

Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz
Curso de Pós-Graduação em Biologia Parasitária

**Monitoramento do vírus da hepatite A na Lagoa Rodrigo de Freitas,
do Município do Rio de Janeiro, RJ.**

Anna Carolina de Oliveira Mendes

Instituto Oswaldo Cruz

Rio de Janeiro, Abril de 2009

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.



Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz
Curso de Pós-Graduação em Biologia Parasitária

**Monitoramento do vírus da hepatite A na Lagoa Rodrigo de Freitas do Município
do Rio de Janeiro, RJ.**

Anna Carolina de Oliveira Mendes

Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária
Instituto Oswaldo Cruz
Fundação Oswaldo Cruz

Orientadora: Dra. Ana Maria Coimbra Gaspar

Rio de Janeiro, Abril de 2009

Ficha catalográfica elaborada pela
Biblioteca de Ciências Biomédicas/ ICICT / FIOCRUZ - RJ

M538

Mendes, Anna Carolina de Oliveira

Monitoramento do vírus da hepatite A na Lagoa Rodrigo de Freitas do Município do Rio de Janeiro, RJ / Anna Carolina de Oliveira Mendes. – Rio de Janeiro, 2009.

xvii, 80 f. : il. ; 30 cm.

Dissertação (mestrado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-graduação em Biologia Parasitária, 2009.

Bibliografia: f. 63-80

1. Hepatite A. 2. Método de concentração. 3. qRT-PCR. 4. RT-Nested-PCR. 5. Amostras ambientais. I. Título.

CDD 616 3623



Ministério da Saúde

Fundação Oswaldo Cruz

Instituto Oswaldo Cruz

Curso de Pós-Graduação em Biologia Parasitária

Dissertação desenvolvida no Laboratório de Desenvolvimento Tecnológico em Virologia do Instituto Oswaldo Cruz da Fundação Oswaldo Cruz, com suportes financeiros do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Coordenação Geral de Vigilância em Saúde Ambiental (CGVAM).

Aos meus Pais Nilton e Sueli,

É com muito orgulho que dedico essa dissertação a vocês, que esticaram a mão e me deram colo nos momentos de fraqueza, entenderam a minha ausência, me incentivaram e, acima de tudo, me mostraram um modelo de determinação que eu deveria seguir. É difícil achar palavras para definir a importância de vocês nessa caminhada, por isso vou resumir em três que talvez cheguem perto: AMO MUITO VOCÊS!

AGRADECIMENTOS

Toda a minha jornada só foi possível porque pude contar com o apoio e a amizade de muitos. Deixo aqui, com muito carinho, meus sinceros agradecimentos a todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a elaboração dessa dissertação. Agradeço:

- ❖ À Deus, em primeiro lugar, por estar sempre comigo.
- ❖ À Dr^a. Ana Maria Coimbra Gaspar pela orientação e oportunidade de desenvolver esse trabalho.
- ❖ Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de estudos de mestrado.
- ❖ À coordenação e a secretaria do programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária (PGBP) pela oportunidade de participar do programa, e a todos os seus funcionários pela boa vontade e disponibilidade, em especial à Fabíola Ferrari, pelo carinho e atenção durante esses dois anos.
- ❖ Ao Dr. Adilson José de Almeida, Dr. Vinícius Fortes Farjalla e a Dr^a. Marise Dutra Asensi pela participação como membros da banca examinadora dessa dissertação.
- ❖ Ao Dr. Adilson José de Almeida, obrigada pela excelente revisão deste trabalho, pelas análises estatísticas e pela prontidão e apoio sempre que precisei.
- ❖ À Dr^a. Jaqueline Mendes de Oliveira, pela revisão deste trabalho, pelo apoio, confiança e amizade. Pelos puxões de orelha e críticas construtivas que me fizeram crescer muito durante esses dois anos.
- ❖ À Dr^a. Marize Pereira Miagostovich, pela revisão deste trabalho, pela amizade e prontidão. Por sua maneira “dura” que não é dura de dizer o melhor caminho a seguir.
- ❖ À amiga Carmen Baur Vieira, pela amizade e parceria no desenvolvimento deste trabalho. Obrigada por tornar os momentos difíceis em situações tranquilas e pelas palavras de carinho e apoio incondicional. A você, o meu muito OBRIGADO!
- ❖ Ao Amigo Tulio Machado Fumian pela ajuda no preparo da curva padrão. Também fica aqui registrado o meu obrigado por todos os momentos de alegria que me proporcionastes.
- ❖ A Dr^a. Marcia Therezinha Baroni de Moraes, pesquisadora do Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos de Manguinhos (Biomanguinhos), pela disponibilidade em ajudar nos experimentos de clonagem.
- ❖ Aos amigos do grupo de Virologia Ambiental (VAMB), Flávia Ramos Guimarães e Matias Victoria, pelo companheirismo, auxílio e amizade durante a realização deste trabalho.
- ❖ À amiga Tamara Fogel, é difícil achar palavras para definir o que foi você durante a realização desse trabalho. Obrigada por todos os momentos, tanto os de força e apoio incondicional como os de carinho e colo nas horas de dificuldade. Amiga, você foi um presente que o mestrado me deu. Te amo muito!
- ❖ À amiga Débora Regina Lopes dos Santos, pela atenção, ajuda e estímulo durante esses dois anos. Obrigada, pelos conselhos e pela demonstração de que sempre é possível alcançar os nossos objetivos. Sem o seu apoio seria difícil trilhar esse caminho.

- ❖ À amiga Luciane Almeida Amado, por ser tão prestativa e carinhosa. Um exemplo de competência. Foram muitas perguntas “nível 2”, todas elas respondidas. Difícil definir a gratidão que sinto por você.
- ❖ Aos amigos do Laboratório de Desenvolvimento Tecnológico em Virologia, cada um com seu jeitinho especial fez parte da elaboração deste trabalho. Amanda Perse, Juliana Freitas, Renata Tourinho, Gentil Arthur, Alexandre Silva, Tatiana Prado, Matheus Kafuri e à Dr^a. Vanessa Salete de Paula.
- ❖ Um agradecimento especial a Dr^a. Sheila Maria, do Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos de Manguinhos (Biomanguinhos), por todo o apoio durante o início deste trabalho.
- ❖ Aos amigos do Laboratório de Virologia Comparada pela companhia nos dias de trabalho. Em especial: Juliana Bragazzi Cunha, Juliana Andrade, Luiz Fernando López Tort, Maria da Penha “Dadade”, Mônica Ferreira e ao Dr. José Paulo Gagliardi Leite.
- ❖ À amiga Marcelle Figueira Marques, por toda a ajuda nas análises filogenéticas deste trabalho, e o seu apoio nas horas difíceis, muitas horas de msn e skype. Sua ajuda foi valiosa. OBRIGADA!
- ❖ Aos amigos da turma 2007 da Biologia Parasitária, pois conhecer vocês no mestrado fez as coisas parecerem mais simples. Em especial: Daniela Rozas, Mariana Gandini, Mariana Almeida e Aline Lima.
- ❖ A todos do Laboratório de Referência Nacional para Hepatites Virais, em especial: a Dr^a. Clara Fumiko Tachibana Yoshida, e aos amigos Lucy Dalva e Allan Perez da Silva por todos os momentos de carinho e amizade.
- ❖ Ao amigo César Pinho, pelo excelente serviço prestado como barqueiro neste estudo.
- ❖ Ao meu namorado Felipe Alves dos Santos Lopes, pela formatação deste trabalho, por toda a compreensão, paciência e carinho durante esses dois anos. Amor, não foi fácil, mas sem a sua ajuda tenho certeza de que esse caminho seria muito mais difícil. Amo você.
- ❖ À amiga Maria Clara Manso, obrigada pelos momentos de apoio incondicional, carinho e amizade. A vida fica mais fácil quando compartilhada.
- ❖ À amiga Simone de Jesus Ferreira, obrigada pela paciência, apoio e respeito aos meus momentos de ausência.
- ❖ Agradeço também às pessoas que me ajudaram a trilhar esse caminho, pessoas essas que agradeço pelo simples fato de existirem: meu irmão, minha cunhada, minha sobrinha (escutar o seu “didi” renova as minhas forças), madrinha, tias, tios e primas. Obrigada pelo carinho, e incentivo durante esses dois anos de trabalho.

“Há um tempo em que é preciso abandonar as roupas usadas, que já tem a forma do nosso corpo, e esquecer os nossos caminhos, que nos levam sempre aos mesmos lugares. É o tempo da travessia: e, se não ousarmos fazê-la, teremos ficado, para sempre, à margem de nós mesmos.”

(Fernando Pessoa)

LISTA DE TABELAS

| | | |
|--------------|--|----|
| TABELA 5.1. | ANÁLISE UNIVARIADA DOS PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS MENSURADOS EM CADA PONTO DE COLETA NA LAGOA RODRIGO DE FREITAS, RJ, NO PERÍODO DE AGOSTO DE 2007 A JULHO DE 2008..... | 38 |
| TABELA 5.2 | VALORES DA ANÁLISE MICROBIOLÓGICA DE COLIFORMES FECAIS EM NMP/100ML DAS AMOSTRAS COLETADAS NA LAGOA RODRIGO DE FREITAS, RIO DOS MACACOS E PRAIA DO LEBLON NO PERÍODO DE AGOSTO DE 2007 A JULHO DE 2008..... | 43 |
| TABELA 5.3 | CONTROLE POSITIVO DO VÍRUS DA HEPATITE A EM DIFERENTES MATRIZES AQUÁTICAS (LAGOA, RIO E MAR), UTILIZANDO OS MÉTODOS DE CONCENTRAÇÃO VIRAL COM MEMBRANA CARREGADA NEGATIVAMENTE E PCR EM TEMPO REAL (TAQMAN QRT-PCR)..... | 45 |
| TABELA 5.4. | ANÁLISE BIVARIADA (SPEARMAN) ENTRE OS PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS E A DETECÇÃO QUANTITATIVA DE HAV (TAQMAN QRT-PCR) NAS AMOSTRAS DE ÁGUA (N = 144)..... | 47 |
| TABELA 5.5. | ANÁLISE BIVARIADA (SPEARMAN) ENTRE OS PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS E A DETECÇÃO QUANTITATIVA DE HAV (TAQMAN QRT-PCR) NAS AMOSTRAS DE ÁGUA (N = 31)..... | 48 |
| TABELA 5. 6. | COMPARAÇÃO DOS RESULTADOS DE DETECÇÃO DO HAV-RNA POR -RT <i>NESTED</i> -PCR X PCR EM TEMPO REAL (QRT-PCR) EM AMOSTRAS DE ÁGUA, COLETADAS NO PERÍODO DE AGOSTO DE 2007 A JULHO DE 2008. | 49 |

TABELA 5.7. IDENTIDADE NUCLEOTÍDICA ENTRE AS CINCO AMOSTRAS DO
PRESENTE ESTUDO COMPARADAS A CEPA PADRÃO HAF-203.50

TABELA 5.8. IDENTIDADE AMINOACÍDICA ENTRE AS CINCO AMOSTRAS DO
PRESENTE ESTUDO E COMPARADAS A CEPA PADRÃO HAF-203.51

LISTA DE FIGURAS

| | | |
|-------------|---|----|
| FIGURA 1.1. | IMUNOMICROSCOPIA ELETRÔNICA DO VÍRUS DA HEPATITE A..... | 2 |
| FIGURA 1.2. | REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO GENOMA DO VÍRUS DA HEPATITE A E PRODUTOS DA TRADUÇÃO DE PROTEÍNAS VIRAIS.. | 3 |
| FIGURA 1.3. | DENDOGRAMA MOSTRANDO A APROXIMAÇÃO GENÉTICA ENTRE OS DIFERENTES GENÓTIPOS DAS CEPAS HUMANAS E SÍMIAS DO HAV. | 5 |
| FIGURA 1.4. | EVENTOS VIROLÓGICOS, IMUNOLÓGICOS E BIOQUÍMICOS DURANTE O CURSO DE INFECÇÃO EXPERIMENTAL DE HEPATITE A EM CHIPANZÉS INOCULADOS INTRAVENOSAMENTE COM O VÍRUS DA HEPATITE A, CEPA HLD2..... | 9 |
| FIGURA 1.5. | DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA DA INFECÇÃO PELO VÍRUS DA HEPATITE A. | 11 |
| FIGURA 1.6. | PREVALÊNCIA DE ANTICORPOS ANTI-VÍRUS DA HEPATITE A TOTAL NAS DIFERENTES REGIÕES BRASILEIRAS ONDE FORAM REALIZADAS INVESTIGAÇÕES EPIDEMIOLÓGICAS.. | 12 |
| FIGURA 4.1. | MAPA GEOGRÁFICO DA LAGOA RODRIGO DE FREITAS, MUNICÍPIO DO RIO DE JANEIRO, RJ..... | 21 |
| FIGURA 4.2. | PONTOS DE COLETAS, ONDE FORAM OBTIDAS AS AMOSTRAS DO PRESENTE ESTUDO NO PERÍODO DE AGOSTO DE 2007 A JULHO DE 2008..... | 22 |
| FIGURA 4.3. | LEITURA DE COLIFORMES FECAIS COM LÂMPADA ULTRAVIOLETA UTILIZANDO CARTELA QUANTI-TRAY®/2000 DO CONJUNTO DE REAGENTES COLILERT®-18.. | 24 |
| FIGURA 4.4. | SISTEMA DE FILTRAÇÃO MILLIPORE®..... | 25 |

| | | |
|-------------|---|----|
| FIGURA 4.5. | CONCENTRADOR CENTRIPREP [®] YM-50, MILLIPORE..... | 25 |
| FIGURA 5.1. | VARIAÇÃO DE pH NA LAGOA RODRIGO DE FREITAS, NO RIO DOS MACACOS E NA PRAIA DO LEBLON, NO PERÍODO DE AGOSTO DE 2007 A JULHO DE 2008. | 39 |
| FIGURA 5.2. | VARIAÇÃO DE CONDUTIVIDADE (mS/cm) NA LAGOA RODRIGO DE FREITAS, NO RIO DOS MACACOS E NA PRAIA DO LEBLON, NO PERÍODO DE AGOSTO DE 2007 A JULHO DE 2008. | 39 |
| FIGURA 5.3. | VARIAÇÃO DE TURBIDEZ (UNT) NA LAGOA RODRIGO DE FREITAS, NO RIO DOS MACACOS E NA PRAIA DO LEBLON, NO PERÍODO DE AGOSTO DE 2007 A JULHO DE 2008. | 40 |
| FIGURA 5.4. | VARIAÇÃO DE OXIGÊNIO DISSOLVIDO (MG/L) NA LAGOA RODRIGO DE FREITAS, NO RIO DOS MACACOS E NA PRAIA DO LEBLON NO PERÍODO DE AGOSTO DE 2007 A JULHO DE 2008..... | 40 |
| FIGURA 5.5. | VARIAÇÃO DE TEMPERATURA (°C) NA LAGOA RODRIGO DE FREITAS, NO RIO DOS MACACOS E NA PRAIA DO LEBLON, NO PERÍODO DE AGOSTO DE 2007 A JULHO DE 2008. | 41 |
| FIGURA 5.6. | VARIAÇÃO DE CLORO (MG/L) NA LAGOA RODRIGO DE FREITAS, NO RIO DOS MACACOS E NA PRAIA DO LEBLON, NO PERÍODO DE AGOSTO DE 2007 A JULHO DE 2008. | 41 |
| FIGURA 5.7. | VARIAÇÃO DE SALINIDADE (%) NA LAGOA RODRIGO DE FREITAS, NO RIO DOS MACACOS E NA PRAIA DO LEBLON, NO PERÍODO DE AGOSTO DE 2007 A JULHO DE 2008. | 42 |
| FIGURA 5.8. | VARIAÇÃO DE COLIFORMES FECAIS POR PONTO DE COLETA NA LAGOA RODRIGO DE FREITAS, NO RIO DOS MACACOS E NA PRAIA DO LEBLON, NO PERÍODO DE AGOSTO DE 2007 A JULHO DE 2008.. .. | 44 |

| | | |
|--------------|--|----|
| FIGURA 5.9. | ANÁLISE DA SENSIBILIDADE DO PCR EM TEMPO REAL, UTILIZANDO-SE TRANSCRITOS DE HAV- RNA SINTÉTICO (10^1 - 10^7). CURVA DE AMPLIFICAÇÃO DAS DILUIÇÕES SERIADAS DOS TRANSCRITOS DE HAV..... | 46 |
| FIGURA 5.10. | LINEARIDADE DA CURVA PADRÃO DAS DILUIÇÕES SERIADAS DO HAV..... | 47 |
| FIGURA 5.11. | DENDOGRAMA CONSTRUÍDO PELA ANÁLISE FILOGENÉTICA DE 218 NUCLEOTÍDEOS DA REGIÃO VP1/2A DO GENOMA DO VÍRUS DA HEPATITE A..... | 52 |

LISTA DE QUADROS

| | | |
|-------------|---|----|
| QUADRO 4.1. | OLIGONUCLEOTÍDEOS E SONDA DA REGIÃO 5'NC UTILIZADOS NA REAÇÃO DE PCR EM TEMPO REAL. | 29 |
| QUADRO 4.2. | OLIGONUCLEOTÍDEOS UTILIZADOS NA REAÇÃO DE PCR E SEQUENCIAMENTO-REGIÃO VP1/2A. | 32 |
| QUADRO 5.2. | PONTOS DE COLETA E OS MESES DE COLETA EM QUE FORAM DETECTADOS O HAV-RNA POR -RT <i>NESTED</i> -PCR..... | 49 |

RESUMO

O vírus da hepatite A (HAV) é um dos vírus entéricos mais estáveis no meio ambiente, permanecendo infeccioso mesmo após os processos de tratamento e desinfecção da água. Surtos de hepatite A associados à contaminação de reservatórios hídricos têm sido descritos em muitos países. No entanto, a importância do HAV permanece negligenciada, principalmente, devido à dificuldade em se recuperar o vírus em águas ambientais. Este estudo teve como objetivo avaliar a disseminação do HAV em águas de recreação de contato primário, utilizando, para concentração viral, um método de adsorção-eluição de vírus em membrana carregada negativamente, associado à detecção do genoma viral por reação em cadeia pela polimerase precedida da transcrição reversa (RT-PCR) e à quantificação viral pela PCR em tempo real (qRT-PCR). A caracterização dos isolados foi realizada por análise filogenética de 218 pares de bases da região VP1/2A do genoma do HAV. A Lagoa Rodrigo de Freitas foi utilizada como modelo de estudo para monitoramento ambiental por ser regulamentada como uma área de proteção permanente, sendo um ponto turístico e de lazer de grande expressão na estrutura urbana da cidade do Rio de Janeiro. De um total de 144 amostras de água coletadas nesse estudo o HAV foi detectado em 31 (21,53%) pelo método de qRT-PCR, com títulos variando entre 13 e 243 cópias/mL. E em apenas cinco (3,47%) pelo método qualitativo (RT-*nested* PCR), todas caracterizadas como genótipo IB, porém apresentando pequena diferença genética entre elas, o que demonstra que existe uma variedade de cepas circulantes na Lagoa Rodrigo de Freitas. Considerando as 25 amostras de água com altos títulos de coliformes fecais, foi observada forte correlação positiva estatisticamente significativa entre os níveis de coliformes fecais e a detecção quantitativa do HAV. Uma correlação positiva fraca foi também observada entre os parâmetros condutividade, salinidade e turbidez e a detecção quantitativa do HAV. A associação dos dois métodos (qRT-PCR e RT-*nested* PCR) utilizados nesse estudo possibilitou evidenciar a presença de HAV nos diferentes pontos da Lagoa Rodrigo de Freitas, demonstrando ser uma importante ferramenta tanto na avaliação da qualidade da água como no esclarecimento de surtos de veiculação hídrica.

ABSTRACT

Hepatitis A virus (HAV) is one of the enterically transmitted viruses most stable in environment, remaining infectious even after systems of water treatment and disinfection. Hepatitis A outbreaks associated with contaminated water reservoirs have been described in many countries. However, the relevance of HAV remains neglected mainly due to difficulties to recover virus particles from environmental water samples. This study aimed to evaluate the dissemination of HAV in recreation water areas of primary contact by using as a method for virus concentration the adsorption-elution in a negatively charged membrane, in association with the detection of virus genome by polymerase chain reaction preceded by reverse transcription (RT-PCR), and with viral quantification by real-time PCR (qRT-PCR). Characterization of isolates was carried out by phylogenetic analysis of 218 base pairs comprising VP1/2A region of HAV genome. The Rodrigo de Freitas Lagoon was chosen as a study model for environmental monitoring since it is regulamented as a permanent protection area, representing a touristic and recreational point of great relevance in the urban area of Rio de Janeiro city. From a total of 144 water samples which had been collected for this study, HAV was detected in 31 of them (21,53%) by the qRT-PCR method, with titres ranging between 13 and 243 copies/mL, whilst only 5 samples (3,47%) were detected when using the qualitative method (RT-nested PCR), all of them characterized as genotype IB, but with small genetic differences among each other, which demonstrates the circulation of a variety of isolates in Rodrigo de Freitas Lagoon. Considering the 25 water samples with high titres of fecal coliforms, a statistically significant, strong positive correlation between the titres of fecal coliforms and quantitative detection of HAV was observed. A weak positive correlation between the parameters conductivity, salinity, and turbidity and quantitative detection of HAV was also observed. The combined use of these two methods (qRT-PCR and RT-nested PCR) in this study allowed to evaluate the presence of HAV in different areas of Rodrigo de Freitas Lagoon, demonstrating to be an important tool for evaluation of quality of water and elucidation of outbreaks with hydric vehiculation.

Sumário

| | |
|--|------|
| LISTA DE TABELAS | viii |
| LISTA DE FIGURAS | x |
| LISTA DE QUADROS | xiii |
| RESUMO.. | xiv |
| ABSTRACT | xv |
| | |
| 1. INTRODUÇÃO | 1 |
| 1.1. O Vírus da Hepatite A..... | 1 |
| 1.1.1. Breve Histórico | 1 |
| 1.1.2. O Vírus..... | 2 |
| 1.1.3. Organização Genômica | 2 |
| 1.1.4. Características Físico-Químicas e Estabilidade do HAV | 6 |
| 1.1.5. Patogenia e Manifestações Clínicas | 6 |
| 1.1.6. Diagnóstico Laboratorial..... | 8 |
| 1.1.7. Epidemiologia | 10 |
| 1.1.8. A pesquisa de HAV no ambiente..... | 13 |
| 1.1.9. Prevenção e Controle | 15 |
| | |
| 2. JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA..... | 17 |
| | |
| 3. OBJETIVOS | 19 |
| 3.1. Objetivo geral..... | 19 |
| 3.2. Objetivos específicos | 19 |
| | |
| 4. MATERIAL E MÉTODOS | 20 |
| 4.1. Área de estudo..... | 20 |
| 4.2. Coleta e processamento das amostras | 20 |
| 4.2.1. Parâmetros Físico-Químicos | 23 |
| 4.2.2. Quantificação dos Coliformes Totais e Fecais..... | 23 |
| 4.2.3. Concentração Viral das Amostras..... | 24 |
| 4.3. Extração do HAV-RNA | 26 |
| 4.3.1. Qiagen Viral RNA Kit (Qiagen, Valencia, Espanha) | 26 |
| 4.4. Transcrição reversa | 27 |
| 4.4.1. PCR em tempo real (TaqMan qRT-PCR) | 27 |
| 4.4.2. Preparo da curva padrão para a PCR em tempo real..... | 27 |
| 4.4.3. Controle positivo da reação de PCR em tempo real | 28 |

| | |
|--|----|
| 4.4.4. Reação de PCR em tempo Real | 28 |
| 4.5. Reação em Cadeia da Polimerase (RT-PCR):..... | 30 |
| 4.5.1. RT <i>Nested</i> -PCR:..... | 31 |
| 4.5.2. Eletroforese em gel de agarose | 32 |
| 4.6. Seqüenciamento do Produto de PCR | 33 |
| 4.6.1. Reação de Seqüenciamento..... | 34 |
| 4.6.1.1. Análise filogenética das seqüências | 36 |
| 4.7. Análise estatística..... | 36 |
| | |
| 5. RESULTADOS..... | 37 |
| 5.1. Parâmetros Físico-químicos | 37 |
| 5.2. Coliformes Fecais..... | 42 |
| 5.3. PCR em tempo real (TaqMan qRT-PCR) | 45 |
| 5.4. Relação entre parâmetros físico-químicos e detecção do HAV por PCR em tempo real (TaqMan qRT-PCR) | 47 |
| 5.5. Relação entre níveis de coliformes fecais e detecção do HAV por PCR em tempo real (TaqMan qRT-PCR) | 48 |
| 5.6. Detecção qualitativa do HAV-RNA por RT- <i>Nested</i> PCR | 48 |
| 5.7. Detecção de HAV-RNA: RT- <i>Nested</i> PCR x TaqMan qRT-PCR..... | 49 |
| 5.8. Caracterização molecular do Vírus da hepatite A (HAV) | 49 |
| | |
| 6. DISCUSSÃO | 53 |
| 6.1. Concentração viral em amostras ambientais..... | 54 |
| 6.2. Determinação de Parâmetros Físico-Químicos e Quantificação dos Coliformes Fecais..... | 55 |
| 6.3. Detecção de HAV-RNA por PCR em tempo real (qRT-PCR) e RT- <i>Nested</i> PCR em águas da Lagoa Rodrigo de Freitas..... | 56 |
| 6.4. Seqüenciamento e genotipagem das amostras | 59 |
| | |
| 7. CONCLUSÕES | 61 |
| | |
| 8. PERSPECTIVAS | 62 |
| | |
| 9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 63 |

1. INTRODUÇÃO

1.1.O Vírus da Hepatite A

1.1.1. Breve Histórico

A hepatite A é conhecida desde as antigas civilizações chinesa, grega e romana, mas o primeiro relato escrito, segundo a revisão de COCKAYNE 1912 de (*Apud PEREIRA & GONÇALVES.*, 2003), foi a descrição de uma epidemia na ilha de Minorca, localizada entre o leste da Espanha e o Oeste da Itália, no século 18. No entanto, foi a partir do século XX, principalmente durante as grandes guerras, que a ampla disseminação da doença assumiu caráter pandêmico (PAUL & GARDNER, 1950), e a hepatite A passou a ser reconhecida como importante problema de saúde pública.

A transmissão da doença do homem ao homem foi demonstrada em voluntários na Alemanha, em 1942, (VOEGT, 1942), no Oriente Médio, em 1943, (CAMERON, 1943) e nos Estados Unidos, em 1944 (MacCALLUM & BRADLEY, 1944). Foi em humanos que um grupo de pesquisadores da Universidade de Yale não só confirmou a transmissão fecal-oral do vírus da Hepatite A (HAV), como também estabeleceu com clareza a existência de duas formas de hepatite, até então conhecidas como “hepatite infecciosa” e “icterícia sérica”, com períodos de incubação e modo de transmissão bem distintos (PEREIRA & GONÇALVES., 2003). MacCallum (1948) introduziu os termos hepatite A para a hepatite infecciosa, e hepatite B para a icterícia sérica.

Estudos de Krugman e colaboradores (1959, 1962 e 1967) em uma escola de excepcionais, em Nova Iorque, onde a hepatite era endêmica, levaram ao isolamento de um dos agentes de hepatite designado MS-1, que era transmitido pela via fecal-oral. A doença era altamente infecciosa e apresentava período de incubação relativamente curto, de aproximadamente seis semanas. A fim de reproduzir a doença, a cepa MS-1 do vírus da hepatite A foi utilizada para infectar adultos voluntários (KRUGMAN *et al.*, 1959, 1962, 1967). A partir desses voluntários, Feinstone e colaboradores (1973) conseguiram, pela primeira vez, por imunomicroscopia eletrônica, identificar o vírus nas fezes destes pacientes. Alguns anos depois, Provost e Hilleman (1979) obtiveram sucesso na adaptação do vírus em cultura celular, possibilitando o desenvolvimento de imunobiológicos, tais como conjunto de reagentes para diagnóstico e vacina.

