

## VÍRUS ENTÉRICOS NA LAGOA RODRIGO DE FREITAS

Carmen Baur Vieira<sup>1\*</sup>, Anna Carolina de Oliveira Mendes<sup>2</sup>, Jaqueline Mendes de Oliveira<sup>2</sup>, Ana Maria Coimbra Gaspar<sup>2</sup>, José Paulo Gagliardi Leite<sup>1</sup> & Marize Pereira Miagostovich<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Instituto Oswaldo Cruz (IOC), Laboratório de Virologia Comparada e Ambiental (LVCA). Avenida Brasil, 4365, Manguinhos, Rio de Janeiro/RJ, Brasil. CEP: 21040-900.

<sup>2</sup>Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Instituto Oswaldo Cruz (IOC), Laboratório de Desenvolvimento Tecnológico em Virologia (LDTV). Avenida Brasil, 4365, Manguinhos, Rio de Janeiro/RJ, Brasil. CEP: 21040-900.

E-mails: c.baur@ioc.fiocruz.br, annacom@ioc.fiocruz.br, jackie@ioc.fiocruz.br, amgaspar@ioc.fiocruz.br, jpgleite@ioc.fiocruz.br, marizepm@ioc.fiocruz.br

### RESUMO

Os vírus são atualmente considerados importantes contaminantes de águas superficiais, embora ainda não estejam incluídos nos parâmetros de balneabilidade avaliados para exposição humana em águas. Este estudo tem como objetivo avaliar a contaminação pelos principais agentes etiológicos da gastroenterite viral aguda [rotavírus espécie A (RVA) e norovírus (NoV)], adenovírus humanos (HAdV) e vírus da hepatite A (HAV) em águas superficiais da Lagoa Rodrigo de Freitas, Rio de Janeiro, pela detecção, quantificação e caracterização molecular destes agentes, correlacionando-os com parâmetros microbiológicos de qualidade da água. Entre Agosto de 2007 e Julho de 2008, 2L de água superficial foram coletados mensalmente em 12 pontos, incluindo 10 pontos na Lagoa Rodrigo de Freitas, um no Rio dos Macacos e um na praia do Leblon, totalizando 144 amostras. As amostras foram concentradas 1000X pelo método de adsorção-eluição utilizando membrana carregada negativamente e reconcentradas a um volume final de 2mL em Centriprep<sup>®</sup>YM-50. RVA, NoV, HAdV e HAV foram detectados e quantificados pelas técnicas de reação em cadeia pela polimerase convencional e quantitativa (cPCR / qPCR) precedidas por transcrição reversa (RT). Pela análise conjunta destas metodologias, RVA, NoV, HAdV e HAV foram detectados em 24,3% (35/144), 18,8% (27/144), 16,7% (24/144) e 21,5% (31/144) das amostras estudadas, respectivamente. *E.coli* foi quantificada por Kit Colilert<sup>®</sup>-18 Quanti-Tray<sup>®</sup>/2000 em cada ponto de coleta como um indicador microbiológico de contaminação fecal e 87,5% (126/144) das amostras foram caracterizadas como próprias a balneabilidade conforme estabelecido pela legislação vigente. RVA, NoV, HAdV e HAV foram detectados em 23,8% (30/126), 16,7% (21/126), 15,1% (19/126) e 23,0% (29/126), respectivamente, das amostras consideradas próprias, evidenciando a presença de vírus em águas que estão dentro dos padrões aceitáveis para *E.coli*. Os dados obtidos neste estudo enfatizam a necessidade do estabelecimento de parâmetros virais para a avaliação da qualidade da água e a necessidade de se disponibilizar protocolos de detecção viral que auxiliem para a adoção de medidas de controle de contaminação ambiental.

**Palavras-chave:** vírus entéricos; água recreacional; PCR convencional; PCR quantitativa.

### ABSTRACT

**ENTERIC VIRUSES IN RODRIGO DE FREITAS LAGOON.** Viruses are now considered important contaminants of surface water, although not yet included in the parameters evaluated for human exposure in bathing waters. This study aims to assess contamination of surface waters of Rodrigo de Freitas Lagoon, Rio de Janeiro, by its major etiologic agents of acute viral gastroenteritis [species A rotavirus (RVA) and norovirus (NoV)], human adenoviruses (HAdV) and hepatitis A virus (HAV) by detection, quantification and molecular characterization of these agents establishing a correlation with microbiological parameters of water quality. From August 2007 to July 2008, 2L of surface water were monthly collected at 12 points, including 10 points in Rodrigo de Freitas Lagoon, one in Macacos River and one in Leblon Beach, with a total of 144 samples.

