hídricos superficiais, o que representa 50% do total de recursos da América do Sul e 11% dos recursos mundiais (www.ibge.gov.br). Entre os inúmeros usos da água estão: abastecimento doméstico e industrial, irrigação, preservação da fauna e da flora, recreação e lazer, criação de espécies, geração de energia elétrica, navegação, harmonia paisagística e transporte de despejos (Von Sperling, 2005).

O conhecimento da água na ecologia e transmissão dos vírus varia e o papel desempenhado pelos vírus entéricos é menos estabelecido do que o de diversas bactérias e protozoários, principalmente devido à dificuldade em se detectar estes agentes em amostras de água (Wyn-Jones & Sellwood, 2001).

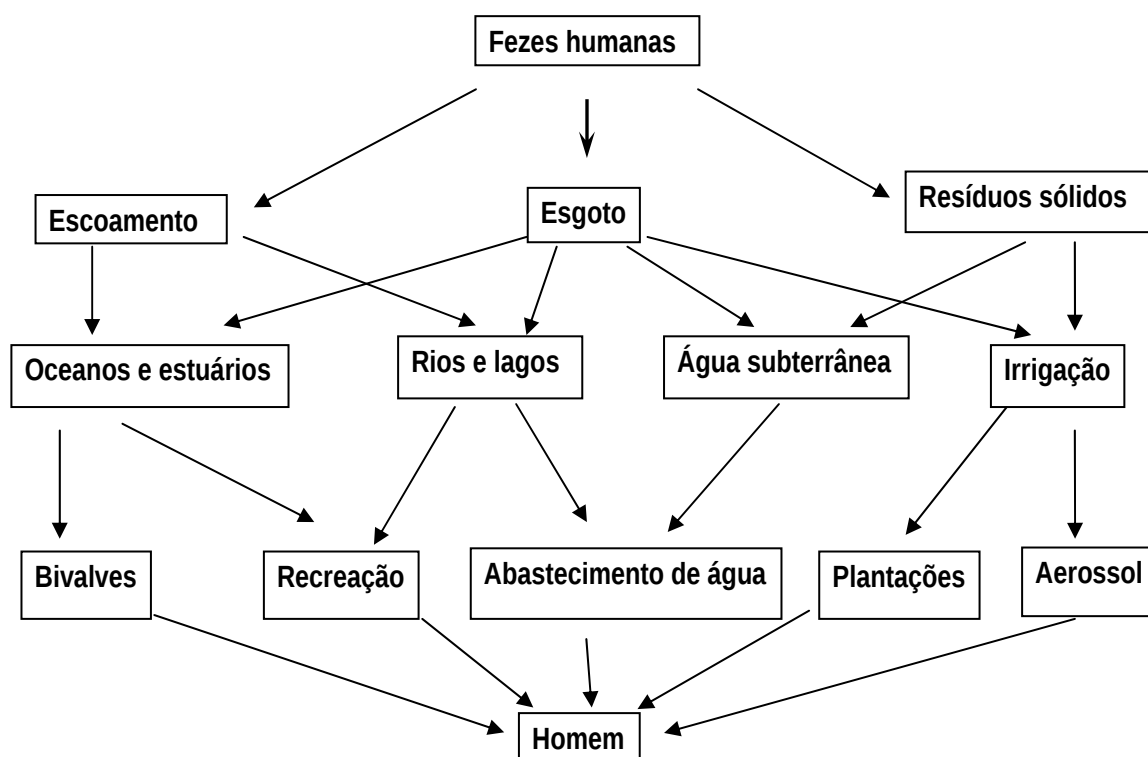
As doenças virais de veiculação hídrica podem ser adquiridas após o consumo de água ou alimentos contaminados, ou águas de recreação poluídas após contato direto pela pele ou ingestão (figura 1.1) (Wyn-Jones & Sellwood, 2001).

Mais de 100 tipos de vírus podem estar presentes em águas de esgoto sendo capazes de causar hepatites, gastroenterites, meningites, febre, conjuntivites, irritações na pele e até diabetes. Os vírus humanos entéricos, presentes no trato gastrointestinal de indivíduos infectados, podem ser eliminados através das fezes em concentrações extremamente elevadas, podendo variar de 10^5 a 10^{11} partículas virais por grama de amostra fecal (Farthing, 1989). Contaminam de forma direta ou indireta, águas destinadas ao consumo humano, podendo permanecer viáveis durante vários meses na água, resistindo a condições adversas. Podem ser identificados durante todas as estações do ano sendo capazes de resistir aos processos de tratamento de água e esgoto aplicados no controle bacteriano, inclusive cloração (Bosch, 1998).

O risco de se adquirir uma doença após contato com água contaminada com vírus é difícil de determinar. Para tal, torna-se importante conhecer a dose mínima

infectante de cada vírus. No caso dos vírus entéricos, uma única partícula viral é capaz de desencadear uma infecção, sendo duas a seis vezes menor que a dose mínima infectante para bactérias (Rao, 1982).

A pesquisa de vírus em águas teve início na década de 40, com a tentativa de se detectar poliovírus em água de esgoto (Melnick, 1947; Metcalf *et al.*, 1995). Na década de 50, o registro de 30.000 casos de hepatite em Nova Délhi, Índia, resultante de uma contaminação com esgoto do sistema de tratamento da água, direcionou os estudos na área de virologia ambiental. Na ocasião, o tratamento da água com alumínio e cloro foi suficiente para evitar infecções bacterianas, mas não para impedir a epidemia de hepatite (Metcalf *et al.*, 1995; Bosch, 1998). Mais recentemente, a demonstração de que a presença de vírus na água não possui correlação com índices de contaminação fecal, que utilizam indicadores bacterianos, em termos qualitativos e quantitativos alavancou os estudos nesta área (Schvoerer *et al.*, 2000; Gofti-Laroche *et al.*, 2001; Kittigul *et al.*, 2001).



Adaptado de Bosch (1998)

Figura 1.1: Vias de transmissão pela água de vírus entéricos.

1.2 Ferramentas para detecção viral a partir de amostras de água

O procedimento para análise de vírus em amostras de águas ambientais envolve diferentes etapas, tais como: coleta, clarificação, concentração, descontaminação/remoção de inibidores e detecção específica dos vírus. A concentração é uma etapa crítica, uma vez que os vírus estão presentes em quantidades reduzidas na água. Um bom método de concentração deve ser tecnicamente simples, rápido, promover alta recuperação viral, ser adequado para uma grande variedade de vírus entéricos, gerar um pequeno volume de concentrado e de baixo custo financeiro (Bosch, 1998; Wyn-Jones & Sellwood, 2001).

A associação de métodos de concentração viral com técnicas moleculares de amplificação de ácidos nucleicos representou, nos anos 80, uma nova era para a virologia ambiental. A técnica molecular mais utilizada atualmente é a reação em cadeia pela polimerase (PCR). Quando comparada ao isolamento viral em cultura de células, a PCR apresenta diversas vantagens como: a) redução no tempo requerido para obter-se o resultado; b) sensibilidade; c) baixo custo; e d) maior facilidade de realização (Abbaszadegan *et al.*, 1999; Schvoerer *et al.*, 2000; Gofti-Laroche *et al.*, 2001; Carducci *et al.*, 2003). Embora não permita diferenciar entre partículas infecciosas e não infecciosas, a detecção do genoma viral é considerada por muitos investigadores uma boa técnica para monitoramento de contaminação viral, principalmente por permitir a detecção de vírus fastidiosos ou daqueles que não se propagam em cultura celular. Além disso, a baixa estabilidade do ácido ribonucleico (RNA) livre no ambiente sugere que este método detecte partículas virais intactas e não o genoma viral livre da partícula (Abbaszadegan *et al.*, 1999; Schvoerer *et al.*, 2000; Wyn-Jones & Sellwood, 2001; Carducci *et al.*, 2003).

Outro fator relacionado às reações de amplificação genômica é o fato de que águas ambientais podem apresentar inúmeras substâncias, que quando concentradas, têm a capacidade de inibir a atividade das enzimas utilizadas nestas metodologias, gerando resultados falso – negativos. Dentre as principais substâncias inibidoras estão proteínas, carboidratos e os ácidos húmicos e fúlvicos. Portanto, a remoção de inibidores é um ponto crítico nos processos de concentração viral seguidos de amplificação genômica, e técnicas que utilizam diálise, extração com solvente,

ultrafiltração e purificação da amostra têm apresentado resultados satisfatórios (Ijzerman *et al.*, 1997; Souble *et al.*, 2000; Queiroz *et al.*, 2001; Katayama *et al.*, 2002).

Em todo o mundo, apesar da reconhecida importância da água na transmissão de vírus patogênicos, o padrão mais utilizado para o controle da qualidade microbiológica de águas ainda são os coliformes fecais, e poucos são os estudos que investigam a qualidade da água com padrões virológicos. A ausência de métodos de concentração viral de alta eficiência de recuperação e de métodos de detecção de baixo custo e complexidade tem sido apontada como responsável pelo pequeno número de estudos na área de virologia ambiental, havendo uma demanda crescente de estudos que estabeleçam métodos rápidos e sensíveis para detecção de vírus em amostras ambientais (Tavares *et al.*, 2005).

1.3 Os rotavírus

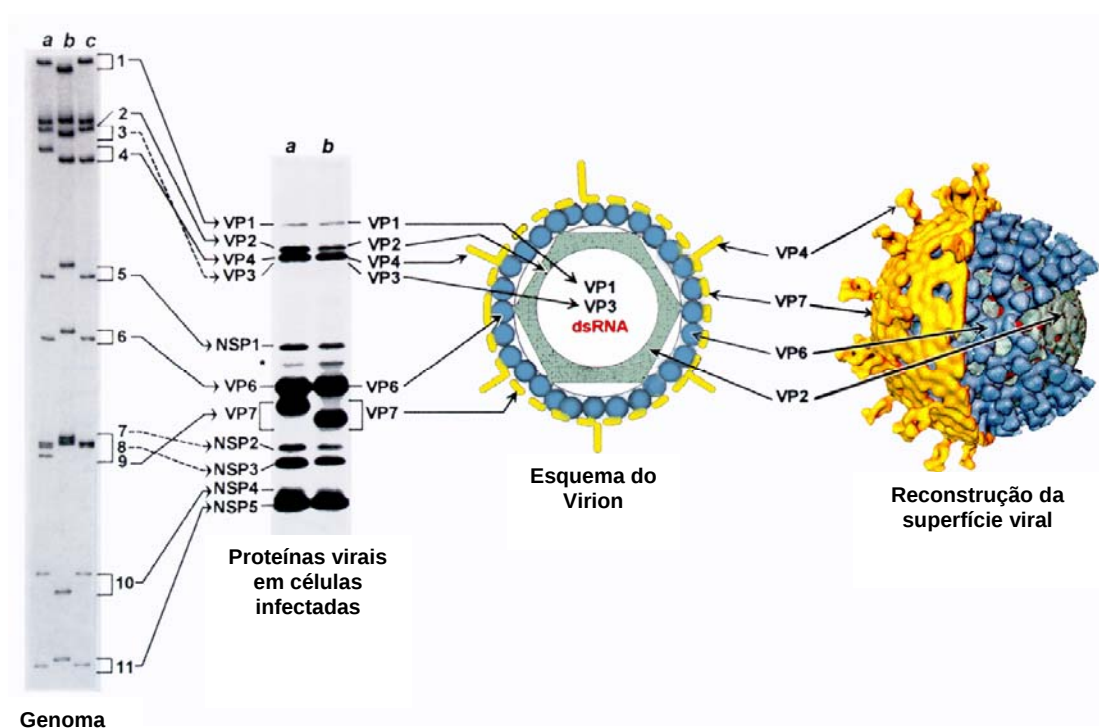
1.3.1 Histórico e classificação

Os rotavírus (RV) foram primeiramente descritos por Bishop e colaboradores (1973) na Austrália por microscopia eletrônica (ME) de amostras de biópsias do duodeno ou intestino delgado de crianças com diarreia aguda de origem não-bacteriana. Flewett e colaboradores (1973) observaram, também por ME, partículas virais semelhantes àsquelas descritas por Bishop e colaboradores em extratos de fezes de crianças com gastroenterite aguda. Algumas de suas primeiras denominações foram *Orbivirus-like* (Bishop *et al.*, 1973), *Reovirus-like* agent (Kapikian *et al.*, 1974) e *Duovirus* (Davidson *et al.*, 1975), esta última relacionada às duas camadas protéicas observadas pela ME. Posteriormente, foi proposta a criação de um novo gênero, *Rotavirus*, na família *Reoviridae*, diferente dos gêneros *Reovirus* e *Orbivirus*. O nome é derivado do latim *rota*, pelo aspecto da partícula semelhante a uma roda quando examinada por contrastação negativa pela ME (Flewett *et al.*, 1974).

Os RV apresentam três importantes especificidades antigênicas: grupo, subgrupo e sorotipo/genótipo. Os sorotipos por sua vez estão inseridos em sorogrupos (ou grupos), que são divididos em: A, B, C, D, E, F e G. Os RV grupo A (RV-A) são classificados também em subgrupos (I, II, I + II e não I não II) e sorotipos/genótipos G e P (Kapikian *et al.*, 2001).

1.3.2 Partícula viral

Os RV são vírus não envelopados de 70-80nm de diâmetro e capsídeo com simetria icosaédrica, formado por três camadas protéicas (triplo capsídeo viral), sendo elas o capsídeo externo, o capsídeo intermediário e o core, onde estão inseridos 11 segmentos de RNA de fita dupla (f.d.) (figura 1.2). Associado ao core, encontram-se três proteínas estruturais: VP1, VP2 e VP3, codificadas pelos segmentos genômicos 1, 2 e 3, respectivamente. Essas proteínas representam em conjunto aproximadamente 18% das proteínas virais (Kapikian *et al.*, 2001).



Adaptado de Conner & Ramig (1997)

a: rotavírus bovino B223; b: variante de origem símia SA11-4F; c: reestruturação entre os rotavírus B223 e SA11-4F. 1-11: segmentos de RNA f.d. do genoma viral; VP: proteína estrutural; NSP: proteína não estrutural; dsRNA: RNA fita dupla.

Figura 1.2: Estrutura da partícula de rotavírus (SA-11). Localização e mobilidade eletroforética das proteínas estruturais e não-estruturais e ácido nucléico.

O capsídeo externo é constituído de 120 cópias da proteína VP4, codificada pelo gene 4 e responsável pela caracterização dos sorotipos P, e de 780 cópias da proteína VP7, codificada pelos genes 7 (*rhesus*), 8 (rotavírus bovino UK) ou 9 (*simian* SA-11) e determinante dos sorotipos G (Prasad *et al.*, 1990; Kapikian *et al.*, 2001).

A VP4 é uma proteína não-glicosilada, com massa molecular de 88kDa e constitui 1,5% das proteínas virais (Kapikian *et al.*, 2001). Estudos têm demonstrado que VP4 participa da adesão e da penetração do vírus na célula, e tem papel importante na hemaglutinação, neutralização e virulência, além de induzir imunidade protetora em animais e crianças (Estes, 2001). Esta proteína é clivada em VP5* (60 kDa) e VP8* (28 kDa) pela ação de enzimas proteolíticas, o que resulta em um aumento da infectividade viral (Konno *et al.*, 1993).

A VP7 é uma proteína glicosilada, com massa molecular de 38kDa e a segunda mais abundante da partícula viral (30% das proteínas virais). É altamente imunogênica, induzindo a síntese de anticorpos neutralizantes (Kapikian *et al.*, 2001). A função precisa da VP7 durante a interação do vírus com a célula permanece indefinida, no entanto tem se postulado que a VP7 pode modular a VP4 durante o processo de adsorção, e também é capaz de interagir com moléculas da superfície celular, uma vez que o processo de interação já tenha sido iniciado pela VP4 (Jayaram *et al.*, 2004). Estudos têm demonstrado que o tratamento de partículas virais utilizando agentes quelantes de íons de cálcio (Ca^{++}) (EGTA ou EDTA) resulta na remoção do capsídeo externo através da dissociação dos trímeros de VP7 e, conseqüentemente, a perda de infectividade. Dessa forma, concentrações apropriadas de Ca^{++} são necessárias para manter a infectividade da partícula, aparentemente pela estabilidade da glicoproteína VP7. Ainda, baixas concentrações de Ca^{++} , semelhantes às do citoplasma, geram partículas incompletas ou *double-layered particles* (DLPs) que são ativas para transcrição e necessárias no ciclo de replicação dos rotavírus (Estes, 2001).

O capsídeo intermediário é formado pela proteína VP6, de massa molecular 41kDa, sendo esta uma das mais importantes proteínas estruturais e também a mais abundante (51%). Devido a essa característica, representa o antígeno mais comum utilizado nos testes de diagnóstico (Kapikian *et al.*, 2001). A VP6 interage com as proteínas VP7 e VP2, atuando na entrada do vírus na célula e na transcrição do RNA f.d. (Estes, 2001). É responsável pela classificação dos RV em grupos e dos RV-A em subgrupos de acordo com presença ou ausência de dois epítomos distintos reativos a

um, dois ou nenhum dos anticorpos monoclonais (MAbs) 255/60 e 631/9 (Greenberg *et al.*, 1983).

Quatro outras proteínas, não-estruturais, são codificadas por segmentos genômicos específicos: NSP1 (segmento 5), NSP2 e NSP3 (segmentos 7, 8 ou 9, dependendo da cepa viral) e NSP4 (segmento 10). As proteínas NSP5 e NSP6 são codificadas pelo segmento 11 (Kapikian *et al.*, 2001). As proteínas NSP1, NSP2, NSP3, NSP5 e NSP6 estão relacionadas à replicação viral, e interagem com o ácido nucléico. A NSP4 é uma glicoproteína transmembrana do retículo endoplasmático rugoso (RER) das células infectadas, e apresenta a função de receptor intracelular, sendo responsável pela aquisição de um envelope transitório nas partículas virais imaturas durante o brotamento das mesmas para o lúmen. Recentemente, tem se estudado a função da NSP4 como enterotoxina uma vez que sua liberação após lise celular e o concomitante estímulo de Ca^{++} nas células vizinhas contribuem para alterar o transporte de íons no epitélio intestinal, tendo como resultado a diarreia secretória (Estes, 2001).

1.3.3 Epidemiologia

As infecções por RV variam desde casos assintomáticos, principalmente em adultos, a casos graves de diarreia, que acometem principalmente bebês e crianças menores de 5 anos. Os sintomas mais comuns são: diarreia, vômito, dores abdominais e desidratação, sendo este último o principal fator de mortalidade do hospedeiro. A doença é autolimitada, e normalmente após uma semana ou 10 dias do início da infecção, o quadro se resolve (Kapikian *et al.*, 2001). O período de incubação pode variar de 19h a dois dias (Flewett, 1982) e as partículas virais podem ser excretadas por 29 dias após o início da infecção em concentrações de até 10^{10} partículas virais por grama de fezes.