1.1.2. O Vírus

A partícula viral é não envelopada, apresenta simetria icosaédrica e diâmetro de 27 a 32 nm (FEINSTONE *et al.*, 1973) (Figura 1.1). No início da década de 80, estudos morfológicos, bioquímicos e biofísicos levaram à classificação provisória do HAV no gênero *Enterovirus* (“enterovírus tipo 72”) da família *Picornaviridae*, devido a semelhanças com os enterovírus e cardiovírus (MELNICK, 1982; GUST *et al.*, 1983). Entretanto, estudos posteriores demonstraram que o HAV apresentava diversas características singulares que o distinguia de outros enterovírus tais como hepatotropismo, termoestabilidade da partícula viral, resistência a algumas drogas e temperaturas mais elevadas (de CHANOSTAY *et al.*, 1988), ciclo replicativo lento e, geralmente, não-citopático em cultivo celular (PURCELL *et al.*, 1984), estabilidade em pH 1,0 (SCHOLZ *et al.*, 1989), presença de um único sorotipo neutralizante (LEMON *et al.*, 1991, 1992) e baixa similaridade genética com outros membros do gênero (TICEHURST *et al.*, 1988). Minor (1991) classificou o HAV como membro único do gênero *Hepatovirus*, da família *Picornaviridae* (SIEGL, 1982).

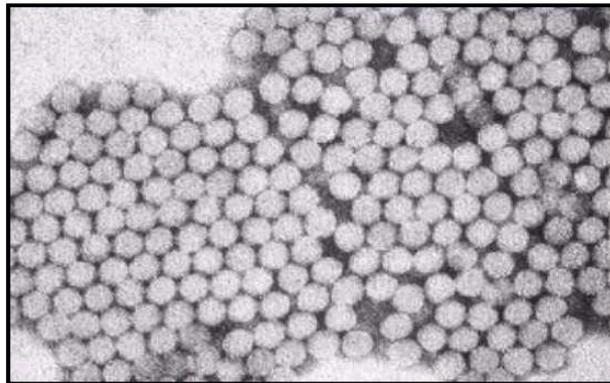


Figura 1.1. Imunomicroscopia eletrônica do vírus da hepatite A (Fonte: www.cdc.gov, 1998)

1.1.3. Organização Genômica

O genoma do HAV é constituído por uma fita simples de RNA de polaridade positiva, com aproximadamente 7.478 nucleotídeos (PROVOST *et al.*, 1975; BRADLEY *et al.*, 1978; PAUL *et al.*, 1987; KOFF, 1998). De forma similar aos demais picornavírus, o genoma do HAV pode ser dividido em três regiões distintas (Figura 1.2): uma região 5' não-codificante (5'NCR) compreendendo aproximadamente 10% do genoma; uma região codificante contendo uma única fase de leitura aberta (ORF), que codifica as proteínas virais

estruturais e não-estruturais, e uma região 3' não-codificante (3'NCR), com 60 nucleotídeos (COHEN *et al.*, 1987; KOFF, 1998).

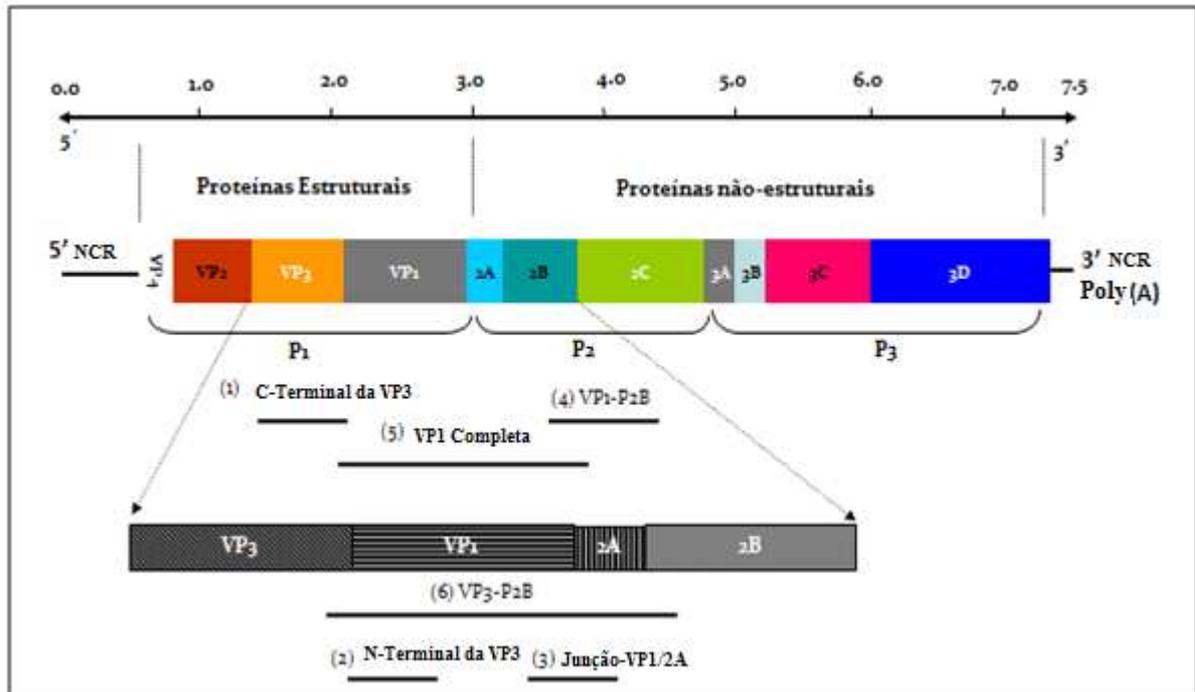


Figura 1.2. Representação esquemática do genoma do vírus da hepatite A e produtos da tradução de proteínas virais. (Adaptado de Nainan *et al.*, 2006).

A região 5' não-codificante representa a porção mais conservada do genoma, com mais de 85% de identidade nucleotídica entre as cepas dos genótipos I, II e III (BRADLEY *et al.*, 1984); possui 734 nucleotídeos e precede a ORF e a região 3' não-codificante. Uma pequena proteína viral, 3B (VPg) está covalentemente ligada à esta região. Apresenta estruturas secundárias e terciárias, sendo organizada em seis domínios de estruturas secundárias, dentre eles uma estrutura em forma de grampo, duas estruturas helicoidais e um trato de polipirimidina (COHEN *et al.*, 1987). Os dois primeiros domínios estão localizados entre os nucleotídeos 1 e 95 e parecem atuar no controle da iniciação da síntese da fita positiva de RNA (ANDINO *et al.*, 1993). Os outros quatro domínios estão localizados entre os nucleotídeos 155 e 734 (TOTSUKA & MORITSUGU, 1999). O terceiro domínio é um pequeno segmento de fita simples e parece participar na replicação do RNA viral, uma vez que mutações neste domínio conferem um fenótipo de replicação viral sensível à temperatura (ANDINO *et al.*, 1993). O último domínio da 5'NCR forma o sítio interno para entrada no ribossomo (IRES), o qual direciona a tradução da ORF. Outras estruturas da região 5'NC, domínios II e IV, foram identificados como IRES (TOTSUKA *et al.*, 1999).

A região codificante possui uma única ORF que codifica uma poliproteína de 2.227 aminoácidos (6.681 nucleotídeos), compreendendo três regiões: a região P1, que codifica proteínas estruturais, e as regiões P2 e P3, que codificam as proteínas não-estruturais (BAROUDY *et al.*, 1985; COHEN *et al.*, 1987). A poliproteína viral é clivada pela protease viral 3C, que é codificada pela região P3 (SCHULTHEISS *et al.*, 1994). As proteínas VP1 e VP3 formam o principal sítio antigênico capaz de induzir resposta de anticorpos neutralizantes. As proteínas não-estruturais codificadas pelas regiões P2 e P3 participam da síntese do RNA e da formação da partícula viral. A proteína VPg, codificada pela região P3, liga-se covalentemente à extremidade 5' do genoma, estando envolvida no início da síntese do RNA viral.

A região 3' não-codificante é poliadenilada em sua extremidade 3' e possui mais de 20% de heterogeneidade nucleotídica entre as cepas de HAV analisadas e, portanto, apresenta maior variabilidade que a região 5' não-codificante. Apresenta estruturas secundárias helicoidais e, possivelmente, um pseudo-nó, provavelmente responsáveis pela interação entre as proteínas virais e celulares específicas. As estruturas secundárias das regiões não-codificantes (domínios I e II e o trato de polipirimidina) são importantes na síntese do RNA viral (TOTSUKA & MORITSUGU, 1999).

Robertson e colaboradores (1992) compararam seqüências de 152 isolados de HAV de diferentes partes do mundo. Neste estudo, foram analisados 168 nucleotídeos da região VP1/2A, compreendendo os nucleotídeos das posições 3.024 ao 3.191 da cepa HM-175. Os isolados foram classificados em sete genótipos, denominados de I a VII (figura 1.3), sendo que os genótipos I e III apresentam os sub-genótipos A e B com 86 a 92,5% de similaridade. Os genótipos I, II, e VII agrupavam somente cepas humanas de HAV. O genótipo III incluía cepas de HAV humanas e a cepa PA 21, isolada de macaco. De acordo com essa nova classificação, muitas cepas humanas foram classificadas nos genótipos I e III, tendo somente uma cepa identificada para cada um dos dois outros genótipos (II e VII). Os genótipos IV, V e VI continham somente cepas símias. Este trabalho influenciou a pesquisa da variabilidade do HAV durante pelo menos 10 anos.

Entretanto, utilizando esta metodologia (ROBERTSON *et al.*, 1992) para genotipagem do HAV, três variantes genéticas relatadas recentemente, na região VP1 (posições 25 e 28) e na região VP3 (posição 72) não foram detectadas (COSTA-MATTIOLI *et al.*, 2002b; SANCHEZ *et al.*, 2003). Esta observação indica que o tradicional método de genotipagem pode não refletir sempre a variabilidade antigênica do vírus. Como alternativa, foi proposta, recentemente, a utilização da seqüência completa da região VP1 (900

nucleotídeos) para a construção de árvores filogenéticas ao invés do pequeno fragmento de 168 nucleotídeos utilizado anteriormente (COSTA-MATTIOLI *et al.*, 2002b;2003). A análise filogenética da região VP1 completa revelou a presença de seis genótipos distintos. Nessa análise, demonstrou-se que os genótipos II e VII eram subgenótipos (IIA e IIB, respectivamente) do mesmo genótipo (COSTA-MATTIOLI *et al.*, 2002b; LU *et al.*, 2004).

Até o momento, as diferentes cepas humanas de HAV coletadas em regiões geográficas distintas, independente da região estudada para a análise da variabilidade do HAV, apresentaram características antigênicas comuns tais como: um único sorotipo e reatividade similar aos anticorpos monoclonais contra o HAV. Isso favorece a eficácia de uma vacinação em massa, contribuindo para que no futuro seja possível a erradicação da doença (NAINAN *et al.*, 2006).

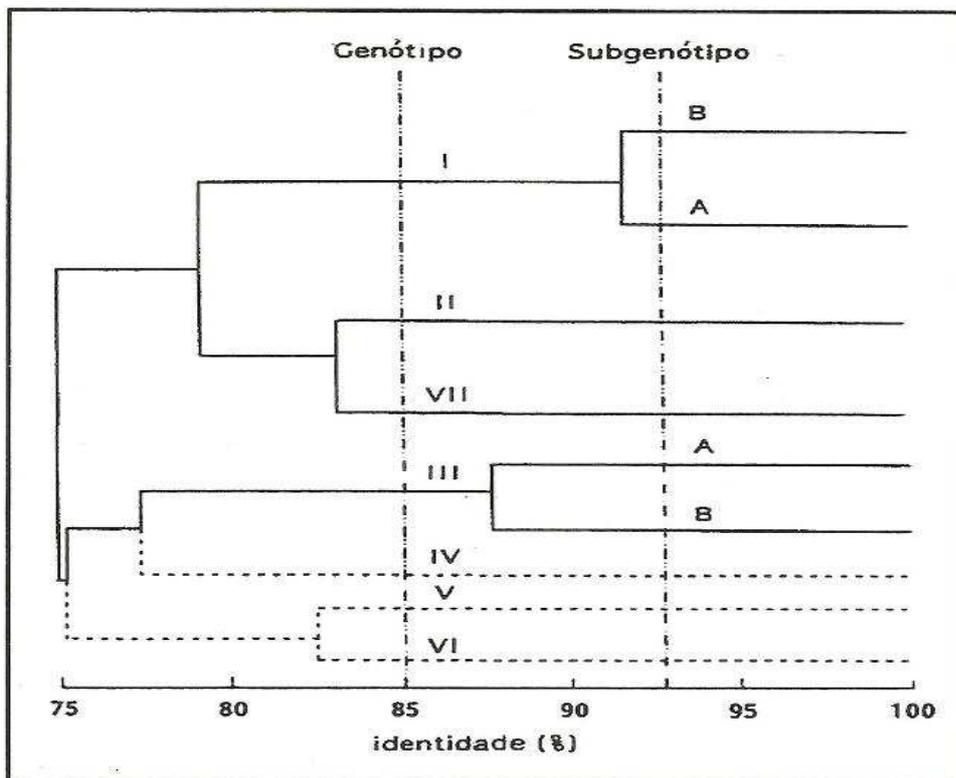


Figura 1.3. Dendrograma mostrando a aproximação genética entre os diferentes genótipos das cepas humanas e símias do HAV. (____) genótipo humano, (-----) genótipo de primata não-humano. Os limites entre os genótipos e subgenótipos estão delimitados por linhas verticais. (Adaptado de Lemon *et al.*, 1992)

1.1.4. Características Físico-Químicas e Estabilidade do HAV

As partículas do HAV são estáveis em pH 1,0, mantendo sua infecciosidade por até 5 horas à temperatura ambiente, se mantém na água e em sedimentos por mais de quatro meses a uma temperatura de 5 até 25°C (SCHOLZ *et al.*; 1989); são resistentes ao clorofórmio e a uma grande variedade de detergentes e solventes lipídicos (PROVOST *et al.*, 1975; SIEGL, 1984). O HAV mantém a infecciosidade mesmo quando exposto à temperaturas de 60°C por 60 minutos em pH neutro, sendo inativado apenas parcialmente após 10 a 12 horas de exposição (PARRY & MORTIMER, 1984; SIEGL *et al.*, 1984). A infecciosidade da partícula viral pode ser preservada por até 1 mês após liofilização e estocagem a 25°C com 42% de umidade (McCAUSTLAND *et al.*, 1982; SOBSEY *et al.*, 1988), ou por anos, à temperatura igual ou inferior a -20°C .

O HAV pode ser inativado completamente por autoclavação (121°C durante 20 minutos), radiação ultravioleta, tratamento com formalina a 3% durante 5 minutos, permanganato de potássio (30 mg/mL) durante 5 minutos ou com compostos contendo cloro (3 a 10 mg/L de hipoclorito de sódio a 20°C durante 10 minutos (PROVOST *et al.*, 1975; SIEGEL *et al.*, 1982).

A resistência do HAV às condições ambientais é um dos fatores que certamente propiciam a sua transmissão através da água e de alimentos contaminados e, além disso, as propriedades físico-químicas do HAV favorecem sua persistência e disseminação entre as populações (PARRY & MORTIMER, 1984; SCHOLZ *et al.*, 1989).

1.1.5. Patogenia e Manifestações Clínicas

A infecção natural pelo HAV ocorre, geralmente, através da ingestão de água ou alimentos contaminados com fezes de indivíduos infectados. Após ingestão, o que ocorre com o vírus dentro do aparelho digestivo não é ainda bem conhecido (CUTHBERT, 2001). Entretanto, sabe-se que o sítio primário de replicação do HAV é o hepatócito, embora ainda não tenham sido descritos os fatores que elucidam o tropismo do vírus por esse sítio. Estudos experimentais mostraram que o HAV pode infectar células epiteliais da mucosa digestiva, onde ocorre sua replicação (PURCELL *et al.*, 1984).

O HAV, após ultrapassar a barreira epitelial do trato digestivo, alcança o parênquima hepático através da circulação portal, sendo capturado pelos hepatócitos através de receptores específicos denominados HAVcr-1 presentes em células de rim de macaco verde

africano (KAPLAN *et al.*, 1996), e huHAV presentes em células humanas (FEIGELSTOCK *et al.*, 1998). O vírus se multiplica nos hepatócitos, onde formam novos vírions. O vírus é eliminado através da membrana apical do hepatócito, produzindo viremia, é excretado na bile e, então, eliminado nas fezes dos indivíduos infectados. O pico de excreção viral nas fezes e, conseqüentemente, o aumento da infecciosidade, ocorrem antes do início dos sintomas ou da elevação do nível sérico de transaminases, declinando após o aparecimento dos sintomas (TASSOPOULOS *et al.*, 1986).

Até pouco tempo, acreditava-se que o período de viremia fosse mais curto do que o período de excreção viral (NORMANN *et al.* 1995; GRINDE *et al.*, 1997), e que ocorresse durante algumas semanas após o desaparecimento dos sintomas (STAPLETON *et al.*, 1995). Entretanto, com o uso de técnicas moleculares, foi observado que a viremia inicia-se uma semana após o aparecimento dos sintomas e pode persistir por até 21 dias (FUJIWARA *et al.*, 1997; BOWER *et al.*, 2000; COSTA-MATTIOLI *et al.*, 2002c) sendo que em alguns casos pode-se observar a persistência de viremia até 180 dias após o início dos sintomas (NORMANN *et al.*, 2004), e em indivíduos co-infectados pelo HIV, o HAV pode ser detectado no soro até 256 dias após o início dos sintomas (COSTA-MATTIOLI, 2002a).

Geralmente, as manifestações clínicas da infecção pelo HAV são brandas, crianças menores de 10 anos são assintomáticas (LEMON, 1997b) e, a partir desta idade, observa-se que a doença se manifesta de forma mais grave, principalmente em adultos e idosos (LEDNAR *et al.*, 1985). O período de incubação do vírus varia de 15 a 50 dias, com média de 30 dias (PAUL *et al.*, 1945). Durante esse período, o indivíduo permanece assintomático, apesar da replicação viral, sendo esse o período de maior transmissão viral devido à maior quantidade de vírus eliminados nas fezes (LEMON & BINN, 1985)

O curso da infecção pode ser dividido em quatro fases: período de incubação, fase pré-ictérica ou prodrômica, período de icterícia e fase de convalescência. O quadro clínico da doença vai desde a infecção inaparente ou subclínica, à doença clínica na forma ictérica. Após a fase prodrômica, quando aparecem os primeiros sintomas que na maioria dos casos podem ser representados por dores no corpo, febre, náuseas, vômitos e fadiga, ocorre a fase ictérica, caracterizada pela deposição de pigmentos (bilirrubinas) na pele e mucosa que assumem uma coloração amarelada. Geralmente, ocorre também colúria e hipocolia nessa fase. Ocasionalmente, pode ocorrer necrose mais extensiva do fígado durante a fase aguda, levando ao comprometimento da função hepática (hepatite fulminante) (O'GRADY , 1992).

1.1.6. Diagnóstico Laboratorial

O quadro clínico da hepatite A não permite a sua diferenciação de outras formas de hepatites virais. Portanto, é necessário que o diagnóstico seja confirmado pela detecção de anticorpos anti-HAV da classe IgM (BRADLEY *et al.*, 1977; LOCARNINI *et al.*, 1977; DECKER *et al.*, 1981), geralmente por ensaio imunoenzimático (teste competitivo), com vários conjuntos de diagnóstico disponíveis no mercado (LaBRECQUE *et al.*, 1998). Embora existam seis genótipos de HAV, estes constituem apenas um sorotipo, não interferindo no diagnóstico sorológico. Esses anticorpos surgem precocemente na fase aguda da doença, seus títulos se elevam rapidamente, atingindo níveis séricos máximos em 3 a 5 semanas a partir do quadro clínico, desaparecendo após 3 a 6 meses do quadro clínico (KAO *et al.*, 1984). O teste de detecção de anticorpos anti-HAV para o diagnóstico da hepatite A possui especificidade de 99%, sensibilidade de 100% e valor preditivo positivo de 88%, de acordo com uma série de casos estudados utilizando doadores voluntários de sangue como controle, quando utilizado o teste de radioimunoensaio (STORCH *et al.*, 1982). A positividade do teste anti-HAV IgM, em geral, persiste cerca de quatro meses, podendo chegar a seis meses em 5% dos casos e, raramente, persiste por mais de 12 meses. Geralmente, os níveis séricos de transaminases se normalizam antes da negatização dos anticorpos anti-HAV IgM (KAO *et al.*, 1984).

Os anticorpos anti-HAV da classe IgG podem ser detectados durante a doença aguda ou a partir de uma a duas semanas, e substituem os anticorpos da classe IgM. Seus títulos se elevam gradualmente, alcançando altos níveis durante a fase de convalescência (STAPLETON *et al.*, 1991), e permanecem por toda a vida, conferindo imunidade contra reinfecção (figura 1.4).

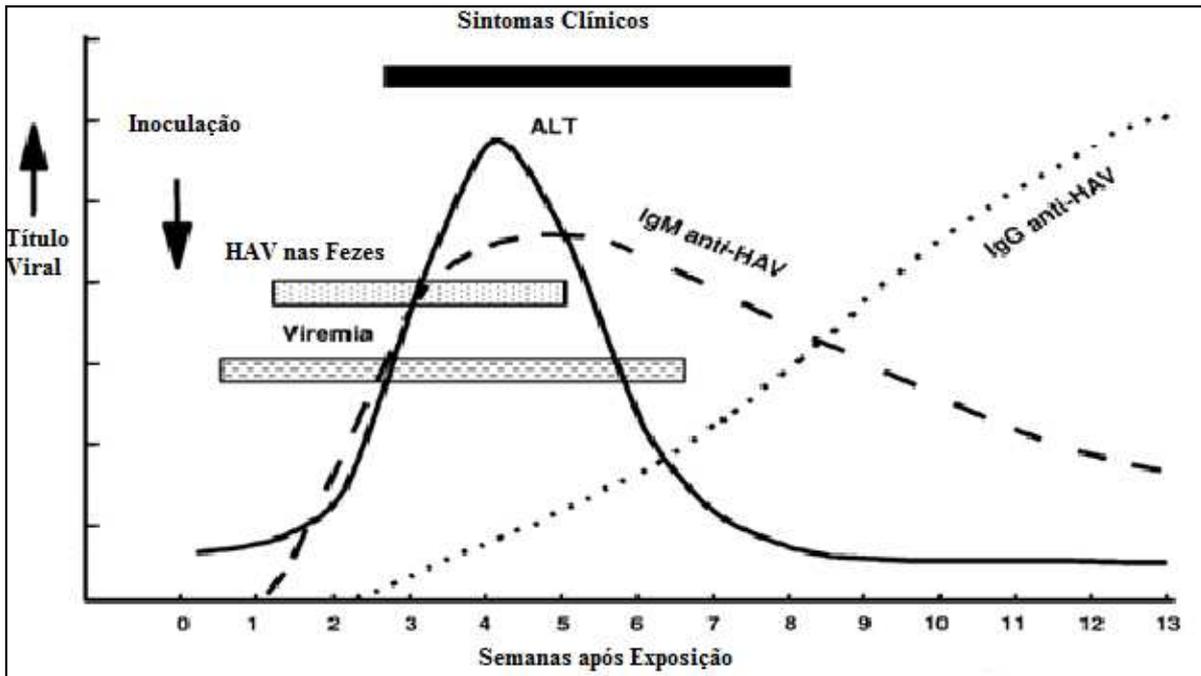


Figura 1.4. Eventos virológicos, imunológicos e bioquímicos durante o curso de infecção experimental de hepatite A em chipanzés inoculados intravenosamente com o vírus da hepatite A, cepa HLD2 (Adaptado de Margolis *et al.*, 1988).

As alterações bioquímicas da hepatite A podem ser caracterizadas pela elevação dos níveis séricos das enzimas intracelulares alanina-aminotransferase (ALT) e aspartato-aminotransferase (AST) e pela determinação dos níveis séricos de bilirrubina (ISHAK, 1976).

Técnicas de detecção de ácidos nucleicos são mais sensíveis do que testes imunoenzimáticos para detecção do HAV em diferentes tipos de amostras. O HAV têm sido detectado, principalmente, por reação em cadeia pela polimerase (PCR) após síntese de DNA complementar (cDNA) por transcrição reversa (de PAULA *et al.*, 2003a; 2003b). A amplificação do RNA viral por RT-*Nested*-PCR é um método sensível e amplamente utilizado para a detecção do HAV-RNA. Estudos demonstram que a detecção do RNA do HAV por “*Nested*” PCR é clinicamente aplicável para o diagnóstico de infecções pelo HAV (FUJIWARA *et al.*, 1997; ARNAL *et al.*, 1998; HUTIN *et al.*, 1999; de PAULA *et al.*, 2004). O uso de PCR tem importante papel no auxílio do diagnóstico em casos agudos de etiologia desconhecida e em surtos epidêmicos. Outra ferramenta importante é a técnica de sequenciamento de ácidos nucleicos realizada a partir dos produtos de PCR para confirmação e caracterização do vírus, permitindo a demonstração da heterogeneidade genômica do HAV. (de PAULA *et al.*, 2004).

Protocolos de RT-PCR quantitativo foram descritos como o método mais sensível para detecção do HAV (ROSE *et al.*, 2006; VILLAR *et al.*, 2006; de PAULA *et al.*, 2007; VILLAR *et al.*, 2007). A técnica de PCR em tempo real tem sido empregada tanto na detecção como na quantificação do HAV, sendo dotada de alta sensibilidade, rapidez e minimização de contaminações (BUSTIN & MUELLER, 2005). Além de possibilitar a quantificação dos produtos amplificados, uma das principais vantagens da utilização dessa metodologia é a rapidez na análise de amostras em situações de surtos epidêmicos. Dentre os sistemas de PCR em tempo real mais utilizados estão o sistema TaqMan® e o sistema SYBR® green (HOUDE *et al.*, 2007).

1.1.7. Epidemiologia

O HAV têm distribuição mundial, apresentando diferentes padrões de endemicidade de acordo com as condições sanitárias, sócio-econômicas e de higiene da população (JACOBSON & KOOPAMAN., 2004). A transmissão pessoa-pessoa é muito comum quando há contato pessoal íntimo e prolongado do doente com um indivíduo suscetível à infecção. Conseqüentemente, o convívio familiar e as aglomerações em lugares fechados (quartéis, prisões, creches, escolas, comunidades fechadas) constituem importantes fatores de risco (MARGOLIS & ALTER, 1995). Além disso, a contaminação fecal de uma fonte única (de água potável ou de alimentos) é um fator que facilita a transmissão da doença, principalmente em crianças sem imunidade prévia, favorecendo a ocorrência de surtos (MELNICK, 1995). Em raras ocasiões, o vírus pode ser também transmitido pelo sangue ou hemoderivados oriundos de doadores infectados ou usuários de drogas intravenosas em fase virêmica (ROSEMBLUM *et al.*, 1991).

A hepatite A é uma doença cuja incidência mundial é superior a 1,4 milhão de casos/ano (CDC, 1999). Em áreas de alta endemicidade, a infecção ocorre precocemente e mais de 90% das crianças apresentam, na primeira década de vida, anticorpos anti-HAV IgG, evidenciando imunidade resultante de exposição prévia ao HAV. Nessas regiões, a hepatite aguda é menos frequente nos nativos; e epidemias são raras. Este padrão epidemiológico é típico de países pobres, com condições sanitárias precárias como, por exemplo, vários países da África, da América Latina e da Ásia. Em áreas de endemicidade moderada, a prevalência de infecção é mais baixa nas duas primeiras décadas de vida, sendo a infecção deslocada para o final da infância e o início da adolescência. Nessas regiões, a

hepatite aguda sintomática é mais freqüente, representando risco para pessoas suscetíveis. Além disso, surtos epidêmicos podem ocorrer devido à contaminação de alimentos ou da água ou, ainda, por contato pessoa-pessoa. Este padrão epidemiológico é típico de algumas regiões da América Latina e da Ásia, onde as taxas de soroprevalência tiveram um declínio nos últimos dez anos (TANAKA *et al.*, 2000; KANG *et al.*, 2004; VITRAL *et al.*, 2006; 2008). Em países desenvolvidos, a incidência da doença é baixa, a maior prevalência de infecção pelo HAV acontecendo em adultos jovens, quando podem ocorrer epidemias. A transmissão do vírus se dá, geralmente, pelo consumo de água ou de alimentos contaminados, mas também pode ocorrer a transmissão pessoa-pessoa (PHAM *et al.*, 2005). Em áreas de muito baixa incidência, a infecção é esporádica e ocorre tipicamente em adultos, que adquirem a infecção durante viagens a regiões endêmicas, um padrão epidemiológico que pode ser visto na Escandinávia (CDC, 1999) (figura 1.5).