The samples were concentrated 1000X by an adsorption-elution method using a negatively charged membrane and reconcentrated to a final volume of 2mL in Centriprep® YM-50. RVA, NoV, HAdV and HAV were detected and quantified by conventional and quantitative polymerase chain reaction (cPCR / qPCR) preceded by reverse transcription (RT). Overall, RVA, NoV, HAdV and HAV were detected in 24.3% (35/144), 18.8% (27/144), 16.7% (24/144) and 21.5% (31/144) of the samples studied, respectively. *E. coli* was quantified by Kit Colilert®-18 Quanti-Tray®/2000 in each sample as an indicator of fecal contamination and 87.5% (126/144) of the samples were characterized as suitable for bathing as established by current regulation. RVA, NoV, HAdV and HAV were detected in 23.8% (30/126), 16.7% (21/126), 15.1% (19/126) and 23.0% (29/126) of the samples, respectively, showing the presence of viruses in waters that are within the acceptable standards for *E.coli*. The data obtained in this study emphasizes the need to establish parameters for the evaluation of viral quality of water and the need to develop viral detection protocols that can assist measures to control the environmental contamination.

**Keywords:** enteric viruses; recreational water; conventional PCR; quantitative PCR.

## RESUMEN

**VIRUS ENTÉRICOS EN LA LAGUNA RODRIGO DE FREITAS.** Los virus son actualmente considerados importantes contaminantes de las aguas superficiales, aunque aún no estén incluidos en los parámetros evaluados en las aguas de baño para la exposición humana. En el presente estudio se evaluó la contaminación de las aguas superficiales de la Laguna Rodrigo de Freitas, Río de Janeiro, por los principales agentes etiológicos de gastroenteritis viral aguda [rotavirus especie A (RVA) y norovirus (NoV)], adenovirus humano (HAdV) y el virus de la hepatitis A (HAV) por la detección, cuantificación y caracterización molecular de estos agentes, estableciendo una correlación con los parámetros microbiológicos de la calidad del agua. Entre Agosto de 2007 y Julio de 2008, se recolectaron mensualmente 2L de agua superficial en 12 puntos, incluyendo 10 puntos en la Laguna Rodrigo de Freitas, una en el Río dos Macacos y una en la Playa de Leblon, con un total de 144 muestras. Las muestras fueron concentradas 1000X por medio de un método de adsorción-elusión utilizando una membrana cargada negativamente, y se reconcentró a un volumen final de 2mL en Centriprep® YM-50. Los RVA, NoV, HAdV y HAV fueron detectados y cuantificados por la reacción en cadena de la polimerasa convencional y cuantitativa (cPCR / qPCR) precedida por la transcripción reversa (RT). En general, los RVA, NoV, HAdV y HAV fueron detectados en un 24,3% (35/144), 18,8% (27/144), 16,7% (24/144) y 21,5% (31/144) de las muestras, respectivamente. *E. coli* fue cuantificada en cada muestra, por medio del Kit Colilert®-18 Quanti-Tray®/2000, como un indicador microbiológico de contaminación fecal y el 87,5% de las muestras (126/144) fueron clasificadas como adecuadas para el baño según lo establecido por la normativa vigente. Los RVA, NoV, HAdV y HAV fueron detectados en un 23,8% (30/126), 16,7% (21/126), 15,1% (19/126) y 23,0% (29/126) de las muestras, respectivamente, evidenciando la presencia de virus en las aguas que están dentro de los estándares aceptables para *E. coli*. La información obtenida en este estudio enfatiza la necesidad de establecer parámetros para la evaluación de la calidad viral del agua y de desarrollar protocolos de detección viral que puedan ayudar a adoptar medidas para el control de la contaminación ambiental.

**Palabras-clave:** virus entéricos; agua recreacional; PCR convencional; PCR cuantitativa.

## INTRODUÇÃO

Mesmo com o progresso em toda área tecnológica, as doenças de veiculação hídrica continuam a ter um grande impacto tanto na saúde pública como na área econômica, em função dos quadros de morbidade e mortalidade gerados por estas. Apesar de projeções

apontarem o declínio de quadros infecciosos nos próximos vinte anos, tais projeções não consideram que a maior proporção das doenças infecciosas emergentes é representada por agentes etiológicos de origem viral, uma vez que a melhoria dos padrões de saneamento e de qualidade da água contribuiu para a redução da transmissão da maior parte dos patógenos

bacterianos. Dentro das enfermidades infecciosas, os vírus são os principais causadores de surtos relacionados à contaminação de água e alimentos nos países desenvolvidos, onde a melhora dos tratamentos e depuração das águas residuais reduziu a transmissão da maior parte dos patógenos bacterianos (Craun 1992, Grabow 2007).

Existem mais de 100 tipos diferentes de vírus encontrados nos dejetos humanos e todos são potencialmente transmitidos pela água (Bosch *et al.* 2008). Ao contrário da poluição por bactérias e fungos, a presença de partículas virais na água é de difícil detecção e exige tecnologias sofisticadas de concentração destes agentes e, em muitos casos, detecção molecular. Um dos desafios da análise de vírus em amostras de água tem sido a dificuldade em se detectar concentrações normalmente baixas pertencentes a diferentes famílias e que estão dispersos em grandes volumes destas amostras ambientais (Metcalf *et al.* 1995, Katayama *et al.* 2002, Bosch *et al.* 2008).