As vias de transmissão mais comuns são a fecal-oral ou o contato com superfícies contaminadas. Estudos com voluntários mostraram que os RV também podem ser adquiridos através de ingestão de água contaminada (Ward *et al.*, 1986), e a superfície contendo a água evaporada também pode causar infecção em contato com a mão ou boca (Ward *et al.*, 1991).

1.3.3.1 Distribuição

Os grupos A, B e C de RV têm sido encontrados tanto em humanos quanto em animais, enquanto que os grupos D, E, F e G só foram identificados em animais (Kapikian *et al.*, 2001).

Os RV-A são os mais importantes epidemiologicamente por serem os principais responsáveis por episódios de diarreia aguda em crianças em todo o mundo (Kapikian *et al.*, 2001). Os RV de grupo B (RV-B) estão associados a epidemias primeiramente descritas na China (Hung *et al.*, 1984) e, mais recentemente, a casos de diarreia em adultos na Índia (Krishnan *et al.*, 1999; Barman *et al.*, 2004). Os RV-C vêm sendo descritos em casos esporádicos e surtos em adultos e crianças em diversos países (Pereira *et al.*, 1983a; Penaranda *et al.*, 1989; Oishi *et al.*, 1993; Jiang *et al.*, 1995; Rahman *et al.*, 2005a).

Os RV-A são caracterizados pelas proteínas VP4 e VP7 em sorotipos/genótipos representados pelas letras P (sensibilidade à protease) e G (glicoproteína), respectivamente. Os sorotipos são determinados pela reatividade do vírus em ensaios por reação de neutralização, utilizando-se soro hiperimune ou anticorpos monoclonais. Foram descritos 14 sorotipos G, cada um apresentando um genótipo diferente. Os genótipos G1 a G6, G8 a G10 e G12 foram associados a infecções em humanos e os genótipos G1 a G11, G13 e G14 foram associados à infecções em animais (Kapikian *et al.*, 2001). Novos genótipos isolados de cepas animais descritos recentemente (G15 e G16) ainda não tiveram seus sorotipos confirmados por ensaios de neutralização (Rao *et al.*, 2000; Gulati *et al.*, 2007). Os genótipos G mais frequentemente encontrados são: G1, G2, G3, G4 e G9. O genótipo G9 é emergente, e tem aparecido com frequência em diversos países (Banyai *et al.*, 2005a; Santos & Hoshino, 2005; Khamrin *et al.*, 2006). Outros estudos identificaram genótipos não-usuais de RV-A (G5, G6, G8, G10 e G12) que atingiram importância epidemiológica em algumas partes do mundo como África, América Latina e Ásia (Cunliffe *et al.*, 2001; Castello *et al.*, 2004; Santos & Hoshino, 2005; Banerjee *et al.*, 2006; Volotão *et al.*, 2006; Rahman *et al.*, 2007).

Até o momento foram descritos 17 sorotipos P, no entanto o número de genótipos tem aumentado a cada ano, chegando a 28 já descritos (Kapikian *et al.*, 2001; Liprandi *et al.*, 2003; Banyai *et al.*, 2005b; Rahman *et al.*, 2005b; Khamrin *et al.*,

2007; Martella *et al.*, 2007). Os mais frequentemente detectados causando infecções em humanos são: P[4], P[6], P[8] e P[9] .

Um estudo realizado para analisar a distribuição temporal e geográfica dos RV-A entre os anos de 1998 e 2004 mostrou que quatro genótipos G (G1, G2, G3 e G4) associados a 2 genótipos P (P[8] e P[4]) representam 88% das 45571 cepas circulantes no mundo. Na América do Norte, Europa e Austrália a prevalência desses genótipos é de 90%, enquanto que na América do Sul e Ásia representa 68%, e na África 50%. Outras combinações de G e P, consideradas não usuais também foram estudadas, e representaram 4,9% do total. A porcentagem dessas combinações não usuais foi bem maior na África (27%), Ásia (14%) e na América do Sul (11%) quando comparada a países da América do Norte (5%), Europa (1,4%) e Austrália (0,1%) (Santos & Hoshino, 2005).

Linhares e colaboradores (1977) descreveram o primeiro relato de casos de gastroenterites infantis agudas associados aos RV-A na América Latina, observando por ME partículas semelhantes aos RV em fezes de crianças com diarreia aguda em Belém do Pará, Brasil. Desde então, sua ocorrência tem sido demonstrada de forma significativa nos casos de diarreia aguda no país (Linhares *et al.*, 1989; Timenetsky *et al.*, 1994; Leite *et al.*, 1996; Mascarenhas *et al.*, 1998; Ramachandran *et al.*, 2000; Santos *et al.*, 2001; Souza *et al.*, 2003; Carmona *et al.*, 2004; Luz *et al.*, 2005; Carvalho-Costa *et al.*, 2006; Volotão *et al.*, 2006).

Com relação aos subgrupos dos RV-A, o SG I e II têm sido os mais encontrados, sendo que o SGII relacionado à cepas de origem humana, enquanto o SG I relacionado à cepas de origem animal (Iturriza-Gómara *et al.*, 2002).

1.3.3.2 Padrões sazonais

Nos países de clima temperado os RV parecem ser mais facilmente transmitidos no inverno, devido à baixa umidade relativa do ar que contribui para a disseminação dos virions (Sattar *et al.*, 1984). Em climas tropicais, a transmissão ocorre não só no inverno, como em outras estações do ano, não apresentando um padrão sazonal tão definido (Linhares *et al.*, 1983; Cook *et al.*, 1990; Stewien *et al.*, 1991). No Brasil, por exemplo, a sazonalidade está relacionada com o aumento das infecções nos meses mais secos e com temperatura mais amena: entre maio e setembro nas regiões Sul e

Sudeste e entre setembro e novembro na região Centro-Oeste. Nas regiões Norte e Nordeste a sazonalidade não é definida (Instituto Adolfo Lutz e Centro de Vigilância Epidemiológica “Professor Alexandre Vranjac”, 2004).

1.3.4 Propriedades físico-químicas

Os RV-A podem se manter infectivos no ambiente por dias ou meses. O ambiente ideal para manutenção de sua viabilidade consiste em temperaturas baixas (4°C a 20°C), pH em torno de 3,0, baixa umidade e proteção contra raios ultravioleta (D’Souza *et al.*, 2007). As partículas virais mantêm sua infectividade e integridade após exposição ao éter, clorofórmio e deoxicolato, refletindo a ausência de envelope em partículas maduras (Estes, 2001). A partícula se mantém em superfícies porosas (papel e roupa de algodão) e não porosas (alumínio, látex) (Abad *et al.*, 1994).

1.3.5 Genoma e diversidade genética

O genoma dos RV-A é constituído por 11 segmentos de RNA f.d. inseridos no *core* viral. Os segmentos variam em tamanho de 667 a 3.302 pares de bases (pb) e o genoma total contém, aproximadamente, 18.522 pb (Kapikian *et al.*, 2001).

Os segmentos genômicos de diferentes cepas de RV compartilham as seguintes características: cada segmento de RNA sentido positivo (+) inicia com uma guanidina, seguida por uma série de seqüências conservadas que fazem parte das seqüências 5’ não codificantes; em seguida uma fase de leitura aberta (ORF) codifica para os produtos protéicos e outra série de seqüências não codificantes, contendo seqüências terminais 3’ conservadas (Kapikian *et al.*, 2001). A maioria dos RNA mensageiros (RNAm) termina com uma seqüência consenso 5’-UGUGACC-3’, e essas seqüências apresentam importantes sinais para expressão de genes e replicação do genoma. O tamanho das seqüências não-codificantes 3’ e 5’ varia para os diferentes genes, e não se encontra poliadenilação na região terminal 3’.

O padrão eletroforético (eletroferotipo) do genoma dos RV pode ser observado após eletroforese em gel de poliacrilamida (EGPA) (figura 1.3). O grupo A é composto de 4 segmentos de RNA f.d. de alto peso molecular (genes de 1 a 4), dois segmentos de médio peso molecular (genes 5 e 6), seguido de três segmentos de peso molecular

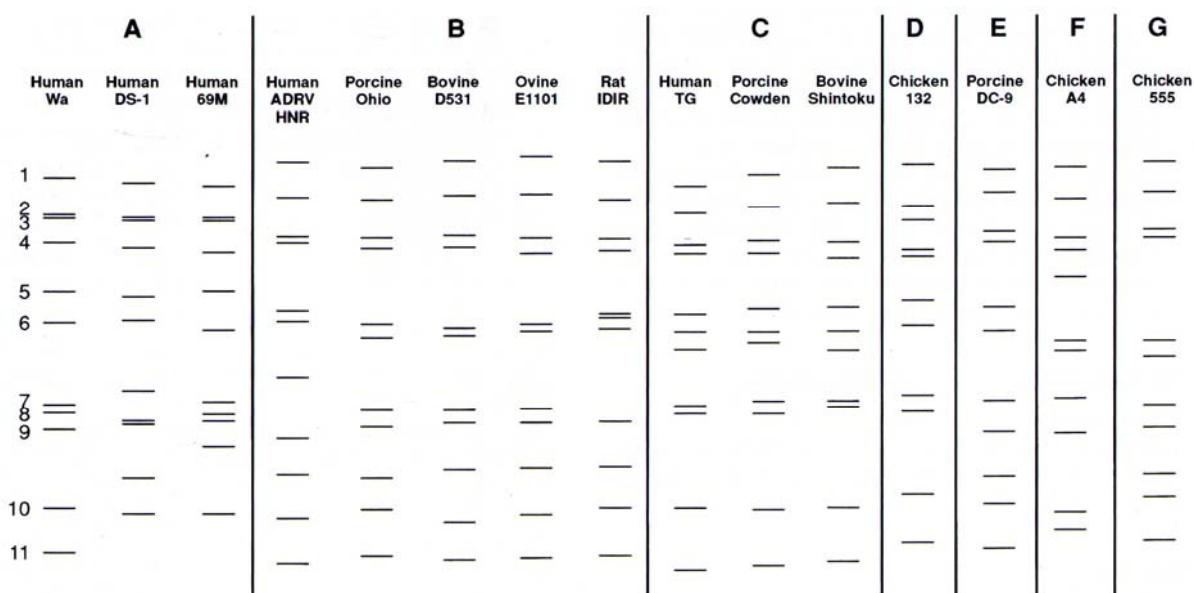
entre médio e baixo (genes de 7 a 9) e dois segmentos de baixo peso molecular (genes 10 e 11). Três perfis estão associados à diferença na migração do gene 11 (perfil longo) e do gene 10 (perfis curto e supercurto). Os eletroferotipos não são iguais entre os grupos, sendo os grupos de B a G denominados RV atípicos por revelarem padrões de migração dos segmentos completamente diferentes entre si (Estes, 2001).

Este polimorfismo eletroforético tem sido um dos aspectos mais observados nos estudos de diversidade genética dos RV, e está relacionado a diferentes mecanismos genéticos como mutação pontual, rearranjo e reestruturação (*reassortment*) (Taniguchi & Urasawa, 1995).

A mutação pontual consiste em alterações na sequência de nucleotídeos que ocorrem durante a replicação do genoma. Os acúmulos de mutações pontuais têm sido observados em isolados obtidos durante uma única epidemia (Palombo *et al.*, 1993).

Os rearranjos são alterações em porções significantes da sequência num mesmo segmento genômico, muitas vezes na forma de deleções ou duplicações. Estas alterações levam as modificações na massa molecular dos segmentos de RNA f.d., resultando num perfil eletroforético diferente daquele original.

Além disso, a natureza segmentada do genoma dos RV sugere que possa ocorrer o evento de reestruturação do genoma (*reassortments*) quando duas cepas diferentes infectam uma mesma célula. Durante o processo de replicação viral essas variantes podem trocar segmentos, originando uma partícula com genoma não usual (Ramig, 1997). As cepas originadas por este processo são chamadas de *reassortants* (Taniguchi & Urasawa, 1995). É importante ressaltar que este processo ocorre apenas em cepas pertencentes ao mesmo sorogrupo (Taraporewala *et al.*, 2006). Esses eventos ocorrem com mais frequência em países em desenvolvimento, onde, o contato com animais é mais estreito, o que proporciona uma maior possibilidade de infecções mistas e conseqüentemente ocorrência de reestruturações (Cunliffe *et al.*, 2002). Estudos indicam que o mecanismo da reestruturação é a força que guia a diversidade dos RV (Gouvêa & Brantly, 1995).



Kapikian *et al.* (2001)

Human = Humano; Porcine = Suíno; Bovine = Bovino; Ovine = Ovino; Rat = Rato; Chiken = Galinha

Figura 1.3: Esquema representativo dos eletroferotipos dos diferentes grupos de rotavírus em gel de poliacrilamida.

1.3.6 Replicação

Os RV infectam as vilosidades do epitélio absortivo do terço apical do intestino delgado. Após a replicação no intestino delgado as partículas infecciosas são liberadas no lúmen intestinal e continuam a se replicar na área distal do intestino delgado (Estes, 2001). A penetração dos RV na célula hospedeira tem sido demonstrada por dois principais mecanismos: i) diretamente através da membrana plasmática, envolvendo partículas onde VP4 é clivada; ii) através de um receptor para endocitose, para partículas que não sofreram a clivagem da VP4 (Conner & Ramig, 1997). A infectividade dos RV *in vitro* é aumentada e aparentemente dependente da presença de tripsina; este tratamento proteolítico resulta na clivagem de VP4, gerando os polipeptídeos VP5* e VP8*. Esta clivagem não interfere no processo de adsorção, mas encontra-se associada com a internalização das partículas de RV nas células. Presume-se que esta condição ocorra durante a infecção no lúmen intestinal do hospedeiro, uma vez que os RV estão expostos às secreções pancreáticas (Zárate *et*

al., 2000). Estudos recentes mostram que a entrada dos RV nas células depende de interações com receptores celulares contendo ácido siálico (AS) e integrinas. Nesse processo, o domínio VP8* interage com AS e VP5* interage com integrinas (Hewish *et al.*, 2000; Guerrero *et al.*, 2000). Após a entrada e liberação do RNA f.d. no citoplasma, iniciam-se as etapas de transcrição, tradução, replicação e maturação viral. A partir da fita molde de RNA (-), os RNAm são transcritos e as proteínas estruturais e não-estruturais, traduzidas (Estes, 2001).

O amadurecimento da partícula viral envolve o transporte de componentes através da membrana do RER, uma vez que sítio único de maturação para os RV nas células é o lúmen do RER. Este processo resulta no brotamento de partículas imaturas da membrana do RER, fazendo com que as mesmas durante este processo adquiram um envelope transitório (Bellamy & Both, 1990). Através da ME foi constatado que o ciclo infeccioso termina quando a progênie viral é liberada por lise da célula hospedeira (Altenburg *et al.*, 1980).

1.3.7 Imunidade

Apesar da natureza superficial da infecção na mucosa intestinal, os RV induzem tanto a resposta imune local (IgA) como a sistêmica (IgG e IgM) (Offit, 1996; Ward, 1996). A aquisição de anticorpos contra os RV ocorre entre 6 e 24 meses de idade (Yolken *et al.*, 1978). Infecções naturais em crianças conferem proteção contra infecções subseqüentes, podendo estimular tanto a resposta imune homotípica quanto a heterotípica (contra diferentes sorotipos). Essa proteção aumenta a cada nova infecção e reduz a gravidade da diarreia, sendo mais eficiente no caso da reinfecção homotípica (Offit, 1996; Velazquez *et al.*, 1996).

Acredita-se que durante a infecção por RV o mais importante isotipo de imunoglobulina presente seja IgA, uma vez que esta infecção encontra-se geralmente restrita às células das vilosidades do intestino delgado. Muitos estudos já relataram nas infecções por RV, respostas imunes relacionadas com a produção de IgA específica para RV *in vivo* em humanos, suínos e camundongos (Matson *et al.*, 1993; Feng *et al.*, 1994; Ward, 1996; Yuan *et al.*, 1996).

Sabe-se, também, que as duas proteínas de capsídeo externo, VP4 e VP7, são capazes de conferir imunidade protetora pela produção de anticorpos neutralizantes (Chiba *et al.*, 1986; O'Ryan *et al.*, 1994).

Outra forma de proteção natural é a transferência passiva de anticorpos maternos via placenta ou aleitamento. Há evidências de que níveis elevados de anticorpos neutralizantes para RV no colostro materno estão associados a infecções menos freqüentes entre neonatos (Zheng *et al.*, 1991).

1.3.8 Diagnóstico laboratorial

As manifestações clínicas da infecção causada por RV são bastante semelhantes às geradas por outros vírus causadores de gastroenterite, sendo necessário, portanto, a realização de diagnóstico laboratorial para definição do agente etiológico.

A detecção de RV pela visualização da partícula viral por ME foi a primeira metodologia utilizada no diagnóstico destes vírus, sendo uma técnica bastante específica devido à morfologia única destes agentes (formato de roda). Atualmente, um dos métodos mais utilizados para detecção de RV é o ensaio imunoenzimático (EIA), que utiliza anticorpos para detecção da proteína VP6 (Flewett & Beards, 1989). O Departamento de Virologia (IOC), em parceria com Biomanguinhos, desenvolveu o ensaio imunoenzimático para detecção de RV e AdV (EIARA) que permite a detecção de antígenos a partir de suspensões fecais (Pereira *et al.*, 1985).

Outro procedimento difundido e recomendado para uso em hospitais e clínicas pediátricas, principalmente devido a rapidez de execução (20 minutos) é o teste do látex, que se baseia na aglutinação de microesferas de látex sensibilizadas com anticorpos e apresenta sensibilidade comparável à do EIA (Brandt *et al.*, 1987).

A EGPA representa um método diagnóstico com sensibilidade e especificidade elevadas, possibilitando a caracterização dos eletroferotipos de RV-A e a diferenciação entre os demais grupos (B – G), que apresentam padrões eletroforéticos atípicos (Pereira *et al.*, 1983b).

A reação em cadeia pela polimerase precedida de transcrição reversa (RT-PCR) também representa um método de alta sensibilidade e especificidade, sendo aplicada para genotipagem dos RV-A, pela utilização de iniciadores de cadeia consensuais e

específicos que amplificam os genes que codificam para as proteínas VP4 e VP7 (Gouvêa et al., 1990; 1994; Gentsch et al., 1992; Das et al., 1994). Uma variação desta técnica, a PCR quantitativa em tempo real (qPCR) tem sido recentemente aplicada na quantificação viral em amostras fecais (Kang et al., 2004; Pang et al., 2004).

1.3.9 Tratamento e profilaxia

O tratamento para infecção por RV é o mesmo instituído para as doenças diarreicas agudas. É importante a reidratação parenteral, quando a reposição de fluidos e eletrólitos por via oral não for suficiente, para evitar complicações tais como desidratação grave e distúrbios hídrico-eletrólíticos. Não é recomendado o uso de antimicrobianos ou antidiarreicos.