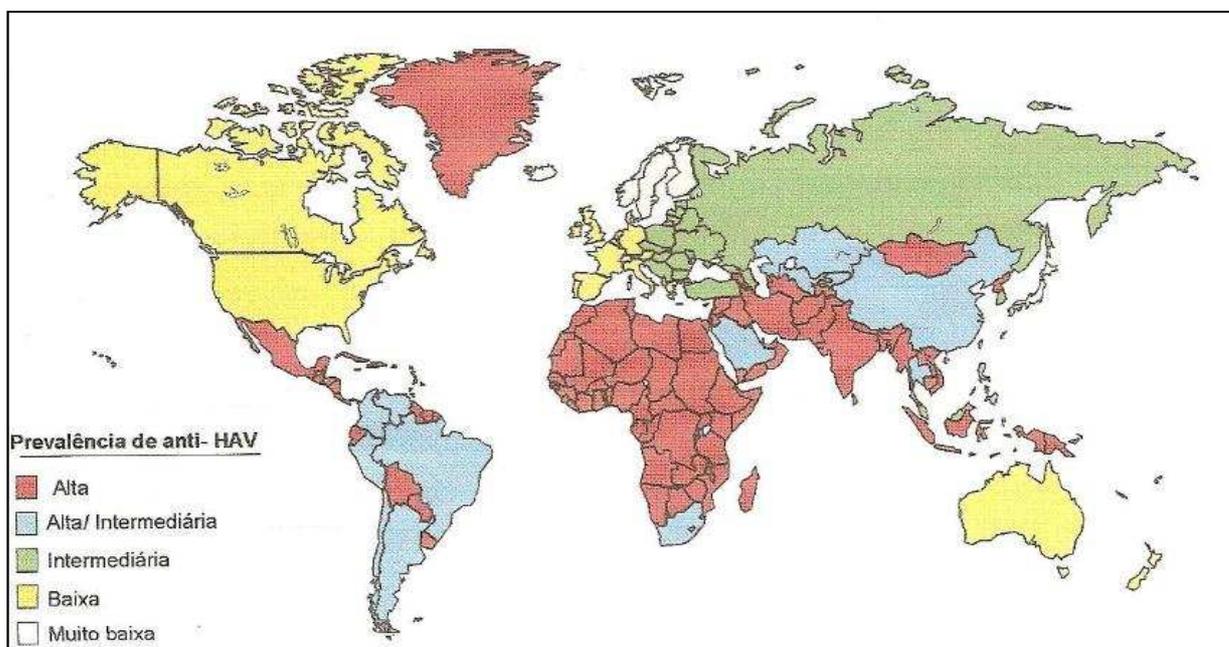


Figura 1.5. Distribuição geográfica da infecção pelo vírus da hepatite A (Adaptado de: epidemiology and prevention of viral Hepatitis A to E- na Overview, CDC 2006).

O Brasil sempre foi considerado um país de alta endemicidade para o HAV, pois dados epidemiológicos demonstravam que aproximadamente 90% da população adulta apresentava anticorpos anti-HAV e que a maioria das crianças já era imune aos 10 anos de idade (ABUZWAIDA *et al.*, 1987; GASPAR *et al.*, 2000). Entretanto, devido à diversidade socioeconômica entre as regiões no Brasil, há, atualmente, uma grande variação na prevalência de infecção pelo HAV. Uma revisão de literatura publicada sobre a prevalência de anti-HAV total em quatro regiões brasileiras (VITRAL *et al.*, 2008) revelou padrões

variáveis: alta prevalência nas regiões Norte (95%) e Nordeste (67%) com padrões semelhantes aos observados em regiões subdesenvolvidas, e prevalências decrescentes nas regiões Sul (42%) e sudeste (25%) (figura 1.6), onde a prevalência na primeira década, mesmo em populações de mais baixa renda, é menor do que a observada na região Norte.

Observações epidemiológicas sobre a hepatite A, no Brasil, demonstraram que nas regiões mais desenvolvidas o número de crianças suscetíveis está aumentando de forma significativa, não só nas classes de nível socioeconômico mais elevado, mas também nas classes de baixo nível socioeconômico, fato decorrente das melhorias nas condições sanitárias existentes nessas regiões (SANTOS *et al.*, 2002; PEREIRA & GONÇALVES., 2003).

Dados obtidos no inquérito nacional para hepatite A, demonstraram que na região Nordeste, em grupos de crianças de 5-9 anos de idade a prevalência observada foi de 41,5%, em adolescentes de 10-19 anos de idade a taxa observada foi de 57,4%. Quando observada a região Centro-Oeste, especificamente o Distrito Federal, a taxa observada foi de 33,8% em crianças de 5-9 anos de idade e 65,1% em adolescentes de 10-19 anos de idade (de ALENCAR XIMENES *et al.*, 2008)

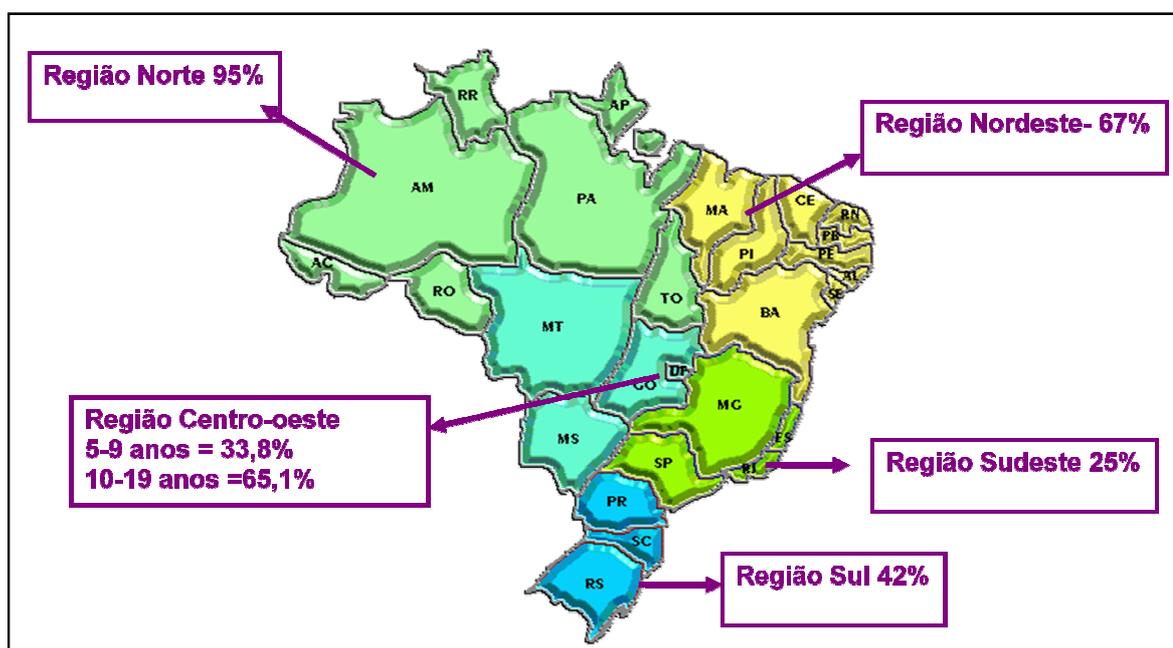


Figura 1.6. Prevalência de anticorpos anti-vírus da hepatite A total nas diferentes regiões brasileiras onde foram realizadas investigações epidemiológicas. Adaptado de uma revisão de literatura (Vital e colaboradores, 2008) e do Inquérito nacional de Hepatite A (de Alencar Ximenes e colaboradores, 2008).

No Brasil, como em alguns outros países da América Latina onde a hepatite A é endêmica, as taxas de prevalência da infecção pelo HAV sofreram declínio nos últimos 20 anos. Diversos estudos apontam para uma mudança do padrão epidemiológico da hepatite A no país: de alta para alta/média endemicidade e no deslocamento da prevalência para grupos etários de maior idade (VITRAL *et al.*, 1998a; 1998b; TAPIA-CONYER *et al.*, 1999; CLEMENS *et al.*, 2000; ALMEIDA *et al.*, 2001; CARRILHO *et al.*, 2005; VITRAL *et al.*, 2006; 2008). Essa mudança parece ocorrer devido a melhorias das condições de higiene e habitação durante as últimas duas décadas e ao maior acesso aos cuidados básicos de saúde. Essa mudança levou à diminuição da incidência da infecção pelo HAV em crianças e, conseqüentemente, ao aumento do número de adultos suscetíveis, com maior probabilidade de ocorrência de surtos epidêmicos e casos esporádicos nesta última faixa etária (CHIN *et al.*, 1991; POOVORAWAN *et al.*, 1993; WU *et al.*, 1993; YAP E GUAN, 1993).

1.1.8. A pesquisa de HAV no ambiente

A pesquisa de vírus na água iniciou-se após a ocorrência, em 1955, de um surto de hepatite em Nova Delhi (Índia), ocasionado pela contaminação do sistema de tratamento da água por esgoto. Nessa época, observou-se que o tratamento da água com alumínio e cloro, em geral eficaz na prevenção de infecções bacterianas, parecia não prevenir a transmissão de viroses. No período de seis meses entre 1955 e 1956, 30 mil casos de hepatite foram registrados e o patógeno causador da epidemia foi, na época, identificado com base apenas em aspectos epidemiológicos como sendo o vírus da hepatite A (HAV) (BOSCH *et al.*, 1998). Foi somente na década de 80, com o advento dos testes sorológicos, que essas amostras foram retestadas e, observou-se que a maioria dos indivíduos era imune para o HAV, não sendo, portanto, o causador do surto. Nessa mesma década, o agente causador do surto foi identificado como sendo o vírus da hepatite E (HEV) (COCKAYNE, 1912; BLUMER, 1923).

O HAV, juntamente com outros vírus entéricos como rotavírus (RV) humano, adenovírus entéricos (ADVs) e astrovírus (HAsV) foram descritos como causadores de diversos surtos relacionados ao consumo de água e alimentos contaminados, incluindo peixes e moluscos bivalves de ambientes marinhos contaminados, além de frutos e vegetais cultivados em solos irrigados e/ou fertilizados com águas contaminadas por esgoto, ou

ainda, por contato direto ou ingestão acidental de água de recreação contaminada por esgoto (BOSCH, 1998; WYN-JONES & SELLWOOD, 2001).

Em muitos países, incluindo o Brasil, o padrão de monitoramento das bacias hídricas estabelecido pelos órgãos reguladores continua baseado na presença de indicadores bacterianos (enterococos, coliformes fecais e totais) para acessar a qualidade microbiológica da água. Entretanto, os indicadores bacterianos nem sempre refletem o risco potencial da transmissão de outros agentes como os vírus entéricos (FONG & LIPP, 2005). O HAV, assim como os demais vírus entéricos, é mais resistente à degradação do que os indicadores bacterianos (SHUVAL, 1971), podendo estar presente em águas onde os níveis bacterianos se encontram dentro dos padrões de qualidade (GRIFFIN *et al.*, 1999; NOBLE & FUHRMAN, 2001). Águas de recreação, que não sofrem nenhum tratamento sanitário, podem conter vírus, apesar de serem consideradas próprias para o banho segundo a legislação vigente (GERBA *et al.*, 1979; GOYAL *et al.*, 1984). De acordo com METCALF & JIANG (1998), atribuir segurança em termos sanitários para águas de recreação, quando as bactérias indicadoras estão dentro dos padrões considerados satisfatórios, é admitir ou aceitar uma falha, com sério potencial de risco para a saúde, uma vez que a presença de vírus não pode ser descartada.

A maior dificuldade na implantação da pesquisa de vírus em águas ambientais esbarra no fato de que cada amostra apresenta características únicas para o isolamento, concentração e detecção de vírus. Dependendo do tipo de amostra de água, esta pode conter grande quantidade de sais, ácido húmico, material orgânico e organismos de vida livre. Esses materiais podem bloquear os filtros, eliminar os vírus durante a concentração e/ou inibir a reação de PCR (IIZERMAN *et al.*, 1997). Por essas razões e pelos baixos níveis de vírus freqüentemente encontrados em amostras ambientais, é necessária uma etapa de concentração antes da detecção das partículas virais. Em geral, os métodos de concentração se baseiam em adsorção em matrizes carregadas positiva ou negativamente (membranas, fibras de vidro, de pó ou de algodão), precipitação, sedimentação sobre influência de força centrífuga, filtração, migração em campo elétrico ou reações imunoquímicas (BOSCH *et al.*, 2008).

O método de adsorção-eluição utilizando membranas carregadas positivamente tem sido utilizado para a recuperação viral em amostras ambientais (MEHNERT *et al.*, 1997; QUEIROZ *et al.*, 2001; FONG & LIPP, 2005). No entanto, alguns estudos já demonstraram que a utilização do extrato de carne para eluição do concentrado pode inibir a PCR, de forma que protocolos envolvendo adsorção-eluição com soluções inorgânicas tem se apresentado

como uma alternativa quando a detecção viral é realizada por métodos moleculares. (KATAYAMA *et al.*, 2002; FONG & LIPP, 2005;).

No Brasil, diversos estudos, basearam-se no método descrito por Katayama e colaboradores (2002), que utiliza membrana carregada negativamente, para a concentração de vírus entéricos (VILLAR *et al.*, 2006; 2007; de PAULA *et al.*, 2007; DINIZ-MENDES *et al.*, 2008; MIAGOSTOVICH *et al.*, 2008). Estes estudos vem apresentando uma boa taxa de detecção desses vírus entéricos.

Uma vez detectados os vírus, esbarra-se em mais uma dificuldade que é a determinação do potencial de risco destes patógenos. Ou seja, o real risco que a população encontra ao entrar em contato com uma água contaminada não é bem conhecido. Diversos estudos vêm sendo conduzidos para a determinação desse risco à saúde humana (VERHOEF *et al.*, 2008; WONG *et al.*, 2009).

Alguns estudos já foram realizados no Brasil pesquisando o HAV em amostras de água (VILLAR *et al.*, 2006; 2007; de PAULA *et al.*, 2007). Para a realização desses estudos foram utilizadas diversas matrizes aquáticas, sendo o presente estudo o primeiro a realizar um monitoramento em uma matriz de água salobra. Villar e colaboradores (2006) realizaram um estudo de comparação de metodologias de concentração e detecção do HAV em amostras de água de torneira, de água de rio, de água mineral e amostras de água do mar. O estudo concluiu que embora influencie o PCR qualitativo, o método de concentração não influencia a detecção quantitativa do vírus. Demonstrando que o PCR em tempo real é bastante eficaz na detecção do HAV em águas ambientais. De Paula e colaboradores (2007), realizaram um estudo na Bacia Amazônica e conseguiram detectar o HAV em amostras de água utilizando tanto o PCR qualitativo, quanto o quantitativo sendo esse o que demonstrou ser mais eficaz. Ambos os estudos contribuíram para o desenvolvimento da pesquisa nessa área.

1.1.9. Prevenção e Controle

As medidas de prevenção e controle da hepatite A devem levar em consideração o estado imunológico da população estudada e as principais vias de transmissão da doença. A medida de controle mais eficiente da doença é a prevenção da contaminação fecal das mãos, alimentos e águas (CDC., 1999). A medida de controle mais crítica é a higienização das mãos após o uso de banheiro, antes do preparo de alimentos e durante a execução de atividades que facilitam a contaminação das mãos quando se trabalha com crianças menores

de dois anos de idade. Devido à dificuldade de controle da higiene pessoal de crianças, estas devem ser impedidas do contato próximo com pessoas suscetíveis durante as primeiras duas semanas da doença ou por no mínimo uma semana após o aparecimento dos sintomas. Alguns autores sugerem precauções entéricas estritas para médicos e outros profissionais que cuidam de recém-nascidos, crianças e pacientes com incontinência fecal (FAVERO *et al.*, 1979; MORAIS *et al.*, 2006).

Uma das medidas profiláticas adotadas em casos de surtos de hepatite A é a imunização passiva por meio da transferência passiva de imunoglobulinas (IG) específicas contra o vírus da hepatite A. A imunização passiva também atua na atenuação da expressão clínica da doença em indivíduos infectados. A maior eficácia da imunização passiva é alcançada quando essa medida é adotada no período de incubação. Após esse período, a administração intramuscular de IG humana anti-hepatite A apenas atenua os sintomas clínicos da infecção pelo HAV (CDC, 2006).

Outra importante medida de prevenção da hepatite A é a vacinação. A estratégia de vacinação disponível consiste em duas doses, para a obtenção de imunidade prolongada. Estimativas usando modelos cinéticos sugerem que níveis de proteção podem persistir na maioria dos vacinados por 20 anos ou mais (VAN DAMME *et al.*, 1994; WIENS *et al.*, 1996).

A disponibilidade de vacina contra a hepatite A fornece a oportunidade de diminuir substancialmente a incidência da doença e eliminar potencialmente a infecção. Devido à alta incidência da doença em crianças e o seu papel crítico na transmissão do HAV, estas devem ser o primeiro foco da estratégia de vacinação. A sua inclusão na rotina do Programa Nacional de Imunização em crianças poderia prevenir a infecção em grupos etários que contribuem com pelo menos um terço dos casos, além de eliminar a maior fonte de contaminação para outras crianças e adultos. A rotina de vacinação em crianças de comunidades com altas taxas da doença tem sido eficaz na prevenção e interrupção de surtos nestas comunidades, o que causaria impacto na incidência geral da doença (VITRAL *et al.*, 2008)

2. JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA

No Brasil, a hepatite A é considerada doença endêmica altamente disseminada. Nas áreas de alta endemicidade, a hepatite A é mais comum em crianças com até 10 anos de idade, mas nos grandes centros urbanos, o perfil epidemiológico da doença vem sendo alterado devido à implementação de medidas de saneamento, contribuindo para a redução do contato com o HAV na infância e, com isso, o deslocamento da doença para grupos etários mais avançados como adolescentes e adultos jovens (VITRAL *et al.*, 2008). Esta mudança tem acarretado um número cada vez maior de crianças susceptíveis com o aumento potencial de surtos epidêmicos, sendo a água um dos principais meios de contaminação (VITRAL *et al.*, 1998a; SANTOS *et al.*, 2002; VILLAR *et al.*, 2002).

As fezes de indivíduos infectados pelo HAV podem conter até 10^9 partículas virais infecciosas/grama e constituem a fonte primária da infecção. O HAV é considerado um dos vírus mais estáveis no meio ambiente, permanecendo infeccioso mesmo após os processos de tratamento e desinfecção da água sendo, portanto, considerado um importante patógeno de transmissão hídrica (SOBSEY *et al.*, 1988). A detecção de HAV em águas é um problema de saúde pública, porque mesmo em baixas concentrações ele é capaz de causar a hepatite A (CUTHBERT, 2001).

A Lagoa Rodrigo de Freitas está localizada atrás da restinga de Ipanema e do Leblon, processando seu balanço hídrico com o ambiente marinho através do canal do Jardim de Alah. O aporte incessante de águas servidas e de matéria sólida que atingem esse corpo d'água lagunar vem prejudicando o comportamento hidráulico e a qualidade da água da lagoa (ALVES *et al.*, 1998). A contaminação da água da lagoa por microorganismos patogênicos causada pelo lançamento de esgoto não tratado é um problema de grande magnitude, pois pode levar ao aumento de casos de doenças de veiculação hídrica como, por exemplo, a hepatite A cujo agente etiológico é de transmissão essencialmente fecal-oral. Suas águas, embora poluídas, são o local preferido pelos remadores da cidade. Ao redor da lagoa estão clubes tradicionais no remo, como Flamengo, Vasco (sede náutica) e Botafogo (sede náutica), e outros de lazer, como Caiçaras e Piraquê.

A Lagoa Rodrigo de Freitas foi utilizada como modelo de estudo para monitoramento ambiental por ser regulamentada como uma área de proteção permanente pela Lei Orgânica do Município do Rio de Janeiro, sendo um ponto turístico e de lazer de grande expressão na estrutura urbana da cidade do Rio de Janeiro, e que ao longo desta

última década vem se caracterizando por um substancial aumento de problemas de natureza físico-ambiental (ALVES *et al.*,1998).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

- Aplicar métodos moleculares para avaliar a disseminação do HAV em águas de recreação de contato primário, utilizando como modelo a Lagoa Rodrigo de Freitas, localizada no Município do Rio de Janeiro, RJ.

3.2. Objetivos específicos

- Detectar, utilizando o método de PCR em tempo real (TaqMan qRT-PCR), a presença do vírus da hepatite A (HAV) em amostras de água em 12 pontos diferentes da Lagoa Rodrigo de Freitas no período de 12 meses.
- Determinar os parâmetros físico-químicos das amostras de água e avaliar sua possível relação com a presença do HAV.
- Detectar e quantificar coliformes fecais nas amostras de água e investigar sua possível relação com a presença do HAV.
- Determinar os genótipos dos isolados obtidos após amplificação, por *Nested* RT-PCR e seqüenciamento nucleotídico de um fragmento da região VP1/2A do genoma do HAV.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Área de estudo

A Lagoa Rodrigo de Freitas está localizada na Zona Sul da Cidade do Rio de Janeiro, possui espelho d'água de 2,2 km², profundidade média de 2,8 m e 7,8 km de perímetro, com volume de aproximadamente 6.200.000 m³. Liga-se ao mar pelo canal do Jardim de Alah, que possui 800 m de comprimento e entre 10 e 18 m de largura (FEEMA, 2008). É o local preferido dos remadores da cidade e possui no seu entorno muitas áreas de prática de esporte e lazer, podendo ser considerada uma possível fonte de contaminação pelo HAV.

4.2. Coleta e processamento das amostras

As coletas foram realizadas mensalmente, no período de agosto de 2007 a julho de 2008, totalizando 12 coletas, em pontos selecionados de modo a abranger amostras de todo o entorno da Lagoa e de um ponto central, incluindo pontos importantes como áreas de lazer e prática de esportes, um ponto na desembocadura do Rio dos Macacos e um ponto na desembocadura da lagoa na Praia do Leblon, próximo à saída do canal de Jardim de Alah. Para localização dos pontos utilizou-se o sistema de posicionamento global GPS (Garmin etrex®Legend, EUA) (Figuras 4.1 e 4.2).

Em cada ponto foram coletados 2,5 L de água, dos quais 2 L foram utilizados para concentração viral e 100 mL para a contagem de coliformes totais e fecais. O volume residual de cada coleta foi descartado.



Figura 4.1. Mapa geográfico da Lagoa Rodrigo de Freitas, Município do Rio de Janeiro, RJ: localização dos pontos de coleta (Fonte: Google Earth).



Curva do Calombo



Baixo Bebê



Sede Náutica do Vasco



Clube Naval

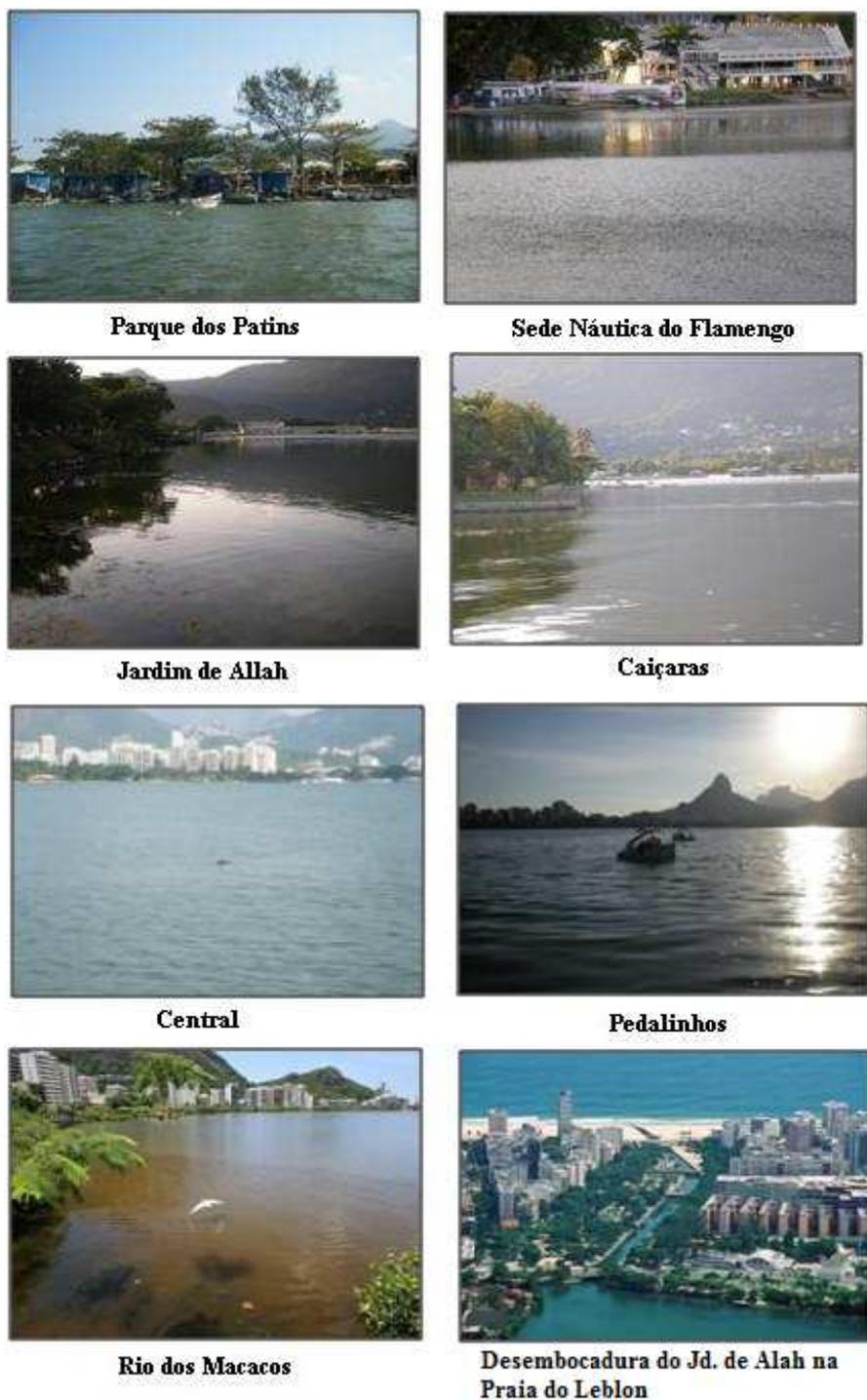


Figura4.2. Pontos de coletas, onde foram obtidas as amostras do presente estudo no período de agosto de 2007 a julho de 2008.

4.2.1. Parâmetros Físico-Químicos

Os parâmetros: temperatura (°C), condutividade (mS/cm), oxigênio dissolvido (mg/L), salinidade e turbidez foram mensurados utilizando-se o aparelho “Water quality Checker” (Horiba® U-10, Irvine, CA, EUA) e os parâmetros pH e cloro livre foram mensurados no equipamento “Pocket colorimeter™ (Hach®, Loveland, CO, EUA).

4.2.2. Quantificação dos Coliformes Totais e Fecais

Para a quantificação de coliformes totais e fecais utilizou-se o conjunto de reagentes Colilert®-18 (IDEXX Laboratories, Westbrook, EUA).

A quantificação dos coliformes fecais foi realizada durante todo o estudo, dentro de até duas horas depois de coletadas as amostras. Na primeira coleta realizada em agosto de 2007, foram feitas diluições seriadas de base 10 em água destilada, iniciando em 10^{-1} até 10^{-8} das amostras de água da Lagoa Rodrigo de Freitas, do Rio dos Macacos e da Praia do Leblon para a determinação da diluição a ser utilizada.

As amostras coletadas nos dez pontos do entorno Lagoa e no ponto da desembocadura na praia do Leblon foram transportadas no gelo e analisadas sem diluição e nas diluições 10^{-1} e 10^{-2} . As amostras da desembocadura do Rio dos Macacos foram analisadas após diluições 10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3} .

Foram adicionados 100 mL da amostra diluída a cartela do Quanti-Tray®/2000. Após incubação de 24 horas a 35°C, foi realizada a leitura de coliformes totais pela visualização direta, e a leitura de coliformes fecais foi determinada com o auxílio de uma lâmpada ultravioleta (Figura 4.3). Os resultados são expressos como “número mais provável” (NMP)/100 mL, de acordo com a tabela apresentada pelo fabricante, e considerados ideais quando estavam dentro dos limites estabelecidos pelo Conselho Nacional de Meio Ambiente (CONAMA) que é de 1.000 coliformes fecais por 100 mL de água, para águas de recreação de contato primário (como é o caso da Lagoa Rodrigo de Freitas). Contato primário é definido como o contato direto e prolongado com a água durante atividades, tais como: natação, mergulho, esqui aquático, em que a possibilidade de o banhista ingerir água é elevada (CONAMA, resoluções 357/2005, 274/2000).