Os primeiros estudos sobre a dispersão dos vírus no ambiente aquático tiveram início na década de 40, com a tentativa de se detectar poliovírus pela inoculação de águas de esgoto em macacos (Melnick 1947). A partir da década de 80, a virologia ambiental ganhou impulso em função do desenvolvimento e aprimoramento de metodologias de concentração e de detecção molecular, que permitiram a obtenção de informações sobre estes patógenos, especialmente daqueles não isolados de forma eficiente em linhagens celulares, como os vírus fastidiosos. Atualmente, a associação de metodologias de concentração e detecção viral, utilizando ferramentas moleculares, tem permitido a avaliação de contaminação viral em diferentes ecossistemas aquáticos (Bosch 1998, Pina *et al.* 1998, Chapron *et al.* 2000, Cho *et al.* 2000, Wyn-Jones *et al.* 2000, Fout *et al.* 2003, La Rosa *et al.* 2007, Miagostovich *et al.* 2008, Wong *et al.* 2009).

O lançamento direto de efluentes domésticos em ambientes aquáticos tem sido apontado como o principal aporte de vírus nesses ecossistemas, uma vez que esses microrganismos são excretados em elevadas concentrações pelas fezes de indivíduos infectados. Os tipos e as concentrações dos vírus detectados no esgoto ou em locais contaminados por lançamentos de esgoto sem tratamento demonstram o fluxo dos vírus na população e refletem as infecções

virais mais prevalentes na comunidade e o nível de poluição da água.

Os vírus entéricos, transmitidos pela via fecal-oral, são mais resistentes à degradação que os indicadores bacterianos fecais, sendo encontrados em águas onde os níveis bacterianos se apresentam dentro dos padrões de qualidade. Os vírus podem permanecer viáveis durante vários meses em condições adversas. A ausência de envelope lipídico, assim como o fato de que o capsídeo protéico apresenta carga negativa em pH natural das águas (5 a 9), facilitando a sua adsorção aos particulados do meio e conferindo maior proteção contra degradação/inativação química, os torna capazes de resistir aos processos de tratamento de água e esgoto aplicados no controle bacteriano, inclusive cloração (Bosch 1998, Griffin *et al.* 1999).

Atualmente, a Legislação Brasileira (Ministério da Saúde 2004) demonstra uma possível preocupação em relação à presença de vírus na água no artigo 12, parágrafo 2º, quando recomenda enfaticamente “para a filtração rápida se estabeleça como meta a obtenção de efluente filtrado com valores de turbidez inferiores a 0,5UT em 95% dos dados mensais e nunca superiores a 5,0 UT” a fim de “assegurar a adequada eficiência de remoção de enterovírus, cistos de *Giardia* spp e oocistos de *Cryptosporidium* sp.” Entretanto, alguns estudos utilizando técnicas moleculares têm permitido observar que a presença de enterovírus não se relaciona com a presença de outros vírus patogênicos e se tem sugerido a utilização de adenovírus humanos (HAdV) como possível indicador viral de contaminação de origem humana (Pina *et al.* 1998, Formiga-Cruz *et al.* 2003).

Uma grande variedade de vírus, responsáveis por diferentes enfermidades, tais como a gastroenterite aguda (GA) ou hepatite, já foram detectados em diferentes matrizes aquáticas em estudos realizados em muitos países, incluindo o Brasil. Diferentes metodologias de concentração e detecção viral têm demonstrado a disseminação destes vírus em estuários, rios, mares, lagos e lagoas, águas subterrâneas, potáveis, minerais, recreacionais e em esgotos brutos ou tratados (Kukkula *et al.* 1999, Pina *et al.* 2001, Beuret *et al.* 2002, Vaidya *et al.* 2002, Van Heerden *et al.* 2003, Pusch *et al.* 2005, de Paula *et al.* 2007, Espinosa *et al.* 2008, Miagostovich *et al.* 2008, Ferreira *et al.* 2009, Hamza *et al.* 2009, Hernandez-Morga *et al.* 2009, Moreno *et al.* 2009, Wong *et al.*

2009, Fumian *et al.* 2010, Rigotto *et al.* 2010, Silva *et al.* 2010, Victoria *et al.* 2010a, 2010b, Lee *et al.* 2011, Prado *et al.* 2011, Wyn-Jones *et al.* 2011).

Dentre os vírus entéricos associados a surtos de veiculação hídrica, estão os rotavírus espécie A (RVA), os norovírus (NoV), os HAdV e o vírus da hepatite A (HAV), reconhecidos como os principais agentes etiológicos da gastroenterite infantil aguda e da hepatite entérica, respectivamente. A investigação destes vírus em uma lagoa urbana, utilizada para atividades recreacionais, como a Lagoa Rodrigo de Freitas na cidade do Rio de Janeiro, teve como objetivo principal avaliar a disseminação destes agentes neste ecossistema, que ao longo dos anos vem sofrendo com o aporte incessante de águas servidas e de matéria sólida, o que prejudicou a qualidade de suas águas (Alves *et al.* 1998). Com este propósito estes vírus foram detectados, quantificados e caracterizados molecularmente em concentrados de águas superficiais da lagoa e de ecossistemas associados, como o Rio dos Macacos e a Praia do Leblon, sendo os resultados previamente publicados (Mendes 2009, Vieira 2010, Vieira *et al. in press*). Este trabalho tem como objetivo reunir os dados obtidos nestes estudos, apresentando uma visão global do estudo de caracterização viral deste ecossistema.