Em 1998, a liberação da vacina Rotashield® contra RV pela USFDA (*U.S. Food and Drug Administration*) representou um avanço para a profilaxia das infecções por RV. A vacina preparada a partir da co-infecção em cultura celular de cepas de origem animal (MMU18006, genótipo G3) e de origem humana (D, sorotipo G1; DS-1, sorotipo G2 e ST-3, sorotipo G4), começou, neste mesmo ano, a ser administrada em bebês nos EUA. Após a administração de mais de um milhão de doses da vacina, a mesma foi retirada do mercado americano devido à ocorrência de 15 casos de intussuscepção associados à vacinação (Hoshino et al., 2003). Estudos posteriores demonstraram que a intussuscepção pode ser evitada com a administração da vacina nos primeiros dois meses de vida do bebê, uma vez que nesse período são extremamente raros os casos deste tipo de obstrução intestinal (Murphy et al., 2003). Após este episódio, surgiu a necessidade de se desenvolver novas vacinas, que não oferecessem riscos aos vacinados.

Em março de 2006, o Brasil incluiu no calendário básico de imunizações e no Programa Nacional de Imunizações a vacina oral para RV humano (VORH), dirigida a crianças de menores de seis meses de idade (1 mês e 15 dias a 5 meses e 15 dias) para proteger antecipadamente as crianças da faixa etária de 6 meses a 24 meses. A vacina, produzida pela GlaxoSmithKline (GSK), tem o nome comercial de Rotarix®, e possui o genótipo G1P[8] da cepa RIX4414 em sua formulação. Juntamente com o Panamá, o Brasil foi o primeiro país no mundo a introduzir a vacina de RV humano no seu calendário de imunizações. Nos EUA uma outra vacina, chamada RotaTeq® (Merck

Vaccines), foi licenciada pela USFDA, também em 2006 (Parashar & Glass, 2006). A RotaTeq[®] foi produzida a partir de uma cepa de origem bovina (WC3), e tem uma composição pentavalente, contendo quatro genótipos diferentes da proteína VP7 (G1, G2, G3 e G4) e um genótipo da proteína VP4 (P1A[8]). Ambas as vacinas foram testadas quanto ao risco de intussuscepção (Ruiz-Palacios *et al.*, 2006; Cisterna Viladrich, 2007; Dennehy, 2007).

2 JUSTIFICATIVA

Segundo a OMS, 1,1 bilhão de pessoas, 1/6 de toda população mundial, não têm acesso à água potável, e 2,4 bilhões não dispõem de condições sanitárias adequadas (OMS, 2004). Calcula-se também, que aproximadamente $\frac{1}{4}$ dos leitos hospitalares no mundo são ocupados por pacientes com complicações decorrentes de infecções de veiculação hídrica (Straub & Chandler, 2003), estando a diarreia no grupo das doenças mais comuns e que causam mais mortes no mundo. Aproximadamente 90% das mortes associadas à diarreia ocorrem devido a problemas na distribuição e tratamento de águas (OMS, 2004).

As infecções por RV são a causa mais comum de diarreia grave na infância em todo o mundo (Linhares, 2000), estando associadas à cerca de 611.000 mortes ao ano e 39% das hospitalizações por diarreia (Parashar *et al.*, 2006). Estima-se que praticamente todas as crianças sofrem ao menos um episódio de rotavirose até os cinco anos de idade (Parashar *et al.*, 2003). Dados recentes da Organização Mundial de saúde (OMS, 1999) tenham demonstrado que apesar da mortalidade devido às gastroenterites estar diminuindo, a morbidade permaneceu estável nas últimas quatro décadas tanto em países desenvolvidos quanto em desenvolvimento (Kosek *et al.*, 2003). No Brasil, dados da Secretaria de Vigilância em Saúde (SVS-MS) relatam a ocorrência, em 2004, de 2.395.485 casos de diarreia em todo o país, em crianças menores de cinco anos, sendo o número de internações aproximadamente 10% do total. Neste ano, foram observados os menores índices de internações e mortalidade relacionados às diarreias no país, coincidindo com o aumento orçamentário destinado a prevenção e ao tratamento a este agravo (DATASUS-MS).

Estudos de epidemiologia molecular de RV-A estão bem estabelecidos nas diferentes regiões do país com prevalência variando de 12 a 42% (Gusmão *et al.*, 1999; Linhares, 2000; Rosa e Silva *et al.*, 2001; Souza *et al.*, 2002; Cardoso *et al.*, 2003; Santos *et al.*, 2005). Entretanto, poucos são os estudos de detecção e caracterização de RV-A em águas ambientais (Mehnert *et al.*, 1997; Queiroz *et al.*, 2001).

Este estudo, pioneiro na região amazônica, apresenta o estabelecimento de uma metodologia de concentração viral associada a diferentes protocolos de detecção molecular de RV e sua aplicação na pesquisa destes vírus em amostras de águas de igarapés. O impacto que o processo de urbanização desordenada, como ocorrido na

cidade de Manaus, pode causar a Saúde Pública, poderá ser demonstrado pela contaminação viral das microbacias da região. Pretendemos com este estudo, portanto, criar condições de alerta às autoridades municipal, estadual e federal para a necessidade de preservação dos corpos d'água e melhoria das condições de potabilidade da bacia Amazônica, reconhecida como a maior bacia hidrográfica do planeta.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

- Detectar e caracterizar rotavírus grupo A em águas de igarapés de Manaus, Amazônia Central.

3.2 Objetivos Específicos

- Avaliar o método de concentração viral baseado na adsorção e eluição viral em membrana de filtro carregada negativamente para detecção de RV-A provenientes de amostras de água.
- Estabelecer uma metodologia de PCR quantitativo em tempo real para detecção e quantificação de RV-A provenientes de amostras de água.
- Detectar, pela RT-PCR, os genes que codificam as proteínas VP4, VP6 e VP7 de RV-A em amostras de água de igarapés.
- Caracterizar, pela *semi-nested* PCR, os genes que codificam as proteínas VP4 e VP7 de RV-A obtidos de amostras de água de igarapés.
- Analisar filogeneticamente o gene que codifica a proteína VP6 de RV-A provenientes de amostras de água de igarapés utilizando a técnica de sequenciamento nucleotídico.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Área de estudo

As amostras de água utilizadas neste estudo foram coletadas em igarapés da cidade de Manaus, capital do Estado do Amazonas (Amazônia Central). Manaus encontra-se a 03°08'S e 60°00'W à margem esquerda do Rio Negro, próximo a sua confluência com o Rio Solimões. A superfície total do Município é de 11.458,5km² (Lei Municipal nº 279, de 05 de abril de 1995), equivalente a 0,73% do estado. Devido ao aumento das atividades econômicas na região, a população de Manaus aumentou 10 vezes em 30 anos, chegando a 1.688.524 milhões de habitantes em 2006 (www.ibge.gov.br – março de 2007).

A cidade está inserida em quatro bacias hidrográficas, subdivididas pelos chamados igarapés, que são canais naturais estreitos, localizados entre duas ilhas, ou entre uma ilha e a terra firme e, constituem sem dúvida, os elementos mais significativos do sítio urbano de Manaus. As principais bacias hidrográficas de Manaus são (Figura 4.1):

- Bacia do Tarumã – Açú: parcialmente inserida na malha urbana, apresenta diversos afluentes de sua margem esquerda nascendo na Reserva Florestal Adolpho Ducke (RFAD).
- Bacia do Puraquequara: parte de sua bacia está localizada dentro da área florestal e de áreas de uso agrícola.
- Microbacia do São Raimundo (inserida na Bacia do Negro): encontra-se integralmente dentro da cidade, e seu principal igarapé é o Mindú.
- Microbacia do Educandos (inserida na Bacia do Negro): seu principal tributário é o igarapé do Quarenta e que também situa-se inteiramente em áreas urbanas.

Para a escolha dos pontos de amostragem de água foram levados em consideração dois aspectos: facilidade de acesso ao local e influência antrópica. Foi definido um total de 13 pontos de coleta de água, distribuídas em igarapés posicionados em áreas com rara densidade humana (reserva florestal), com baixa densidade (área rural) ou alta densidade (área urbana) (quadro 4.1 e figura 4.2).

Os igarapés localizados em áreas urbanas são caracterizados por grande despejo de efluentes domésticos e industriais *in natura*, despejo de lixo pela população

e não apresentam mais mata no entorno (pontos 3, 4, 5, 6, 7 e 8 – figura 4.2). As áreas rurais são caracterizadas por não oferecerem tanto impacto humano aos igarapés, sendo este limitado às habitações e plantações com poucos locais de despejo de efluentes domésticos (pontos 1, 2, 9 e 10 – figura 4.2). Os rios situados nas áreas de reserva florestal não apresentam despejo de esgoto próximo, ainda estão localizados em meio à Floresta Amazônica e a presença humana é restrita a pesquisadores e pessoas autorizadas. O ponto 11 situa-se próximo ao Rio Puraquequara, no igarapé do Mainazinho, onde se encontra uma Base do Comando Militar da Amazônia (CMA) (figura 4.2). Os pontos 12 e 13 estão localizados dentro da RFAD, de propriedade do Instituto de Pesquisas da Amazônia (INPA) (figura 4.2). As coletas foram realizadas com o apoio do Instituto Leônidas e Maria Deane - Fiocruz/AM e do INPA.



Fonte: Instituto Brasileiro de Administração Municipal

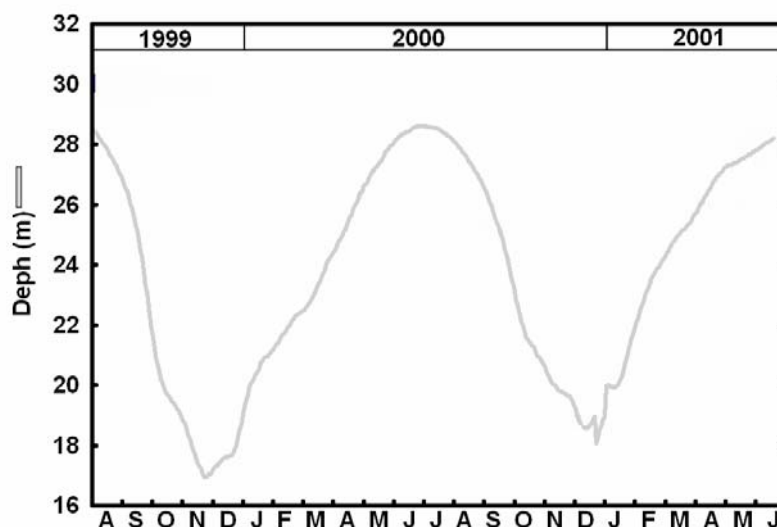
Figura 4.1: Mapa das bacias hidrográficas da cidade de Manaus, Amazônia Central.

Quadro 4.1: Características dos pontos de coleta de água em igarapés de Manaus.

Densidade Humana/ Tipo de uso da área	Bacias	Pontos	Sistema de Posicionamento Global (GPS)	
Muito Baixa Densidade/ Floresta Primária	Puraquequara	11	03°02'04,9"S	059°79'76,2"W
	Tarumã-Açu	12	02°58'42,6"S	059°56'34,9"W
		13	02°59'28,5"S	059°56'29,0"W
Baixa Densidade/ Área rural	Tarumã – Açu	1	03°00'17,9"S	060°05'29,4"W
		2	02°58'23,4"S	060°01'16,4"W
Baixa Densidade/ Área rural	Puraquequara	9	02°54'07,4"S	059°54'25,2"W
	Tarumã-Açu	10	02°45'47,7"S	060°02'12,2"W
Alta Densidade/ Área Urbana	São Raimundo	3	03°07'41,5"S	060°01'58,9"W
		4	03°03'48,1"S	059°57'46,1"W
		5	03°03'53,0"S	059°57'44,9"W
		6	03°03'04,4"S	060°00'50,2"W
	Educandos	7	03°08'19,5"S	060°00'59,5"W
		8	03°06'54,1"S	059°58'15,0"W

4.2 Período de coletas

As coletas foram realizadas em quatro períodos ao longo de 11 meses, de acordo com o pulso de inundação do Rio Negro que reflete as duas principais estações do ano da região: seca e chuvosa (figura 4.3). A primeira coleta foi realizada no início da estação seca (vazante [agosto de 2004]), seguidas por outras três realizadas no período da seca (novembro de 2004), início (enchente [fevereiro de 2005]) e ápice da estação chuvosa (cheia [junho de 2005]).



Eixo Y: Depth (m) = Profundidade em metros; Eixo X: Meses de agosto de 1999 a Junho de 2001.

Figura 4.3: Gráfico ilustrando a variação no nível de água do Rio Negro, de 1999 a 2001.

4.3 Iniciadores de cadeia (*primers*)

O quadro 4.2 apresenta a sequência dos iniciadores de cadeia utilizados para detectar RV-A através da técnica de *semi-nested* PCR para os genes que codificam as proteínas VP4 (Genstch *et al.*, 1992) e VP7 (Das *et al.*, 1994; Gouvêa *et al.*, 1994), e PCR qualitativo e quantitativo (tempo real) para amplificação do gene que codifica a proteína VP6 (Iturriza-Gómara *et al.*, 2002). Os iniciadores de cadeia foram sintetizados pela InvitrogenTM (EUA).

Quadro 4.2: Sequência de iniciadores de cadeia utilizados nas PCRs para detecção e caracterização dos genes que codificam as proteínas VP4, VP6 e VP7.

Proteína alvo	Iniciadores de cadeia	Nucleotídeos (posição – pb)	Fragmento (pb)	Sequência (5' - 3')
VP7	9con1 (+)	37 – 56		tag ctc ctt tta atg tat gg
	9con2 (-)	922 – 941	904	gta taa aat act tgc cac ca
	9T1-1 (G1) (-)	176 – 195	158	tct tgt caa agc aaa taa tg
	9T1-2 (G2) (-)	262 – 281	244	gtt aga aat gat tct cca ct
	9T1-3 (G3) (-)	484 – 503	466	gtc cag ttg cag tgt tag c
	9T1-4 (G4) (-)	423 – 440	403	ggg tcg atc gaa aat tct
	9T1-9 (G9) (-)	131 – 147	110	tat aaa gtc att gca c
	FT5 (G5) (-)	760 – 779	742	cat gta ctc gtt gtt acg tc
VP4	4con3 (+)	11 – 32		tgg ctt cgc tca ttt ata gac a
	4con2 (-)	887 – 868	876	att tcg gac cat tta taa cc
	1T1 P[8] (-)	339 – 356	345	tct act tgg gat aac gtg c
	2T1 P[4] (-)	474 – 494	483	cta ttg tta gag gtt aga gtc
	3T1 P[6] (-)	259 – 278	267	tgt tga tta gtt gga ttc aa
	4T1 P[9] (-)	385 – 402	391	tga gac atg caa ttg gac
VP6	VP6 - F (+)	747 – 766		gac ggv gcr act aca tgg t
	VP6 - R (-)	1126 – 1106	379	gtc caa ttc atn cct ggt tgg

4.4 Padronização do método de qPCR

4.4.1 Estabelecimento da curva padrão

A padronização do PCR quantitativo em tempo real (qPCR) exigiu o estabelecimento de uma curva padrão, contendo diferentes concentrações do gene alvo, que codifica a proteína VP6. Com este objetivo, uma região de 379pb do gene 6, compreendida entre os nts 747 – 1126 foi amplificada pela RT-PCR, oriundo de uma amostra de fezes (número 8200) positiva para RV-A disponível no Laboratório de Referência Regional para Rotavíruses – IOC/Fiocruz. O RNA f.d. viral foi extraído utilizando o kit QIAamp® Viral Mini kit (Qiagen, Inc., Valencia, CA, EUA) de acordo com o protocolo descrito pelo fabricante, e estocado a –70°C. A síntese do DNA complementar (cDNA) foi realizada com a utilização de um iniciador randômico (Pd[N]₆ - Pharmacia) iniciando-se com a denaturação de 5µL RNA f.d. com 2µL de dimetil sulfoxido (DMSO – Sigma), a 97°C por 7 minutos, seguido de resfriamento a 4°C por 2

minutos. Em seguida, os reagentes para síntese do cDNA foram adicionados ao RNA f.d. denaturado e a mistura incubada a 42°C por 1 hora, seguido de 7 minutos a 95°C. O cDNA foi estocado a -20°C para posterior utilização. O quadro 4.3 apresenta os reagentes utilizados para a reação de síntese do cDNA.

Quadro 4.3: Reagentes utilizados para reação de transcrição reversa do RNA.

Reagentes	Volume (µL)
H ₂ O DNAase/RNAase livre*	10,75
dNTP (dCTP, dDTP, dATP, dGTP) (20µM)* ¹	2
Tampão 10x*	2,5
MgCl ₂ (50mM)*	1,25
Pd(N) ₆ * ²	1
Superscript II (200U/µL)*	0,5
DMSO	2
RNA f.d.	5
Total	25

* Invitrogen™, Califórnia, EUA

*1 Gibco®, Califórnia, EUA

*2 Pharmacia Biotech, EUA

O protocolo da PCR utilizado para amplificação do gene que codifica a proteína VP6 foi baseado naquele descrito por Iturriza-Gómara e colaboradores (2002). O ciclo consistiu em ativação da enzima a 94 °C por 2 minutos; 40 ciclos de denaturação dos *amplicons* a 94°C por 30 segundos, anelamento do iniciador a 58°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 1 minuto. Ao final foi realizado um ciclo de extensão a 72°C por 7 minutos. Foram acrescentados 3µL de cDNA à mistura da reação (quadro 4.4). Visando posterior clonagem do *amplicon*, o mesmo foi submetido a uma adição extra de adeninas por uma Taq DNA polimerase sem fidelidade, seguindo instruções do fabricante (Invitrogen™, EUA).

Os *amplicons* foram analisados por eletroforese (100 volts por 1 hora) em gel de agarose (Sigma Chemical Company, St. Louis, EUA) a 1% em tampão Tris-Ácido Bórico-EDTA 1X (100mM Tris, 90mM Ácido bórico, 100mM EDTA, pH 8,3). Foram adicionados 2µL do corante azul de bromofenol (Sigma Chemical Company, St. Louis,

EUA) a 10µL do produto da PCR. Para identificar a massa molecular do *amplicon* se utilizou um padrão de 100pb (GIBCO BRL). O gel foi submerso em solução de brometo de etídio (0,5µg/mL) por 20 minutos e após lavagem em água destilada, foi visualizado em transiluminador de luz ultravioleta (Labnet, Edison, NJ, EUA). As imagens foram registradas em sistema de captura de imagem utilizando o programa Labworks 4.0 (UVP, Mitsubishi, Japão).