Figura 4.3. Leitura de Coliformes Fecais com lâmpada ultravioleta utilizando Cartela Quanti-Tray®/2000 do conjunto de reagentes Colilert®-18. A – Cartela Quanti-Tray®/2000 B – Lâmpada ultravioleta.

4.2.3. Concentração Viral das Amostras

O método de concentração viral utilizado foi o de Katayama *et al.* (2002), com algumas modificações como a utilização de um pré-filtro AP-20 e utilização de 15mL hidróxido de sódio (NaOH) a 3 mM na etapa de eluição, ao invés de 10 mL de NaOH a 1 mM como descrito originalmente por Katayama. As amostras foram submetidas ao processo de clarificação, que consiste na remoção de resíduos grosseiros mediante filtração com pré-filtros AP-20® (membranas de 142 mm de diâmetro, malha de Millipore), utilizando um sistema de filtração Millipore (Millipore, Rio de Janeiro, Brasil) constituído por uma bomba de vácuo, um recipiente de pressão e um suporte para a colocação de membranas (figura 4.4). Com exceção das amostras provenientes da Praia do Leblon, foram adicionados às demais amostras 25 mL de cloreto de magnésio a uma concentração final de 25 mM ($MgCl_2$ Vetec, Rio de Janeiro, Brasil). O pH foi ajustado para 5,0 com a adição de ácido clorídrico 6N (HCl Merck, Rio de Janeiro, Brasil).



Figura 4.4. Sistema de filtração Millipore®: 1, Bomba de vácuo com manômetros; 2, Recipiente de pressão; 3, Suporte de membranas.

Após clarificação, as amostras foram filtradas em uma membrana HA negativamente carregada (142 mm de diâmetro, malha de 0,45 μm , Millipore) acoplada ao Sistema de Pressão Millipore. A membrana foi rinsada com 350 mL de ácido sulfúrico 0,5 mM (H_2SO_4 Merck, Rio de Janeiro, Brasil). Os vírus foram eluídos em 15 mL de hidróxido de sódio 3 mM, pH 10,5 (NaOH Vetec, Rio de Janeiro, Brasil), através de agitação por 5 minutos. O eluato foi neutralizado pela adição de 50 μL de H_2SO_4 50 mM e 50 μL de tampão Tris-EDTA (TE) 100x (10 μM Tris, 1 mM EDTA, pH 8,0). O eluato neutralizado foi transferido para uma unidade do concentrador Centriprep® YM-50 (Millipore, Rio de Janeiro, Brasil) (Figura 4.5), seguido de centrifugação a 1500 x g por 10 min a 4°C, até obter volume final aproximado de 2 mL.

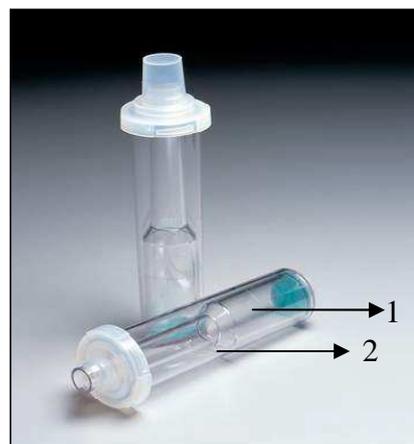


Figura 4.5. Concentrador Centriprep® YM-50, Millipore. 1, Tubo coletor; 2, Recipiente

4.3. Extração do HAV-RNA

A extração do RNA viral foi realizada em todas as 144 amostras coletadas utilizando-se o conjunto de reagentes comercial “Qiagen Viral RNA Kit” (Qiagen, Valencia, Espanha) que é baseado na adsorção dos ácidos nucleicos às partículas de sílica.

4.3.1. Qiagen Viral RNA Kit (Qiagen, Valencia, Espanha)

Este método fundamenta-se na ligação específica do RNA viral à uma membrana de sílica gel enquanto os contaminantes passam através da membrana, sendo então eliminados.

Materiais:

- Conjunto de reagentes comerciais para extração (Qiagen®, Valencia, Espanha)
- Etanol 100%

Método:

O RNA viral das amostras de água foi extraído utilizando-se um conjunto de reagentes comercial seguindo as instruções do fabricante. A cada tubo devidamente identificado contendo 560 µL do Tampão AVL (“Viral Lysis Buffer”) foram adicionados 140 µL da amostra de água correspondente. Após homogeneização e incubação em temperatura ambiente por 10 minutos, foram adicionados 560 µL de etanol a 100% e novamente homogeneizado. Esta solução foi transferida para colunas e submetidas a uma centrifugação de 6000 x g por 1 minuto em centrífuga Excelsa II (FANEM, São Paulo, Brasil). Os tubos coletores das colunas foram descartados e novos tubos foram recolocados. Após adição de 500 µL do tampão AW1 (“Washer buffer 1”) para lavagem da coluna, procedeu-se outra centrifugação de 6000 x g por 1 minuto. Novamente, os tubos coletores foram descartados e novos tubos foram recolocados. Foram adicionados 500 µL do tampão AW2 (“Washer buffer 2”) para segunda lavagem; as colunas foram centrifugadas a 20000 x g durante 4 minutos e mais uma vez os tubos coletores foram removidos. As colunas foram colocadas em tubos cônicos estéreis de poliestireno de 1,5 mL e, em seguida, foram adicionados 60 µL do tampão AVE (“Elution buffer”) para eluição do RNA. As colunas foram submetidas à centrifugação de 6.000 x g por 1 minuto e posteriormente, foram

descartadas, sendo os tubos cônicos estéreis contendo o RNA viral estocados a -70°C até o momento de sua utilização para síntese do cDNA.

4.4. Transcrição reversa

Materiais:

- Random *primer* 20 pmol/ μL (Invitrogen, Escócia)
- dNTP 1,25 mM (Promega, WI, EUA)
- DTT 0,1 M (Invitrogen, CA, EUA)
- RNAsin 1 U/ μL (Invitrogen, Escócia)
- Tampão (5x) da enzima Superscript III H^{RT} (SS III)
- Enzima Superscript III H^{RT} 1 U/ μL (Invitrogen, CA, EUA)

Método:

Em 10 μL do RNA viral, foi acrescentada uma mistura contendo 0,5 μL de RNAsin (inibidor de RNases), 2 μL de random *primer* e 2 μL de dNTP. As amostras foram incubadas a 65°C durante 5 minutos e, em seguida, acrescentamos em cada tubo: 4 μL do tampão da enzima, 2 μL de DTT e 1 μL da enzima SS III. As amostras foram incubadas a 55°C durante 60 minutos para ocorrer a transcrição reversa do RNA em cDNA. Logo após, a enzima foi inativada pela incubação das amostras a 65°C durante 10 minutos e o material estocado a -20°C .

O mesmo produto obtido da transcrição reversa foi utilizado para a reação em cadeia pela polimerase convencional (RT *Nested*-PCR “in house”) e para a PCR em tempo real (qRT-PCR).

4.4.1. PCR em tempo real (TaqMan qRT-PCR)

4.4.2. Preparo da curva padrão para a PCR em tempo real

Uma amostra de HAF-203 (cepa de HAV, isolada de um caso agudo de hepatite A e que foi primeiramente isolada no Brasil por Gaspar e colaboradores em 1992) foi extraída e amplificada, utilizando-se oligonucleotídeos iniciadores de polaridade positiva e negativa

para a região 5'NC (quadro 4.2), originando fragmentos de 400 bp, que foram então seqüenciados para a confirmação da presença do RNA do HAV. O produto de PCR foi clonado no vetor TOPO PCRII (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA). O plasmídeo resultante foi introduzido em *Escherichia coli* e os clones com insertos foram selecionados utilizando-se a enzima EcoRI, posteriormente isolados por meio da preparação de DNA plasmidial. Uma vez extraído, a concentração deste DNA plasmidial foi determinada por leitura de absorbância a 280 nm em dois espectrofotômetros (DU@460, Beckman Coulter, Fullerton, CA, EUA e NanoDrop™ 1000, Wilmington, DE, EUA). Para conversão do resultado dessas quantificações para a unidade de medida cópias/μL, utilizamos a seguinte fórmula:

$$\frac{\text{Concentração (g/}\mu\text{L)}}{[\text{tamanho do plasmídeo (PB)}] \times 660} \times (6,022 \times 10^{23})$$

Em seguida, o DNA plasmidial foi diluído em séries de log₁₀ para construção da curva padrão e controle positivo do HAV para a PCR em tempo real para determinação da sensibilidade do método. As diluições utilizadas foram de 1,3 x 10¹; 1,3 x 10²; 1,3 x 10³; 1,3 x 10⁴; 1,3 x 10⁵; 1,3 x 10⁶ e 1,3 x 10⁷ cópias/mL. Com essas diluições, verificou-se o coeficiente de regressão linear (R²) e de inclinação.

4.4.3. Controle positivo da reação de PCR em tempo real

Para obtermos um controle positivo de cada matriz aquática utilizada nesse estudo inoculamos a cepa HAF-203 experimentalmente em amostras de 2 litros de água obtidas do ponto da desembocadura da Lagoa no Rio dos Macacos e do ponto da desembocadura da Lagoa na Praia do Leblon. As amostras da Lagoa e do Rio foram inoculadas com 2,36 x 10⁵ cópias/mL e a amostra do ponto de desembocadura da lagoa na Praia com 1,3 x 10⁴ cópias/mL do HAV.

4.4.4. Reação de PCR em tempo Real

Nesse estudo, a metodologia utilizada para detecção de fragmento da região 5'NC do genoma do HAV e para determinar a carga viral nas amostras de água foi descrita por JOTHIKUMAR e colaboradores (2005).

Materiais:

- Água Dnase/RNase free (GIBCO/Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA)
- Master mix - 1x TaqMan Universal PCR Master Mix (tampão, dNTP com UTP, ampERASE UNG e AmpliTaq Gold DNA polimerase) (Roche, Nova Jersey, EUA)
- Assay by design (300 nM de cada *primer* e 150 nM de sonda) (Gentec, Applied Biosystems assay, CA, EUA)
- Placa de poliacrilamida.

Método:

Foram sintetizados oligonucleotídeos específicos para região 5'NC do HAV e uma sonda marcada na extremidade 5' com o "repórter FAM", utilizando o software Primer Express V2.0 (TaqMan gene expression assay, Applied Biosystems, CA, EUA). Os oligonucleotídeos e sonda utilizados nessa reação estão descritos no quadro 4.1.

Quadro 4.1 - Oligonucleotídeos e sonda da região 5'NC do genoma do vírus da hepatite A utilizados na reação de PCR em tempo real.

| Oligo e Sonda | Polaridade | Posição no genoma | Seqüência 5'→ 3' |
|-------------------|------------|-------------------|----------------------------|
| Senso | Positiva | 86-109 | TGCAGGTTTCAGGGTTCTTAAATC |
| anti-senso | Negativa | 219-240 | GAGACCCTGGAAGAAAGAAGA |
| sonda | — | 198-218 | FAM ACTCATTTTTTCACGCTTTCTG |

T= Timina; G= Guanina; C=Citosina; A=Adenina

As reações de qRT-PCR foram realizadas utilizando-se o sistema 7500 da Applied Biosystems de PCR em tempo real. Para cada corrida, foi preparado em banho de gelo uma mistura contendo 12,5 µL de TaqMan Universal master Mix (tampão, dNTP com UTP, ampERASE UNG e AmpliTaq Gold DNA polimerase) (Roche, New Jersey, EUA), 1,25 µL de assay by design (300 nM de cada oligo e 150 nM de sonda) (Gentec, Applied Biosystems assay, CA, EUA) e 6,25 µL de Água Dnase/RNase free (GIBCO/Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA). O tampão de PCR contém 5-carboxy-X-rodamine (5-ROX) (500 nM) como

referência passiva para normalização das reações. Cinco microlitros de cDNA e de cada ponto da curva padrão foram adicionados em 20 μ L da mistura de PCR. A placa contendo as amostras foi submetida às seguintes condições: etapa inicial a 50°C durante 2 minutos, para descontaminação inicial da placa com Uracil-N-glicosilase (UNG), e após uma etapa de desnaturação a 95°C por 10 minutos, as amostras foram submetidas a 40 ciclos de 95°C durante 15 segundos e 60°C durante 1 minuto. Todas as amostras foram testadas em duplicata. A fluorescência foi detectada ao final da etapa de hibridização da sonda. O valor de C_T (*cycle threshold*) foi fornecido automaticamente em cada corrida. Esse valor refere-se ao número do ciclo no qual a fluorescência é detectada, caracterizando a amplificação da amostra.

4.5. Reação em Cadeia da Polimerase (RT-PCR):

Para detecção de fragmento da região VP1/2A do genoma do HAV foi utilizado o protocolo descrito por dePAULA e colaboradores (2002).

A fim de evitar contaminação na PCR, todas as etapas de amplificação e também as corridas eletroforéticas foram realizadas em salas separadas. Em todas as reações, desde a extração do RNA viral, foram incluídas amostras de “água ultrapura” (DNase/RNase free GIBCO/Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) como controles negativos e um controle positivo do vírus (cepa HAF-203).

Materiais:

- Água Dnase/RNase free (GIBCO/Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA)
- 5 pmol/ μ L de oligonucleotídeos específicos, de polaridade positiva (F6) e polaridade negativa (F7)
- dNTP 1,25 mM (Promega, WI, EUA)
- $MgCl_2$ 25 mM (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA)
- Tampão (10x) da Taq polimerase PCR (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA)
- Enzima Taq DNA polimerase 5 U/ μ L (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA).

Método:

No interior dos tubos de poliestireno de 0,5 mL foram colocados 9,7 µL de água Dnase/RNase free, 2,5 µL de tampão Taq polimerase (10x), 1,5 µL de MgCl₂, 4 µL dNTP, 1 µL de oligonucleotídeos F6 e F7, 0,5 µL de TAQ polimerase e 5 µL do cDNA. Em seguida as amostras foram colocadas em um termociclador (TC-312, Analítica, Munique, Alemanha) após a desnaturação inicial em 94°C durante 4 minutos, foram submetidas a 30 ciclos de amplificação. Cada ciclo consistia de 94°C durante 30 segundos para a desnaturação, 40°C durante 30 segundos para hibridização dos oligonucleotídeos, 72°C durante 1 minuto para síntese do DNA. Após o último ciclo, uma etapa de 72°C por 7 minutos foi incluída para alongamento final das cadeias de DNA. Em seguida, as amostras foram submetidas a um segundo ciclo de amplificação (RT *Nested*-PCR).

4.5.1. RT *Nested*-PCR:

Materiais:

- Água Dnase/RNase free (GIBCO/Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA)
- 5 pmol/µL de oligonucleotídeos específicos, de polaridade positiva (F8) e polaridade negativa (F9)
- dNTP 1,25 mM (Promega, Madison, WI, EUA)
- MgCl₂ 25 mM (Invitrogen, Carlsbad CA, EUA)
- Tampão (10x) da Taq polimerase (Invitrogen, Carlsbad CA, EUA)
- Enzima Taq DNA polimerase 5U/µL (Invitrogen, Carlsbad CA, EUA)

Método:

No interior dos tubos de poliestireno de 0,5 mL foram acrescentados 13,7 µL de água Dnase/RNase free, 2,5 µL de tampão Taq polimerase (10x), 1,5 µL de MgCl₂, 4 µL dNTP, 1 µL de oligonucleotídeos F8 e F9, 0,5 µL de TAQ polimerase e 2 µL do produto da PCR 1. As amostras foram colocadas no termociclador (TC-312- Analítica, São Paulo, Brasil) e após desnaturação inicial em 94°C durante 4 minutos, foram submetidas a 40 ciclos de amplificação. Cada ciclo consistia em: 94°C durante 30 segundos para desnaturação, 48°C

durante 30 segundos para hibridização dos oligonucleotídeos, 72°C durante 1 minuto para a síntese do DNA e, por último, seguiu-se uma elongação adicional de 72°C durante 7 minutos.

No quadro 4.2, são descritos os oligonucleotídeos utilizados na reação de RT e PCR.

Quadro 4.2 - Oligonucleotídeos utilizados na reação de PCR e seqüenciamento da região VP1/2ª do genoma do vírus da Hepatite A.

| Oligonucleotídeo | Polaridade | Posição no genoma | Seqüência 5'→3' |
|------------------|------------|-------------------|---------------------------|
| F6 | positiva | 2897 | TATTCAGATTGCAAATTAYAAT |
| F7 | negativa | 3288 | AAYTTCATYATTTTCATGCTCCT |
| F8 | Positiva | 2949 | TTGTCTGTYACAGAACAATCAG |
| F9 | negativa | 3192 | AGGRGGTGGGAAGYACTTCATTTGA |

T= Timina; G= Guanina; C=Citosina; A=Adenina; Y= C ou T; R= A ou G

4.5.2. Eletroforese em gel de agarose

Materiais:

- Tampão Tris/Acetato/EDTA (TAE) (50x: 242 g Tris Base/ 57,1 mL ácido acético glacial/ 100 mL de EDTA 0,05 M; pH 8,0)
- Tampão carreador da amostra (50% de glicerol, 0,4% de azul de bromofenol, 0,4% de xileno cianol)
- Brometo de etídeo (EtBr) – 0,5 µg/mL
- Agarose 1,5% em tampão TAE (Tris-Acetato-EDTA) contendo 0,5% de EtBr
- Padrão de peso molecular (ΦX174 DNA/Hae III fragmentsI) (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA)

Método:

Uma alíquota de 10 µL do produto da reação de *Nested* PCR foi submetida a eletroforese (100 volts durante 60 minutos) em gel de agarose à 1,5% contendo 0,5% de

brometo de etídio, em tampão TAE. O marcador de peso molecular Φ X174 foi colocado em um orifício em cada gel para determinação do tamanho das bandas obtidas na reação de PCR. Após corrida eletroforética, o gel foi examinado em luz ultravioleta no transiluminador (TMW-20, UVP Imagestore, CA, EUA) para visualização das bandas de DNA de 247 pares de bases.

4.6. Seqüenciamento do Produto de PCR

As amostras cujos produtos da amplificação da região VP1/2A por PCR apresentaram padrão de bandas de 247 pares de base no gel de agarose foram selecionadas para serem seqüenciadas.

Primeiramente, foi realizada nova *Nested* PCR em um volume final de aproximadamente quatro vezes maior (104 μ L) para se obter uma quantidade maior do produto amplificado. Em seguida, essas amostras foram aplicadas em gel de agarose 1,5% para verificação do padrão de bandas e para comparação com as concentrações de massa, utilizando como padrão o Low DNA Mass Ladder® (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA). O produto da PCR das amostras foi purificado pelo uso de colunas segundo as instruções do fabricante, utilizando-se o conjunto de reagentes comerciais de purificação de PCR (Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System, Promega, Madison, WI, EUA). Após esse processo, o DNA foi quantificado em um espectrofotômetro (NanoDrop™ 1000 Wilmington, DE, EUA) e as amostras que possuíam mais de 30 ng de DNA foram submetidas à reação de seqüenciamento.

Materiais:

- Conjunto de reagentes comerciais de purificação de PCR (Promega, Madison, WI, EUA)
- Etanol 70%

Método de purificação do produto da PCR por centrifugação:

Ao volume final obtido da reação de PCR 2 adicionou-se igual volume da solução de ligação de membrana fornecida pelo conjunto de reagentes. Logo após, foram processadas 3 etapas: ligação do DNA, lavagem e eluição. Na primeira etapa (ligação do DNA), inseriu-se

a minicoluna a um tubo coletor, transferiu-se a mistura do produto da PCR com a solução de ligação de membrana para essa minicoluna e incubou-se a temperatura ambiente durante 1 minuto. Posteriormente, centrifugou-se a 16.000 x g durante 1 minuto, descartou-se o resíduo e recolocou-se a minicoluna no tubo coletor. Na segunda etapa (etapa de lavagem), adicionou-se 700 µL da solução de lavagem de membrana (certificando-se de que o etanol foi adicionado seguindo instruções do fabricante), centrifugou-se novamente a 16.000 x g durante 1 minuto, descartou-se o resíduo e a minicoluna foi recolocada no tubo coletor. Essa etapa de lavagem foi realizada mais 1 vez vez utilizando-se 500 µL de solução de lavagem. Na última etapa (eluição), cuidadosamente transferiu-se a minicoluna para um tubo cônico estéril de poliestireno de 1,5 mL, onde foram adicionados 50 µL de água Dnase/RNase free, incubado a temperatura ambiente durante 1 minuto e centrifugou-se a 16.000 x g durante 1 minuto. Em seguida, descartou-se a minicoluna e o DNA foi estocado a -20°C.

4.6.1. Reação de Seqüenciamento

Materiais:

- Água RNA/DNase free (GIBCO/Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA)
- Oligonucleotídeos específicos, de polaridade positiva (F8) e negativa (F9) – 3 pmol/µL
- Placa de poliacrilamida
- DNA quantificado (aproximadamente 30 ng)
- Conjunto de seqüenciamento “Big Dye” (Big Dye® Terminator 3.1 Cycle Sequencing Kit, Applied Biosystems, Carlsbad, CA, EUA).
- Tampão “Big Dye” (Tampão de Seqüenciamento)

Método:

Em cada orifício da placa foram adicionados aproximadamente 30 ng de DNA, 1µL de oligonucleotídeos (senso ou antisenso), 0,5 µL (16x) do marcador “BigDye” mix e 1,75 µL de tampão (2,5x), sendo o volume final da reação de 10µL. Ambas as fitas de DNA foram seqüenciadas, utilizando-se um único oligonucleotídeo por reação. Em seguida, as amostras foram colocadas em um termociclador “Gene Amp PCR System 9700” e submetidas a 40 ciclos de amplificação. Cada ciclo consistia de: 96°C durante 10 segundos,

50°C durante 5 segundos e 60°C durante 4 minutos. O seqüenciamento e a leitura automática das seqüências foram feitos utilizando-se o equipamento “DNA analyzer 3730” (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, EUA).

As reações de seqüenciamento desse estudo foram todas realizadas na Plataforma de Seqüenciamento de DNA do Programa de Desenvolvimento Tecnológico em Insumos para Saúde (PDTIS)/FIOCRUZ.

4.6.1.1. Análise filogenética das seqüências

As seqüências obtidas foram alinhadas utilizando-se o programa blast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>) e comparadas com outras seqüências conhecidas disponíveis no GenBank. Para a construção da árvore filogenética, seqüências de 218 nucleotídeos (posição 3024 a 3191) da região VP1/2A do genoma do HAV foram alinhadas utilizando-se o programa CLUSTAL W (THOMPSON *et al.*; 1997). A análise filogenética das seqüências foi realizada utilizando-se o software MEGA 4 (TAMURA *et al.*, 2007) e a distância genética calculada pelo modelo de dois parâmetros de Kimura (FELSENTEIN, 1993), utilizando o método *Neighbor-joining* (SAITON & NEI, 1987) com *bootstrap* de 2000 réplicas.

4.7. Análise estatística

Os dados obtidos durante as coletas foram codificados por meio de números e armazenados em um banco de dados criado no programa Access 97 (versão 6.0). Foi realizada estatística descritiva com cálculos de freqüências, média \pm desvio-padrão e valores mínimo e máximo.

Para comparação entre variáveis categóricas, utilizou-se o teste qui-quadrado (χ^2), com correção de Yates quando apropriado.

A correlação entre variáveis que apresentaram distribuição normal (de acordo com o teste de Kolmogorov-Smirnov) foi realizada através do coeficiente de correlação linear de Pearson (r), e a correlação entre variáveis que não passaram no teste de normalidade foi realizada através da análise por postos (prova de Spearman; r_s).

Um valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo. Toda a análise estatística foi realizada utilizando o pacote Statistical Package for the Social Sciences (SPSS for Windows, release 12.0; SPSS Inc., Chicago, IL).

5. RESULTADOS

5.1. Parâmetros Físico-químicos

A tabela 5.1 apresenta os valores para média \pm desvio padrão, valores mínimo e máximo de pH, condutividade (mS/cm), turbidez (UNT), oxigênio dissolvido (mg/L), temperatura ($^{\circ}$ C), cloro livre (mg/L) e salinidade (%) obtidos para os 12 pontos de coleta durante os 12 meses de estudo. As figuras 5.1-5.7 mostram as variações mensais de cada um dos parâmetros avaliados, nos 12 meses de estudo.

Tabela 5.1 . Análise univariada dos parâmetros físico-químicos da água mensurados em cada ponto de coleta na Lagoa Rodrigo de Freitas, RJ, no período de agosto de 2007 a julho de 2008.

| Pontos | Curva do Calombo | Baixo Bebê | Sede Náut do V. da Gama | Clube Naval | Parque dos patins | Sede Náut. do Flamengo | Jardim de Aláh | Clube caiçaras | Central | Pedalinhos | Rio dos Macacos | Praia do Leblon |
|-----------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| pH | 8,66±0,98 (7,00-11,00) | 8,50±0,79 (7,00-9,00) | 8,66±0,77 (7,00-9,00) | 8,41±0,79 (7,00-9,00) | 8,16±0,38 (8,00-9,00) | 8,41±0,66 (7,00-9,00) | 8,25±0,62 (7,00-9,00) | 8,50±0,67 (7,00-9,00) | 8,33±0,65 (7,00-9,00) | 8,33±0,77 (7,00-9,00) | 7,41±1,08 (5,00-9,00) | 8,00±0,85 (6,00-9,00) |
| CE (mS/cm) | 17,50±6,23 (12,00-28,00) | 16,66±5,64 (12,00-28,00) | 16,91±5,72 (12,00-28,00) | 16,25±6,25 (8,00-29,00) | 17,00±5,47 (12,00-28,00) | 17,50±6,30 (12,00-29,00) | 16,33±5,83 (11,00-28,00) | 17,08±6,05 (12,00-29,00) | 17,41±5,90 (12,00-28,00) | 17,25±5,86 (12,00-29,00) | 5,66±3,86 (0,00-15,00) | 50,16±7,82 (28,00-56,00) |
| Turb (unt) | 21,25±9,28 (6,00-43,00) | 16,91±3,96 (7,00-21,00) | 19,83±4,73 (10,00-21,00) | 17,08±3,91 (9,00-25,00) | 20,75±8,65 (10,00-41,00) | 16,16±5,40 (8,00-28,00) | 17,50±4,31 (9,00-28,00) | 16,58±4,16 (8,00-21,00) | 19,25±5,78 (9,00-31,00) | 17,25±4,09 (10,00-24,00) | 14,08±6,66 (7,00-27,00) | 8,83±7,51 (0,00-24,00) |
| OD (mg/L) | 8,83±1,02 (6,00-10,00) | 8,83±1,11 (6,00-10,00) | 8,66±0,98 (6,00-10,00) | 8,83±1,33 (5,00-10,00) | 8,58±1,08 (6,00-10,00) | 8,66±1,15 (6,00-10,00) | 8,58±1,31 (6,00-10,00) | 8,66±0,98 (6,00-10,00) | 8,41±1,16 (6,00-10,00) | 8,75±1,13 (6,00-10,00) | 9,08±3,28 (0,00-13,00) | 8,16±1,40 (5,00-10,00) |
| Temp (°C) | 26,83±2,28 (23,00-30,00) | 26,83±2,44 (23,00-30,00) | 26,91±2,67 (23,00-30,00) | 27,00±2,55 (23,00-31,00) | 27,00±2,66 (23,00-30,00) | 27,16±2,79 (23,00-31,00) | 27,08±2,81 (23,00-32,00) | 27,00±2,89 (23,00-31,00) | 26,58±2,74 (23,00-30,00) | 26,91±2,96 (23,00-31,00) | 25,58±2,23 (23,00-29,00) | 24,66±1,72 (22,00-27,00) |
| Cloro (mg/L) | 0,15±0,17 (0,00-0,60) | 0,09±0,07 (0,00-0,30) | 0,16±0,14 (0,00-0,40) | 0,26±0,15 (0,00-0,50) | 0,23±0,13 (0,00-0,50) | 0,19±0,18 (0,00-0,60) | 0,11±0,15 (0,00-0,40) | 0,10±0,14 (0,00-0,50) | 0,12±0,10 (0,00-0,30) | 0,08±0,11 (0,00-0,30) | 0,00±0,00 (0,00-0,00) | 0,08±0,15 (0,00-0,50) |
| Salinidade (%) | 1,04±0,40 (0,69-1,77) | 1,00±0,36 (0,69-1,73) | 1,00±0,37 (0,70-1,74) | 0,96±0,40 (0,46-1,79) | 1,01±0,35 (0,70-1,73) | 1,04±0,40 (0,69-1,79) | 0,98±0,39 (0,62-1,76) | 1,02±0,39 (0,70-1,80) | 1,04±0,40 (0,69-1,77) | 1,02±0,39 (0,69-1,80) | 0,30±0,23 (0,01-0,89) | 3,45±0,25 (2,72-3,71) |

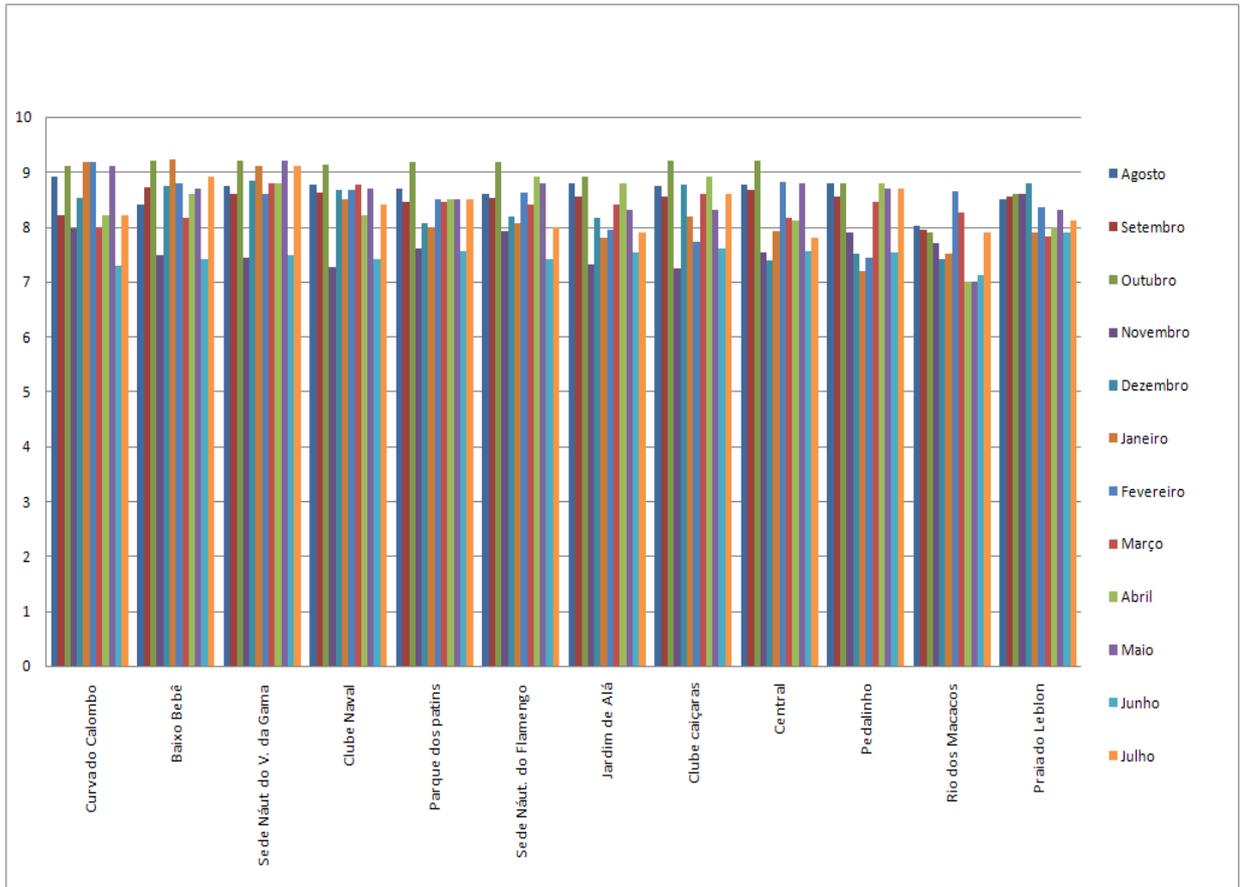


Figura 5.1. Variação de pH na Lagoa Rodrigo de Freitas, no Rio dos Macacos e na Praia do Leblon, no período de agosto de 2007 a julho de 2008.