### ROTAVÍRUS ESPÉCIE A

Os rotavírus (RV) são os principais agentes etiológicos da GA em crianças com idade inferior a cinco anos em todo o mundo, sendo responsáveis por aproximadamente 40% das internações relacionadas à GA (CDC 2008, Chandran *et al.* 2010).

Descritos pela primeira vez em 1973, em Melbourne, Austrália, os RV pertencem à família *Reoviridae*, gênero *Rotavirus* (Bishop *et al.* 1973, Flewett *et al.* 1973, Flewett & Woode 1978). A partícula é não-envelopada, apresenta simetria icosaédrica, mede aproximadamente 100nm de diâmetro e é composta por 11 segmentos de RNA fita dupla (RNAfd) (Estes & Kapikian 2007).

Os RV são classificados em sete sorogrupos distintos (A-G) baseando-se nas propriedades antigênicas da sua proteína estrutural VP6. Os sorogrupos A, B, e C têm sido encontrados em humanos e animais, enquanto os sorogrupos D-G somente em animais (Estes & Kapikian 2007, Chandran *et al.* 2010).

A classificação dos RVA em genótipos consiste em um sistema binário baseado na especificidade das proteínas VP7 e VP4. Assim, foram estabelecidos os genótipos/sorotipos G (glicoproteína) e P (sensível a protease) para VP7 e VP4, respectivamente, sendo descritos até o momento 19 genótipos G e 27 genótipos P (Ciarlet *et al.* 2008, Matthijnssens *et al.* 2008a, 2008b). Recentemente, Matthijnssens *et al.* (2008a, 2008b) propuseram um novo sistema de classificação para os RVA, tendo como base as propriedades moleculares dos 11 segmentos de RNAfd. Análises filogenéticas sugerem que as características moleculares dos genes que codificam para as proteínas VP1 (*RNA-dependent RNA polymerase*), VP2 (*Core Protein*), VP3 (*Methyltransferase*), VP6 (*Inner Capsid*), NSP1 (*Interferon Antagonist*), NSP2 (*NTPase*), NSP3 (*Translation Enhancer*), NSP4 (*Enterotoxin*) e NSP5 (*pHosphoprotein*) resultam em 4, 5, 6, 11, 14, 5, 7, 11 e 6 diferentes genótipos, respectivamente.

Em função do genoma segmentado, os genes podem segregar independentemente e gerar partículas com combinações diferentes destes genes e, conseqüentemente, de suas proteínas. Mais de 40 combinações G-P já foram descritas, entretanto estudos de epidemiologia molecular de RVA têm demonstrado que são cinco os genótipos mais comumente detectados no mundo: G1P[8], G2P[4], G3P[8], G4P[8] e G9P[8] (Santos & Hoshino 2005).

As infecções por RVA produzem quadros infecciosos que vão desde casos assintomáticos, principalmente em adultos, a casos graves de diarreia, que acometem principalmente crianças menores de dois anos. Casos graves em adultos podem ocorrer devido às infecções por genótipos não usuais ou por concentrações extremamente elevadas de partículas virais. A diarreia é a principal manifestação clínica, porém sintomas como vômito, dores abdominais e desidratação, sendo este último o principal fator de mortalidade do hospedeiro, podem ser observados. O período de incubação pode variar de 12 a 48 horas e a doença é autolimitada, normalmente após cinco dias do início da infecção, podendo chegar a 10, o quadro se resolve (Estes & Kapikian 2007, Greenberg & Estes 2009). A eliminação de partículas virais pelas fezes inicia-se antes ou após o término da diarreia e pode levar de quatro a 57 dias, com média de 10 dias (Richardson *et al.* 1998).

A epidemiologia dos RVA é complexa, com variados estudos apontando diversos genótipos P e G de RVA co-circulando dentro de uma mesma região, com prevalências alternadas anualmente de um dado genótipo em uma determinada região. Outra observação é que os genótipos prevalentes em diferentes regiões de um país podem ser diferentes dentro do mesmo período epidêmico (Pérez-Vargas *et al.* 2006).

Vacinas anti-RVA tem sido desenvolvidas ao longo de duas décadas. A vacina Rotarix<sup>®</sup>, desenvolvida pela GlaxoSmithKline Biologicals, de especificidade genotípica G1P[8], foi introduzida no Programa Nacional de Imunização (PNI) em março de 2006, porém já estava disponível desde 2005 em clínicas e consultórios particulares (Carvalho-Costa *et al.* 2011).