Quadro 4.4: Reagentes utilizados na PCR para detecção do gene que codifica a proteína VP6 de rotavírus grupo A.

Reagentes	Volume (µL)
H ₂ O DNAase/RNAase livre ^{*1}	14,125
dNTP (dCTP, dDTP, dATP, dGTP) (20µM) ^{*1}	2
Tampão 10 X *	2,5
MgCl ₂ (50mM)*	1,25
Iniciadores de cadeia do gene 6	2
Taq Polimerase Platinum (5U/µL)*	0,125
cDNA	3
Total	22

* Invitrogen[™], Califórnia, EUA

* 1 Gibco[®], Califórnia, EUA

O fragmento amplificado foi purificado utilizando o kit comercial QIAquick[®] PCR Purification kit (QIAGEN[™], Valencia, CA, EUA), e a seguir clonado em plasmídeo pCR[®] 2.1 utilizando o kit TOPO TA Cloning[®] para sequenciamento (Invitrogen[™], EUA). Foram adicionados 3µL do produto da ligação purificado às células bacterianas competentes (*Escherichia coli* cepa TOP10F). Para permitir a entrada do plasmídeo recombinante nas células competentes, a mistura foi incubada durante 30 minutos em banho de gelo, submetida a um choque térmico por 90 segundos a 42°C e a uma nova incubação em banho de gelo por um período de 10 minutos (Sambrook *et al.*, 2001).

A recuperação das células bacterianas, após o choque térmico, foi realizada adicionando-se à reação 300µL de meio Luria Bertani líquido (LB: 1% de triptona, 0,5% de extrato de levedura, 1% de cloreto de sódio, pH 7,0) sem antibiótico, seguido de

incubação a 37°C sob forte agitação (250rpm) por 1 hora (Gyrotech Water Bath Shaker Modelo G75, New Brunswick, Scientific Edison, New Jersey, EUA).

Após essa etapa, foi realizado o plaqueamento em uma única placa contendo meio LB sólido (LB líquido contendo 1,5% (p/v) de ágar) com 100µg/mL de ampicilina, 0,1mM de IPTG e 40µg/mL de X-Gal. A placa foi incubada a 37°C por cerca de 16 horas. Após este período de incubação, foram transferidas 10 colônias bacterianas brancas correspondentes a 10 clones plasmidiais para tubos contendo 5mL de meio LB líquido suplementado com ampicilina 50µg/mL e incubadas por 16 horas com agitação constante de 150rpm a 37°C (Gyrotech Water Bath Shaker Modelo G75, New Brunswick, Scientific Edison, New Jersey, EUA).

Para a seleção dos clones contendo o inserto, foi realizada a extração do DNA plasmidial a partir das culturas dos clones bacterianos utilizando-se o kit *Miniprep DNA Purification System*[®] (Promega Corporation, Madison, Winsconsin, EUA). A partir do produto extraído, foi realizada a caracterização do fragmento clonado pela técnica de RT-PCR utilizando os iniciadores de cadeia VP6-F e VP6-R (quadro 4.2). O produto amplificado desta reação foi seqüenciado (item 4.6), para confirmação do fragmento clonado.

O plasmídeo recombinante, denominado de clone plasmidial 8200, foi quantificado em espectrofotômetro (Biophotometer, Eppendorf, Hamburg, Alemanha) a 260nm comprimento de onda, e a concentração encontrada em ng/µL foi transformada em número de cópias/µL de acordo com a fórmula a seguir:

$$\text{Número de cópias/ } \mu\text{L} = \frac{\text{Concentração (g/}\mu\text{L)}}{(\text{Número de pares de base do plasmídeo recombinante}) \times 660} \times 6,022 \times 10^{23}$$

Onde: $6,022 \times 10^{23}$ = número de Avogadro; 660 = massa molecular aproximada de um par de bases (A-T ou G-C).

O título relativo à massa plasmidial do clone 8200 foi de $1,02 \times 10^{11}$, sendo realizadas, em seguida, diluições seriadas de base 10, a fim de se obter as quantidades de $1,02 \times 10^7$ a $1,02 \times 10^2$ cópias/µL para a curva padrão do qPCR. Essas diluições foram alíquotadas e armazenadas a -70°C.

4.4.2 Condições da reação de quantificação

O qPCR desenvolvido utilizou o sistema SYBR® Green da Applied Biosystems. As amostras foram aplicadas em duplicatas em uma microplaca de 96 cavidades (MicroAmp®, Applied Biosystems, Foster City, Califórnia, EUA) e a reação foi realizada em plataforma ABI 7500 (Applied Biosystem, Califórnia, EUA).

Para a otimização do ensaio foram testadas as concentrações de 0,2µM, 0,4µM, 0,6µM e 0,8µM de cada iniciador (VP6-F e VP6-R), volume de cDNA a ser aplicado (3µL ou 5µL), temperatura de anelamento (58°C ou 60°C), temperatura de extensão (60°C ou 72°C), temperatura de detecção da fluorescência (60°C ou 80°C) e número de ciclos (40 ou 45). Outro fator importante testado foi o tipo de cDNA a ser utilizado: randômico, sintetizado pelo iniciador Pd(N)₆, ou específico, sintetizado pelo iniciador VP6-R.

O quadro 4.5 apresenta os reagentes e os volumes utilizados na reação final, após padronização da RT- PCR em tempo real utilizando sistema SYBR® Green. O seguinte ciclo foi estabelecido para a amplificação genômica: um ciclo de 50°C por 2 minutos, seguido de 95°C por 10 minutos, 40 ciclos a 94°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto, e ao final uma curva de dissociação determinada pelo sistema da plataforma ABI 7500 (Applied Biosystems).

Quadro 4.5: Reagentes utilizados na qPCR para detecção do gene que codifica a proteína VP6 de rotavírus grupo A.

Reagentes	Volume (µL)
H ₂ O livre de DNAase/RNAase * ¹	6
SYBR® Green Master Mix * ²	12,5
Iniciador VP6-R (20µM)	0,5
Iniciador VP6-F (20µM)	0,5
cDNA	5
Total	25

*1Gibco®, Califórnia, EUA;

*2 Applied Biosystems, Branchburg, New Jersey, EUA

4.5 Detecção de rotavírus grupo A na área de estudo

Foi coletado um total de 52 amostras de 2,0L de água, referentes à amostragem de 13 pontos georeferenciados durante quatro campanhas de coleta (itens 4.1 e 4.2). As amostras foram encaminhadas ao laboratório e submetidas ao processo de concentração viral no mesmo dia da coleta. O protocolo de concentração utilizado baseou-se naquele descrito por Katayama e colaboradores (2002) (figura 4.4), e apresentou uma modificação na etapa de adaptação do método para águas doces, adicionando-se 3mM de cloreto de magnésio ($MgCl_2$) no lugar da concentração de 25mM descrita. Foram utilizados o sistema de filtração Millipore® e o concentrador Centriprep® YM-50 no processamento das amostras (figuras 4.5 e 4.6).

Após a concentração, as amostras foram submetidas à extração do RNA f.d. viral e síntese do cDNA como descrito no item 4.4.1.

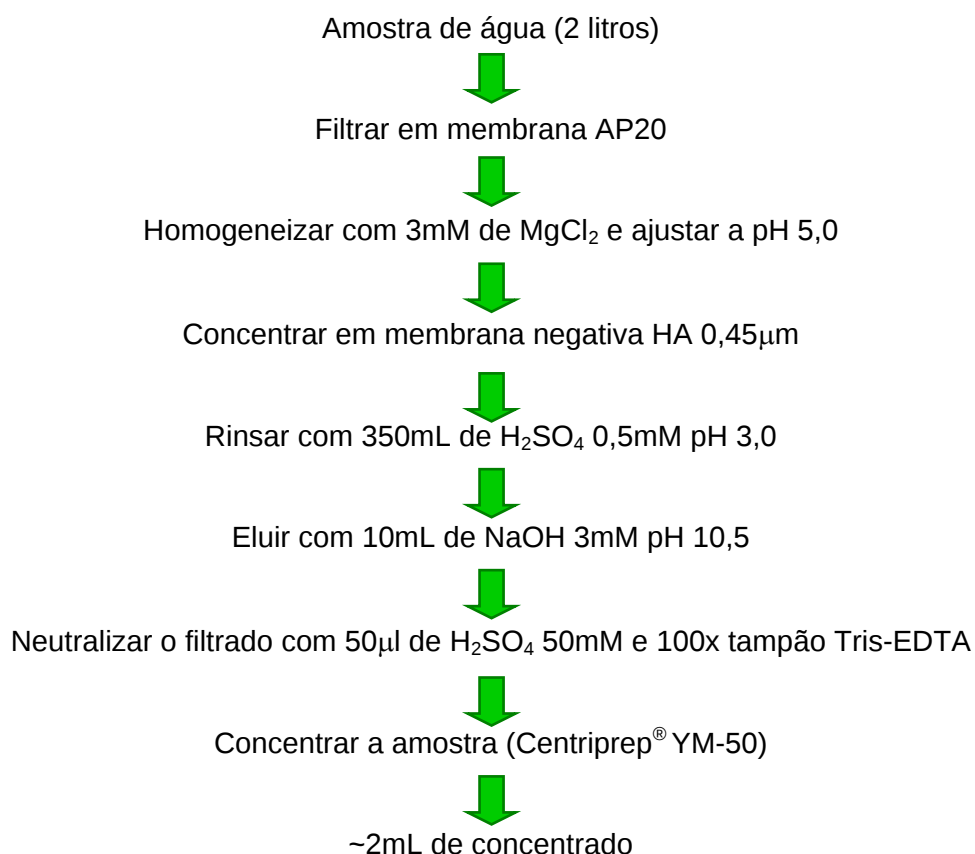
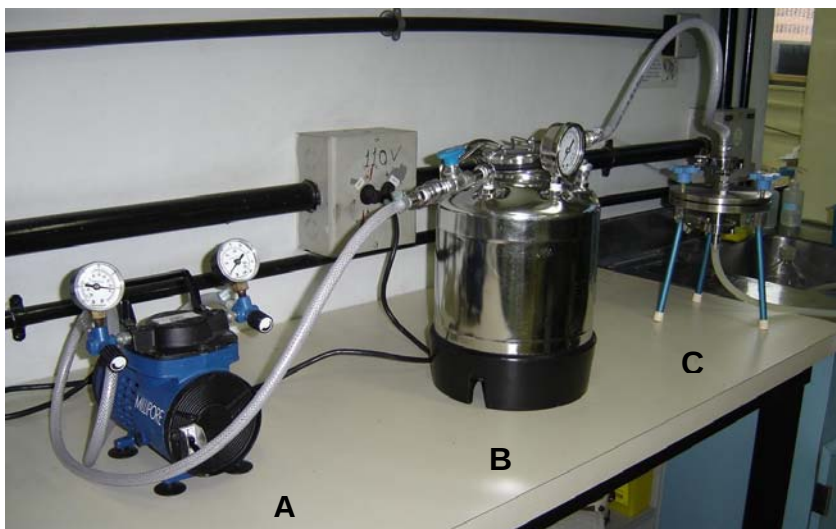


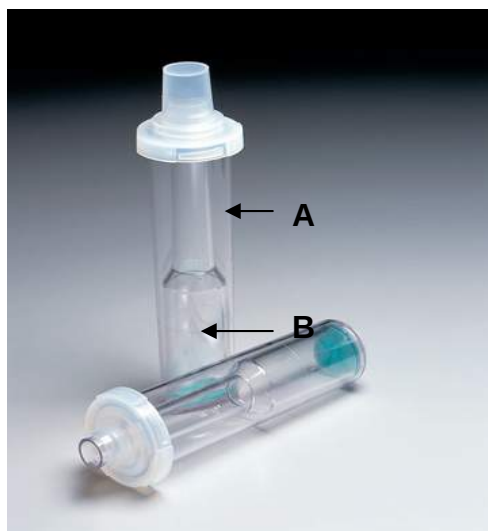
Figura 4.4: Etapas do método de concentração viral a partir de amostras de água.



Fonte: Laboratório de Desenvolvimento Tecnológico – IOC/FIOCRUZ

A – Bomba de vácuo; B- Recipiente de pressão; C – Suporte da membrana.

Figura 4.5: Sistema de Filtração Millipore®.



A – Recipiente externo para colocar a amostra; B – Tubo coletor do filtrado.

Figura 4.6: Concentrador Centriprep® YM-50, Millipore®.

4.5.1 PCR e *semi-nested* PCR para detecção e genotipagem dos genes que codificam as proteínas VP4 e VP7

Os genes que codificam as proteínas VP4 e VP7 e determinam os genótipos P e G, respectivamente, foram detectados e caracterizados por PCR nas amostras ambientais. Foram adicionados 2,5µL do cDNA, a uma mistura com reagentes (quadro 4.6). O ciclo da PCR consistiu em ativação da enzima a 94°C por 2 minutos; 35 ciclos de denaturação dos *amplicons* a 94°C por 30 segundos, anelamento do iniciador a 50°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 1 minuto. Ao final foi realizado um ciclo de extensão a 72°C por 10 minutos. Os produtos foram analisados como descrito no item 4.4.1.

Quadro 4.6: Reagentes utilizados na PCR para detecção dos genótipos G e P de rotavírus grupo A.

Reagentes	Volume (µL)
H ₂ O DNAase/RNAase livre ^{*1}	15,625
dNTP (dCTP, dDTP, dATP, dGTP) (20µM) ^{*1}	2
Tampão 10X *	2,5
MgCl ₂ (50mM)*	1,25
9con1/9con2 (G) ou 4con2/4con3 (P) (20µM)*	1
Taq Polimerase Platinum (5U/µL)*	0,125
cDNA	2,5
Total	22,5

* Invitrogen[™], Califórnia, EUA

*1 Gibco[®], Califórnia, EUA

Para a caracterização dos genótipos G pela *semi-nested* PCR foram utilizados 0,5µL do iniciador consensual para G (9con1) e uma mistura de 0,5µL de cada iniciador G específico (G1, G2, G3, G4, G5 e G9) (quadro 4.2). Para o genótipo P foram utilizados 0,5µL do iniciador consensual para P (4con3) e uma mistura de 0,5µL de cada iniciador específico para P[4], P[6], P[8] e P[9] (quadro 4.2). Foram adicionadas 1µL do produto da PCR a 24µL da mistura da reação contendo os reagentes conforme o quadro 4.7 para G tipo e o quadro 4.8 para P tipo. As condições de ciclagem para

ambos os tipos G e P consistiram em ativação da enzima a 94°C por 2 minutos; 25 ciclos de denaturação dos *amplicons* a 94°C por 30 segundos, anelamento dos iniciadores de cadeia a 47°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 1 minuto. Ao final foi realizado um ciclo de extensão a 72°C por 10 minutos. Os produtos foram analisados como descrito no item 4.4.1.

Quadro 4.7: Reagentes utilizados na *semi-nested* PCR para detecção de genótipos G de rotavírus grupo A.

Reagentes	Volume (µL)
H ₂ O DNAase/RNAase livre* ¹	14,875
dNTP (dCTP, dDTP, dATP, dGTP) (20µM)* ¹	2
Tampão 10X*	2,5
MgCl ₂ (50mM)*	1
Mistura dos iniciadores de cadeia de G tipo* ²	3,5
Taq Polimerase Platinum (5U/µL)*	0,125
Produto da PCR	1
Total	24

* Invitrogen™, Califórnia, EUA; * 1 Gibco®, Califórnia, EUA; * 2 Mistura de G tipo (0,5 de cada iniciador): 9con1 + 9T1-1 (G1) + 9T1-2 (G2) + 9T1-3 (G3) + 9T1-4 (G4) + FT5 (G5) + 9T1-9 (G9).

Quadro 4.8: Reagentes utilizados na *semi-nested* PCR para detecção de genótipos P de rotavírus grupo A.

Reagentes	Volume (µL)
H ₂ O DNAase/RNAase livre* ¹	15,875
dNTP (dCTP, dDTP, dATP, dGTP) (20µM)* ¹	2
Tampão 10X*	2,5
MgCl ₂ (50mM)*	1
Mistura dos iniciadores de cadeia de P tipo* ²	2,5
Taq Polimerase Platinum (5U/µL)*	0,125
Produto da PCR	1
Total	24

* Invitrogen™, Califórnia, EUA; * 1 Gibco®, Califórnia, EUA; * 2 Mistura de P (0,5 de cada iniciador): con3 + 1T1 P[8] + 2T1 P[4] + 3T1 P[6] + 4T1 P[9]

4.5.2 Detecção e quantificação do gene que codifica a proteínas VP6

O gene de RV-A que codifica a proteína VP6 foi investigado nas amostras ambientais utilizando os protocolos de RT-PCR e de qPCR (itens 4.4.1 e 4.4.3). O qPCR foi aplicado a 20 amostras de água, das 52 coletadas, com a finalidade de comparar o resultado àquele obtido pelo PCR qualitativo.

4.5.3 Seqüenciamento parcial do gene que codifica a proteína VP6 (nt 747 – 1126)

Os *amplicons* obtidos pela PCR para amplificar o fragmento do gene que codifica a proteína VP6 (nt 747 – 1126) foram purificados utilizando o kit comercial QIAquick® PCR Purification kit (QIAGEN™, Valencia, CA, EUA) ou QIAquick® Gel Extraction kit (QIAGEN™, Valencia, CA, EUA). Após purificação, os *amplicons* foram quantificados em gel de agarose a 1,5% utilizando o marcador de peso e massa molecular *Low DNA Mass Ladder* (Invitrogen™, Califórnia, EUA).

Para o seqüenciamento direto dos *amplicons* foi utilizado o kit comercial Big Dye Terminator® v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, CA, EUA) e separadamente, iniciadores de cadeia VP6-R e VP6-F (quadros 4.2 e 4.9). Foram utilizadas colunas CENTRI-SEP® (Princeton Separations, CA, EUA) para purificação dos produtos. O seqüenciador automático modelo ABI 3100 (Applied Biosystems) foi utilizado para obtenção dos eletroferogramas.

Quadro 4.9: Reagentes utilizados na reação de seqüenciamento.

Reagentes	Volume (µL)
DNA (25ng)	2 a 10
Tampão de seqüenciamento (5X)*	2
Big Dye*	2
Iniciadores de cadeia VP6-F ou VP6-R (0,4µM)	2
H ₂ O DNAase/RNAase livre q.s.p. * ¹	10 ou 20

* Invitrogen™, Califórnia, EUA; *¹ Gibco®, Califórnia, EUA

4.5.4 Análise filogenética das seqüências parciais do gene 6

O programa *BioEdit Sequence Alignment Editor* (Hall, 1999) foi utilizado para realização do alinhamento das seqüências obtidas juntamente com as seqüências de protótipos dos diferentes subgrupos, oriundas de cepas de diferentes regiões do mundo disponibilizados no Banco de genes (*GenBank*) do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI).