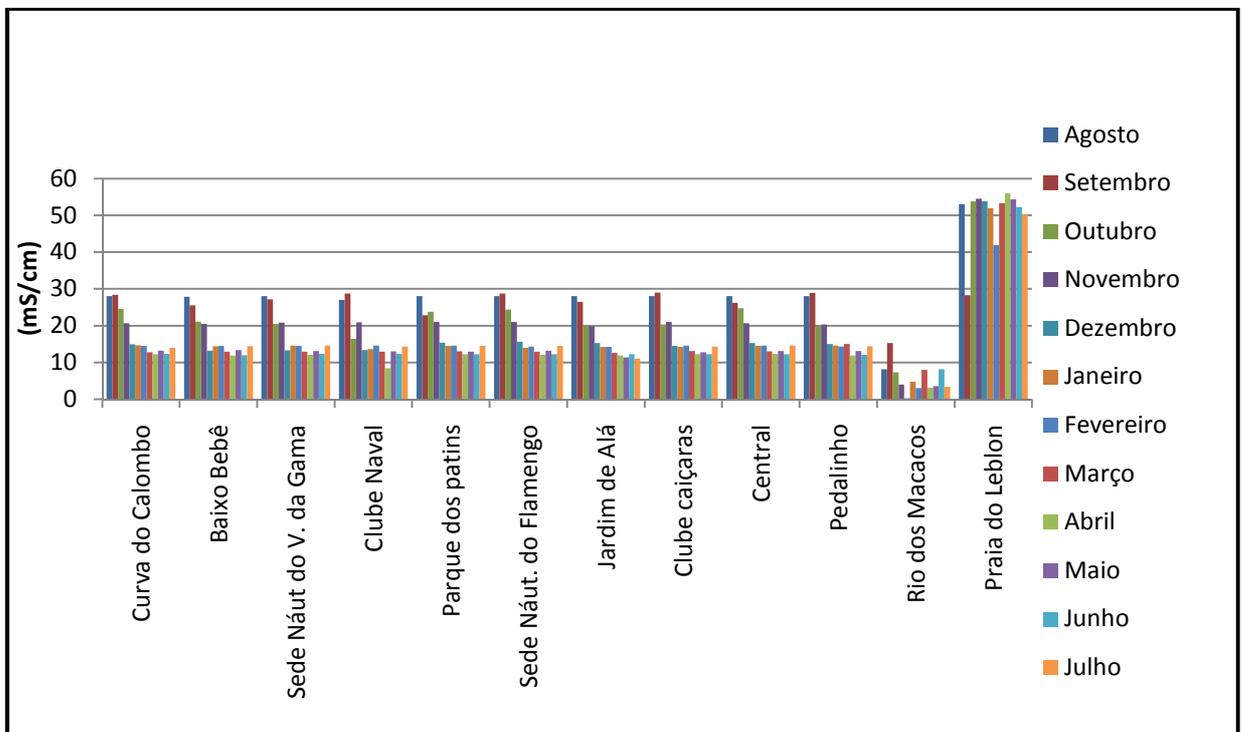


Figura 5.2. Variação de condutividade (mS/cm) na Lagoa Rodrigo de Freitas, no Rio dos Macacos e na Praia do Leblon, no período de agosto de 2007 a julho de 2008.

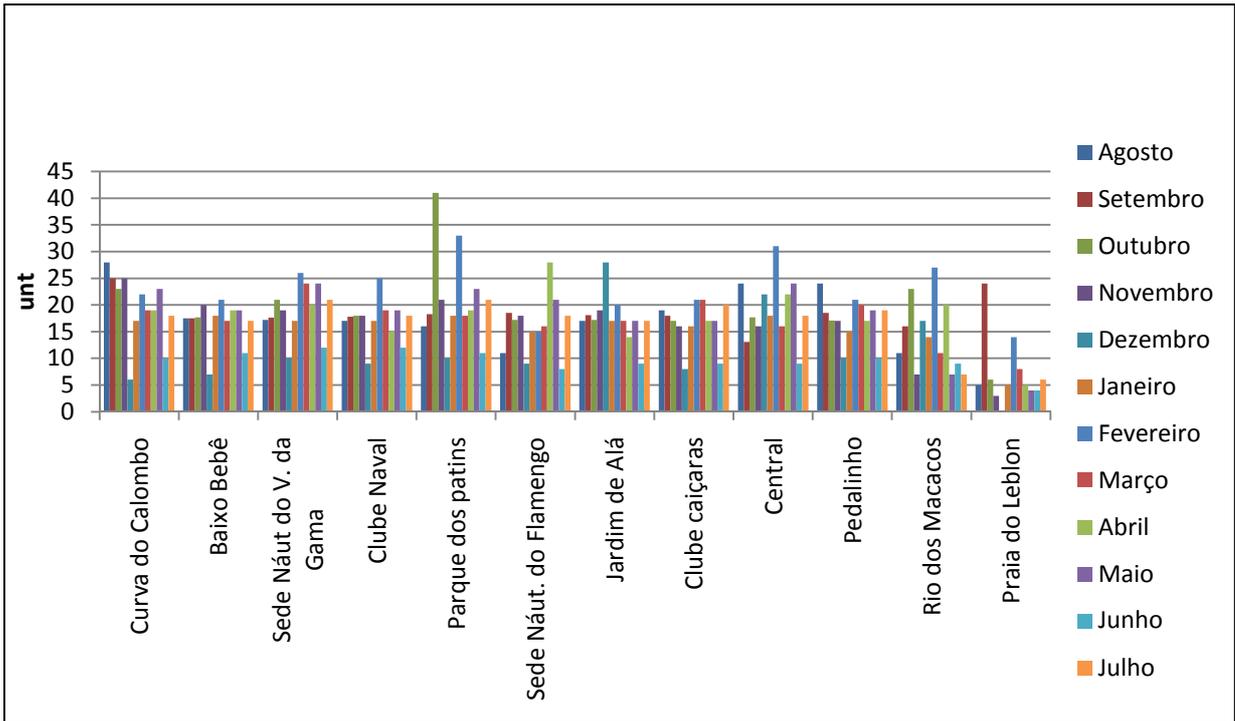


Figura 5.3. Variação de turbidez (UNT) na Lagoa Rodrigo de Freitas, no Rio dos Macacos e na Praia do Leblon, no período de agosto de 2007 a julho de 2008.

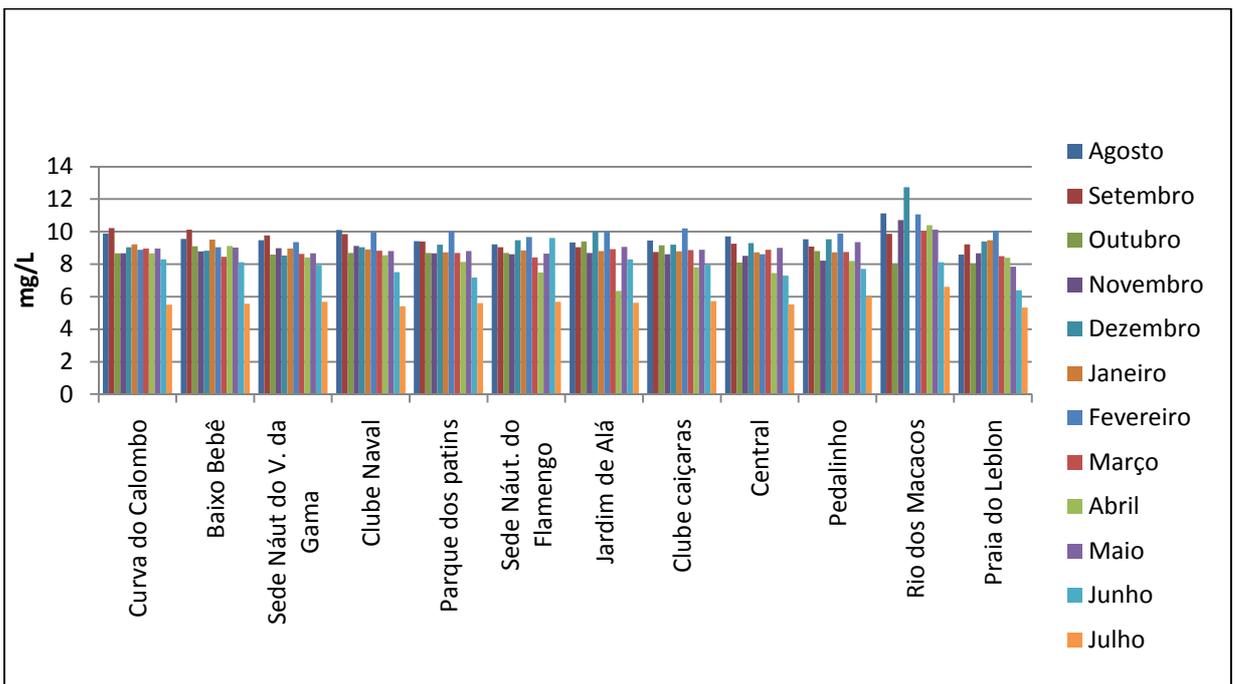


Figura 5.4. Variação de oxigênio dissolvido (mg/L) na Lagoa Rodrigo de Freitas, no Rio dos Macacos e na Praia do Leblon no período de agosto de 2007 a julho de 2008.

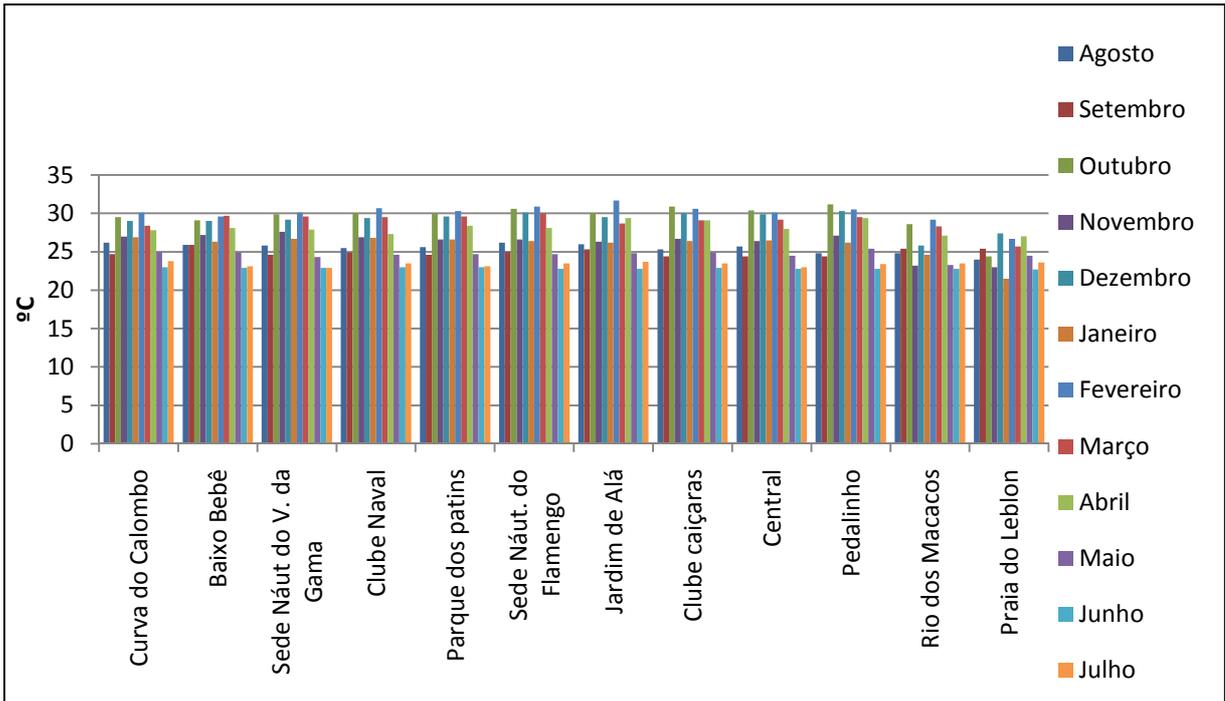


Figura 5.5. Variação de temperatura (°C) na Lagoa Rodrigo de Freitas, no Rio dos Macacos e na Praia do Leblon, no período de agosto de 2007 a julho de 2008.

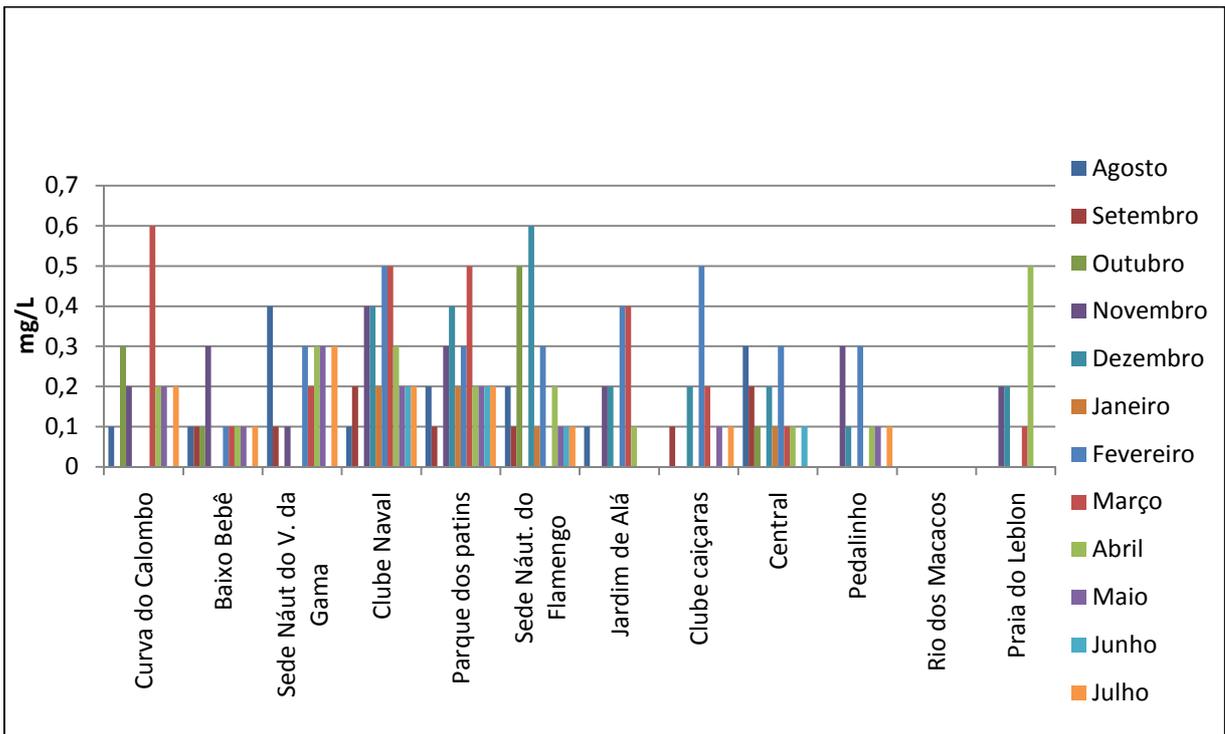


Figura 5.6. Variação de cloro (mg/L) na Lagoa Rodrigo de Freitas, no Rio dos Macacos e na Praia do Leblon, no período de agosto de 2007 a julho de 2008.

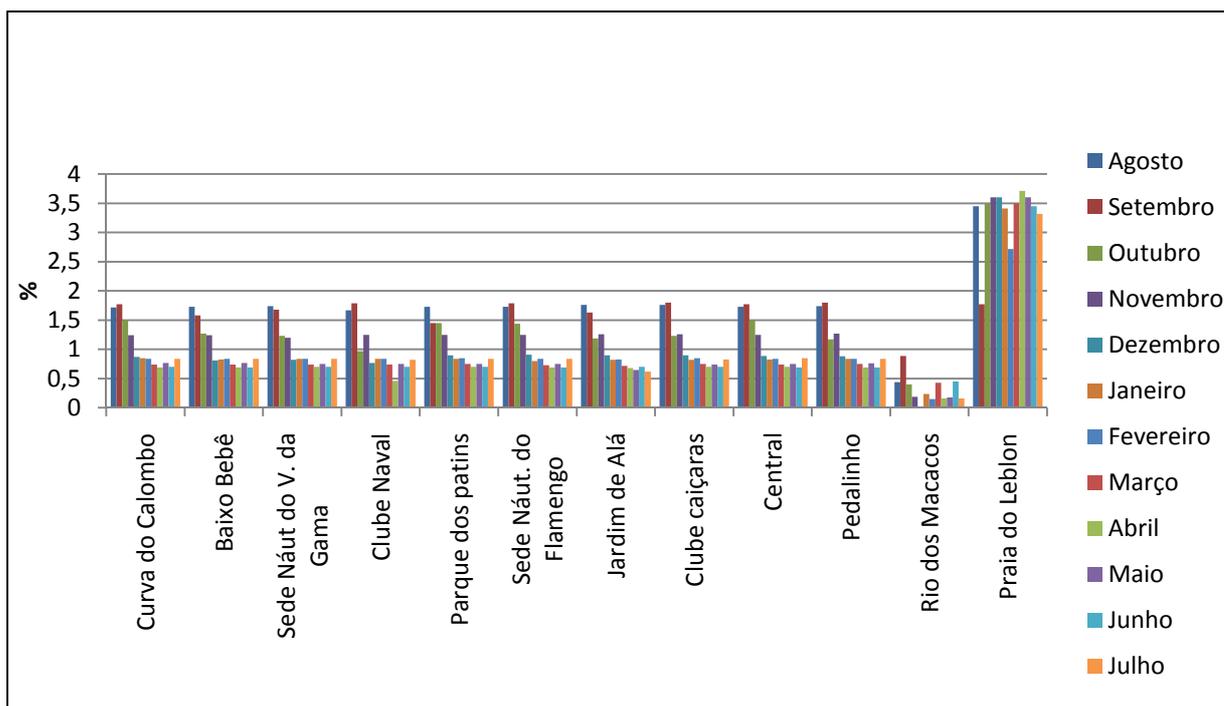


Figura 5.7. Variação de salinidade (%) na Lagoa Rodrigo de Freitas, no Rio dos Macacos e na Praia do Leblon, no período de agosto de 2007 a julho de 2008.

5.2. Coliformes Fecais

As diluições seriadas só foram realizadas na primeira coleta. Com a análise dos resultados foram escolhidas as diluições a serem utilizadas durante o estudo, seguindo uma margem de segurança. As amostras do Rio dos Macacos foram as únicas com diluições diferenciadas, por se tratar de uma área com grande aporte de esgoto.

Os resultados dos coliformes fecais foram expressos, de acordo com a tabela apresentada pelo fabricante, em número mais provável (NMP)/100 mL (tabela 5.2), e foram considerados satisfatórios quando se encontravam abaixo do limite determinado pelo Conselho Nacional de Meio Ambiente (CONAMA). A tabela 5.2 e a figura 5.8 apresentam os valores obtidos de coliformes fecais nos doze pontos de coleta durante os doze meses de estudo.

Tabela 5.2 Valores da análise microbiológica de coliformes fecais em NMP/100mL das amostras coletadas na Lagoa Rodrigo de Freitas, Rio dos Macacos e Praia do Leblon no período de Agosto de 2007 a Julho de 2008.

| Pontos Meses | Curva do Calombo | Baixo bebê | Vasco | Clube Naval | Parque dos Patins | Flamengo | Jardim de Alah | Caiçaras | Central | Pedalinhos | Rio dos Macacos | Praia do Leblon |
|-------------------------------|-------------------------|-------------------|--------------|--------------------|--------------------------|-----------------|-----------------------|-----------------|----------------|-------------------|------------------------|------------------------|
| Agosto | 548 | 870 | 755 | 549 | 496 | 446 | 507 | 792 | 756 | 629 | 860 | 630 |
| Setembro | 722 | 824 | 599 | 373 | 706 | 960 | 310 | 100 | 1111 | 432 | 12400 | 7170 |
| Outubro | 496 | 757 | 294 | 504 | 368 | 1290 | 2952 | 612 | 203 | 236 | 13000 | 504 |
| Novembro | 74 | 104 | 144 | 310 | 386 | 345 | 359 | 116 | 630 | 134 | 7358 | 30 |
| Dezembro | 10 | 74 | 31 | 41 | 20 | 92 | 75 | 10 | 100 | 10 | 2180 | 41 |
| Janeiro | 328 | 272 | 322 | 111 | 377 | 546 | 8704 | 6294 | 170 | 91 | 3224 | 669 |
| Fevereiro | 74 | 518 | 276 | 175 | 116 | 20 | 393 | 63 | 100 | 96 | 4471 | 934 |
| Março | 126 | 30 | 185 | 84 | 100 | 234 | 234 | 10 | 10 | 121 | 5348 | 450 |
| Abril | 222 | 194 | 160 | 295 | 116 | 74 | 235 | 67 | 233 | 1388 | 5120 | 164 |
| Mai | 38 | 104 | 1946 | 61 | 644 | 195 | 12760 | 1430 | 605 | 75 | 1354 | 239 |
| Junho | 55 | 10700 | 12 | 763 | 488 | 269 | 1362 | 249 | 216 | 132 | 8960 | 289 |
| Julho | 58 | 240 | 250 | 68 | 60 | 238 | 7520 | 331 | 70 | 172 | 5912 | 9528 |

Em destaque pode-se observar os valores de coliformes fecais acima do limite considerado satisfatório pelo CONAMA (resoluções 357/2005, 274/2000) que é de 1000 coliformes fecais em cada 100mL de água.

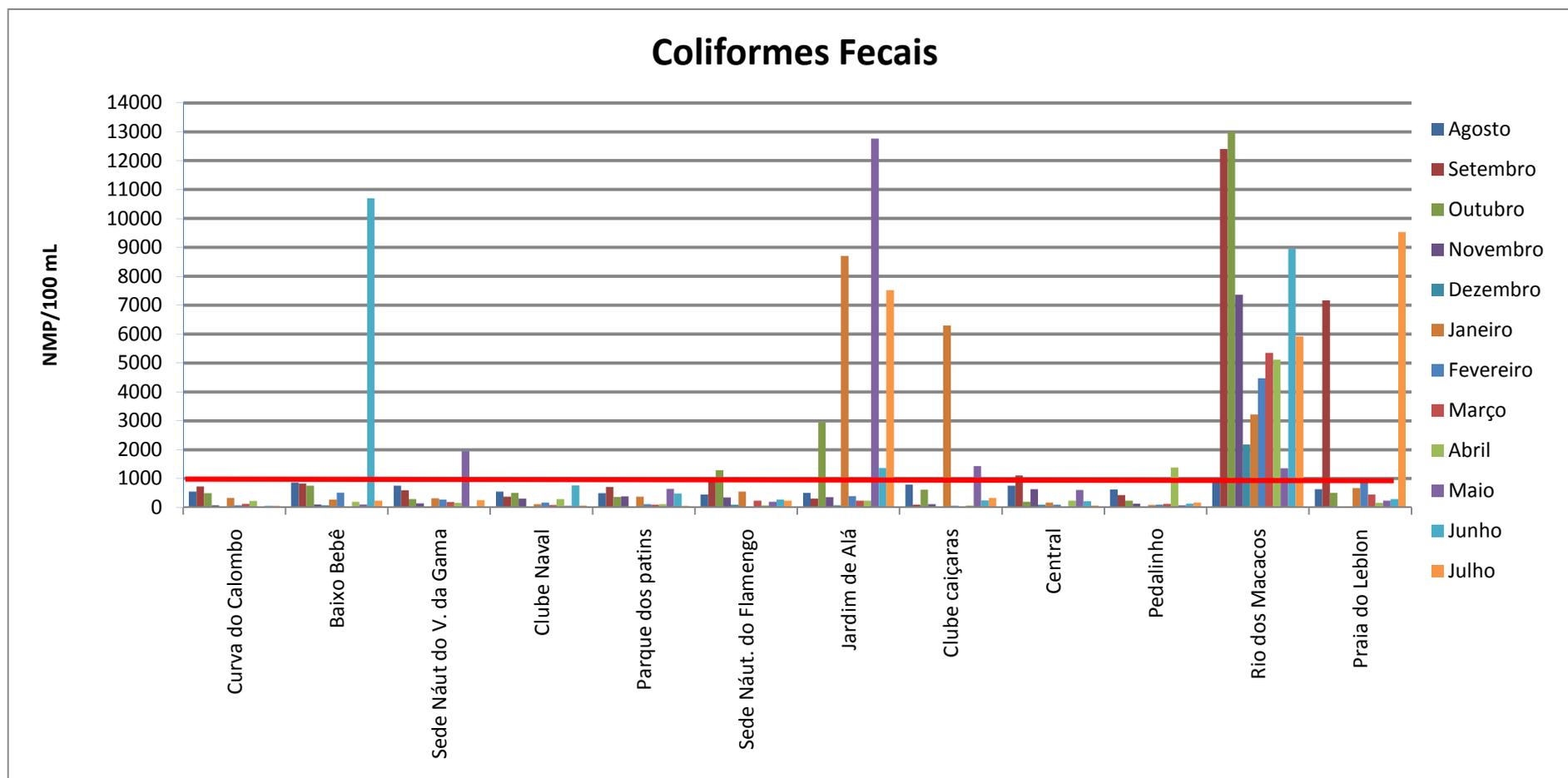


Figura 5.8. Variação de coliformes fecais por ponto de coleta na Lagoa Rodrigo de Freitas, no Rio dos Macacos e na Praia do Leblon, no período de agosto de 2007 a julho de 2008. A linha vermelha determina o valor máximo de coliformes fecais que podem ser detectados dentro dos limites ideais determinados pelo CONAMA.