Linhares *et al.* (1977) descreveram o primeiro relato de casos de gastroenterite infantil aguda associado aos RVA na América Latina, observando por microscopia eletrônica (ME) partículas semelhantes aos RV em fezes de crianças com diarreia aguda em Belém do Pará, Brasil. Desde então, diversos outros trabalhos têm sido publicados demonstrando os casos de GA associados aos RV no país. Em uma extensa revisão dos artigos que descrevem a genotipagem de RVA circulantes no Brasil em dois períodos pré-vacinais compreendidos entre 1982-1995 e 1996-2005, Leite *et al.* (2008) demonstraram que as combinações mais frequentemente encontradas foram: G1P[8]/G1P[NT] (43%), G9P[8]/ G9P[NT] (20%), G2P[4]/ G2P[NT] (9%), G3P[8]/ G3P[NT] (6%), G4P[8]/ G4P[NT] (4%) e G5P[8]/ G5P[NT] (4%). A partir de 2005, foi observada a reemergência do genótipo G2P[4] no país, com predominância desse genótipo no período de 2006 a 2008. O mesmo ocorreu após a introdução da vacina em outros países, o que levou a especulação sobre a relação da vacinação com essa reemergência. Entretanto, o genótipo G2P[4] também foi detectado em países em que não havia sido implementada a vacinação contra os RVA e estudos apontaram que esta reemergência estaria associada a flutuações naturais na distribuição dos genótipos dos RVA (Carvalho-Costa *et al.* 2011).

## NOROVIRUS

Os NoV são responsáveis por cerca de 50% dos surtos de gastroenterite em todo o mundo,

correspondendo a aproximadamente 93% das gastroenterites não-bacterianas (Patel *et al.* 2009). Estima-se que os NoV sejam responsáveis por 64.000 episódios diarreicos que requerem hospitalização, 900.000 consultas clínicas em crianças de países industrializados e acima de 200.000 óbitos de crianças com idade inferior a cinco anos em países em desenvolvimento (Patel *et al.* 2008).

O NoV pertence à família *Caliciviridae*, gênero *Norovirus*, e foi o primeiro vírus descrito como causador da GA, quando foi detectado por ME em amostras de um surto de gastroenterite em crianças de uma escola primária na cidade de Norwalk, Ohio, Estados Unidos (Kapikian *et al.* 1972). O gênero *Norovirus* está dividido em cinco genogrupos (GI-GV) baseando-se na análise da seqüência de informação obtida da região que codifica a proteína de capsídeo VP1, sendo os genogrupos I, II e IV responsáveis por infecções em humanos. Os G são constituídos de genótipos (GG), que representam a unidade mínima de classificação dos NoV. Até o momento foram descritos oito GG no GI e 20 no GII (Zheng *et al.* 2006, Patel *et al.* 2009).

O genoma dos NoV é composto de um RNA fita simples (RNAs) com polaridade positiva e sua partícula é não-envelopada, apresenta simetria icosaédrica, mede aproximadamente 40nm de diâmetro e apresenta 32 depressões em forma de taça na sua superfície (Patel *et al.* 2009).

As infecções por NoV são caracterizadas por diarreia e vômito. Essas manifestações podem estar acompanhadas por náusea, câimbras abdominais, cefaléia, febre e mialgia (Thornton *et al.* 2004, Bull *et al.* 2006). Os sintomas manifestam-se de 12 a 72 horas e os vírus são eliminados por um período que pode exceder 22 dias. O período de incubação é de 12 a 48 horas, a doença é geralmente branda e autolimitada, afetando indivíduos de todas as faixas etárias (Clark & McKendrick 2004, Thornton *et al.* 2004, Patel *et al.* 2009).

A principal via de transmissão dos NoV é fecal-oral, com a infecção primária ocorrendo principalmente pela ingestão de água e alimentos contaminados, resultando em altas taxas de transmissão e grandes surtos. A transmissão também pode ocorrer pelo contato com superfícies contaminadas e pela formação de aerossóis (vômitos) gerando infecções secundárias. A baixa dose infecciosa requerida para ser estabelecida a

infecção, a eliminação prolongada de partículas nas fezes, a estabilidade no ambiente, a grande diversidade genética e a baixa imunidade contribuem na disseminação de casos e explicam a disseminação rápida e extensa de surtos de doenças em ambientes fechados, como hospitais, hotéis, cruzeiros e creches (Estes *et al.* 2000, Glass *et al.* 2000, Fankhauser *et al.* 2002, Widdowson *et al.* 2005, Bull *et al.* 2006, Patel *et al.* 2009).

Surto e casos esporádicos de GA associados aos NoV podem ocorrer durante todo o ano, embora se observem diferentes padrões de sazonalidade nos hemisférios norte e sul para a maioria dos surtos. No hemisfério norte, os casos ocorrem com maior frequência no inverno ou na estação seca, enquanto que no sul são mais frequentes no verão (Froggatt *et al.* 2004, Parashar *et al.* 2004, Bon *et al.* 2005, Fretz *et al.* 2005, Ike *et al.* 2006).