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

4.6 Análise estatística

Para análise dos resultados de diferença de positividade entre as técnicas de PCR qualitativo e qPCR foi utilizado a análise de concordância Kappa, utilizando-se o programa WIN Episcopo. Para a análise dos resultados entre as áreas urbanas, rurais e florestais, e entre a detecção pelos protocolos de amplificação dos genes de VP4, VP6 e VP7, foi realizado o teste qui quadrado (χ^2) para independência com nível de significância de 5%, utilizando correção de Yates (Vieira, 2004).

4.7 Determinação da eficiência do método de concentração viral

Para determinar-se a eficiência do método de concentração viral na recuperação de RV-A em amostras de água doce, foram realizados experimentos utilizando diferentes matrizes aquáticas (água de consumo, mineral, fluvial, de esgoto bruto e de esgoto tratado). Inicialmente, alíquotas de uma suspensão fecal positiva para RV-A contendo títulos previamente determinados por qPCR foram adicionadas a 2,0L de cada matriz aquática testada. Em seguida, as amostras foram filtradas e concentradas pelo método descrito por Katayama e colaboradores (2002) (item 4.5), adicionando-se 25mM de $MgCl_2$ com uma etapa de adaptação para águas doces. Para a análise da água de consumo se adicionou 0,8mL/L de tiosulfato de sódio 10% (Reagen, Rio de Janeiro, Brasil) (CETESB, 2006) com o objetivo de retirar a cloro dissolvido.

Como controle negativo do experimento, amostras de 2,0L das matrizes aquáticas, coletadas no mesmo dia e local, também foram filtradas e concentradas sem adição do vírus. Os concentrados de 2,0mL obtidos após os experimentos foram submetidos à extração do RNA f.d., síntese do cDNA e detecção viral por qPCR como descritos nos itens 4.4.1 e 4.4.2.

O cálculo do percentual de recuperação foi realizado comparando-se a quantidade de RV-A inoculada em 2,0L e a quantidade final recuperada em 2,0mL. Uma vez que o resultado do qPCR é dado em cópias/reacção foi necessária a utilização de uma fórmula matemática para transformação do resultado obtido na quantidade exata que foi inoculada, e recuperada:

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

Onde, V_{ext} = volume de amostra submetido à extração de RNA (140 μ L); V_{total} = volume total da amostra (300 μ L para o inóculo de RV-A e 2000 μ L para o concentrado de água); $V_{\text{f_{RNA}}}$ = volume final de RNA extraído (60 μ L); V_{RNA} = volume de RNA aplicado na reacção de cDNA (5 μ L); $V_{\text{f_cDNA}}$ = volume final da reacção de cDNA (25 μ L); V_{cDNA} = volume de cDNA aplicado na reacção de qPCR (5 μ L); $N_{\text{cópias/reacção}}$ = número de cópias por reacção obtido pelo qPCR; $N_{\text{cópias total}}$ = número de cópias total inoculado, ou recuperado;

O percentual de recuperação, que caracteriza a eficiência do método de concentração viral, foi finalmente calculado a partir do número de cópias total obtido para o inóculo e para o recuperado, utilizando-se uma nova fórmula, baseada em regra de três:

$$\% \text{Recuperação} = N_{\text{recuperado}} \times 100 / N_{\text{inoculado}}$$

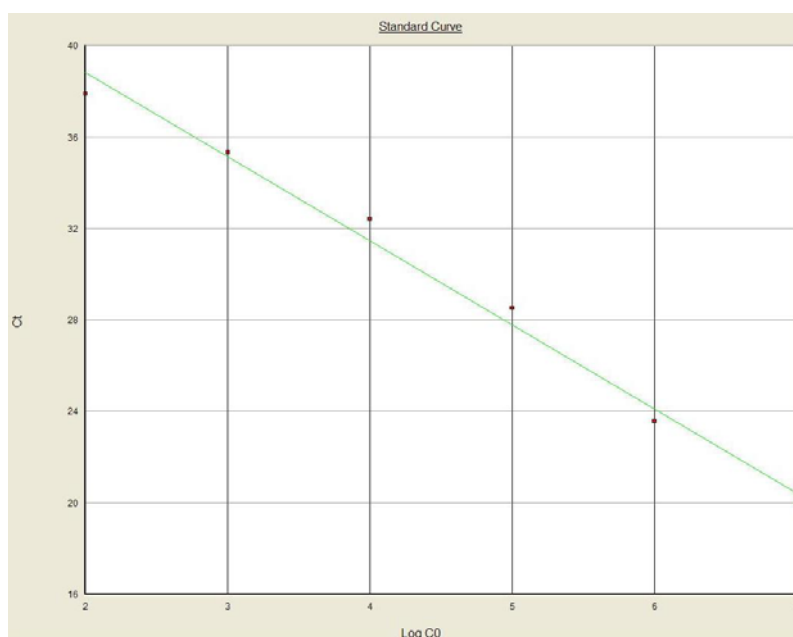
Onde, $N_{\text{recuperado}}$ = número de cópias total de RV-A recuperado em 2000 μ L de concentrado de água; $N_{\text{inoculado}}$ = número de cópias total de RV-A inoculado em 2,0L de água; $\% \text{Recuperação}$ = percentual de recuperação do método.

5 RESULTADOS

5.1 Padronização da qPCR

Após os testes de otimização realizados, o protocolo mais sensível e específico foi definido (item 4.4.3). Para análise dos resultados obtidos foi aceito R^2 acima de 0,95. O *slope* dos ensaios variou de -3,65 a -4,00. A curva padrão utilizada apresentou concentrações do clone plasmidial 8200 variando de 5×10^2 a 5×10^7 cópias por reação (figura 5.1), em diluições seriadas de base 10.

As seguintes temperaturas de dissociação foram observadas nas diferentes amostras testadas: 81°C - fragmentos específicos do gene 6 amplificados a partir do clone plasmidial 8200 (figura 5.2); 76°C - fragmentos amplificados a partir de amostras positivas (figura 5.2) e abaixo de 70°C - amostras negativas.



Eixo x: Log da concentração do plasmídeo ($5,1 \times 10^2$ a $5,1 \times 10^7$ cópias/reação); Eixo y: Ct (ciclo inicial de detecção da amostra)

Figura 5.1: Gráfico ilustrativo da curva padrão utilizada na qPCR obtida de diluições seriadas do clone plasmidial 8200.

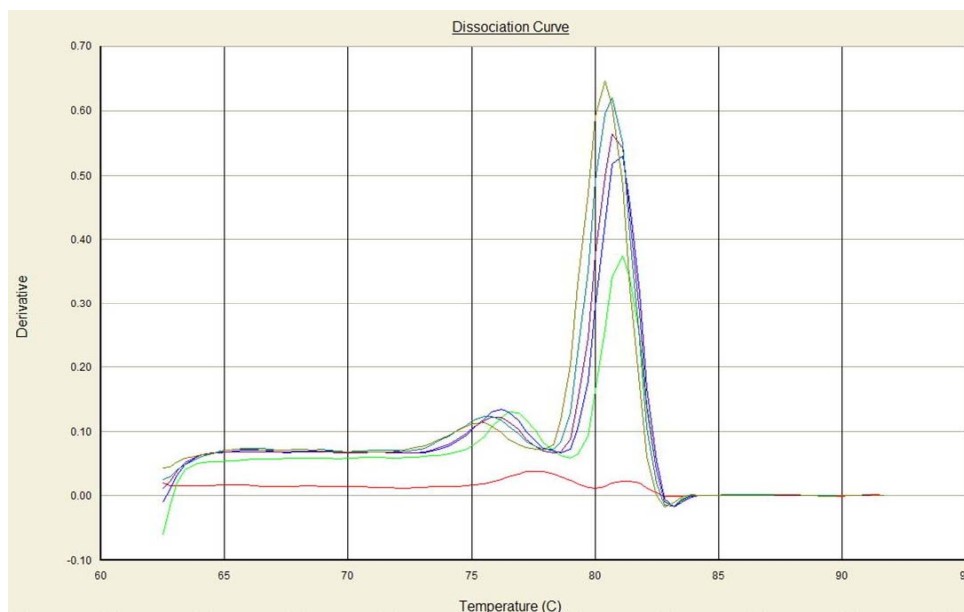


Figura 5.2: Gráfico ilustrativo da curva de dissociação das concentrações de 5×10^2 a 5×10^6 cópias/reação do clone plasmidial 8200 gerada pela qPCR utilizando o sistema SYBR[®] Green.

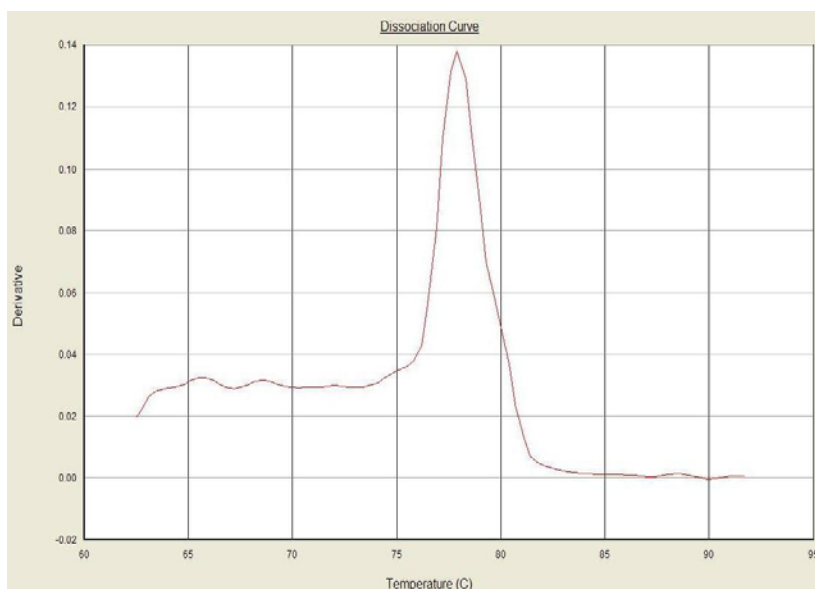


Figura 5.3: Gráfico ilustrativo da curva de dissociação do fragmento do gene 6 de uma amostra positiva para rotavírus grupo A amplificado pela qPCR utilizando o sistema SYBR[®] Green.

5.2 Detecção e genotipagem dos genes que codificam as proteínas VP4 e VP7 por RT-PCR e *semi-nested* PCR

Com a realização das reações de amplificação utilizadas (RT-PCR e *semi-nested* PCR) para detecção e genotipagem dos genes que codificam as proteínas VP4 e VP7, foram encontradas 23/52 (44%) amostras positivas. Com relação à detecção do gene da VP4, 16/23 (70%) amostras foram positivas, sendo 14 delas genótipo P[8], uma mista P[4], P[8], e uma amostra não foi possível genotipar. O gene da VP7 foi detectado em 11/23 (48%) das amostras, sendo 10 caracterizadas como genótipo G1, e uma não foi possível genotipar. Quatro amostras foram detectadas nesses 2 métodos, e todas apresentaram genótipo G1P[8] (tabela 5.1).

Tabela 5.1: Detecção e genotipagem dos genes que codificam as proteínas VP4 e VP7 de rotavírus grupo A pela RT-PCR e pela *semi-nested* PCR nas amostras estudadas.

Áreas	Pontos de Coleta	Período de coleta			
		Vazante	Seca	Enchente	Cheia
Floresta Primária	11	-	G1	-	-
	12	P[8]	-	P[8]	-
	13	-	-	-	-
Rural	1	-	G1	P[8]	-
	2	P[8]	-	-	G?
	9	-	-	-	P[8]
	10	-	-	-	-
Urbana	3	P[4], P[8]	G1	G1	G1P[8]
	4	-	-	P[8]	G1P[8]
	5	-	P[8]	G1P[8]	-
	6	-	G1	G1	-
	7	P[8]	-	P?	G1P[8]
	8	-	-	P[8]	P[8]

P[8]: Amostra VP4 positiva, genótipo P[8]; P[4]: Amostra VP4 positiva, genótipo P[4]; P?: Amostra VP4 positiva, não – genotipável; G1: Amostra VP7 positiva, genótipo G1; G?: Amostra VP7 positiva, não-genotipável; (-): Amostra Negativa.

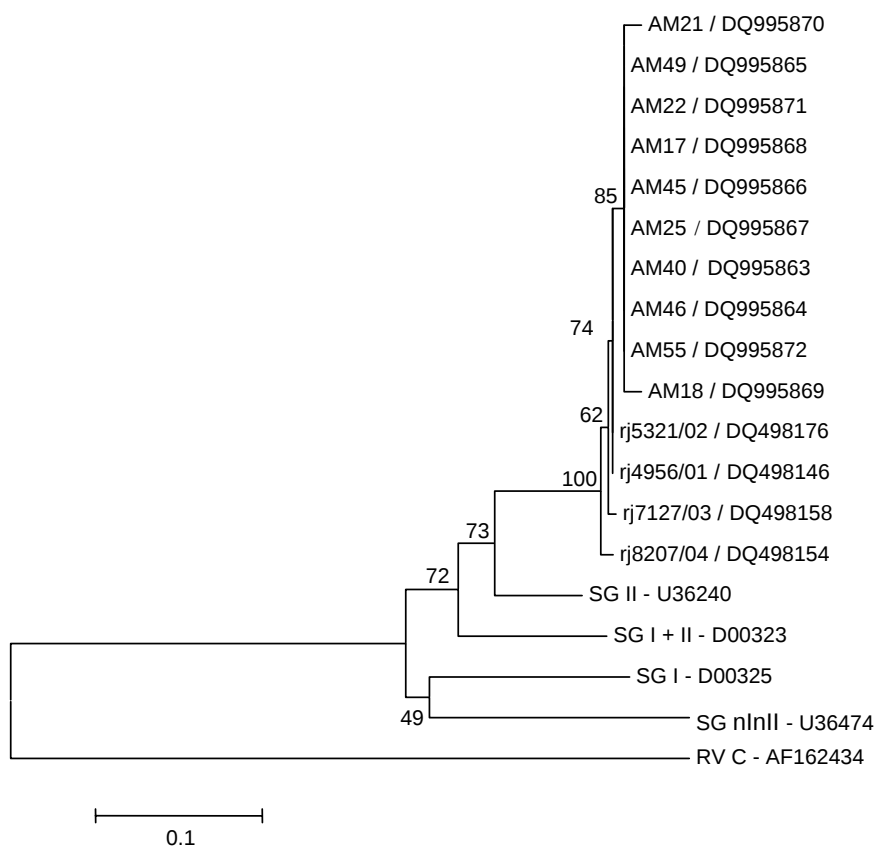
5.3 Detecção e caracterização molecular do gene que codifica a proteína VP6 pela RT-PCR e por sequenciamento nucleotídico

Através da amplificação parcial do gene que codifica a proteína VP6 de RV-A pela RT-PCR foram obtidas 25/52 (48%) amostras positivas (tabela 5.2), das quais 10 foram seqüenciadas. As seqüências foram depositadas no *GenBank* do NCBI (números de acesso de DQ995863 a DQ995872). O dendograma construído (figura 5.4) caracterizou as amostras obtidas como pertencentes ao SG II, e de origem humana. A semelhança das amostras analisadas entre si e com àquelas provenientes de crianças do Rio de Janeiro também ficou evidente.

Tabela 5.2: Resultados obtidos a partir da RT-PCR para detecção do gene que codifica a proteína VP6 de rotavírus grupo A nas amostras estudadas.

Áreas	Pontos de Coleta	Período de coleta			
		Vazante	Seca	Enchente	Cheia
Floresta Primária	11	-	+	+	-
	12	-	-	-	-
	13	+	+	-	-
Rural	1	+	+	+	+
	2	+	+	+	-
	9	-	-	+	+
	10	+	-	+	-
Urbana	3	-	-	-	+
	4	+	+	+	+
	5	-	-	-	-
	6	-	-	+	-
	7	-	+	+	-
	8	-	+	+	-

(+) : Amostra Positiva; (-) : Amostra Negativa



Os isolados estão indicados pelo nome da amostra seguido do número de acesso no *GenBank* (NCBI). Sequências obtidas no presente estudo: AM17, AM18, AM21, AM22, AM25, AM45, AM46, AM49, AM50, AM55. Sequências originadas de amostras do Rio de Janeiro (nome/ano): rj5321/02, rj4956/01, rj7127/03, rj8207/04. Sequências protótipos Subgrupo I, II, I + II, não I (nI), não II (nII): SGI, SGII, SG I + II, SG nInII. Grupo externo rotavírus grupo C: RV C.

Figura 5.4: Dendograma construído a partir de um fragmento do gene que codifica a proteína VP6 de rotavírus grupo A provenientes de amostras de água utilizando os métodos Kimura 2 parâmetros e *neighbor-joining*.

5.4 Análise combinada dos métodos qualitativos de amplificação genômica para detecção de rotavírus grupo A

A análise dos resultados dos três métodos qualitativos de PCR utilizados indicou que 33/52 (63%) amostras de água coletadas foram positivas para RV-A. O protocolo de amplificação parcial do gene que codifica a VP6 foi o que detectou o maior número de amostras positivas (25/33 - 75%). Duas amostras foram detectadas em todos os protocolos utilizados, e 18 amostras foram detectadas somente em um deles, sendo 11 destas detectadas pelo PCR de VP6, 4 pelo PCR de VP7 e 3 pelo PCR de VP4. O teste estatístico qui quadrado foi realizado para avaliar a diferença entre as três metodologias e demonstrou que existe diferença significativa entre elas, sendo o PCR de VP6 o mais sensível na detecção de RV-A ($\chi^2 = 9,50$ e nível de significância = 5%).

Os RV-A foram detectados em 19/24 (79%) das amostras obtidas em pontos de coleta localizados na área urbana, em 7/12 (58%) das amostras obtidas em pontos de áreas florestais, e em 8/16 (50%) das amostras obtidas em pontos de áreas rurais. O teste de qui quadrado realizado demonstrou que não existe diferença entre a positividade destas diferentes áreas de estudo ($\chi^2 = 3,95$ e nível de significância = 5%).

5.5 Detecção do gene que codifica a proteína VP6 pela qPCR

Foram detectadas 18/20 (90%) amostras analisadas pela qPCR, apresentando títulos de $1,7 \times 10^3$ a $5,1 \times 10^6$ cópias/reação. Das 18 amostras detectadas, 15 foram positivas em pelo menos um dos protocolos de amplificação genômica de RV-A previamente utilizados. Das 20 amostras analisadas, 5 foram negativas em todas as metodologias de PCR convencional, sendo que 3 destas foram positivas pela qPCR, e duas permaneceram negativas (tabela 5.3). O teste de concordância Kappa realizado para comparar a amplificação do gene da VP6 pelos dois ensaios utilizados demonstrou que há diferença entre os resultados por qPCR e por PCR qualitativo, indicando que o qPCR foi mais eficiente ($k = 0,38$).