5.3. PCR em tempo real (TaqMan qRT-PCR)

Todas as 144 amostras de água obtidas neste estudo foram analisadas em duplicata por PCR em tempo real. O RNA do HAV foi detectado em 31 (21,53%) das 144 amostras.

Todos os pontos de coleta tiveram o HAV detectado/quantificado por qRT-PCR em pelo menos uma das coletas realizadas, e a frequência de detecção do HAV variou de uma a quatro amostras positivas por ponto de coleta. A média do número de cópias variou de 13 até 243 cópias/mL. Em caso de divergência de resultados entre as duplicatas, a amostra era retestada para confirmação do resultado. Do total de 144 amostras, 32 foram submetidas à repetição e, dessas, quatro amostras foram realmente positivas.

Foi realizado um controle positivo da reação para as três matrizes aquáticas analisadas neste estudo: água da Lagoa, água do Mar (desembocadura da Lagoa na Praia do leblon) e água de Rio (desembocadura da Lagoa no Rio dos Macacos). Os resultados obtidos deste experimento podem ser observados na tabela 5.3.

Tabela 5.3 Controle positivo do vírus da hepatite A em diferentes matrizes aquáticas (Lagoa, Rio e Mar), utilizando os métodos de concentração viral com membrana carregada negativamente e PCR em tempo real (TaqMan qRT-PCR).

| Matriz aquática | Número de Cópias | Número de Cópias | Taxa de recuperação |
|-----------------|--------------------|--------------------|---------------------|
| | Inoculadas | recuperadas | |
| Água de Lagoa | $2,36 \times 10^5$ | $1,81 \times 10^3$ | 2% |
| Água de Rio | $2,36 \times 10^5$ | $4,91 \times 10^2$ | 1,4% |
| Água de Mar | $1,3 \times 10^4$ | $1,76 \times 10^2$ | 27% |

A sensibilidade do método de qRT-PCR utilizado neste estudo foi determinada utilizando-se diluições seriadas de transcritos de HAV-RNA sintético contendo de $1,3 \times 10^1$; $1,3 \times 10^2$; $1,3 \times 10^3$; $1,3 \times 10^4$; $1,3 \times 10^5$; $1,3 \times 10^6$; $1,3 \times 10^7$ cópias/mL. O limite de detecção desta técnica foi de 13 cópias/mL ($1,3 \times 10^1$) (figura 5.10).

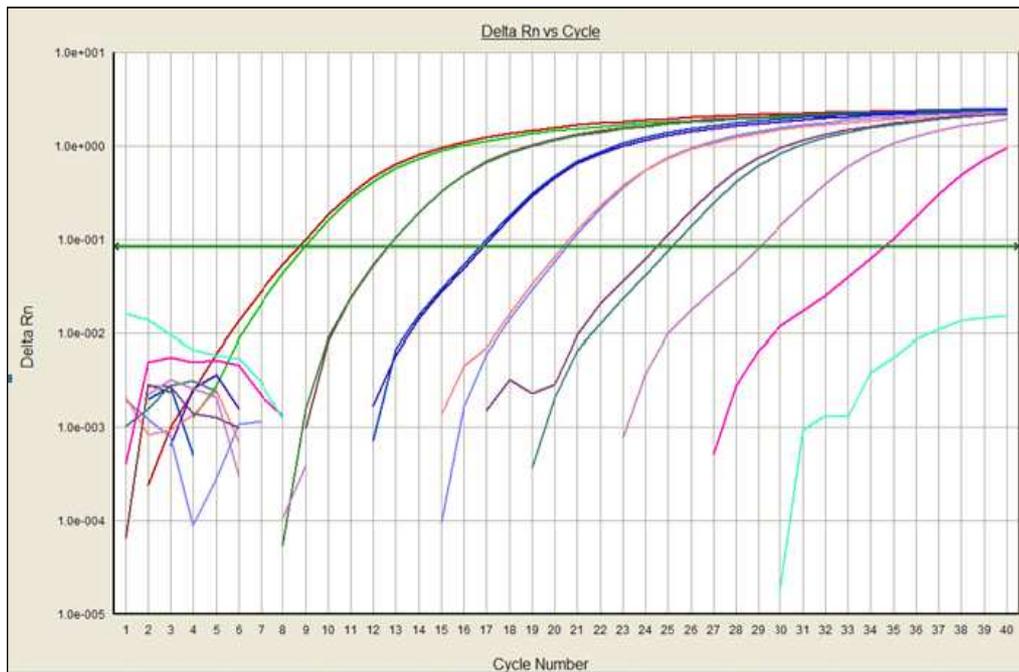


Figura 5.9. Análise da sensibilidade do PCR em tempo real, utilizando-se transcritos de HAV- RNA sintético (10^1 - 10^7). Curva de amplificação das diluições seriadas dos transcritos de HAV.

A linearidade da curva padrão foi verificada entre as diluições $1,3 \times 10^1$ a $1,3 \times 10^7$ cópias/mL, apresentando coeficiente de regressão linear (R^2) de 0,997 e inclinação de -3,96 (figura 5.11). A cada reação foi utilizada uma nova curva com padrões aliquotados e estocados a -70°C para aferição do teste, apresentando variações de R^2 de 0,994 a 0,999 e de inclinação de -3,96 a -4,0.

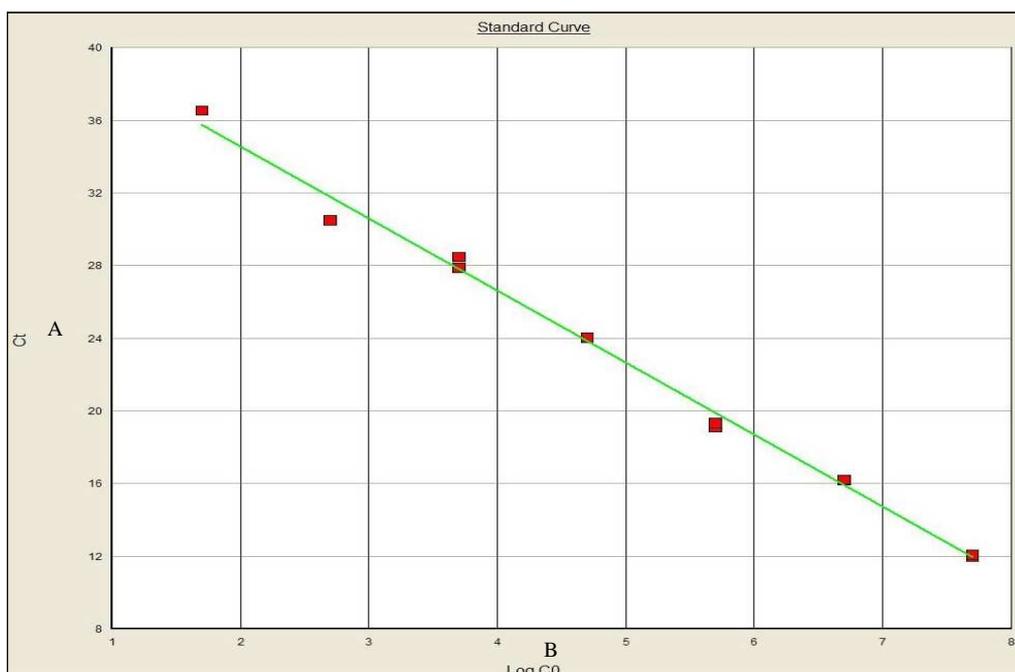


Figura 5.10. Linearidade da curva padrão das diluições seriadas do HAV. Coeficiente de regressão linear (R^2) de 0,997 e inclinação de -3,96. A, número de cópias em escala logarítmica; B, Cycle Threshold.

5.4. Relação entre parâmetros físico-químicos e detecção do HAV por PCR em tempo real (TaqMan qRT-PCR)

Na análise bivariada, foi observada relação estatisticamente significativa apenas entre os parâmetros físico-químicos condutividade ($r_s = 0,189$; IC95% $r_s = 0,027 - 0,342$; $p = 0,0235$) e salinidade ($r_s = 0,187$; IC95% $r_s = 0,024 - 0,340$; $p = 0,0254$) e a detecção quantitativa de HAV nas 144 amostras de água analisadas, porém com correlação positiva fraca (tabela 5.4).

Tabela 5.4. Análise bivariada (Spearman) entre os parâmetros físico-químicos e a detecção quantitativa de HAV (TaqMan qRT-PCR) nas amostras de água ($n = 144$)

| Parâmetro físico-químico | Coefficiente de correlação por postos (r_s) | IC95% (r_s) | Valor de p^* |
|--------------------------|---|-----------------|----------------|
| pH | 0,058 | -0,107 - 0,219 | 0,4880 |
| Condutividade | 0,189 | 0,027 to 0,342 | 0,0235 |
| Oxigênio dissolvido | -0,033 | -0,196 to 0,131 | 0,6902 |
| Salinidade | 0,187 | 0,024 to 0,340 | 0,0254 |
| Temperatura | 0,102 | -0,063 to 0,261 | 0,2239 |
| Cloro livre | -0,094 | -0,254 to 0,071 | 0,2615 |
| Turbidez | -0,015 | -0,178 to 0,149 | 0,8586 |

*Valor de $p < 0,05$ foi considerado significante. IC95%, intervalo de 95% de confiança

Considerando-se apenas as 31 amostras de água com valores de HAV determinados, foi observada relação estatisticamente significativa ($p = 0,0326$) entre o parâmetro físico-químico turbidez e a detecção quantitativa de HAV nas amostras analisadas, porém com correlação positiva fraca ($r_s = 0,390$; IC95% $r_s = 0,042 - 0,654$) (tabela 5.5).

Tabela 5.5. Análise bivariada (Spearman) entre os parâmetros físico-químicos e a detecção quantitativa de HAV (TaqMan qRT-PCR) nas amostras de água ($n = 31$)

| Parâmetro físico-químico | Coefficiente de correlação por postos (r_s) | IC95% (r_s) | Valor de p^* |
|--------------------------|---|-----------------|----------------|
| pH | 0,210 | 0,156 - 0,525 | 0,2496 |
| Condutividade | 0,015 | -0,341 - 0,367 | 0,9355 |
| Oxigênio dissolvido | -0,155 | -0,483 - 0,211 | 0,3969 |
| Salinidade | 0,003 | -0,352 - 0,357 | 0,9867 |
| Temperatura | 0,231 | -0,063 - 0,261 | 0,2066 |
| Cloro livre | -0,178 | -0,501 - 0,188 | 0,3298 |
| Turbidez | 0,390 | 0,042 - 0,654 | 0,0326 |

*Valor de $p < 0,05$ foi considerado significativo. IC95%, intervalo de 95% de confiança

5.5. Relação entre níveis de coliformes fecais e detecção do HAV por PCR em tempo real (TaqMan qRT-PCR)

Na análise bivariada, não foi observada correlação estatisticamente significativa entre os valores de coliformes fecais e a detecção quantitativa de HAV nas 144 amostras de água analisadas ($r_s = 0,114$; IC95% $r_s = -0,050 - 0,273$; $p = 0,1713$).

Considerando-se apenas as 25 amostras de água com níveis altos de coliformes fecais (acima de 1.000 NMP/100 mL), foi observada correlação estatisticamente significativa entre essa variável e a detecção quantitativa de HAV ($r = 0,7253$; IC95% $r = 0,4628 - 0,8709$; $p < 0,0001$).

5.6. Detecção qualitativa do HAV-RNA por RT- *Nested* PCR

De todas as 144 amostras de água analisadas, apenas cinco (3,47%) tiveram o HAV-RNA detectado, quando foram submetidas à amplificação por RT- *Nested* PCR, (quadro 5.2).

Quadro 5.2 - Pontos de coleta e os meses de coleta em que foram detectados o HAV-RNA por -RT *Nested* -PCR.

| Ponto de Coleta | Mês de Coleta |
|-----------------------|--|
| Baixo Bebê (P2) | Novembro (coleta 4) |
| Rio dos Macacos (P11) | Novembro (coleta 4) |
| Praia do Leblon (P12) | Janeiro (coleta 6), Março (coleta 8) Abril (coleta 9) |

5.7. Detecção de HAV-RNA: RT- *Nested* PCR x TaqMan qRT-PCR

Com a utilização do teste de PCR em tempo real foi possível detectar um número maior de amostras positivas (21,53%) em nosso estudo quando comparado a técnica RT *Nested* -PCR (3,47%) (tabela 5.6).

O método RT- *Nested* PCR quando comparado ao método qRT-PCR, com intervalo de confiança de 95%, apresentou sensibilidade de 3% (0,0008-0,16), especificidade de 96% (0,91- 0,99), valor preditivo positivo de 20% (0,005- 0,71) e valor preditivo negativo de 78% (0,70- 0,84).

Tabela 5. 6. Comparação dos resultados de detecção do HAV-RNA por -RT *Nested* -PCR vs PCR em tempo real (qRT-PCR) em amostras de água, coletadas no período de agosto de 2007 a julho de 2008.

| | qRT-PCR (+) | qRT-PCR (-) | Total |
|-------------------|-----------------|------------------|-------------------|
| <i>Nested</i> (+) | 1 (1%) | 4 (3%) | 5 (3%) |
| <i>Nested</i> (-) | 30 (21%) | 109 (76%) | 139 (97%) |
| Total | 31 (22%) | 113 (78%) | 144 (100%) |

5.8. Caracterização molecular do Vírus da hepatite A (HAV)

As seqüências nucleotídicas dos produtos de PCR de 218 pares de bases da região VP1/2A do genoma do HAV foram determinadas em cinco amostras obtidas no ponto do Baixo Bebê (coleta 4), Rio dos Macacos (coleta 4) e na Praia do Leblon (coletas 6, 8, e 9) para confirmação e caracterização do genótipo circulante no ambiente lagunar e marinho. Essas amostras foram selecionadas de acordo com a quantidade de DNA obtida após a

quantificação do produto da RT- *Nested* PCR. Somente as amostras que apresentavam no mínimo de 30 ng/ μ L de DNA foram selecionadas para seqüenciamento parcial, juntamente com os controles positivos utilizados em cada reação.

Para confirmação de que todas as seqüências dos isolados desse estudo eram do HAV, utilizamos o programa BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast) para a verificação da identidade dessas seqüências com seqüências do HAV disponíveis no GenBank. Todas as seqüências dos isolados do nosso estudo eram do vírus da hepatite A (HAV).

O cromatograma das seqüências obtidas foi analisado e as seqüências foram editadas usando o programa BioEdit Sequence Alignment Editor (version 6.0) (HALL, 1999). As seqüências de nucleotídeos e aminoácidos obtidas foram alinhadas utilizando-se o programa CLUSTAL W (THOMPSON *et al.*, 1997). A relação filogenética entre as cepas foi construída através do método de *Neighbor-joining*, usando os modelos dois parâmetros de Kimura (substituição de nucleotídeos) e de Poisson (substituição de aminoácidos) dentro do pacote de programas Mega 4 (TAMURA *et al.*, 2007). A significância estatística da filogenia inferida foi estimada com análise de *Bootstrap* de 2000 réplicas. A busca por cepas protótipos de HAV utilizadas nesse estudo foi feita utilizando o Centro Nacional de Informação e Biotecnologia (NCBI), BLAST (Ferramenta básica de busca e alinhamento) (ALTSCHUL *et al.*, 1997).

Foi calculado o percentual de identidade entre as seqüências nucleotídicas, entre as seqüências de aminoácidos e de todas em relação à cepa brasileira padrão HAF-203 isolada de cultura celular que está na 7^a passagem e que foi utilizada como controle nesse estudo. O percentual de identidade entre as seqüências nucleotídicas das amostras desse estudo variou de 92,7% a 100% (tabela 5.7).

Tabela 5.7. Identidade nucleotídica entre as cinco amostras do presente estudo comparadas a cepa padrão HAF-203.

| | P2C4 | P11C4 | P12C6 | P12C8 | P12C9 |
|---------|-------|-------|-------|-------|-------|
| P2C4 | ID | 93,9 | 97,5% | 100% | 99,3% |
| P11C4 | 93,9% | ID | 92,7% | 93,9% | 93,3% |
| P12C6 | 97,5% | 92,7% | ID | 97,5% | 96,9% |
| P12C8 | 100% | 93,9% | 97,5% | ID | 99,3% |
| P12C9 | 99,3% | 93,3% | 96,9% | 99,3% | ID |
| HAF-203 | 100% | 93,9% | 97,5% | 100% | 99,3% |

ID= igual

Entre as seqüências aminoacídicas o percentual variou de 96,3% a 100% (tabela 5.8).

Tabela 5.8. Identidade aminoacídica entre as cinco amostras do presente estudo e comparadas a cepa padrão HAF-203.

| | P2C4 | P11C4 | P12C6 | P12C8 | P12C9 |
|---------|-------|-------|-------|-------|-------|
| P2C4 | ID | 100% | 98,1% | 100% | 98,1% |
| P11C4 | 100% | ID | 98,1% | 100% | 98,1% |
| P12C6 | 98,1% | 98,1% | ID | 98,1% | 96,3% |
| P12C8 | 100% | 100% | 98,1% | ID | 98,1% |
| P12C9 | 98,1% | 98,1% | 96,3% | 98,1% | ID |
| HAF-203 | 100% | 100% | 98,1% | 100% | 98,1% |

ID= igual

Quando comparamos os isolados de HAV com a cepa padrão HAF-203, verificamos uma variação percentual de 93,9% a 100% nas seqüências nucleotídicas e de 98,1% a 100% nas seqüências de aminoácidos.

Um dendograma foi construído comparando 218 nucleotídeos (3024-3191) da região VP1/2A do HAV das amostras de água (Lagoa Rodrigo de Freitas, Rio dos Macacos e Praia do Leblon) com as seqüências nucleotídicas do HAV correspondentes ao genótipo IB: (HAF-203) (GASPAR *et al.*, 1992); genótipo IA: (HAS-15) (SVERDLOV *et al.*, 1987); MBB , Epi-006 e Arg 4.9; genótipo IIB: (SLF88); genótipo IIIA: (Nor-21, H-132, GA76 e PA-21), genótipo IIIB: (KPH). Os isolados de HAV seqüenciados nesse estudo foram classificados como do genótipo IB: P2C4, P12C8 e P12C9 com *bootstrap* de 74 % , P11C4 79% e P12C6 92% (figura 5.12).

A análise da relação filogenética dos isolados de HAV das amostras de água obtidas nesse trabalho foi realizada comparando-os com outros 15 isolados de HAV previamente seqüenciados no Rio de Janeiro (de PAULA *et al.*, 2002; VILLAR *et al.*, 2004; MORAIS *et al.*, 2006) representados por:

HAP-300(AF538727), staff-006(DQ061178), HAP-231(DQ198360), RJ-NSG2(AF410383), RJ-005(AF410381), CHILD-E29(DQ061187), STAFF-092(DQ061164), CHILD-C17 DQ061168), RJ-213(AF410387), RH-193(AF410388), RJ-104(AY323022),RJ-178(AY323023),RJ-12(AY323034), MA-377(AY323038), MA-374 (AY323040).

As seqüências de HAV obtidas nesse estudo serão, posteriormente, submetidas ao GenBank. As seqüências de HAV referentes às amostras de água da Lagoa Rodrigo de Freitas, Rio dos Macacos e Praia do Leblon estão representadas pelas siglas: P2C4 (Lagoa); P11C4 (Rio) e P12C6, P12C8, P12C9 (Praia).

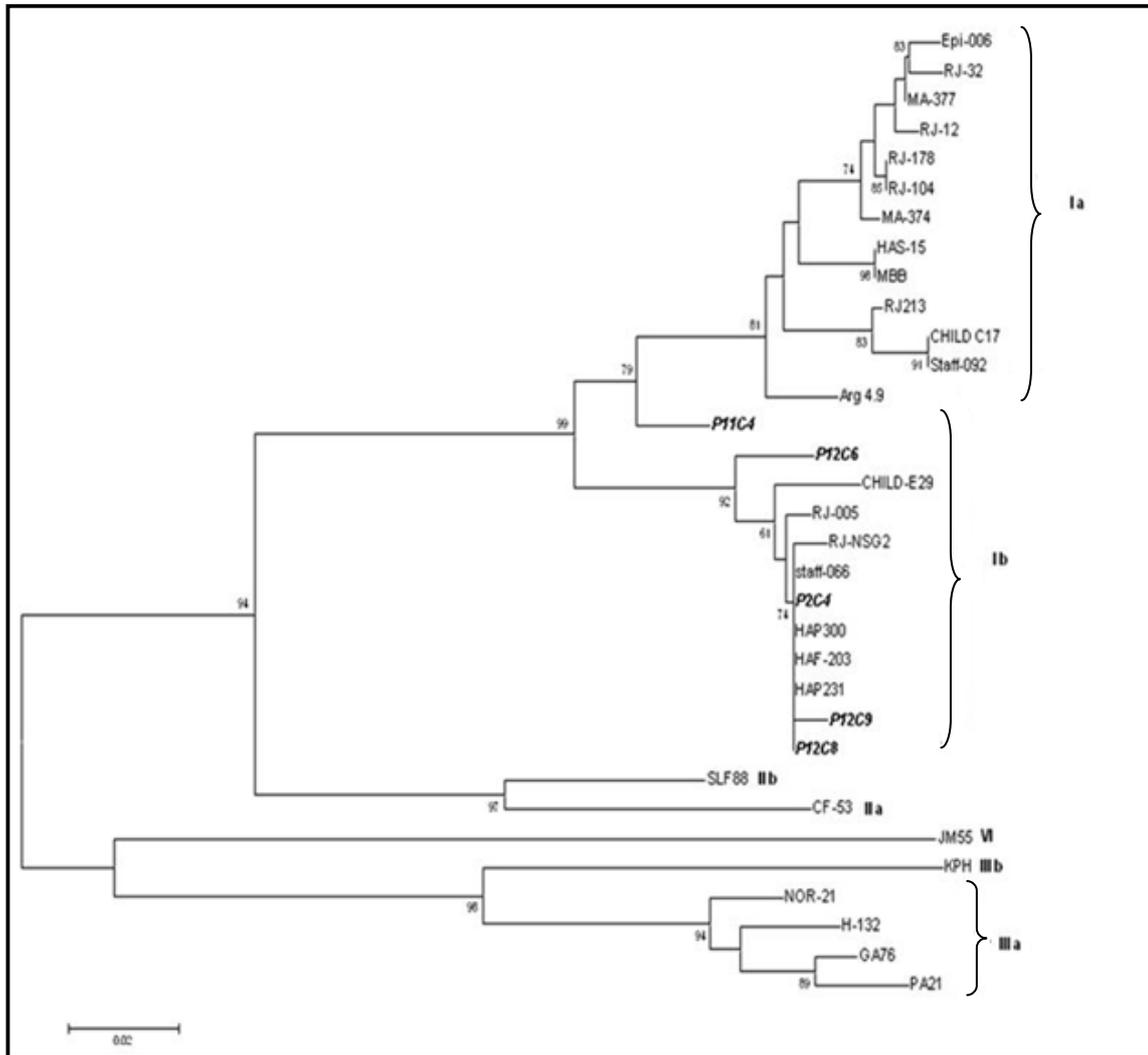


Figura 5.11. Dendograma construído pela análise filogenética de 218 nucleotídeos da região VP1/2A do genoma do vírus da hepatite A. Comparação com outras 15 amostras previamente seqüenciadas no Rio de Janeiro. As amostras deste estudo estão representadas por: P2C4 (Lagoa), P11C4 (Rio) e P12C6, P12C8 e P12C9 (Praia).

6. DISCUSSÃO

Indicadores bacterianos de contaminação fecal são freqüentemente associados ao risco de doenças adquiridas por ingestão de água contaminada. No entanto, as doenças de veiculação hídrica estão mais freqüentemente associadas à contaminação por vírus do que por bactérias (CABELI *et al.*, 1982; BOSCH *et al.*, 2008)). Sendo assim, o desenvolvimento de metodologia para a detecção e quantificação de vírus nas diferentes matrizes aquáticas constitui tópico de grande importância para a saúde pública.

Dentre os vírus entéricos freqüentemente encontrados em matrizes aquáticas (rotavírus A, astrovírus, norovírus, adenovírus entéricos) destaca-se o vírus da hepatite A, que apresenta propriedades físico-químicas que lhe garantem maior estabilidade e ampla disseminação no meio ambiente (PARRY & MORTIMER., 1984; SCHOLZ *et al.*, 1989). Surtos de hepatite A associados à contaminação de reservatórios hídricos foram descritos em muitos países (PINTÓ *et al.*, 2007). No entanto, a importância do vírus da hepatite A é ainda negligenciada devido principalmente à dificuldade em se recuperar vírus no ambiente aquático. No Brasil, a maioria dos trabalhos relacionados ao monitoramento da qualidade da água limita-se à determinação dos níveis de contaminação bacteriana (ALVES *et al.*, 2002; MARQUES, 2003; NOGUEIRA *et al.*, 2003), sendo recente a pesquisa de vírus entéricos humanos em ecossistemas aquáticos (MEHNERT & STEWIEN, 1993; MEHNERT *et al.*, 1997; QUEIROZ *et al.*, 2001; VILLAR *et al.*, 2006; 2007; de PAULA *et al.*, 2007; DINIZ-MENDES *et al.*, 2008; MIAGOSTOVICH *et al.*, 2008).

A freqüente associação do HAV a surtos de veiculação hídrica tem motivado diversos grupos a investigar e demonstrar a presença desse vírus no ambiente (SOBSEY *et al.*, 1988; BROOKS *et al.*, 2005; KITTIGUL *et al.*, 2005; DUBOIS *et al.*, 2006; GERSBERG *et al.*, 2006; ROSE *et al.*, 2006;).

O principal desafio no estabelecimento da metodologia para análise virológica da água é obter uma boa taxa de recuperação do vírus, encontrado geralmente, em baixa concentração no ambiente aquático, a partir de grandes volumes de água. Portanto, um bom método de concentração deve preencher certos requisitos: simplicidade, rapidez, baixo custo, alto rendimento na recuperação do vírus e versatilidade (aplicabilidade à diferentes vírus entéricos). Espera-se, ainda, que o método possa gerar, a partir de grandes volumes da amostra original, um volume reduzido do concentrado. Na falta de uma metodologia que atenda a todos esses requisitos, a escolha deverá se basear na experiência e na necessidade específica do usuário (BOSCH *et al.*, 2008). A limitação da metodologia nesta área vem

gerando uma demanda crescente de estudos visando o desenvolvimento de métodos rápidos e sensíveis para detecção de vírus em amostras ambientais.

6.1. Concentração viral em amostras ambientais

No presente estudo, utilizou-se o método de adsorção-eluição em membranas carregadas negativamente seguido de ultrafiltração descrito por Katayama e colaboradores (2002). Esse método de concentração foi utilizado em combinação com os métodos de RT-*Nested* PCR e PCR em tempo real (qRT-PCR) para a detecção e quantificação do HAV. O controle positivo foi realizado mediante inoculação experimental de $2,36 \times 10^5$ cópias genômicas de HAV em amostras de 2 L de água da Lagoa e do Rio e de $1,3 \times 10^4$ cópias genômicas de HAV em amostras de 2 L de água do mar. As amostras foram, então, submetidas aos métodos de concentração, extração de ácidos nucléicos e transcrição reversa e os cDNA obtidos submetidos ao TaqMan qRT-PCR. Esta metodologia apresentou baixas taxas de recuperação quando aplicadas às amostras de água da Lagoa (2%) e da desembocadura da Lagoa no Rio dos Macacos (1,4%). No entanto, uma taxa de recuperação de 27% foi verificada para as amostras obtidas na desembocadura da Lagoa na Praia do Leblon. Deve-se ressaltar que o método utilizado descrito por Katayama e colaboradores (2002) foi, originalmente, desenvolvido para a recuperação de vírus de água marinha. A partir da inoculação artificial em água do mar, os autores obtiveram uma taxa de recuperação viral variando de 50 a 70% para poliovírus.