Trabalhos desenvolvidos em diversos países do mundo têm demonstrado a importância dos NoV nas GA, especialmente os NoV GI.4, descritos como os mais prevalentes. Além disso, nesses trabalhos pode-se observar a grande diversidade genética dos NoV e a descrição de novas cepas circulantes (Vidal *et al.* 2005, Bon *et al.* 2005, Okada *et al.* 2005, Colomba *et al.* 2006, Ike *et al.* 2006).

No Brasil, alguns estudos têm demonstrado a importância dos NoV em surtos e/ou em casos esporádicos de gastroenterite infantil aguda (Castilho *et al.* 2006, Soares *et al.* 2007, Victoria *et al.* 2007, Campos *et al.* 2008, Ferreira *et al.* 2008, Nakagomi *et al.* 2008, Ribeiro *et al.* 2008, Ferreira *et al.* 2010).

### ADENOVÍRUS HUMANOS

Os HAdV são responsáveis por 7 a 8% das doenças respiratórias em crianças em todo o mundo e cerca de 10% de todas as doenças febris que acometem crianças são atribuídas a esses vírus, que são também os patógenos mais associados a infecções oculares (Santos & Soares 2008).

Os HAdV pertencem à família *Adenoviridae*, gênero *Mastadenovirus*. Atualmente, são descritos 51 sorotipos de HAdV (HAdV1-51), subdivididos em 6 espécies (A – F) de acordo com suas propriedades físico-químicas, imunológicas e bioquímicas, que estão associadas a uma grande variedade de enfermidades,

como faringite, amigdalite, bronquite, bronquiolite, pneumonia, conjuntivite, cistite e gastroenterite (Berk 2007).

Os HAdV são vírus não-envelopados, de simetria icosaédrica e apresentam um DNA fita dupla (DNAfd) como material genético. Esses vírus possuem aproximadamente 70-100nm de diâmetro e seu capsídeo é composto por 252 capsômeros, dos quais 240 são hexons e 12 são pentons (Berk 2007).

A maioria das doenças causadas por HAdV são agudas e autolimitadas. Embora a fase sintomática possa ser curta, os vírus podem permanecer no trato gastrointestinal e continuam a ser excretados por um período prolongado de tempo (Mena & Gerba 2008).

Os HAdV foram responsáveis por numerosos surtos em instalações para crianças, como creches, escolas e orfanatos (Chiba *et al.* 1983, Payne *et al.* 1984, McMinn *et al.* 1991), hospitais e centros de saúde (Brummitt *et al.* 1988, Krajden *et al.* 1990, McMinn *et al.* 1991) e instalações militares (Dingle & Langmuir 1968, Meiklejohn 1983).

A importância dos HAdV e o papel que a água desempenha na sua epidemiologia, assim como o risco que a presença destes patógenos na água traz para o homem, são reconhecidos em todo o mundo (Puig *et al.* 1994). Sua investigação tem sido importante na avaliação da qualidade viral da água por ser de fácil detecção por métodos moleculares e por apresentarem maior estabilidade em vários tipos de ambientes (água de esgoto, de mar e de abastecimento) que outros vírus entéricos (Puig *et al.* 1994, Castignolles *et al.* 1998, Papapetropoulou & Vantarakis 1998, Gerba *et al.* 2002).

A aplicação de técnicas moleculares tem permitido identificar adenovírus em praticamente 100% das amostras de água residuais urbanas analisadas em diversas cidades da África, Estados Unidos, Suécia, França, Grécia e Reino Unido e são os vírus detectados em um maior número de amostras de moluscos bivalves cultivados em águas marinhas com alguma presença de contaminação fecal (Formiga-Cruz *et al.* 2002). Os adenovírus foram incluídos recentemente na lista de contaminantes candidatos da “United States Environmental Protection Agency” (USEPA), devido a sua grande prevalência em águas residuais, sua relação com diversas patologias, sua resistência no meio ambiente e a alguns dos tratamentos utilizados

nos processos de depuração de água. A USEPA indica o grupo dos vírus entéricos como o mais seguro e confiável para o monitoramento ambiental (EPA 1988, Van Heerden *et al.* 2003). Os resultados obtidos sobre a abundância destes vírus e a capacidade de detectar de forma específica a presença de adenovírus de origem humana ou de origem animal (Maluquer de Motes *et al.* 2004) sugerem sua utilidade como índice molecular de contaminação fecal e como instrumento para se determinar a origem da contaminação.

### VÍRUS DA HEPATITE A

O HAV está classificado na família *Picornaviridae* como representante único do gênero *Hepatovirus*. A partícula viral, não-envelopada, apresenta simetria icosaédrica e diâmetro de 27 a 32nm (Feinstone *et al.* 1973, Winokur *et al.* 1991, Winokur & Stapleton 1992). Como os demais membros da família *Picornaviridae*, o HAV possui genoma RNAfs com polaridade positiva, de 7,5kb. Uma única fase de leitura aberta (ORF), composta por três regiões distintas (P1, P2 e P3), é traduzida em uma única poliproteína de 2.225 a 2.227 aminoácidos (Cohen *et al.* 1987).