Tabela 5.3: Detecção do gene que codifica a proteína VP6 de rotavírus por SYBR® Green PCR em tempo real em amostras positivas e negativas por PCR convencional.

Pontos	RT-PCR VP4	RT-PCR VP6	RT-PCR VP7	qPCR (cópias/reacção)
1	+	+	-	$1,8 \times 10^5$
1	-	+	+	$1,1 \times 10^5$
2	-	-	-	-
2	-	-	-	$4,5 \times 10^3$
3	+	-	+	$3,1 \times 10^5$
3	-	+	+	$3,1 \times 10^4$
4	-	+	-	$2,2 \times 10^4$
4	+	+	-	$7,2 \times 10^4$
5	+	+	+	$2,4 \times 10^5$
5	+	+	-	$1,7 \times 10^5$
5	-	-	-	$1,9 \times 10^4$
6	-	-	+	$4,4 \times 10^3$
6	-	+	+	$7,9 \times 10^4$
7	-	-	-	$5,6 \times 10^4$
7	+	-	+	$1,7 \times 10^3$
7	+	+	-	$5,1 \times 10^6$
8	-	-	-	-
9	-	+	-	$1,7 \times 10^5$
10	-	-	+	$5,3 \times 10^3$
11	-	-	+	$2,1 \times 10^4$

(-): Amostra negativa; (+): Amostra positiva

5.6 Determinação da eficiência do método de concentração viral

Os testes experimentais para se determinar a eficiência do método de filtração e concentração, descrito por Katayama e colaboradores (2002), para detecção de RV-A, apresentaram percentual de recuperação variando de 13,0% para água mineral e 86,3% para esgoto tratado (tabela 5.4).

Tabela 5.4: Eficiência do método de concentração viral por filtração em membranas carregadas negativamente descrito por Katayama e colaboradores (2002) na detecção de rotavírus grupo A.

Tipo de Água	Quantidade inoculada (cópias/2L)	Quantidade recuperada (cópias/2mL)	Taxa de recuperação
Consumo	$8,1 \times 10^5$	$2,9 \times 10^5$	35,7%
Mineral	$4,3 \times 10^7$	$5,5 \times 10^6$	13,0%
Rio	$4,3 \times 10^7$	$3,2 \times 10^7$	76,4%
Esgoto Tratado	$4,3 \times 10^7$	$3,7 \times 10^7$	86,3%
Esgoto Bruto	$4,3 \times 10^7$	$2,9 \times 10^7$	68,9%

6 DISCUSSÃO

6.1 Eficiência do método de concentração viral

A adsorção e subsequente eluição dos vírus em membrana carregada positivamente tem sido o método mais utilizado para concentração de vírus em diferentes tipos de água, sendo a concentração viral, em geral, determinada pelo plaqueamento viral (Logan *et al.*, 1981; Puig *et al.*, 1994; Chapron *et al.*, 2000; Queiroz *et al.*, 2001). O extrato de carne têm sido a substância mais utilizada para eluição dos vírus, devido à presença de compostos protéicos que detêm a capacidade de interferir na adsorção das partículas virais à estes tipos de membrana. Entretanto, estes compostos têm apresentado efeito inibidor da PCR, que tem sido uma técnica largamente utilizada para detecção de vírus entéricos no ambiente (Abbaszadegan *et al.*, 1993; Schwab *et al.*, 1995). Desta forma, um novo protocolo de concentração viral utilizando membrana carregada negativamente e eluição com soluções inorgânicas foi estabelecido com o objetivo de reduzir a inibição da PCR (Katayama *et al.*, 2002). A utilização deste protocolo no presente estudo resultou principalmente do fato de que a pesquisa de vírus fastidiosos, assim como os RV-A, foi incluída no projeto (Miagostovich *et al.*, submetido, De Paula *et al.*, 2007), tornando a técnica de PCR como a mais indicada para detecção viral.

Katayama e colaboradores (2002) obtiveram taxas variando de 50 a 70% de recuperação de poliovírus em água de mar inoculada artificialmente. Furhman e colaboradores (2005), utilizando esta mesma metodologia, avaliaram a recuperação de enterovírus em água do mar e de rio, e obtiveram taxas de 23% e 51%, respectivamente. Rose e colaboradores (2006), por sua vez, obtiveram taxas de recuperação em água marinha de 71% para poliovírus, e 12% para HAV.

Uma etapa adicional no método foi estabelecida por Katayama e colaboradores (2002) quando utilizado para águas doces, adicionando-se 25mM de $MgCl_2$ aos 2,0L de água. Esta metodologia adaptada demonstrou taxas de recuperação de RV-A variando de 13% a 86%, em diferentes matrizes aquáticas. A concentração de 3mM de $MgCl_2$ utilizada no estudo de campo baseou-se em dados de eficiência obtidos por Villar e colaboradores (2006) para detecção de HAV em diferentes matrizes aquáticas. A recuperação de astrovírus humano e RV-A em água de rio, utilizando-se esta mesma

concentração de $MgCl_2$, revelou taxas de 65% e 17%, respectivamente (dados não demonstrados). O alto percentual de detecção de RV-A (63%) indicou que a metodologia utilizada possibilitou uma eficiente recuperação destes vírus nos igarapés estudados, no entanto, esta taxa poderia ter sido mais significativa com a adição de uma maior concentração de $MgCl_2$ durante o processo de concentração viral.

6.2 Detecção, quantificação e caracterização molecular de rotavírus grupo A

Águas poluídas por esgoto têm sido consideradas como fonte causadora de gastroenterites (Hopkins *et al.*, 1984) e, desde 1977, surtos de RV-A, tendo a água como principal fonte de contaminação, foram descritos em diferentes países: Suécia (Lycke *et al.*, 1978), Brasil (Sutmoller *et al.*, 1982), Rússia (Solodovnikov *et al.*, 1989), Finlândia (Kukkula *et al.*, 1997) e Albânia (Villena *et al.*, 2003). Estudos demonstrando a presença destes vírus em águas de esgoto ou águas contaminadas por esgoto também têm sido descritos (Mehnert & Stewien, 1993; Gajardo *et al.*, 1995; Kittigul *et al.*, 2001; Abbaszadegan *et al.*, 2003; Pusch *et al.*, 2005).

O percentual de detecção de RV-A nos igarapés de Manaus sugere uma elevada contaminação destes ambientes, devido, provavelmente, ao despejo contínuo de esgoto doméstico em algumas áreas da cidade. A cidade de Manaus cresceu indevidamente nos últimos anos, e observou um aumento de 15 vezes no número de habitantes de 1977 a 2003 (Magalhães & Rojas, 2005). A ocupação desordenada do território criou situações críticas para os habitantes locais, já que muitos se instalaram na beira de rios e igarapés, correndo riscos periódicos de inundação e conseqüentes desabamentos. Além disso, provocou uma diminuição nas condições de salubridade dos habitantes devido à falta de saneamento básico, refletindo diretamente no aumento do número de doenças de veiculação hídrica, sendo que o número de notificações de casos de diarreia naquela região apresentou um aumento de 90,5 % entre os anos de 1998 a 2001 (Informe Geo Manaus, 2002).

A investigação de RV-A em águas fluviais de diferentes países demonstraram que estes estavam presentes em 34,5% (Brasil), 26,7% (Tailândia), 5-20% (Alemanha) e 3% (França) das amostras (Hot *et al.*, 2003; Kittigul *et al.*, 2001; Mehnert & Stewien, 1993; Pusch *et al.*, 2005). O percentual de positividade encontrado nos igarapés de Manaus (63%) pode indicar uma maior contaminação destes ambientes, assim como a

eficiência da utilização de diferentes protocolos de amplificação genômica para detecção viral, uma vez que a maioria daqueles estudos detectou apenas um gene de RV-A.

O teste estatístico (χ^2) realizado comprovou a maior eficiência do método de amplificação do gene que codifica a proteína VP6 na detecção de RV-A, quando comparado à detecção pelos métodos de amplificação de VP4 e VP7. A proteína VP6 vem sendo largamente utilizada em ensaios imunoenzimáticos para detecção de RV provenientes de amostras fecais e ambientais (Kane et al., 2004; Sanchez-Fauquier et al., 2004; Kittigul et al., 2005; Farahtaj et al., 2006), devido ao fato de ser a proteína mais abundante dos RV-A, representando mais de 50% da partícula viral, e deter elevado potencial antigênico (Kapikian et al., 2001).

A ausência de diferença significativa entre os valores de positividade encontrados nas áreas urbanas, rurais e florestais pode sugerir uma elevada persistência dos RV-A nos igarapés de Manaus, o que possibilitaria o carregamentos das partículas virais para locais mais distantes. Estudos têm avaliado a persistência dos RV-A em diferentes tipos de água. Raphael e colaboradores (1985) demonstraram que a uma temperatura de 20°C a diminuição de 2log no título de RV em água doce pode levar até 10 dias, e à 4°C até 32 dias. Enriquez e colaboradores (1995) demonstraram que os RV-A persistem por 10 dias em água de rio, e até 64 em água de torneira. Deve-se considerar, também, que a presença humana nas áreas rurais e florestais pode ter sido subestimada, uma vez que não se tem uma avaliação precisa da frequência e do número de pessoas que circulam nas proximidades destes pontos de coleta.

A pesquisa de RV-A provenientes de ambientes aquáticos dispões de poucos estudos relacionados à caracterização molecular conjunta dos genes que codificam as proteínas VP4 e VP7 (Villena et al., 2003; van Zyl et al., 2006). A prevalência dos genótipos G1 e P[8] nas amostras estudadas corrobora com dados da literatura, que demonstra a ampla circulação destes no mundo (Santos & Hoshino, 2005). A baixa variabilidade genotípica encontrada pode evidenciar a diferente estabilidade entre os genótipos de RV-A, e, por conseguinte, sugere que o genótipo G1P[8] é mais estável, e de mais fácil detecção. As duas amostras não genotipáveis, uma para G tipo, e outra para P tipo, podem indicar a circulação de genótipos diferentes daqueles investigados nos protocolos utilizados (Villena et al., 2003).

O sequenciamento parcial do gene que codifica a proteína VP6 evidenciou que todas as amostras analisadas pertenciam ao SG II. Devido à elevada similaridade com amostras de fezes provenientes de crianças do Rio de Janeiro (Araújo *et al.*, 2007) as amostras foram caracterizadas como de origem humana. De acordo com dados da literatura, o SG II tem sido descrito como o mais comum em humanos (Iturriza-Gómara *et al.*, 2002). A similaridade das seqüências obtidas entre si e com as amostras oriundas do Rio de Janeiro também sugere que, com relação ao gene 6, as amostras de RV-A circulantes nessas duas regiões não apresentam grande divergência. É importante ressaltar que apenas este estudo realizado com amostras do Rio de Janeiro realizou a caracterização do gene 6 de RV-A no Brasil, o que impossibilita a comparação com amostras circulantes de outras regiões brasileiras.

A literatura dispõe de poucos ensaios estabelecidos para detecção de RV-A por qPCR (sistemas SYBR[®] Green ou TaqMan[®]) (Kang *et al.*, 2004; Pang *et al.*, 2004; Logan *et al.*, 2006; Min *et al.*, 2006). Dessa forma, os estudos existentes que determinaram a quantidade destes vírus em amostras de água utilizaram técnicas de isolamento viral (Smith & Gerba, 1982; Oragui & Mara, 1989; Mehnert *et al.*, 1997).

Ensaio de qPCR promove inúmeras vantagens quando comparadas a técnicas de PCR qualitativo: i) resultado mais rápido; ii) menor risco de contaminação iii) maior sensibilidade analítica e iv) quantificação das amostras (Beuret, 2004; Kang *et al.*, 2004; Pang *et al.*, 2004). O protocolo de qPCR apresentado neste estudo detectou 18/20 (90%) das amostras analisadas, evidenciando uma elevada eficiência na detecção de RV-A. É importante ressaltar que as duas amostras caracterizadas como negativas pelo qPCR também foram negativas pelas metodologias de PCR qualitativo previamente utilizados. A análise de concordância para avaliar a sensibilidade analítica dos protocolos de PCR qualitativo e quantitativo, que utilizaram os mesmos iniciadores de cadeia para amplificação do gene 6 (VP6-F e VP6-R), demonstrou que o método quantitativo desenvolvido foi significativamente mais eficiente na detecção de RV-A que o qualitativo. Dados da literatura apontam o qPCR como 1000 vezes mais sensível que qualitativo quando utilizados os mesmos iniciadores de cadeia (Pang *et al.*, 2004).

De acordo com os padrões de qualidade de água recomendados pela *United States Environmental Protection Agency* (USEPA), podem estar presentes até 0,002/L de partículas de RV em águas para tratamento de 99,99% de redução e apenas $2,2 \times 10^{-7}$ /L em águas potáveis. Estudos em países em desenvolvimento mostram que os RV

estão presentes em concentrações de 0,06 – 4,85 partículas virais por litro em águas potáveis (Gerba *et al.*, 1996), valores acima das recomendações. Dados de quantificação obtidos indicaram que as concentrações de RV-A nos igarapés de Manaus também estavam acima dos valores recomendados para águas potáveis.

Em colaboração com o Instituto Maria & Leônidas Deane, realizou-se uma avaliação da contaminação bacteriana pela pesquisa de coliformes totais e fecais. O resultado microbiológico demonstrou que níveis de coliformes fecais excederam os valores estabelecidos como satisfatórios pelo Conselho Nacional de Meio Ambiente - CONAMA (Resolução nº274, de 29 de novembro de 2000) para água recreacional (1000/100 mL) em 73% (38/52) das amostras de água analisadas (dados não apresentados). Em cinco amostras em que os valores de coliformes fecais estavam dentro do permitido, detectou-se a presença de RV-A, sugerindo que a presença viral não apresenta correlação direta com os padrões bacterianos de coliformes fecais, corroborando resultados similares obtidos em outros estudos (Bosch, 1998; Hot *et al.*, 2003; Pusch *et al.*, 2005). Em muitos países, incluindo o Brasil, o padrão microbiológico de qualidade da água ainda é avaliado de acordo com indicadores bacterianos. No entanto, coliformes fecais podem estar presentes tanto em fezes humanas como animais, (Fong & Lipp, 2005) e em geral são degradados mais rapidamente que vírus e protozoários em ambientes aquáticos (Solic & Krstulovic, 1992; Bordalo *et al.*, 2002), o que torna inconveniente utilizá-los como indicadores da presença de fezes humanas.

A avaliação das técnicas utilizadas neste estudo demonstrou que a utilização do método descrito por Katayama e colaboradores (2002) associado à detecção pelo protocolo de qPCR desenvolvido pode ser recomendado na pesquisa de RV-A em diferentes ambientes aquáticos, revelando-se uma importante ferramenta na elucidação de surtos de diarreia provenientes de águas contaminadas e também no monitoramento da qualidade de águas de consumo e recreação. Estas informações podem fornecer subsídios para atender futuras normas de controle microbiológico que exijam a pesquisa de vírus entéricos. A detecção e caracterização molecular de RV-A em águas fluviais durante um período longo como o apresentado é pioneiro na região amazônica. Este tipo de estudo tem se mostrado cada vez mais importante na avaliação sobre o papel da presença humana na dispersão de RV-A em ambientes aquáticos. Além disso, o monitoramento dos genótipos de RV-A provenientes destes ambientes, no âmbito da distribuição geográfica e temporal, é de suma importância para revelar os genótipos

circulantes na população, e são dados essenciais para o desenvolvimento de uma vacina eficaz, que abranja um maior número de variantes.

Os resultados apresentados nesta dissertação comprovam que a urbanização da cidade de Manaus gerou impactos em proporções antes desconhecidas. A presença significativa de RV-A nos igarapés que circundam a cidade evidencia a vulnerabilidade destes ecossistemas aquáticos, e pode gerar danos à saúde pública, como têm demonstrado os indicadores de doenças de veiculação hídrica. Portanto, torna-se necessária a implantação de medidas eficazes para melhoria das condições de potabilidade destes ecossistemas que são essenciais à população local, tanto no cunho social, como econômico.

7 CONCLUSÕES

- O método de concentração viral utilizando filtração em membrana negativa e eluição em solvente inorgânico mostrou ser eficiente para recuperação de RV-A em diferentes matrizes aquáticas;
- Os RV-A foram detectados em 63% das amostras de água coletadas, indicando uma alta contaminação do ambiente estudado;
- A detecção de coliformes fecais dentro dos valores aceitos para água de recreação não significou a ausência de RV-A, comprovando que os padrões bacterianos de qualidade não são suficientes para determinar a qualidade virológica da água;
- Os genótipos de RV-A detectados corroboraram com os mais prevalentes na população mundial: P[8], G1 e SGII;
- Dentre as técnicas de PCR convencional utilizadas, a que utilizou a detecção do gene que codifica a proteína VP6 foi a mais eficiente para detecção de RV-A;
- O PCR quantitativo em tempo real desenvolvido mostrou-se eficiente para detecção e quantificação de RV-A em amostras ambientais, e significativamente mais sensível que o PCR qualitativo;

8 PERSPECTIVAS

O estabelecimento de uma metodologia de recuperação de RV a partir de amostras ambientais, associada a métodos qualitativos e quantitativos de detecção viral abre novas perspectivas para o estudo destes vírus em diferentes matrizes aquáticas. Inicialmente, esta metodologia será aplicada a um estudo iniciado, em 2005, na Estação de Tratamento de Esgoto da Fundação Oswaldo Cruz, para avaliação no campo da eficiência de recuperação de RV em águas residuárias tratadas e não tratadas. Em adição, esta metodologia será ferramenta indispensável no esclarecimento de surtos de RV de veiculação hídrica e em estudos epidemiológicos de RV.

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abad FX, Pinto RM, Bosch A. Survival of enteric viruses on environmental fomites. *Appl Environ Microbiol.* 1994; 60: 3704-3710.

Abbaszadegan M, Huber MS, Gerba CP, Pepper IL. Detection of enteroviruses in groundwater with the polymerase chain reaction. *Appl Environ Microbiol.* 1993; 59(5): 1318-1324.

Abbaszadegan M, Stewart P, LeChevallier M. A strategy for detection of viruses in groundwater by PCR. *Appl Environ Microbiol.* 1999 ; 65(2): 444-449.

Abbaszadegan M, LeChevallier M, Gerba C. Ocurrente of virases in US groundwaters. *J Am Water Works Associ.* 2003; 95: 107-120.

Altenburg BC, Graham DY, Estes MK. Ultrastructural study of rotavirus replication in cultured cells. *J Gen Virol.* 1980; 46(1): 75-85.

Araujo IT, Heinemann MB, Mascarenhas JDP, Assis RMS, Fialho AM, Leite JPG. Molecular analysis of NSP4 and VP6 genes of rotavírus strains recovered from hospitalized children in Rio de Janeiro, Brazil. *J Med Microbiol.* 2007; *in press*.