Esses resultados são compatíveis com os do estudo de Rose e colaboradores (2006) que, utilizando o mesmo método, obtiveram taxa de recuperação de 71% para poliovírus e apenas 12% para o HAV em água marinha. Fuhrman e colaboradores (2005), utilizando o mesmo método para enterovírus, obtiveram taxa de recuperação de 51% em água doce e 23% em água do mar. Villar e colaboradores (2006), em um estudo comparativo entre dois métodos de concentração, observou uma melhor taxa de recuperação nas amostras de rio com o método de Katayama, não tendo sido boa a recuperação quando aplicadas a águas de mar. Victoria e colaboradores (2009) realizaram um estudo para determinar as melhores taxas de recuperação de astrovírus e norovírus utilizando diferentes matrizes de água. Na suposição de que a concentração de cloreto de magnésio ($MgCl_2$) pudesse interferir na adsorção do vírus a membrana, os autores testaram três diferentes concentrações. Para ambos os vírus, a melhor recuperação foi com água mineral e de rio que foi entre 18% e 64%; já para água de torneira e do mar, a taxa de recuperação ficou entre 3% e 14%. Em

nosso estudo, apesar da baixa taxa de recuperação obtida para as amostras de água salobra (Lagoa Rodrigo de Freitas) e água doce (Rio dos Macacos), a metodologia utilizada permitiu detectar amostras positivas nesses pontos, o que sugere a presença do HAV em concentrações provavelmente bem mais altas nesses pontos. Com relação às amostras de água do mar, os resultados obtidos corroboram os dados disponíveis na literatura. (ROSE *et al.*, 2006; VILLAR *et al.*, 2006).

Esta é a primeira descrição da utilização deste método para detecção de HAV em águas salobras. Estudos visando avaliar e minimizar a influência de potenciais inibidores das reações de PCR/qRT-PCR, presentes nas diferentes matrizes aquáticas, devem ser estimulados.

6.2. Determinação de Parâmetros Físico-Químicos e Quantificação dos Coliformes Fecais

A determinação dos parâmetros físico-químicos (temperatura, condutividade, oxigênio dissolvido, salinidade, turbidez, pH e cloro livre) foi realizada no momento da coleta. E os resultados obtidos foram posteriormente analisados em relação à detecção do HAV por qRT-PCR. Entre as 144 amostras desse estudo foi observada na análise bivariada (Spearman) uma correlação positiva fraca entre os parâmetros condutividade e salinidade e a detecção do HAV, respectivamente ($r_s = 0,189$; IC95% $r_s = 0,027 - 0,342$; $p = 0,0235$) e ($r_s = 0,187$; IC95% $r_s = 0,024 - 0,340$; $p = 0,0254$). Considerando-se apenas as 31 amostras de água com valores de HAV determinados, foi observada relação estatisticamente significativa ($p = 0,0326$) entre o parâmetro físico-químico turbidez e a detecção quantitativa de HAV nas amostras analisadas, porém com correlação positiva fraca ($r_s = 0,390$; IC95% $r_s = 0,042 - 0,654$).

A quantificação de coliformes totais e fecais em amostras de água faz parte da maioria dos órgãos regulatórios do mundo inteiro, inclusive do Brasil. Apenas a quantificação desses parâmetros é feita e considerada satisfatória para acessar a qualidade microbiológica da água, entretanto, indicadores bacterianos nem sempre refletem o risco potencial de transmissão de muitos patógenos, dentre eles os protozoários e os vírus. (GELDENHUYS & PRETORIUS, 1989; JIANG *et al.*, 2001; NOBLE & FUHRMAN, 2001).

Vírus entéricos já foram detectados em vários ambientes aquáticos, que apresentavam indicadores bacterianos dentro dos limites aceitáveis pelos órgãos

regulatórios, tendo sido os mesmos causadores de surtos pela ingestão de água ou de alimentos que estavam infectados por esses vírus (CRAUN, 1991; McANULTY *et al.*, 1993). Um das desvantagens no uso de coliformes fecais e enterococos como indicadores de qualidade da água é que eles podem ser encontrados tanto em fezes humanas como em fezes de animais (SPRINGTHORPE *et al.*, 1993). Uma vez que os produtos utilizados no tratamento da água não conseguem remover os vírus entéricos, eles permanecem na água como contaminantes, podendo estar presentes em número suficiente para ser considerado um problema de saúde pública (BOSCH *et al.*, 2008).

Diversos estudos já foram publicados realizando uma comparação entre os níveis de coliformes e a presença de vírus. Jiang e colaboradores (2001) observaram que a presença de adenovírus humano não estava relacionada com os indicadores bacterianos, incluindo os coliformes fecais, em 12 praias localizadas no sul da Califórnia, sugerindo que os coliformes não são um bom indicador de qualidade da água. Brooks e colaboradores (2005) analisaram água de mar e não observaram relação entre os níveis de coliformes fecais e a concentração do vírus da hepatite A. Rose e colaboradores (2006) também não observaram relação entre os níveis de coliformes fecais e os níveis de enterovírus quando analisadas amostras de água de mar.

No presente estudo, também relacionamos a quantificação de coliformes fecais das 144 amostras de água coletadas com a detecção quantitativa do HAV. Na análise bivariada, não foi observada correlação estatisticamente significativa entre os valores de coliformes fecais e a detecção quantitativa de HAV nas 144 amostras de água analisadas ($r_s = 0,114$; IC95% $r_s = -0,050 - 0,273$; $p = 0,1713$). Contudo, considerando-se apenas as 25 amostras de água com níveis altos de coliformes fecais (acima de 1.000 NMP/100 mL), foi observada correlação estatisticamente significativa entre essa variável e a detecção quantitativa de HAV ($r = 0,7253$; IC95% $r = 0,4628 - 0,8709$; $p < 0,0001$).

6.3. Detecção de HAV-RNA por PCR em tempo real (qRT-PCR) e RT-Nested PCR em águas da Lagoa Rodrigo de Freitas.

No presente estudo, utilizamos o conjunto de reagentes *Qiagen Viral RNA Kit* (Qiagen, Valencia, Espanha) para extração de ácidos nucleicos. A opção por esse método comercial que garante alto rendimento (superior a 90%) na recuperação de RNA viral, mesmo em baixos títulos, foi pautada em resultados obtidos em estudos relacionados que preconizaram a utilização deste protocolo enfatizando a dificuldade de recuperar vírus a

partir de grandes volumes de água . (KITTIGUL *et al.*, 2005; VILLAR *et al.*, 2006; DUBOIS *et al.*, 2007; de PAULA *et al.*, 2007; VILLAR *et al.*, 2007; LEE *et al.*, 2008; MIAGOSTOVICH *et al.*, 2008)

A fim de minimizar os custos da técnica de extração de ácidos nucléicos, um método similar, fundamentado também no princípio da ligação específica do RNA à sílica, foi avaliado (dados não demonstrados). Esse método, descrito por Boom e colaboradores (1990), foi utilizado em outros estudos e, embora apresente maior complexidade técnica, revelou resultados satisfatórios quando aplicado à extração de RNA a partir de amostras de água.

O desempenho do método de Boom na extração de ácidos nucléicos para detecção do HAV foi, então, avaliado utilizando-se parte (25%) das amostras deste estudo que foram submetidas, simultaneamente, às duas técnicas de extração de RNA. Ao compararmos os resultados obtidos, observamos que as amostras extraídas com o conjunto de reagentes comercial apresentaram um maior número de amostras positivas ($n=4$) em relação ao método de Boom que apresentou apenas uma amostra positiva.

Os métodos tradicionalmente utilizados para quantificação de outros vírus entéricos baseiam-se no isolamento de vírus em cultura celular. Entretanto, os sistemas de cultura celular para o isolamento de vírus em águas e sedimentos apresentam inconvenientes, principalmente quando o agente estudado é o HAV, como crescimento lento em cultura menor sensibilidade e alto custo. Além disso, os sistemas de cultivo celular são laboriosos e nem sempre eficientes para todos os vírus entéricos. A detecção da replicação do HAV nessas condições é ainda dificultada devido à ausência de efeito citopático (PROVOST *et al.*, 1979). Estudos recentes sobre a utilização da PCR em tempo real como procedimento de quantificação viral de alta sensibilidade forneceram informações novas e apropriadas para o diagnóstico e investigação da hepatite A (BROOKS *et al.*, 2005; ROSE *et al.*, 2006; VILLAR *et al.*, 2006; de PAULA *et al.*, 2007; DUBOIS *et al.*, 2007).

A técnica de PCR em tempo real possibilita a quantificação dos produtos amplificados, tendo como principal vantagem a rapidez na análise de amostras em situações de surtos epidêmicos. A região 5'NC foi utilizada nesse estudo por ser considerada uma região conservada do genoma viral, permitindo, portanto, a amplificação e quantificação de amostras de todos os diferentes genótipos.

A técnica de PCR em tempo real utilizada nesse estudo baseou-se na linearidade da curva padrão, que foi preparada utilizando-se controles positivos com número conhecido de cópias de HAV-RNA. A curva padrão obtida apresentou boa linearidade entre as diluições

de $1,3 \times 10^7$ até $1,3 \times 10^1$ com coeficiente de regressão linear de 0,997 e inclinação de -3,96 (YANG *et al.*, 2002). Nesse estudo, a sensibilidade de 13 cópias/mL foi maior quando comparada a estudos anteriores utilizando outros espécimes biológicos. Costa-Mattioli e colaboradores (2002c) demonstraram um limite de detecção de 360 cópias/mL de HAV para amostras de soro. Por outro lado, os resultados obtidos para a detecção do HAV em amostras de água corroboraram os resultados de Amado e colaboradores (2008) que obtiveram sensibilidade de 14 cópias/mL de HAV em amostras de soro, embora em amostras de saliva tenha sido de 140 cópias/mL de HAV.

Quando comparado a outros estudos utilizando amostras de água, a sensibilidade do método neste estudo foi superior aos resultados obtidos em estudos anteriores, como os de Villar e colaboradores (2006) e De Paula e colaboradores (2007) que obtiveram, limites de detecção de 60 cópias/mL. Arankalle e colaboradores (2006) obtiveram limites de detecção de 100 cópias/mL em amostras de esgoto, água e soro.

Das 144 amostras quantificadas nesse estudo, encontramos positividade em 31 (21,53%), com carga viral variando entre 13 e 243 cópias/mL. Outros estudos sobre a utilização do PCR em tempo real para a detecção de HAV em amostras ambientais demonstraram percentuais de positividade variáveis de acordo com tipo de água estudada (BROOKS *et al.*, 2005; ROSE *et al.*, 2006; VILLAR *et al.*, 2006; de PAULA *et al.*, 2007).

Todas as 144 amostras deste estudo foram submetidas ao método de RT-*Nested* PCR, para avaliação da eficiência do método e também para possibilitar a caracterização molecular dos isolados. Ao compararmos as duas técnicas de detecção do HAV-RNA utilizadas nesse estudo, verificamos maior frequência de detecção do vírus através da PCR em tempo real (21,53% vs 3,47%), sendo que das 31 amostras positivas por esse método, 96,8% eram negativas pelo método convencional (RT *nested*-PCR). A baixa sensibilidade desse método poderia ser atribuída à presença de inibidores nas amostras estudadas. A fim de minimizar a influência de tais inibidores, as amostras de água da Lagoa Rodrigo de Freitas, Rio dos Macacos e Praia do Leblon haviam sido previamente diluídas a 1:10, porém os resultados não se alteraram.

A discrepância de resultados entre os dois métodos foi observada também por outros autores (de PAULA *et al.*, 2007; VILLAR *et al.*, 2006), que a atribuíram ao fato de ser a técnica de PCR convencional provavelmente, mais sensível que a PCR em tempo real aos inibidores. Villar e colaboradores (2006) analisaram amostras de água e obtiveram 32% de positividade usando a técnica RT- *nested* PCR e 92% quando utilizaram a PCR em tempo real. De Paula e colaboradores (2007) estudaram amostras de água e encontraram 27% de

positividade quando foi usada a para o RT-*Nested* PCR e 92% quando utilizaram a PCR em tempo real.

Outro fator que poderia explicar essa discrepância de resultados seria relacionado às regiões genômicas alvos dos iniciadores específicos para as metodologias estudadas: região VP1/2A (RT-*Nested* PCR) e 5'NC (TaqMan qRT-PCR). Entretanto, estudos anteriores descreveram a qRT-PCR como um método seguramente mais sensível (VILLAR *et al.*, 2006; de PAULA *et al.*, 2007).

Os resultados do presente estudo demonstraram que a PCR em tempo real é um método sensível, reprodutível, rápido e apropriado para o monitoramento da carga viral do HAV em amostras de água, quando comparado a RT-*nested* PCR. Este último possui desvantagens como a necessidade de se realizar duas etapas de amplificação e gel de agarose para revelação das bandas contendo os produtos de PCR, o que aumenta sua complexidade e seu custo para sua implementação em programas de rotina de diagnóstico e esclarecimento de surtos epidemiológicos (ABD EL GALIL *et al.*, 2005).

6.4. Seqüenciamento e genotipagem das amostras

A análise das seqüências nucleotídicas é considerada um dado importante para auxiliar nos estudos de epidemiologia molecular da infecção pelo HAV. As seqüências analisadas podem nos fornecer dados de relacionamento entre diferentes cepas, podendo até sugerir possíveis fontes de contaminação em surtos epidêmicos (ROBERTSON *et al.*, 1992; NORMANN *et al.*, 1995; ROBERTSON *et al.*, 2000). Essa análise fornece uma classificação precisa do HAV em genótipos e subgenótipos que, correlacionados com dados epidemiológicos e geográficos, podem ser úteis na determinação das cepas predominantes durante um surto.

Dados de seqüências nucleotídicas do HAV demonstram que os seus genótipos possuem distribuição geográfica única, sendo o genótipo I o mais prevalente em todo o mundo, e o subgenótipo IA mais comum que o IB (NAINAN *et al.*, 2006). Os genótipos IA e IB são frequentemente identificados na América do Norte, América do Sul, Europa, China e Japão (ROBERTSON *et al.*, 1992). No Brasil, o único genótipo que foi encontrado foi o I, principalmente o subgenótipo IA, embora o subgenótipo IB já tenha sido observado nos Estados do Rio de Janeiro e Pernambuco e também na região Amazônica (de PAULA *et al.*, 2002; VILLAR *et al.*, 2004; 2006; de PAULA *et al.*, 2007). A cocirculação de múltiplos genótipos ou subgenótipos tem sido relatada em algumas regiões do mundo. A cocirculação

de subgenótipos IA e IB foi relatada na África do Sul (TAYLOR et al., 1997) e Brasil (de PAULA et al., 2002; 2004; VILLAR et al., 2004; FIACCADORI et al., 2008), e a cocirculação dos genótipos IA e IIIA já foi descrita na Índia (HUSSAIN et al., 2005). Nos EUA, já foi identificada a cocirculação dos subgenótipos IA e IB, entretanto o subgenótipo IB foi identificado em indivíduos infectados que retornavam de viagens a outros países (NAINAN et al., 2005).

Ao comparar o percentual de identidade nucleotídica das amostras desse estudo, observou-se que o percentual de identidade entre elas variou de 92,7% a 100%. O percentual de identidade superior a 93% demonstra que essas amostras estão corretamente classificadas dentro do mesmo subgenótipo, segundo Robertson e colaboradores (1992). Quanto à similaridade de seqüências de aminoácidos entre as amostras desse estudo, o percentual variou de 96,3% a 100%.

Comparando as seqüências dos isolados deste estudo com a cepa padrão HAF-203, observamos que a porcentagem de identidade nucleotídica foi de 93,9% a 100%, e a nível aminoacídico foi de 98,1% a 100%. Sendo que a HAF-203 utilizada nesse estudo foi uma de 7^a passagem em cultura celular, apresentando uma mutação que a diferenciava da seqüência da HAF-203 disponível no GenBank.

Na análise do relacionamento filogenético das cepas isoladas previamente no Rio de Janeiro verificamos que três amostras isoladas (P2C4, P12C8, P12C9) em nosso estudo foram agrupadas no mesmo ramo da árvore filogenética, indicando alto percentual de identidade nucleotídica com as cepas RJ-NSG2, staff-066, HAP300, HAP231 e sugerindo uma circulação endêmica de algumas cepas em nosso estado.

Por fim, observou-se no dendograma que 99% das amostras são classificadas como genótipo I e que embora todas as cinco amostras analisadas nesse estudo sejam caracterizadas como subgenótipo IB, apresentam diferenças entre elas, sugerindo a existência de uma variedade de cepas circulantes na Lagoa Rodrigo de Freitas e nas desembocaduras do Rio dos Macacos e da Praia do Leblon. Quando comparado com as outras análises de relacionamento filogenético de cepas isoladas previamente no Rio de Janeiro (VILLAR *et al.*, 2006; MORAIS *et al.*, 2006), pudemos verificar que existe mais de uma linhagem de HAV circulante na Lagoa.

Esses resultados suportam a necessidade da inclusão da análise virológica nas águas ambientais segundo os padrões regulatórios existentes, uma vez os vírus que eles podem ser detectados com indicadores bacterianos dentro dos limites da normalidade.

7. CONCLUSÕES

- ✓ A associação dos métodos de concentração e detecção (RT-PCR e qRT-PCR) possibilitaram evidenciar a presença de HAV em amostras da Lagoa Rodrigo de Freitas, Rio dos Macacos e Praia do Leblon.
- ✓ O método TaqMan RT-PCR apresentou melhor desempenho que o RT- Nested PCR para detecção do HAV nas amostras ambientais apresentando baixas concentrações de vírus.
- ✓ Os resultados deste estudo demonstram que o HAV pode ser detectado em amostras ambientais, mesmo que a contagem de coliformes esteja dentro dos limites considerados ideais pelas normas vigentes.
- ✓ Embora não tenha sido observada uma correlação estatisticamente significativa entre a contagem de coliformes e a detecção do HAV, o número de cópias/mL do HAV detectado por PCR em tempo real foi proporcional ao número de coliformes fecais nas amostras em que a contagem estava acima dos limites ideais de detecção.
- ✓ As amostras analisadas pela técnica de seqüenciamento nucleotídico foram caracterizadas como genótipo IB e apresentaram elevado grau de similaridade genética com outras amostras previamente isoladas no Rio de Janeiro apresentaram divergências entre elas, o que demonstra a circulação de diversos variantes do HAV na Lagoa Rodrigo de Freitas .
- ✓ O presente estudo foi realizado em uma área de proteção permanente localizada num dos centros urbanos mais desenvolvidos do país. A presença do HAV neste ambiente aquático implica em risco potencial de transmissão do vírus por contato primário com a água da lagoa, com possibilidade de causar surtos de veiculação hídrica.

8. PERSPECTIVAS

Os métodos utilizados neste estudo demonstraram ser uma boa opção para a pesquisa de HAV em amostras de água, porém, devido a baixa taxa de recuperação, observou-se uma necessidade de aperfeiçoamento da metodologia utilizada para concentração quando a matriz estudada é de água salobra, uma vez que não está disponível na literatura estudos com esse tipo de matriz.

A avaliação do potencial de risco nessa matriz aquática também poderia ser realizada, através de estudos epidemiológicos com remadores, e praticantes de esportes que entram em contato direto com a água da Lagoa Rodrigo de Freitas, RJ.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABD EL GALIL K, SOKKARY EL, KHEIRA SM, SALAZAR AM, YATES MV, CHEN W, MULCHANDANI A. Real-time nucleic acid sequence-based amplification assay for detection of hepatitis A virus. **Appl Environ Microbiol** 2005; 71(11): 7113-7116.

ABUZWAIDA ARN, SIDONI M, YOSHIDA CFT, SCHATZMAYR HG. Seroepidemiology of hepatitis A and B in two urban communities of Rio de Janeiro, Brazil. **Rev Inst Med Trop São Paulo** 1987; 29(4): 219-223.

Advisory committee on immunization practices (ACIP), FIORE AE, WASLEY A, BELL BP. Prevention of hepatitis A through active or passive immunization: recommendations of the **MMWR Recomm Rep** 2006; 55(RR-7):1-23.

ALMEIDA LM, WERNECK GL, CAINCROSS S, COELI CM, COSTA MC, COLETTY PE. The epidemiology of hepatitis A in Rio de Janeiro: environmental and domestic risk factors. **Epidemiol Infect** 2001; 127(2):327-33.

ALTSCHUL SF, MADDEN TL, SCHÄFFER AA, ZHANG J, ZHANG Z, MILLER W, LIPMAN DJ. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Res** 1997; 25(17):3389-402.

ALVES DTM, ARGENTO MSF, CRUZ CBM, ZEE D. Qualidade Ambiental da Lâmina d'água da Lagoa Rodrigo de Freitas – RJ. Subsídios aos Estudos de Impactos Ambientais em Lagoas Costeiras. **IX Simpósio Brasileiro de Sensoriamento Remoto**; 11-18 setembro de 1998; Santos, Brasil. Rio de Janeiro: INPE, 1998.

ALVES NC, ODORIZZI AC, GOULART FC. Microbiological analysis of mineral water and drinking water of reservoir supplies, Brazil. **Rev Saude Publica** 2002; 36(6):749-51.

AMADO LA, VILLAR LM, De PAULA VS, GASPAR AMC. Comparison between serum and saliva for the detection of hepatitis A virus RNA. **J Virol Methods** 2008; 148(1-2):74-80.

ANDINO R, RIECKHOF GE, ACHACOSO PL, BALTIMORE D. Poliovirus RNA synthesis utilizes a RNP complex formed around the 5'-end of viral RNA. **EMBO J** 1993; 12(9):587-3598.

ARANKALLE VA, SARADA DEVI KL, LOLE KS, SHENOY KT, VERMA V, HANEEPHABI M. Molecular characterization of hepatitis A virus from a large outbreak from Kerala, India. **Indian J Med Res** 2006; 123(6):760-769.

ARNAL C, CRANCE JM, GANTZER C, SCHWARTZBROD L, DELOINCE R, BILLAUDEL S. Persistence of infectious hepatitis A virus and its genome in artificial seawater. **Zentbl Hyg Umweltmed** 1998; 201(3):279-284.

BAROUDY BM, TICEHURST JR, MIELE TA, MAIZEL JV, PURCELL RH, FEINSTONE SM. Sequence analysis of hepatitis A virus cDNA coding for capsid proteins and RNA polymerase. **Proc Natl Acad Sci. USA** 1985. 82(7):2143-2147.

BLUMER, 1923 In: Maynard, JE. Hepatitis A. **Am J Path** 1975; 81(3):683-691.

BOOM R, SOL CJ, SALIMANS MM, JANSEN CL, WERTHEIM-VAN DILLEN PM, VAN DER NOORDA J. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. **J Clin Microbiol** 1990; 28(3):495-503.

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

BOSCH A. Human enteric viruses in the water environment: a minireview. **Int Microbiol** 1998; 1(3):191-6.

BOWER WA, NAINAN OV, HAN X, MARGOLIS HS. Duration of viremia in hepatitis A virus infection. **J Infect Dis** 2000; 182 (1) 12-17.

BRADLEY DW, McCCAUSTLAND KA, COOK EH, MURPHY BL, FIELDS HA, EBERT JW, WHEELER C, MAYNARD JE. Hepatitis A virus: growth characteristics of in vivo and in vitro propagated wild and attenuated virus strains. **J Med Virol** 1984; 14(4):373-386

BRADLEY DW, McCAUSTLAND KA, SCHREEDER MT, *et al.* Multiple buoyant densities of hepatitis A virus in cesium chloride gradients. **J Med Virol** 1977; 1(2):219-226.

BRADLEY DW, FIELDS HA, McCAUSTLAND KA, COOK EH, GRAVELLE CR, MAYNARD JE. Biochemical and biophysical characterization of light and heavy density hepatitis A virus particles: evidence HAV is an RNA virus. **J Med Virol** 1978;2(2):175-87.

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

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

BROOKS HA, GERSBERG RM, DHAR AK. Detection and quantification of hepatitis A virus in seawater via real-time RT-PCR. **J Virol Methods** 2005; 127(2):109-118.

BUSTIN SA, MUELLER R. Real time reverse transcription PCR (qRT-PCR) and its potential use in clinical diagnosis. **Clin Sci (Lond)** 2005; 109(4):365-79.

CABELLI VJ, DUFOUR AP, McCABE LJ, LEVIN MA. Swimming-associated gastroenteritis and water quality. **Am J Epidemiol** 1982; 115(4): 606-616.

CAMERON JDS. Infective hepatitis. **Q J Med** 1943; 12(3):139-155.

CARRILHO FJ, MENDES CLEMENTE C, SILVA LC. Epidemiology of hepatitis A and E virus infection in Brazil. **Gastroenterol Hepatol** 2005; 28(3):118-25.

Center of Disease Control and Prevention (CDC) electronic immunomicroscopy of hepatitis A virus, United States, 1998.

Center of Disease Control and Prevention (CDC). Summary of notifiable diseases, United States, 1998. **Morb Mortal wkly Rep** 1999; 47(53):1-92.

Center of Disease Control and Prevention (CDC). Epidemiology and prevention of viral Hepatitis A to E, an Overview. United States, 2006.

CHIN KP, LOK AS, WONG LS, LAI CL, WU PC. Current seroepidemiology of hepatitis A in Hon Kong. **J Med Virol** 1991; 34 (3): 191-3.

CLEMENS SA, da FONSECA JC, AZEVEDO T, CAVALCANTI A, SILVEIRA TR, CASTILHO MC, CLEMENS R. Hepatitis A and hepatitis B seroprevalence in 4 centers in Brazil. **Rev Soc Bras Med Trop** 2000; 33(1):1-10.

COCKAYNE EA. Catarrhal jaundice, sporadic and epidemic and its relation to acute yellow atrophy of the liver. **Q J Med** 1912; 6(1):1-29.

COHEN JI, TICEHURST JR, PURCELL RH, BUCKLER-WHITE A, BAROUDY BM. Complete nucleotide sequence of wild-type hepatitis A virus: comparison with different strains of hepatitis A virus and other picornaviruses. **J. Virol** 1987; 61(1):50–59.

COSTA-MATTIOLI M, ALLAVENA C, POIRIER AS, BILLAUDEL S, RAFFI F, FERRÉ V. Prolonged hepatitis A infection in a HIV-1 seropositive patient. **J Med Virol** 2002a; 68 (1):7-11.

COSTA-MATTIOLI M, CRISTINA J, ROMERO H, PEREZ-BERCOFF R, CASANE D, COLINA R, GARCIA L, VEJA I, GLOKMAN G, ROMANOWSKY V, CATELLO A, NICAND E, GASSIN M, BILLAUDEL S, FERRÉ V. Molecular evolution of hepatitis A virus: a new classification based on the complete VP1 protein. **J Virol** 2002b; 76 (18):9516-9525.

COSTA-MATTIOLI M, DI NAPOLI A, FERRÉ V, BILLAUDEL S, PEREZ-BERCOFF R, CRISTINA J. Genetic variability of hepatitis A virus. **J Gen Virol** 2003; 84:3191-201.

COSTA-MATTIOLI M., MONPOEBO S, NICAND E, ALEMAN MH, BILLAUDEL S, FERRÉ V. Quantitation and duration of viraemia during hepatitis A infection as determined by real time RT-PCR. **J Viral Hepatitis** 2002c; 9(2):101-106.

CRAUN GF. Causes of waterborne outbreaks in the United States. **Water Sci Technol** 1991; 24(1):17-20.

CUTHBERT JA. Hepatitis A: old and new. **Clin Microbiol Rev** 2001; 14(1):38-58.

DE ALENCAR XIMENES RA, MARTELLI CM, MERCHÁN-HAMANN E, MONTARROYOS UR, BRAGA MC, DE LIMA ML, CARDOSO MR, TURCHI MD, COSTA MA, DE ALENCAR LC, MOREIRA RC, FIGUEIREDO GM, PEREIRA LM; HEPATITIS STUDY GROUP. Multilevel analysis of hepatitis A infection in children and adolescents: a household survey in the Northeast and Central-west regions of Brazil. **Int J Epidemiol** 2008; 37(4):852-61

De PAULA VS, BAPTISTA ML, LAMPE E, NIEL C, GASPAR AMC. Characterization of hepatitis A virus isolates from subgenotypes IA e IB Rio de Janeiro, Brazil. **J Med Virol** 2002; 66(1):22-27

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):1169-76.

De PAULA VS, LU L, NIEL C, GASPAR AM, ROBERTSON BH. Genetic analysis of hepatitis A virus isolates from Brazil. **J Med Virol** 2004; 73(3):378-83.