O HAV causa infecção autolimitada com manifestações clínicas variáveis - desde uma infecção assintomática ou inaparente a quadros mais graves podendo, inclusive, levar à morte por insuficiência hepática aguda fulminante. A probabilidade de desenvolvimento de doença clinicamente aparente a partir da infecção por HAV aumenta com a idade (Nainan *et al.* 2006). Em adultos e crianças maiores, a infecção é geralmente sintomática com presença de icterícia em >70% dos pacientes (Lednar *et al.* 1985).

O HAV é transmitido por via fecal-oral e tem como principal modo de transmissão o contato próximo com pessoas infectadas e a ingestão de alimentos ou água contaminados. Altas concentrações do vírus são eliminadas nas fezes dos indivíduos infectados (até  $10^{11}$  partículas virais/g). Condições precárias de higiene e saneamento facilitam a transmissão do vírus devido à alta resistência do HAV em ambiente aquático e são frequentemente associadas a surtos (Bosch *et al.* 1991, Halliday *et al.* 1991).

A hepatite A é uma doença de distribuição global, apresentando pelo menos três padrões epidemiológicos classificados de acordo com as condições socioeconômicas e sanitárias das diferentes

regiões geográficas (Gust 1992, Melnick 1995). O primeiro padrão é apresentado pelos países com condições sanitárias precárias, onde a maioria das crianças se infecta nos primeiros anos de vida e desenvolve a forma assintomática da doença e acima de 10 anos a população é imune ao HAV em quase sua totalidade. No segundo padrão estão os países desenvolvidos, onde as barreiras ambientais impedem o contato com o vírus na infância, resultando em um grande número de adultos suscetíveis que podem se contaminar a qualquer exposição ao vírus, sendo a infecção sintomática mais freqüente. O terceiro padrão ocorre nos países em desenvolvimento, apresentando melhorias nas condições de higiene e saneamento.

Melhorias nas condições socioeconômicas e no padrão sanitário possuem um reflexo no padrão de endemicidade da infecção pelo HAV. Nas últimas décadas, houve mudanças na epidemiologia da hepatite A, migrando de um padrão endêmico de alta para um de endemicidade intermediária em diversas regiões, principalmente nos grandes centros urbanos (Vital *et al.* 2006, 2008). No Brasil, a região Sudeste apresenta as menores taxas de soroprevalência da infecção pelo HAV. No estado do Rio de Janeiro, Vital *et al.* (2006, 2008) assinalam que as mudanças na prevalência do HAV vêm ocorrendo independente do nível sócio-econômico da população. O principal aspecto epidemiológico resultante da diminuição da prevalência do HAV representa o aumento no número de indivíduos de grupos etários mais elevados suscetíveis à infecção (Vital *et al.* 1998). Como resultado, observa-se um aumento na freqüência de casos clínicos mais graves de hepatite A aguda, além da possibilidade da ocorrência de surtos da doença (Cuthbert 2001).

## MATERIAL E MÉTODOS

### ÁREA DE ESTUDO

A Lagoa Rodrigo de Freitas, localizada na zona sul da cidade do Rio de Janeiro, possui um espelho d'água de 2,2km<sup>2</sup>, profundidade média de 2,8m e 7,8km de perímetro, com volume de aproximadamente 6.200.000m<sup>3</sup>. Liga-se ao mar pelo canal do Jardim de Alah, que possui 800m de comprimento e entre 10 e 18 metros de largura. A sua bacia hidrográfica é formada basicamente pelos

rios dos Macacos e Cabeça, que desembocam na rua Gal. Garzon, e pelo rio Rainha, que deságua no canal da Av. Visconde de Albuquerque (INEA 2009).

A Lagoa está localizada na malha urbana de uma área de alta densidade populacional na cidade e recebeu despejos domésticos por longo período, e ainda os recebe acidentalmente, gerando alterações em seu ecossistema. Melhorias de expansão da rede coletora (galeria de cintura) empreendidas eliminaram parte desses despejos em tempo seco. Atualmente o grupo de trabalho desenvolve ações visando à revitalização da vertente sul da serra da Carioca (INEA 2009, Projeto Ambiental Lagoa Limpa 2009).