Barman P, Ghosh S, Das S, Varghese V, Chaudhuri S, Sarkar S, Krishnan T, Bhattacharya SK, Chakrabarti A, Kobayashi N, Naik TN. Sequencing and sequence analysis of VP7 and NSP5 genes reveal emergence of a new genotype of bovine group B rotaviruses in India. *J Clin Microbiol.* 2004; 42(6): 2816-2818.

Banyai K, Gentsch JR, Schipp R, Jakab F, Meleg E, Mihaly I, Szucs G. Dominating prevalence of P[8],G1 and P[8],G9 rotavirus strains among children admitted to hospital between 2000 and 2003 in Budapest, Hungary. *J Med Virol.* 2005a; 76(3): 414-423.

Banyai K, Forgach P, Erdelyi K, Martella V, Bogdan A, Hocsak E, Havasi V, Melegh B, Szucs G. Identification of the novel lapine rotavirus genotype P[22] from an outbreak of enteritis in a Hungarian rabbitry. *Virus Res.* 2005b; 113(2): 73-80.

Bellamy AR, Both GW. Molecular biology of rotaviruses. *Adv Virus Res.* 1990; 38: 1-43.

Banerjee I, Ramani S, Primrose B, Moses P, Iturriza-Gómara M, Gray JJ, Jaffar S, Monica B, Muliylil JP, Brown DW, Estes MK, Kang G. Comparative study of the epidemiology of rotavirus in children from a community-based birth cohort and a hospital in South India. *J Clin Microbiol.* 2006; 44(7):2468-74.

Beuret C. Simultaneous detection of enteric viruses by multiplex real-time RT-PCR. *J Virol Methods.* 2004; 115: 1-8.

Bishop RF, Davidson GP, Holmes IH & Ruck BJ. Virus particles in epithelial cells of duodenal mucosa from children with acute non-bacterial gastroenteritis. *Lancet.* 1973; 2: 1281-1283.

Bordalo AA, Onrassami R, Dechsakulwatana C. Survival of faecal indicator bacteria in tropical estuarine waters (Bangpakong River, Thailand). *J appl Microbiol.* 2002; 93: 864-871.

Bosch A. Human enteric viruses in the water environment: a minireview. *Int Microbiol.* 1998; 1(3): 191-196.

Brandt CD, Arndt CW, Evans GL, Kim HW, Stallings EP, Rodriguez WJ, Parrott RH. Evaluation of a latex test for rotavirus detection. *J Clin Microbiol.* 1987; 25(9): 1800-1802.

Cardoso DD, Soares CM, Dias e Souza MB, de Azevedo Mda S, Martins RM, Queiroz DA, de Brito WM, Munford V, Racz ML. Epidemiological features of rotavirus infection in Goiania, Goias, Brazil, from 1986 to 2000. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2003; 98(1): 25-29.

Carducci A, Casini B, Bani A, Rovini E, Verani M, Mazzoni F, Giuntini A. Virological control of groundwater quality using biomolecular tests. *Water Sci Technol*. 2003; 47(3): 261-266.

Carmona RC, Timenetsky Mdo C, da Silva FF, Granato CF. Characterization of rotavirus strains from hospitalized and outpatient children with acute diarrhoea in Sao Paulo, Brazil. *J Med Virol*. 2004; 74(1): 166-172.

Carvalho-Costa FA, Assis RM, Fialho AM, Boia MN, Alves DP, Martins CM, Leite JP. Detection and molecular characterization of group A rotavirus from hospitalized children in Rio de Janeiro, Brazil, 2004. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2006; 101(3): 291-294.

Castello AA, Arvay ML, Glass RI, Gentsch J. Rotavirus strain surveillance in Latin America: a review of the last nine years. *Pediatr. Infect. Dis. J*. 2004; 23(10):168-72.

CETESB. Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental. Setor de Transferência de Conhecimento Ambiental. Coleta e preservação de amostras de água. São Paulo, 2006.

Chapron CD, Ballester NA, Fontaine JH, Frades CN, Margolin AB. Detection of astroviruses, enteroviruses, and adenovirus types 40 and 41 in surface waters collected and evaluated by the information collection rule and an integrated cell culture-nested PCR procedure. *Appl Environ Microbiol*. 2000; 66(6): 2520-2525.

Chiba S, Yokoyama T, Nakata S et al. Protective effect of naturally acquired homotypic and heterotypic rotavirus antibodies. *Lancet*. 1986; 417-421.

Conner ME & Ramig RF. Viral Enteric Diseases. In: *Viral Pathogenesis*, ed. by Neal Nathanson et al., Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia. 1997; 713-774.

Cook SM, Glass RI, LeBaron CW, Ho MS. Global seasonality of rotavirus infections. *Bull World Health Organ*. 1990; 68(2): 171-177.

Cunliffe NA, Gondwe JS, Graham SM, Thindwa BD, Dove W, Broadhead RL, Molyneux ME, Hart CA. Rotavirus strain diversity in Blantyre, Malawi, from 1997 to 1999. *J Clin Microbiol.* 2001; 39(3): 836-843.

Cunliffe NA, Bresee JS, Gentsch JR, Glass RI, Hart CA. The expanding diversity of rotaviruses. *Lancet.* 2002; 359(9307): 640-642.

D'Souza RM, Hall G, Becker NG. Climatic factors associated with hospitalizations for rotavirus diarrhoea in children under 5 years of age. *Epidemiol Infect.* 2007; 1-9.

DATASUS-MS. Banco de dados do Sistema Único de Saúde/Ministério da Saúde - Brasil (www.datasus.gov.br).

Dennehy PH. Rotavirus vaccines-An update. *Vaccine.* 2007; 25(16): 3137-3141.

Das BK, Gentsch JR, Cicirello HG, Woods PA, Gupta A, Ramachandran M, Kumar R, Bhan MK, Glass RI. Characterization of rotavirus strains from newborns in New Delhi, India. *J Clin Microbiol.* 1994; 32(7): 1820-1822.

Davidson GP, Bishop RF, Townley RR, Holmes IH. Importance of a new virus in acute sporadic enteritis in children. *Lancet.* 1975; 1(7901): 242-246.

De Paula VS, Diniz-Mendes L, Villar LM, Luz SL, Silva LA, Jesus MS, da Silva NM, Gaspar AM. Hepatitis A virus in environmental water samples from the Amazon Basin. *Water Res.* 2007; 41(6): 1169-1176.

Dubois E, Le Guyader F, Haugarreau L, Kopecka H, Cormier M, Pommepuy M. Molecular epidemiological survey of rotaviruses in sewage by reverse transcriptase seminested PCR and restriction fragment length polymorphism assay. *Appl Environ Microbiol.* 1997; 63(5): 1794-1800.

Estes, KM. Rotaviruses and Their Replication In: Fields, BN, Knipe, DM, Howley, PM et al. *Virology.* 4 ed. Philadelphia, Lippincott-Raven Press. 2001; 747-1785.

Enriquez CE, Hurst CJ, Gerba CP. Survival of the enteric adenoviruses 40 and 41 in tap, sea and wastewater. *Water Res.* 1995; 29: 2548-2553.

Farahtaj F, Gallimore CI, Iturriza-Gómara M, Taremi M, Zali MR, Edalatkhah H, Fayaz A, Gray JJ. Rotavirus VP7, VP4 and VP6 genotypes co-circulating in Tehran, Iran, between 2003 and 2004. *Epidemiol Infect.* 2006; 1-5.

Farthing MJG. *Viruses and the Gut.* Welwyn Garden City, Hertfordshire: Smith Kline & French. 1989.

Feng N, Burns JW, Bracy L, Greenberg HB. Comparison of mucosal and systemic humoral immune responses and subsequent protection in mice orally inoculated with a homologous or a heterologous rotavirus. *J Virol.* 1994; 68(12): 7766-7773.

Flewett TH, Bryden AS & Davies H. Virus particles in gastroenteritis. *Lancet.* 1973; 2: 1497.

Flewett TH, Bryden AS, Davies H, Woode GN, Bridger JC, Derrick JM. Relation between viruses from acute gastroenteritis of children and newborn calves. *Lancet.* 1974; 2 (7872): 61-63.

Flewett TH. New prospects for control of virus diarrhoea in children. *J R Soc Med.* 1982; 75 (7): 493-494.

Flewett TH, Beards GM. Recent advances in the study of viral gastroenteritis. *Sci Prog.* 1989;73 (289 Pt 1): 33-51.

Fong TT, Lipp EK. Enteric viruses of humans and animals in aquatic environments: health risks, detection, and potential water quality assessment tools. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2005; 69(2): 357-371.

Fuhrman JA, Liang X, Noble RT. Rapid detection of enteroviruses in small volumes of natural waters by real-time quantitative reverse transcriptase PCR. *Appl Environ Microbiol.* 2005; 71(8): 4523-4530.

Gajardo R, Bouchriti N, Pinto RM, Bosch A. Genotyping of rotaviruses isolated from sewage. *Appl Environ Microbiol.* 1995; 61(9): 3460-3462.

Gentsch JR, Glass RI, Woods P, Gouvea V, Gorziglia M, Flores J, Das BK, Bhan MK. Identification of group A rotavirus gene 4 types by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol.* 1992; 30(6): 1365-1373.

Gerba CP, Rose JB, Haas CN, Crabtree KD. Waterborne rotavirus: a risk assessment. *Wat Res.* 1996; 30 (12): 2929 – 2940.

Gofti-Laroche L, Gratacap-Cavallier B, Genoulaz O, Joret JC, Hartemann P, Seigneurin JM, Zmirou D. A new analytical tool to assess health risks associated with the virological quality of drinking water (EMIRA study). *Water Sci Technol.* 2001; 43(12): 39-48.

Gouvea V, Glass RI, Woods P, Taniguchi K, Clark HF, Forrester B, Fang ZY. Polymerase chain reaction amplification and typing of rotavirus nucleic acid from stool specimens. *J Clin Microbiol.* 1990; 28(2): 276-282.

Gouvea V, Santos N, Timenetsky Mdo C. Identification of bovine and porcine rotavirus G types by PCR. *J Clin Microbiol.* 1994; 32(5): 1338-1340.

Gouvea V, Brantly M. Is rotavirus a population of reassortants? *Trends Microbiol.* 1995; 3: 159-162.

Greenberg HB, Valdesuso J, van Wyke K, Midthun K, Walsh M, McAuliffe V, Wyatt RG, Kalica AR, Flores J, Hoshino Y. Production and preliminary characterization of monoclonal antibodies directed at two surface proteins of rhesus rotavirus. *J. Virol.* 1983; 47: 267–275.

Guerrero CA, Mendez E, Zarate S, Isa P, Lopez S, Arias CF. Integrin alpha(v)beta(3) mediates rotavirus cell entry. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000; 97(26): 1464-1469.

Gulati BR, Deepa R, Singh BK, Rao CD. Diversity in Indian equine rotaviruses: identification of genotype G10,P6[1] and G1 strains and a new VP7 genotype (G16) strain in specimens from diarrheic foals in India. *J Clin Microbiol*. 2007; 45(3): 972-978.

Gusmao RH, Mascarenhas JD, Gabbay YB, Lins-Lainson Z, Ramos FL, Monteiro TA, Valente SA, Fagundes-Neto U, Linhares AC. Rotavirus subgroups, G serotypes, and electrophoretotypes in cases of nosocomial infantile diarrhoea in Belem, Brazil. *J Trop Pediatr*. 1999; 45(2): 81-86.

Hall TA. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl Acids Symp Ser*. 1999; 41: 95-98.

Hewish MJ, Takada Y, Coulson BS. Integrins alpha2beta1 and alpha4beta1 can mediate SA11 rotavirus attachment and entry into cells. *J Virol*. 2000; 74: 228-236.

Hopkins RS, Gaspard Jr GB, Williams FP, Karlin RJ, Cukor G, Blacklow NR. A community waterborne gastroenteritis outbreak: evidence for rotavirus as the agent. *Am J Public Health*. 1984; 74: 263 -265.

Hoshino Y, Wagner M, Yan XY, Perez-Schael I, Kapikian AZ. Horizontal transmission of rhesus monkey rotavirus-based quadrivalent vaccine during a phase 3 clinical trial in Caracas, Venezuela. *J Infect Dis*. 2003; 187(5): 791-800.

Hot D, Legeay O, Jacques J, Gantzer C, Caudrelier Y, Guyard K, Lange M, Andreoletti L. Detection of somatic phages, infectious enteroviruses and enterovirus genomes as indicators of human enteric viral pollution in surface water. *Water Res*. 2003; 37(19): 4703-4710.

Hung T, Chen GM, Wang CG. Waterborne outbreak of rotavirus diarrhoea in adults in China caused by a novel rotavirus. *Lancet*. 1984; 1(8387): 1139-1142.

Ijzerman MM, Dahling DR, Fout GS. A method to remove environmental inhibitors prior to the detection of waterborne enteric viruses by reverse transcription-polymerase chain reaction. *J Virol Methods*. 1997; 63(1-2): 145-153.

Informe Geo Manaus 2002. Projeto Geo Cidades: relatório ambiental urbano integrado. 2002; Rio de Janeiro: Concórdio Parceria 21.

Instituto Adolfo Lutz e Centro de Vigilancia Epidemiologica Professor Alexandre Vranjac. Diarrhea and rotavírus. *Rev Saude Publica*. 2004; 38(6):844-5.

Iturriza-Gómara M, Wong C, Blome S, Desselberger U, Gray J. Molecular characterization of VP6 genes of human rotavirus isolates: correlation of genogroups with subgroups and evidence of independent segregation. *J Virol*. 2002; 76(13): 6596-6601.

Jayaram H, Estes MK, Prasad BV. Emerging themes in rotavirus cell entry, genome organization, transcription and replication. *Virus Res*. 2004; 101(1): 67-81.

Jiang B, Denneyh PH, Spangenbergerr S, Gentsch JR & Glass RI. First detection of group C rotavirus in fecal specimens of children with diarrhea in the United States. *J. Infect Dis*. 1995; 172: 45-50.

Kane EM, Turcios RM, Arvay ML, Garcia S, Bresee JS, Glass RI. The epidemiology of rotavirus diarrhea in Latin America. Anticipating rotavírus vaccines. *Rev Panam Salud Publica*. 2004; 16(6): 371-377.

Kang G, Iturriza-Gomara M, Wheeler JG, Crystal P, Monica B, Ramani S, Primrose B, Moses PD, Gallimore CI, Brown DW, Gray J. Quantitation of group A rotavirus by real-time reverse-transcription-polymerase chain reaction: correlation with clinical severity in children in South India. *J Med Virol*. 2004; 73(1):118-122.

Kapikian AZ, Kim HW, Wyatt RG, Rodriguez WJ, Ross S, Cline WL, Parrott RH, Chanock RM. Reoviruslike agent in stools: association with infantile diarrhea and development of serologic tests. *Science*. 1974; 185(156): 1049-1053.

Kapikian AZ, Hoshino Y & Chanock RM. Rotaviruses. In: Fields, BN, Knipe DM, Howley PM *et al*. *Virology*. 4 ed. Philadelphia, Lippincott-Raven Press. 2001; 1787-1825.

Katayama H, Shimasaki A, Ohgaki S. Development of a virus concentration method and its application to detection of enterovirus and norwalk virus from coastal seawater. *Appl Environ Microbiol*. 2002; 68(3): 1033-1039.

Kittigul L, Khamoun P, Sujirarat D, Utrarachkij F, Chitpirom K, Chaichantanakit N, Vathanophas K. An improved method for concentrating rotavirus from water samples. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2001; 96(6): 815-821.

Kittigul L, Ekchaloemkiet S, Utrarachkij F, Siripanichgon K, Sujirarat D, Pungchitton S, Boonthum A. An efficient virus concentration method and RT-nested PCR for detection of rotaviruses in environmental water samples. *J Virol Methods*. 2005; 124(1-2):117-122.

Khamrin P, Peerakome S, Wongsawasdi L, Tonusin S, Sornchai P, Maneerat V, Khamwan C, Yagyu F, Okitsu S, Ushijima H, Maneekarn N. Emergence of human G9 rotavirus with an exceptionally high frequency in children admitted to hospital with diarrhea in Chiang Mai, Thailand. *J Med Virol*. 2006; 78(2): 273-280.

Khamrin P, Maneekarn N, Peerakome S, Chan-It W, Yagyu F, Okitsu S, Ushijima H. Novel porcine rotavirus of genotype P[27] shares new phylogenetic lineage with G2 porcine rotavirus strain. *Virology*. 2007; 361(2): 243-252.

Krishnan T, Sen A, Choudhury JS *et al*. Emergence of adult diarrhoea rotavirus in Calcutta, India. *Lancet*. 1999; 353 (9150): 380-381.

Konno T, Suzuki H, Kitaoka S, Sato T, Fukuhara N, Yoshie O, Fukudome K, Numazaki Y. Proteolytic enhancement of human rotavirus infectivity. Clin Infect Dis. 1993; 16(2):92-97.

Kosek M, Bern C & Guerrant RL. The global burden of diarrhoeal disease, as estimated from studies published between 1992 and 2000. Bull. OMS. 2003; 81: 197-201.

Kukkula M, Arstila P, Klossner ML, Maunula L, Bonsdorff CH, Jaatinen P. Waterborne outbreak of viral gastroenteritis. Scand J Infect Dis. 1997; 29(4): 415-418.

Kumar S, Tamura K, Jakobsen IB, Nei M. MEGA2: molecular evolutionary genetics analysis software. Bioinformatics. 2001; 17(12): 1244-5.

Leite JPG, Alfieri AA, Woods PA et al. Rotavirus G and P types circulating in Brazil: characterization by RT-PCR, probe hybridization and sequence analysis. Arch. Virol. 1996; 141: 2265-2274.

Linhares AC, Pinheiro FP, Schmetz C et al. Duovirus (rotavirus) em Belém do Para. Rev. Inst. Med. Trop. 1977. 19(4): 278-279.

Linhares AC, Moncao HC, Gabbay YB, de Araujo VL, Serruya AC, Loureiro EC. Acute diarrhoea associated with rotavirus among children living in Belem, Brazil. Trans R Soc Trop Med Hyg. 1983; 77(3): 384-390.

Linhares AC, Gabbay YB, Freitas RB et al. Longitudinal study of rotavirus infections among children from Belém, Brazil. Epidemiol. Infect. 1989. 102(1): 129-145.

Linhares AC. Epidemiologia das infecções por rotavírus e os desafios para o seu controle. Cad. Saúde Pública. 2000; 16(3): 629 – 646.

Liprandi F, Gerder M, Bastidas Z, Lopez JA, Pujol FH, Ludert JE, Joelsson DB, Ciarlet M. A novel type of VP4 carried by a porcine rotavirus strain. Virology. 2003; 315(2):373-380.