De PAULA VS, SABACK FL, COIMBRA GASPAR AM. Comparison of four extraction methods to detect hepatitis A virus RNA in serum and stool samples. **Braz J Infect Dis** 2003a; 7(2):135-41.

De PAULA VS, SABACK FL, GASPAR AM, NIEL C. Mixed infection of a child care provider with hepatitis A virus isolates from subgenotypes IA and IB revealed by heteroduplex mobility assay. **J Virol Methods** 2003b; 107(2):223-8.

De CHANOSTAY J, SIEGL G. Effect of three known antiviral substances on hepatitis A virus replication. In: Zuckerman AJ, Ed. **Viral hepatitis and liver disease**. New York: Alan R Liss, 1988; 956-96.

DECKER RH, KOSAKOWSKI SM, VANDERBILT AS, *et al.* Diagnosis of acute hepatitis A by HAVB-M: a direct radioimmunoassay for IgM anti-HAV. **Am J Clin Pathol** 1981; 76(6): 140-147.

DINIZ-MENDES L, PAULA VS, LUZ SL, NIEL C. High prevalence of human Torque teno virus in streams crossing the city of Manaus, Brazilian Amazon. **J Appl Microbiol** 2008; 105(1):51-8.

DUBOIS E, HENNECHART C, MERLE G, BURGER C, HMILA N, RUELLE S, PERELLE S, FERRÉ V. Detection and quantification by real-time RT-PCR of hepatitis A virus from inoculated tap waters, salad vegetables, and soft fruits: characterization of method performances. **Int J Food Microbiol** 2007; 117(2):141-149

FAVERO MS, MAYNARD JE, LEGER RT. Guidelines for the care of patients hospitalized with viral hepatitis. **Ann Inter Med** 1979; 91(6):872-876

FEEMA - Fundação Estadual de Engenharia do Meio Ambiente [homepage da Internet]. Rio de Janeiro. INEA c2007-2009 [atualizada em 13 de Fevereiro de 2009; acesso em 5 de Julho de 2008]. **Lagoa Rodrigo de Freitas**. [aproximadamente 1 tela]. Disponível em <http://www.feema.rj.gov.br/lagoa-rodriigo-freitas.asp?cat=75&subcat=80>

FEIGELSTOCK D, THOMPSON P, MATTOO P, ZHANG Y, KAPLAN GG. The human homolog of HAVcr-1 codes for hepatitis A virus cellular receptor. **J Virol** 1998; 72(8): 6621-8.

FEINSTONE SM, KAPIKIAN MAS, PURCELL RH. Hepatitis A: detection by immunoelectronmicroscopy of a virus like antigen associated with acute illness. **Science** 1973; 182:1026-1028

FELSENSTEIN J. Phylogenetic inference package, version 3.5. **Department of genetics, University of Washington** 1993; Coastalittle, WA.

FIACCADORI FS, PEREIRA M, COELHO ASG, BORGES AMT, PARENTE JA, SOARES CMA, CARDOSO DDP. Molecular characterization of hepatitis A virus isolates from Goiânia, Goiás, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz** 2008; 103(8): 831-835.

FONG TT, LIPP EK. Enteric viruses of human and animals in aquatic environments: health risk, detection and potencial 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):4523-30.

FUJIWARA K, YOKOSUKA O, EHATA T. Frequent detection of hepatitis A viral RNA in serum during the early convalescent phase of acute hepatitis A. **Hepatology** 1997; 26(6):1634-1639.

GASPAR AM, VITRAL CL, YOSHIDA CF, SCHATZMAYR HG. Primary isolation of a Brazilian strain of hepatitis A virus (HAF-203) and growth in a primate cell line (FRhK-4). **Braz J Med Biol Res** 1992; 25(7):697-705.

GASPAR AMC, SANTOS DCM, VILLAR LM, LEWIS LLX, SIDONI M, VITRAL CL *et al.* Hepatitis A virus infection in Rio de Janeiro, Brazil. In: **10th International Symposium on Viral Hepatitis and Liver Disease**; 2000 April 9-13; Atlanta (USA).

GELDENHUYS JC, PRETORIUS PD. The occurrence of enteric viruses in polluted water, correlation to indicator organisms and factors influencing their numbers. **Water Sci Technol** 1989; 21(1):105-109.

GERBA CP, GOYAL SM, LABELLE NL, CECH I, BOGDAN GF. Failure of indicator bacteria to reflect the occurrence of enterovirus in marine waters. **Am J Public Health** 1979; 69 (11): 1116-1119.

GERSBERG RM, ROSE MA, ROBLES-SIKISAKA R, DHAR AK. Quantitative detection of hepatitis A virus and enteroviruses near the United States-Mexico border and correlation with levels of fecal indicator bacteria. **Appl Environ Microbiol** 2006; 72, (12): 7438-7444.

GOYAL SM, ADAMS WN, O'MALLEY L, LEAR DW. Human pathogenic viruses at sewage sludge disposal sites in the middle atlantic region. **Appl Environ Microbiol** 1984; 48 (4):758-763.

GRIFFIN D, GIBSON CJ 3RD, LIPP EK, RILEY K, PAUL JH 3RD, ROSE JB. Detection of viral pathogens by reverse transcriptase PCR and of microbial indicators by standard methods in the canals of the Florida Keys. **Appl Environ Microbiol** 1999; 65(9):4118-4125.

GRINDE B, STENE-JOHANSEN K, SHARMA B, HOEL T, JENSENIUS M, SKAUG K. Characterization of an epidemic of hepatitis A virus involving intravenous drug abusers: infection by needle-sharing? **J Med Virol** 1997; 53(1): 69-75.

GUST ID, COULEPIS AG, FEINSTONE SM, LOCARNINI SA, MORITSUGU Y, NAJERA R, SIEGL G. Taxonomic classification of hepatitis A virus. **Intervirology** 1983; 20(1):1-7.

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

HOUDE A, GUÉVREMONT E, POITRAS E, LEBLANC D, WARD P, SIMARD C, TROTTIER YL. Comparative evaluation of new TaqMan real-time assays for the detection of hepatitis A virus. **J Virol Methods** 2007; 140(1-2):80–89.

HUSSAIN Z, DAS BC, HUSAIN AS, ASSIM M, CHATTOPADHYAY S, MALIK A, POOVORAWAN Y, THEAMBOONLERS A, KAR P. Hepatitis A viral genotypes and clinical relevance: clinical and molecular characterization of hepatitis A virus isolates from Northern India. **Hepatology** 2005; 32(1): 16-24.

HUTIN YJ, POOL V, CRAMER EH, NAINAN OV, WETH J, WILLIAMS IT, GOLDSTEIN ST, GENSHEIMER KF, BELL BP, SHAPIRO CN, ALTER MJ, MARGOLIS HS. A multistate, foodborne outbreak of hepatitis A. National Hepatitis At Investigation Team. **N Engl J Med** 1999; 340 (8):595-602.

IIZERMAN MM, DAHILILNG DR, FOUT GS. A method to remove environmental inhibitors prior to the detection of waterborne enteric viruses by reverse transcription-polymerase chain reaction. **J Virol Methods** 1997; 63(12):145-153.

ISHAK KG. Light microscopic morphology of viral hepatitis. **Am J Clin Pathol** 1976; 65:787–827.

JACOBSON & KOOPAMAN. Declining hepatitis A seroprevalence: a global review and analysis. **Epidemiol Infect** 2004; 132(6):1005-22.

JIANG S, NOBLE R, CHU WP. Human adenoviruses and coliphages in urban runoff-impacted coastal waters os southern California. **Appl Environ Microbiol** 2001; 67(1):179-184.

JOTHIKUMAR N, CROMEANS TL, SOBSEY MD, ROBERTSON BH. Development and evaluation of a broadly reactive detection TaqMan assay for rapid detection of hepatitis A virus. **Appl Environ Microbiol** 2005; 71(6):3359-3363.

KANG JH, LEE KY, KIM CH, SIM D. Changing Hepatitis A epidemiology and the need for vaccination in Korea. **Asian Pac J Allergy Immunol** 2004; 22(4):237-242.

KAO HW, ASHCAVAI M, REDEKER AG. The persistence of hepatitis A IgM antibody after acute clinical hepatitis A. **Hepatology** 1984; 4(5):933-936.

KAPLAN G, TOTSUKA A, THOMPSON P, AKATSUKA T, MORITSUGU Y, FEINSTONE SM. Identification of a surface glycoprotein on African green monkey kidney cells as a receptor for hepatitis A virus. **EMBO J** 1996; 15 (16): 4282-4296.

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, 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):117-22.

KOFF RS. Hepatitis A. **Lancet** 1998; 351(9116):1643-9.

KRUGMAN S, GILES JP, HAMMON J. Infectious hepatitis. Evidence for two distinctive clinical, epidemiological, and immunological types of infection. **JAMA** 1967 1;200(5):365-73.

KRUGMAN S, WARD R, GILES JP The natural history of infectious hepatitis. **Am J Med** 1962; 32:717-28.

KRUGMAN S, WARD R, GILES JP, BODANSKY O, JACOBS AM. Infectious hepatitis: detection of virus during the incubation period and clinically inapparent infection. **N Engl J Med** 1959; 8; 261:729-34.

LaBRECQUE FD, LaBRECQUE DR, KLINZMAN D, PERLMAN S, CEDERNA JB, WINOKUR PL *et al.* Recombinant hepatitis A virus antigen: improved production and utility for diagnostic immunoassay. **J Clin Microbiol** 1998; 36 (7): 2014-2018.

LEDNAR WM, LEMON SM, KIRKPATRICK JW, REDFIELD RR, FIELDS ML, KELLEY PW. Frequency of illness associated with epidemic hepatitis A virus infections in adults. **Am J Epidemiol** 1985; 122(2):226-33.

LEE, CHEONGHOON, KIM SJ. Molecular detection of human enteric viruses in urban rivers in Korea. **J Microbiol Biotechnol** 2008; 18(6):1156–1163.

LEMON SM, BARCLAY W, FERGUSON M, MURPHY P, WOOD D, KATRAK K. Immunogenicity and antigenicity of chimeric picornaviruses which express hepatitis A virus (HAV) peptide sequences: evidence for a neutralization domain near the amino terminus of VP1 of HAV. **Virology** 1992; 188(1):285-295.

LEMON SM, BINN LN. Incomplete neutralization of hepatitis A virus in vitro due to lipid-associated virus. **J Gen Virol** 1985; 66(Pt 11):2501–2506.

LEMON SM, JANSEN RW, BROWN EA. Genetic, antigenic and biological differences between strains of hepatitis A virus. **Vaccine** 1992; 10 (1):S40-4

LEMON SM, PING LH, DAY S, COX E, JANSEN R, AMPHLETT E *et al.* Immunobiology of hepatitis A virus. In: Hollinger F.B., Lemon S.M., Margolis H.S, Eds. **Viral hepatitis and liver disease**, Baltimore: Williams & Wilkins 1991; 20-24.

LEMON SM. Type A viral hepatitis: epidemiology, diagnosis, and prevention. **Clin Chem** 1997e; 43:1494-9.

LOCARNINI SA, FERIS AA, LEHMAN NI, GUST ID. The antibody response following hepatitis A infection. **Intervirology** 1977; 8(5):309-318.

LU L, CHING KZ, de PAULA VS, NAKANO T, SIEGL G, WITZ M, ROBERTSON BH. Characterization of the complete genomic sequence of genotype II hepatitis A virus (CF53/Berne isolate). **J Gen Virol** 2004; 85(Pt10):2943-52.

MacCALLUM FO, BRADLEY WH. Transmission of infective hepatitis to human volunteers. **Lancet** 1944; 2:228

MacCALLUM FO. Recent advances in infective hepatitis and serum hepatitis. **Abstr Int Congr Trop Med Malar** 1948;56 (4º Congresso):34

MARGOLIS HS, ALTER MJ. Will hepatitis A become a vaccine- preventable disease? **Ann Int Med** 1995; 122(6): 464-465.

MARGOLIS HS, NAINAN OV, KRAWCZYNSKI K, BRADLEY DW, EBERT JW, SPELBRING J, FIELDS HA, MAYNARD JE. Appearance of immune complexes during experimental hepatitis A infection in chimpanzees. **J Med Virol** 1988; 26(3):315-26.

MARQUES RG. Ocorrência de coliformes e Samonella em águas de irrigação de hortaliças nos municípios de Goiânia e Aparecida de Goiânia, Goiás. Goiânia [Tese de Mestrado em Medicina Tropical- IPTSP/UFG], 2003.

McANULTY JM, RUBIN GL, CARVAN CT, HUNTLEY WJ, GROHMANN G, HUNTER R. An outbreak of norwalk-like gastroenteritirs associated with contaminated drinking water at a caravan park. **Aust J Public Health** 1993;17(1):36-41.

McCAUSTLAND KA, BOND WW, BRADLEY DW *et al.* Survival of hepatitis A vírus in feces after drying and storage for one month. **J Clin Microbiol** 1982;16(5):957-958.

MEHNERT DU, STEWIEN KE. Detection and distribution of rotavírus in raw sewage and creeks in São Paulo, Brazil. **Appl Environ Microbiol** 1993; 59:(1):140-143.

MEHNERT DU, STEWIEN KE, HÁRSI CM, QUEIROZ APS, CANDEIAS JMG, CANDEIAS JAN. Detection of rotavirus in sewage and creek water: efficiency of the concentration method. **Mem Inst Oswaldo Cruz** 1997;92(1):97-100.

MELNICK JL. Classification of hepatitis A as enterovirus type 72 and of hepatitis B vírus as hepadnavirus type 1. **Intervirology** 1982; 18(3):105-6

MELNICK JL. History and epidemiology of hepatitis A. **J Infect Dis** 1995; 171 (Suppl 1): S2-8.

METCALF TG, JIANG X. Detection of hepatitis A virus in estuarine samples by gene probe assay. **Microbiol Sci** 1998; 5(10): 296-300.

MIAGOSTOVICH MP, FERREIRA FFM, GUIMARÃES FR, FUMIAN TM, DINIZ-MENDES L, LUZ SLB, SILVA LA, LEITE JPG. Molecular detection and characterization of gastroenteritis viruses occurring naturally in the stream waters of Manaus, Central Amazônia, Brazil. **Appl Environ Microbiol** 2008; 74(2):375–382.

MINOR P. Picornaviridae. In: Francki RIB, Fauquet CM, Knudson DL, Bown F, Eds. **Classification on nomenclature of viruses** (Arch. Virol. Suppl. 2). Wien: Springer-Verlag, 1991; 320-326.

MORAIS LM, De PAULA VS, ARANTES MR, OLIVEIRA ML, GASPAR AM. Early infection and asymptomatic spread of hepatitis A virus in a public child care center in Rio de Janeiro, Brazil: should attending children under two years of age be vaccinated? **Mem Inst Oswaldo Cruz** 2006;101(4):401-5.

NAINAN OV, ARMSTRONG GL, HAN X, WILLIAMS IT, BELL BP, MARGOLIS HS. Hepatitis A molecular epidemiology in the United States, 1996–1997: sources of infection and implications of vaccination policy. **J Infect Dis** 2005; 191(6):957–963.

NAINAN OV, XIA G, VAUGHAN G, MARGOLIS HS. Diagnosis of hepatitis a virus infection: a molecular approach. **Clin Microbiol Rev** 2006; 19(1):63-79.

NOBLE RT, FUHRMAN JA. Enteroviruses detected by reverse transcriptase polymerase chain reaction from the coastal waters of Santa Monica Bay, California: low correlation to bacterial indicator levels. **Hydrobiologia** 2001; 460(1-3): 175–184.

NOGUEIRA G, NAKAMURA CV, TOGNIM MCB, ABREU FILHO BA, DIAS FILHO BP. Microbiological quality of drinking water of urban and rural communities, Brazil. **Rev Saude Publica** 2003; 37(2):232-236.

NORMANN A, JUNG C, VALLBRACHT A, FLEHMING B. Time course of hepatitis A viremia and viral load in the blood of human hepatitis A patients. **J Med Virol** 2004; 72 (1): 10-16

NORMANN A, PFISTERE-HUNT, SCHADE S, GRAFF J, CHAVES RL, CROVARI P, ICARDI G, FLEHMIN B. Molecular epidemiology of an outbreak of hepatitis A in Italy. **J Med Virol** 1995; 47(4): 467-471.

O'GRADY J. Management of acute and fulminant hepatitis A. **Vaccine** 1992; 10(1):S21-S23.

PARRY JV, MORTIMER PP. The heat sensitivity of hepatitis A virus determined by a simple tissue culture method. **J Med Virol** 1984; 14(3):277-283.

PAUL AV, TADA H, VON DER HELM K, WISSEL T, KIEHN R, WIMMER E *et al.* The entire nucleotide sequence of the genome of human hepatitis virus (isolate MBB). **Virus Res** 1987; 8(2):153-171.

PAUL JR, GARDNER HT. Endemic aspects of hepatitis in U.S. troops in Germany 1946-1950. **Am J Med** 1950; 8 (5): 565-80.

PAUL JR, HAVENS WP, SABIN AB, PHILIP CB. Transmission experiments in serum jaundice and infectious hepatitis. **JAMA** 1945; 128:911-915.

PEREIRA FEL, GONÇALVES CS. Hepatite A. **Rev Soc Bras Med Trop** 2003; 36(3): 387-400.

PHAM B, DUVAL B, de SERRES G, GILCA V, TRICCO AC, OCHNIO J, SCHEIFELE DW. Seroprevalence of hepatitis A infection in a low endemicity country: a systematic review. **BMC Infect Dis** 2005; 5:56.

PINTÓ RM, SÁIZ JC. Enteric hepatitis viruses. In: Bosch A. **Human viruses in water**. The Netherlands: Amsterdam 2007; 39-67.

POOVORAWAN Y, PONGPUNLERT W, THEAMBOONLERS A, VIMOLGEJ L, CHUMDERMPADETSKU S, VANDERPAPELIERE P, SAFARY A. Changing seroepidemiology of hepatitis A virus infection in Thailand. **Southeast Asian J Trop Med Public Health** 1993; 24 (2): 255-9.

PROVOST PJ, HILLEMANN MR. Propagation of human hepatitis A in cell culture in vitro. **Proc Soc Exp Biol Med** 1979; 160(2):213-221.

PROVOST PJ, WOLANSKI BS, MILLER WJ, *et al.* Physical, chemical and morphologic dimensions of human hepatitis A virus strain CR326. **Proc Soc Exp Biol Med** 1975; 148(2):532-539.

PURCELL RH, FEINSTONE SM, TICEHURST JR, DAEMER RJ, BAROUDY BM. Hepatitis A virus. In: Vyas GN, Dienstag JL, Hoofnagle JH, Eds. **Viral Hepatitis and liver disease**. Orlando, Florida; Grune & Stratton; 1984. P. 9-22.

QUEIROZ APS, SANTOS FM, SASSAROLI A, HÁRSI CM, MONEZI TA, MEHNERT DU. Eletropositive filter membrane as an alternative for the elimination of PCR inhibitors from sewage and water samples. **Appl Environ Microbiol** 2001; 67(10):4614-4618.

ROBERTSON BH, AVERHOFF F, CROMEANS TL, HAN X, KHOPRASERT B, NAINAN OV, ROSENBERG J, PAIKOFF L, DEBESS E, SHAPIRO CN, MARGOLIS HS. Genetic relatedness of hepatitis A virus isolates during a community-wide outbreak. **J Med Virol** 2000; 62(2):144-50.

ROBERTSON BH, JANSEN RW, KHANNA B, TOTSUKA A, NAINAN OV, SIEGL G, WIDELL A, MARGOLIS HS, ISOMOURA S, ITO K, ISHIZU T, MORITSUGA Y, LEMON SM. Genetic relatedness of hepatitis A virus strains recovered from different geographic regions. **J Gen Virol** 1992; 73(Pt 6):1365-1377.

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):2387-96.

ROSEMBLUM LS, VILLARINO ME, NAINAN OV, MELISH ME, HADLER SC, PINSKY PP, JARVIS WR, OTT CE, MARGOLIS HS. Hepatitis A outbreak in a neonatal intensive care unit: risk factors for transmission and evidence of prolonged viral excretion among preterm infants. **J Infect Dis** 1991; 164(3): 476-82.

SAITON N, NEI M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. **Mol Biol Evol.** 1987; 4(4):406-25.

SANCHEZ G, BOSCH A, PINTO RM. Genome variability and capsid structural constraints of hepatitis A virus. **J Virol** 2003; 77(1):452-9.

SANTOS DC, SOUTO FJ, SANTOS DR, VITRAL CL, GASPAR AM. Seroepidemiological markers of enterically transmitted viral hepatitis A and E in individuals living in a community located in the North Area of Rio de Janeiro, RJ, Brazil. **Mem Inst Osw Cruz** 2002; 97(5):637-40.

SCHOLZ E, HEINRICY U, FLEHMIG B. Acid stability of hepatitis A virus. **J Gen Virol** 1989; 70(Pt 9):2481-2485.

SCHULTHEISS T, KUSOV Y Y, GAUSS-MULLER V. Proteinase 3C of hepatitis A virus (HAV) cleaves the HAV polyprotein P2-P3 at all sites including VP1/2A and 2A/2B. **Virology** 1994; 198(1):275-281.

SHUVAL HI. Detection and control of enteroviruses in the water environment. in: **Developments in Water Quality Research** ed. Shuval, H.I. 1971; Ann Arbor: Ann Arbor-Humphrey Publishers, p.47-71.

SIEGL G. Structure and biology of hepatitis A virus. In: Szmuness W, Alter HJ, Maynard JE, Eds. **Viral hepatitis** 1982; P.13-20.

SIEGL G. The biochemistry of hepatitis A virus. In: Gerety, RJ, **Hepatitis A**. New York: Academic Press; 1984:9-32.

SOBSEY MD, SHIELDS PQ, HAUCHMAN FS, DAVIS AL, RULLMAN VA, BOSCH A. Survival and persistence of hepatitis A virus in environmental samples. In: Zuckerman AJ, **Viral hepatitis and liver disease**. New York: Alan R Liss, 1988; 121-124.

SPRINGTHORPE VS, LOH CL, ROBERTSON WJ, SATTAR AS. In situ survival of indicator bacteria, MS-2 phages and human pathogenic viruses in river water. **Water Sci Technol** 1993;27(2):413-420.

STAPLETON JT, FREDERICK J, MEYER B. Hepatitis A virus attachment to cultured cell lines. **J Infect Dis** 1991; 164(6):1098-1103.

STAPLETON JT. Host Immune response to hepatitis virus. **J Infect Dis** 1995; 171:(1):S9-S14.

STORCH GA, BODICKY C, PARKER M, BLECKA LJ, AACH RD. Use of conventional and IgM specific radioimmunoassay for anti-hepatitis A antibody in an outbreak of hepatitis A. **Am J Med** 1982; 73(5):663-668.

SVERDLOV SD, TSAREV SA, MARKOVA SV, VASILENO SK, CHIZHIKOV VE, PETROV NA, KUSOV Y, NASTASHENKO TA, BALAYAN MS. Cloning and expression of hepatitis A virus genome in E. Coli Cell. **Mol Gen Microbiol Virol** 1987; 6: 129-133.

TAMURA K, DUDLEY J, NEI M, KUMAR S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0 **Mol Biol Evol** 2007; 24(8):1596-9.

TANAKA J. Hepatitis A shifting epidemiology in Latin America. **Vaccine** 2000; 18 Suppl 1: S57-S60.

TAPIA-CONYER R, SANTOS JI, CAVALCANTI AM, URDANETA E, RIVERA L, MANTEROLA A, POTIN M, RUTTAMAN R, TANAKA KIDO J. Hepatitis A in Latin America: a changing epidemiologic pattern. **Am J Trop Med Hyg** 1999; 61(5):825-9.

TASSOPOULOS NC, PAPAEVANGELOU GJ, TICEHURST JR, PURCELL RH. Fecal excretion of Greek strains of hepatitis A virus patients with hepatitis A and experimentally infected chimpanzees. **J Infect Dis** 1986; 154(2):231-237.

TAYLOR MB. Molecular epidemiology of South African strains of hepatitis A virus: 1982-1996. **J Med Virol** 1997; 51(4):273-9.

THOMPSON JD, GIBSON TJ, PLEWNIAK F, JEANMOUGIN F, HIGGINS DG. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. **Nucleic Acids Res** 1997; 25(24):4876-82.

TICEHURST J, COHEN JI, PURCELL RH. Analyses of molecular sequences demonstrate that hepatitis A virus (HAV) is a unique picornavirus. In: Zuckerman AJ, Ed. **Viral hepatitis and liver disease**. New York: Alan R Liss; 1988. P.33-35.

TOTSUKA A, MORITSUGU Y. Hepatitis A virus proteins. **Intervirology** 1999; 42(2-3):63-8.

VAN DAMME P, THOELEN S, CRAMM M, DE GROOTE K, SAFARY A, MEHEUS A. Inactivated hepatitis A vaccine: reactogenicity, and long-term antibody persistence. **J Med Virol** 1994; 44(4):446-451.

VERHOEF L, BOXMAN IL, DUIZER E, RUTIES SA, VENNEMA H, FRIESEMA IH, DE RODA, HUSMAN AM, KOOPMANS M. Multiple exposures during a norovirus outbreak on a river-cruise sailing through Europe, 2006. **Euro Surveill** 2008; 12(24):4-6.

VICTORIA M, GUIMARÃES F, FUMIAN T, FERREIRA F, VIEIRA C, LEITE JP, MIAGOSTOVICH M. Evaluation of an adsorption–elution method for detection of astrovirus and norovirus in environmental Waters. **J Virol Methods**.2009; 156(1-2):73-76.

VILLAR LM, DA COSTA MCE, De PAULA VS, GASPAR AMC. Hepatitis A outbreak in a public school in Rio de Janeiro, Brazil. **Mem Inst Osw Cruz** 2002; 97 (3):301-305.

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

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.

VILLAR LM, LAMPE E, MEYER A, GASPAR AM. Genetic variability of hepatitis A virus isolates in Rio de Janeiro: implications for the vaccination of school children. **Braz J Med Biol Res** 2004b; 37(12):1779-87.

VITRAL CL, GASPAR AM, SOUTO FJD. Epidemiological pattern and mortality rates for hepatitis A in Brazil, 1980-2002- a review. **Mem Inst Oswaldo Cruz** 2006; 101(2):119-127.

VITRAL CL, SOUTO FJ, GASPAR AM. Changing epidemiology of hepatitis A in Brazil: reassessing immunization policy. **J Viral Hepat** 2008; 15 Suppl 2:22-5.

VITRAL CL, YOSHIDA CFT, LEMOS ER, TEIXEIRA CS, GASPAR AM. Age-specific prevalence of antibodies to hepatitis A in children and adolescents from Rio de Janeiro, Brazil, 1978 and 1995. Relationship of prevalence to environmental factors. **Mem Inst Oswaldo Cruz** 1998a; 93(1):1-5.

VITRAL CL, YOSHIDA CFT, TEIXEIRA CS, GASPAR AMC. Seroprevalence of hepatitis A in health care students from a public university of Rio de Janeiro, Brazil. **Rev. Microbiol** 1998b; 29: 149-151.

VOEGT H. Zur atologie der hepatitis epidemica. **Much Méd Wschr** 1942; 89(76):76-79.

WIENS BL, BOHIDAR NR, PIGEON JG, EGAN J, HURNI W, BROWN L, KUTER BJ, NALIN DR. Duration of protection from clinical hepatitis A disease after vaccination with VAQTA. **J Med Virol** 1996; 49(3):235-241.

WONG M, KUMAR L, JENKINS TM, XAGORARAKI I, PHANIKUMAR MS, ROSE JB. Evaluation of public health risks at recreational beaches in Lake Michigan via detection of enteric viruses and a human-specific bacteriological marker. **Water Res** 2009; 43(4):1137-1149.

WU PC, LAU JY, LAU SK, LAI CL. Relationship between intrahepatic expression of hepatitis B viral antigens and histology in Chinese patients with chronic hepatitis B virus infection. **Am J Clin Pathol** 1993; 100 (6): 648-53.

WYN-JONES, SELLWOOD J. Enteric viruses in the aquatic environment. **J Appl Microbiol** 2001; 91 (6): 945-962.

YANG JH, LAI JP, DOUGLAS SD, METZGER D, ZHU XH, HO WZ. Real time RT-PCR for quantitation of hepatitis C virus RNA. **J Virol Methods** 2002; 102(1-2):119-128.

YAP I, GUAN R. Hepatitis A sero-epidemiology in Singapore: A changing pattern. **Trans R Soc Trop Med Hyg** 1993; 87(1): 22-3.

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](#)