Logan KB, Scott GE, Seeley ND, Primrose SB. A portable device for the rapid concentration of viruses from large volumes of natural freshwater. *J Virol Methods*. 1981; 3(4): 241-249.

Logan C, O'Leary JJ, O'Sullivan N. Real-time reverse transcription-PCR for detection of rotavirus and adenovirus as causative agents of acute viral gastroenteritis in children. *J Clin Microbiol*. 2006; 44(9): 3189-3195.

Luz CR, Mascarenhas JD, Gabbay YB, Motta AR, Lima TV, Soares Lda S, Linhares AC. Rotavirus serotypes and electropherotypes identified among hospitalised children in Sao Luis, Maranhao, Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2005; 47(5): 287-93.

Lycke E, Blomberg J, Berg G, Eriksson A, Madsen L. Epidemic acute diarrhoea in adults associated with infantile gastroenteritis virus. *Lancet*. 1978; 2 (8098):1056-1057.

Magalhães F, Rojas E. The re-urbanization of the city center of Manaus, Brazil - Facing the challenges of informal settlements. 2005; 41^o Congresso ISoCaRP.

Martella V, Ciarlet M, Banyai K, Lorusso E, Arista S, Lavazza A, Pezzotti G, Decaro N, Cavalli A, Lucente MS, Corrente M, Elia G, Camero M, Tempesta M, Buonavoglia C. Identification of group A porcine rotavirus strains bearing a novel VP4 (P) Genotype in Italian swine herds. *J Clin Microbiol*. 2007; 45(2): 577-580.

Mascarenhas JDP, Paiva FL, Barardi CRM et al. Rotavirus G and P types in children from Belém, Northern Brasil, as determined by RT-PCR: Occurrence of mixed P type infections. *J. Diarrhoeal Dis. Res*. 1998; 16 (1): 8-14.

Matson DO, O'Ryan ML, Herrera I, Pickering LK, Estes MK. Fecal antibody responses to symptomatic and asymptomatic rotavirus infections. *J Infect Dis*. 1993; 167(3): 577-583.

Mehnert DU, Stewien KE. Detection and distribution of rotavirus in raw sewage and creeks in Sao Paulo, Brazil. *Appl Environ Microbiol*. 1993; 59(1): 140-143.

Mehnert DU, Stewien KE, Harsi CM, Queiroz AP, Candeias JM, Candeias JA. Detection of rotavirus in sewage and creek water: efficiency of the concentration method. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1997; 92(1): 97-100.

Melnick JL. Poliomyelitis virus in urban sewage in epidemic and non-epidemic times. *Am J Hyg*. 1947; 45: 240-53

Metcalf TG, Melnick JL, Estes MK. Environmental virology: from detection of virus in sewage and water by isolation to identification by molecular biology--a trip of over 50 years. *Annu Rev Microbiol*. 1995; 49: 461-87.

Min BS, Noh YJ, Shin JH, Baek SY, Min KI, Ryu SR, Kim BG, Park MK, Choi SE, Yang EH, Park SN, Hur SJ, Ahn BY. Assessment of the quantitative real-time polymerase chain reaction using a cDNA standard for human group A rotavirus. *J Virol Methods*. 2006; 137(2): 280-286.

Murphy BR, Morens DM, Simonsen L, Chanock RM, La Montagne JR, Kapikian ZA. Reappraisal of the association of intussusception with the licensed live rotavirus vaccine challenges initial conclusions. *J Infect Dis*. 2003; 187: 1301-1308.

O'Ryan ML, Matson DO, Estes MK, Pickering LK. Anti-rotavirus G type-specific and isotype-specific antibodies in children with natural rotavirus infections. *J. Infect. Dis*. 1994; 169: 504-511.

Offit PA. Host factors associated with protection against rotavirus disease: the skies are clearing. *J Infect Dis*. 1996; 174 (1): 59-64.

Oishi I, Yamazaki K & Minekawa Y. An occurrence of diarrheal cases associated with group C rotavirus in adults. *Microbiol. and Immunol*. 1993; 37: 505-509.

OMS. Organização Mundial de Saúde. Report on Infectious Diseases: Removing obstacles to Healthy Development. 1999; 1-68.

OMS. Organização Mundial de Saúde. Information Products on Water Sanitation and Health. 2004.

Oragui JI, Mara DD. Simple method for the detoxification of wastewater ultrafiltration concentrates for rotavirus assay by indirect immunofluorescence. *Appl Environ Microbiol.* 1989; 55(2): 401-405.

Palombo EA, Bishop RF, Cotton RGH. Intra- and inter- season genetic variability in the VP7 gene of serotype 1 (monotype 1a) rotavirus clinical isolates. *Arch. Virol.* 1993; 130: 57-69.

Pang XL, Lee B, Boroumand N, Leblanc B, Preiksaitis JK, Yu Ip CC. Increased detection of rotavirus using a real time reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) assay in stool specimens from children with diarrhea. *J Med Virol.* 2004; 72(3): 496-501.

Parashar UD, Bresee JS, Glass RI. The global burden of diarrhoeal disease in children. *Bull World Health Organ.* 2003; 81(4): 236.

Parashar UD & Glass RI. Progress Towards Rotavirus Vaccines. *Science.* 2006; 312: 851-852.

Pereira HG, Leite JP, Azeredo RS, de Farias V, Sutmoller F. An atypical rotavirus detected in a child with gastroenteritis in Rio de Janeiro, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1983a; 78(3): 245-250.

Pereira HG, Azeredo RS, Leite JPG et al. Comparison of polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE), immuno-electron microscopy (IEM) and enzyme immunoassay (EIA) for the rapid diagnosis of rotavirus infection in children. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz,* 1983b; 78(4): 483-490.

Pereira HG, Azeredo RS, Leite JP, Andrade ZP, De Castro L. A combined enzyme immunoassay for rotavirus and adenovirus (EIARA). *J Virol Methods*. 1985; 10(1): 21-28.

Penaranda ME, Cubitt WD, Sinarachatanant P, et al. Group C rotavirus infection in patients with diarrhea in Thailand, Nepal, and England. *J. Infect. Dis*. 1989; 160: 392-397.

Prasad BV, Burns JW, Marietta E, Estes MK, Chiu W. Localization of VP4 neutralization sites in rotavirus by three-dimensional cryo-electron microscopy. *Nature*. 1990; 343(6257): 476-479.

Puig M, Jofre J, Lucena F, Allard A, Wadell G, Girones R. Detection of adenoviruses and enteroviruses in polluted waters by nested PCR amplification. *Appl Environ Microbiol*. 1994; 60(8): 2963-2970.

Pusch D, Oh DY, Wolf S, Dumke R, Schroter-Bobsin U, Hohne M, Roske I, Schreier E. Detection of enteric viruses and bacterial indicators in German environmental waters. *Arch Virol*. 2005; 150 (5): 929-947.

Queiroz AP, Santos FM, Sassaroli A, Harsi CM, Monezi TA, Mehnert DU. Electropositive filter membrane as an alternative for the elimination of PCR inhibitors from sewage and water samples. *Appl Environ Microbiol*. 2001; 67(10): 4614-4618.

Rahman M, Banik S, Faruque AS, Taniguchi K, Sack DA, Van Ranst M, Azim T. Detection and characterization of human group C rotaviruses in Bangladesh. *J Clin Microbiol*. 2005a; 43(9): 4460-4465.

Rahman M, Matthijnssens J, Nahar S, Podder G, Sack DA, Azim T, Van Ranst M. Characterization of a novel P[25],G11 human group a rotavirus. *J Clin Microbiol*. 2005b; 43(7):3208-12.

Rahman M, Matthijnssens J, Yang X, Delbeke T, Arijs I, Taniguchi K, Iturriza-Gomara M, Iftekharruddin N, Azim T, Van Ranst M. Evolutionary history and global spread of the emerging g12 human rotaviruses. *J Virol*. 2007; 81(5):2382-90.

Ramachandran M, Kirkwood CD, Unicomb L, Cunliffe NA, Ward RL, Bhan MK, Clark HF, Glass RI, Gentsch JR. Molecular characterization of serotype G9 rotavirus strains from a global collection. *Virology*. 2000; 278(2): 436-444.

Ramig RF. Genetics of the rotaviruses. *Ann Rev Microbiol*. 1997; 51: 225-255.

Rao VC. Introduction to environmental virology. In *Methods in Environmental Virology*. 1982. Ed CP Gerba, SM Goyal. pp 1 – 13. New York: Decker.

Rao CD, Gowda K, Reddy BSY. Sequence Analysis of VP4 and VP7 genes of nontypeable strains identifies a new pair of outer capsid proteins representing novel P and G genotypes in bovine rotaviruses. *Virology*. 2000; 276: 104-113.

Raphael RA, Sattar SA, Springthorpe VS. Long-term survival of human rotavirus in raw and treated river water. *Can J Microbiol*. 1985; 31(2): 124-128.

da Rosa e Silva ML, Naveca FG, Pires de Carvalho I. Epidemiological aspects of rotavirus infections in Minas Gerais, Brazil. *Braz J Infect Dis*. 2001; 5(4): 215-222.

Rose MA, Dhar AK, Brooks HA, Zecchini F, Gersberg RM. Quantitation of hepatitis A virus and enterovirus levels in the lagoon canals and Lido beach of Venice, Italy, using real-time RT-PCR. *Water Res*. 2006; 40(12): 2387-2396.

Ruiz-Palacios GM, Perez-Schael I, Velazquez FR, Abate H, Breuer T, Clemens SC, Cheuvart B, Espinoza F, Gillard P, Innis BL, Cervantes Y, Linhares AC, Lopez P, Macias-Parra M, Ortega-Barria E, Richardson V, Rivera-Medina DM, Rivera L, Salinas B, Pavia-Ruz N, Salmeron J, Ruttimann R, Tinoco JC, Rubio P, Nunez E, Guerrero ML, Yarzabal JP, Damaso S, Tornieporth N, Saez-Llorens X, Vergara RF, Vesikari T, Bouckenoghe A, Clemens R, De Vos B, O'Ryan M; Human Rotavirus Vaccine Study

Group. Safety and efficacy of an attenuated vaccine against severe rotavirus gastroenteritis. *N Engl J Med.* 2006; 354(1): 11-22.

Sambrook J, Fritsch EF, Maniats D. *Molecular Cloning: laboratory manual.* 3^a ed. Nova York: Cold Spring Haroor laboratory Press, Cold Spring Haroor, 2001.

Sanchez-Fauquier A, Wilhelmi I, Colomina J, Cubero E, Roman E. Diversity of group A human rotavirus types circulating over a 4-year period in Madrid, Spain. *J Clin Microbiol.* 2004; 42(4): 1609-1613.

Santos N, Volotao EM, Soares CC, Albuquerque MC, da Silva FM, de Carvalho TR, Pereira CF, Chizhikov V, Hoshino Y. Rotavirus strains bearing genotype G9 or P[9] recovered from Brazilian children with diarrhea from 1997 to 1999. *J Clin Microbiol.* 2001; 39(3): 1157-1160.

Santos N & Hoshino Y. Global distribution of rotavirus serotypes/genotypes and its implication for the development and implementation of an effective rotavirus vaccine. *Rev. Med. Virol.* 2005; 15(1): 29-56.

Santos N, Volotao EM, Soares CC, Campos GS, Sardi SI, Hoshino Y. Predominance of rotavirus genotype G9 during the 1999, 2000, and 2002 seasons among hospitalized children in the city of Salvador, Bahia, Brazil: implications for future vaccine strategies. *J Clin Microbiol.* 2005b; 43(8): 4064-4069.

Sattar SA, Raphael RA, Springthorpe VS. Rotavirus survival in conventionally treated drinking water. *Can J Microbiol.* 1984; 30(5): 653-656.

Schwab KJ, De Leon R, Sobsey MD. Concentration and purification of beef extract mock eluates from water samples for the detection of enteroviruses, hepatitis A virus, and Norwalk virus by reverse transcription-PCR. *Appl Environ Microbiol.* 1995; 61(2): 531-537.

Schvoerer E, Bonnet F, Dubois V, Cazaux G, Serceau R, Fleury HJ, Lafon ME. PCR detection of human enteric viruses in bathing areas, waste waters and human stools in Southwestern France. *Res Microbiol.* 2000; 151(8): 693-701.

Smith EM, Gerba CP. Development of a method for detection of human rotavirus in water and sewage. *Appl Environ Microbiol.* 1982; 43(6): 1440-1450.

Solic M, Krstulovic N. Separate and combined effects of solar radiation, temperature, salinity, and pH on the survival of faecal coliforms in seawater. *Mar Poll Bull.* 1992; 24: 411-416.

Solodovnikov IUP, Nechiporenko NG, Tregub AV, Kuz'mina NA, Balandin AI. The epidemiology of rotavirus gastroenteritis. *Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol.* 1989; 10: 43-48.

Sóule H, Genoulaz O, Gratacap-Cavallier B, Chevallier P, Liu JX, Seigneurin J. Ultrafiltration and Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction: an efficient process for poliovirus, rotavirus and hepatitis A virus detection in water. *Wat Res.* 2000; 34(3): 1063-1076.

Souza EC, Martinez MB, Taddei CR, Mukai L, Gilio AE, Racz ML, Silva L, Ejzenberg B, Okay Y. Etiologic profile of acute diarrhea in children in Sao Paulo. *J Pediatr (Rio J).* 2002; 78(1): 31-38.

Souza MB, Racz ML, Leite JP, Soares CM, Martins RM, Munford V, Cardoso DD. Molecular and serological characterization of group a rotavirus isolates obtained from hospitalized children in Goiania, Brazil, 1998-2000. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2003; 22(7): 441-443.

Stewien KE, da Cunha LC, Alvim Ade C, dos Reis Filho SA, Alvim MA, Brandao AA, Neiva MN. Rotavirus associated diarrhoea during infancy in the city of S. Luis (MA), Brazil: a two-year longitudinal study. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 1991; 33(6): 459-464.

Straub TM, Chandler DP. Towards a unified system for detecting waterborne pathogens. J Microbiol Methods. 2003; 53(2): 185-197.

SVS-MS. Serviço de Vigilância em Saúde. (http://portal.saude.gov.br/portal/saude/area.cfm?id_area=962).

Sutmoller F, Azeredo RS, Lacerda MD, Barth OM, Pereira HG, Hoffer E, Schatzmayr HG. An outbreak of gastroenteritis caused by both rotavirus and Shigella sonnei in a private school in Rio de Janeiro. J Hyg (Lond). 1982; 88(2): 285-293.

Taniguchi K & Urasawa S. Diversity in rotavirus genomes. Seminars in Virology. 1995; 6: 123-131.

Taraporewala ZF, Jiang X, Vasquez-Del Carpio R, Jayaram H, Prasad BV, Patton JT. Structure-function analysis of rotavirus NSP2 octamer by using a novel complementation system. J Virol. 2006 ;80(16): 7984-7894.

Tavares TM, Cardoso DDP, Brito WMED. Vírus entéricos veiculados por água: aspectos microbiológicos e de controle de qualidade da água. Rev Patologia Tropical. 2005; 34 (2): 85-105.

Tian P, Ball JM, Zeng CQY, Estes MK. The rotavirus nonstructural glycoprotein NSP4 possesses membrane destabilization activity. J. Virol. 1996; 70: 6973-6981.

Timenetsky MC, Santos N & Gouvea V. Survey of rotavirus G and P types associated with human gastroenteritis in São Paulo, Brazil, from 1986 to 1992. J. Clin. Microbiol. 1994; 32: 2622-2624.

van Zyl WB, Page NA, Grabow WO, Steele AD, Taylor MB. Molecular epidemiology of group A rotaviruses in water sources and selected raw vegetables in southern Africa. Appl Environ Microbiol. 2006 Jul;72(7):4554-4560.

Velazquez FR, Matson DO, Calva JJ, Guerrero L, Morrow AL, Carter-Campbell S, Glass RI, Estes MK, Pickering LK, Ruiz-Palacios GM. Rotavirus infections in infants as protection against subsequent infections. *N Engl J Med*. 1996; 35(14): 1022-1028.

Vieira, S. Bioestatística – Tópicos avançados. Ed. Campos. 2ª ed. 2004.

Villar LM, de Paula VS, Diniz-Mendes L, Lampe E, Gaspar AM. Evaluation of methods used to concentrate and detect hepatitis A virus in water samples. *J Virol Methods*. 2006; 137(2):169-76.

Villena C, Gabrieli R, Pinto RM, Guix S, Donia D, Buonomo E, Palombi L, Cenko F, Bino S, Bosch A, Divizia M. A large infantile gastroenteritis outbreak in Albania caused by multiple emerging rotavirus genotypes. *Epidemiol Infect*. 2003 Dec;131(3):1105-1110.

Volotao EM, Soares CC, Maranhao AG, Rocha LN, Hoshino Y, Santos N. Rotavirus surveillance in the city of Rio de Janeiro-Brazil during 2000-2004: detection of unusual strains with G8P[4] or G10P[9] specificities. *J Med Virol*. 2006; 78(2): 263-272.

Von Sperling, M. Introdução ao tratamento das águas e ao tratamento de esgotos. Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental – UFMG. 1ª ed. Belo Horizonte; 2005.

Ward RL, Knowlton DR, Winston PE. Mechanism of inactivation of enteric viruses in fresh water. *Appl Environ Microbiol*. 1986;52(3): 450-459.

Ward RL, Bernstein DI, Knowlton DR, Sherwood JR, Young EC, Cusack TM, Rubino JR, Schiff GM. Prevention of surface-to-human transmission of rotaviruses by treatment with disinfectant spray. *Clin Microbiol*. 1991; 29(9): 1991-1996.

Ward RL. Mechanisms of protection against rotavirus in humans and mice. *J Infect Dis*. 1996 Sep;174 (1): 51-58.

Wyn-Jones AP, Sellwood J. Enteric viruses in the aquatic environment. *J Appl Microbiol.* 2001; 91(6): 945-962.

Yolken RH, Barbour BA, Wyatt RG, Kapikian AZ. Immune response to rotaviral infection-measurement by enzyme immunoassay. *J Am Vet Med Assoc.* 1978; 173 (5 Pt 2): 352-354.

Yuan L, Ward LA, Rosen BI, To TL, Saif LJ. Systematic and intestinal antibody-secreting cell responses and correlates of protective immunity to human rotavirus in a gnotobiotic pig model of disease. *J Virol.* 1996; 70(5): 3075-3083.

Zarate S, Espinosa R, Romero P et al. The VP5 domain of VP4 can mediate attachment of rotaviruses to cells. *J. Virol.* 2000; 74(2): 593-599.

Zheng BJ, Ma GZ, Tam JS, Lo SK, Ng MH, Lam BC, Yeung CY, Lo M. The effects of maternal antibodies on neonatal rotavirus infection. *Pediatr Infect Dis J.* 1991; 10(11): 865-868.

10 ANEXOS

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)