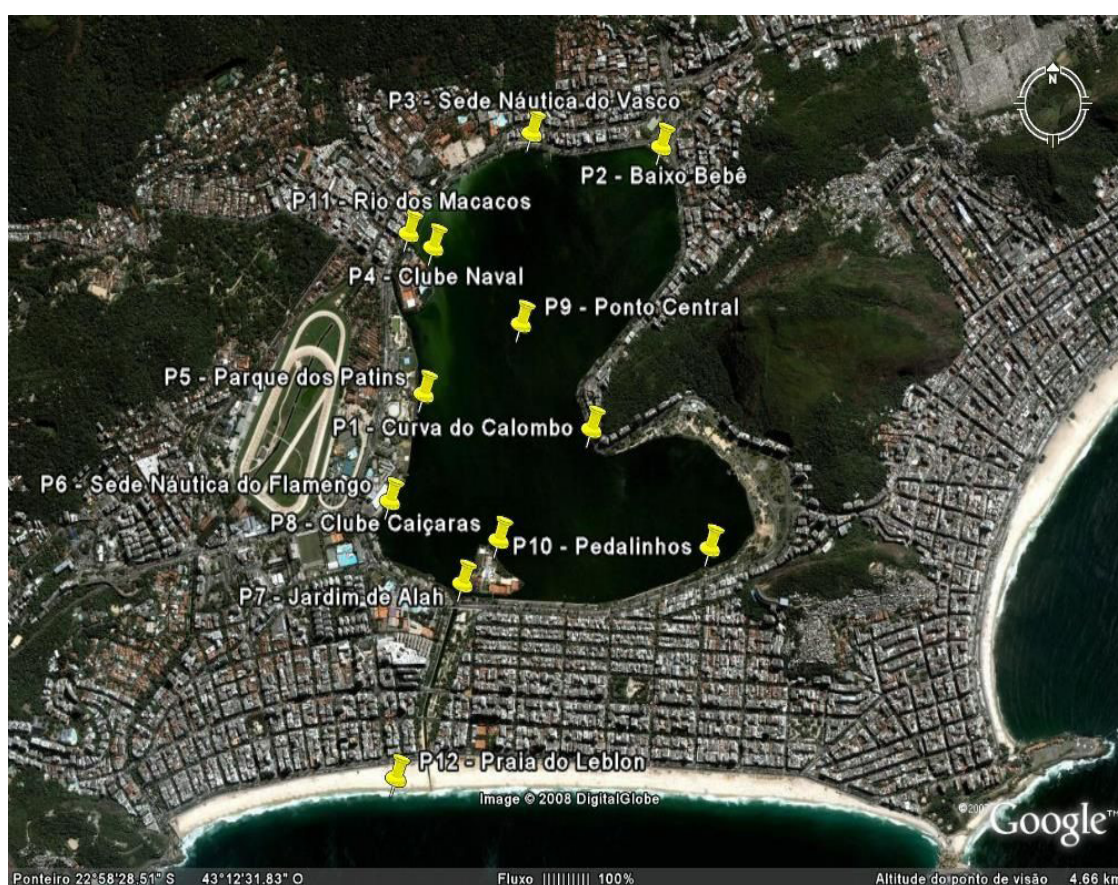
A Lagoa Rodrigo de Freitas se inclui na categoria de lagoa sufocada, por apresentar uma única via de comunicação com o mar. Devido à ineficiente troca de suas águas com o mar, faz-se longo o tempo de residência de suas águas, o que gera um acúmulo de materiais em suspensão e matéria orgânica que aí aportam (INEA 2009).

## COLETA

Para avaliação da disseminação viral na Lagoa Rodrigo de Freitas (água salobra), foram realizadas coletas mensais de 2L de água superficial no período de Agosto de 2007 a Julho de 2008. Os pontos de coleta foram determinados utilizando-se o sistema de posicionamento global GPS (Garmin etrex® Legend, EUA) e escolhidos de maneira que todo o entorno lagunar fosse representado, incluindo áreas de lazer e prática de esportes, além de um ponto central, um ponto no Rio dos Macacos (água doce) e um ponto na Praia do Leblon (água salgada), próximo à saída do canal de Jardim de Alah (Figura 1).

## CONCENTRAÇÃO VIRAL

As amostras foram concentradas por metodologia baseada na adsorção-eluição dos vírus em membrana carregada negativamente, descrita por Katayama *et al.* (2002).

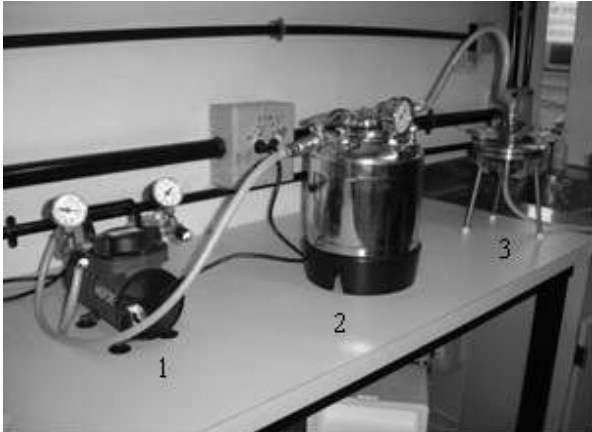


**Figura 1.** Mapa geográfico da Lagoa Rodrigo de Freitas, município do Rio de Janeiro, RJ: localização dos pontos de coleta (Mendes 2009, Vieira 2010, Vieira *et al.* in press).

**Figure 1.** Geographical map of Rodrigo de Freitas Lagoon, Rio de Janeiro, RJ: water sample collection sites (Mendes 2009, Vieira 2010, Vieira *et al.* in press).



As amostras foram previamente clarificadas para a remoção de resíduos grosseiros por filtração com pré-filtro AP-20® (membrana de 142mm de diâmetro, Millipore®, Brasil) utilizando um Sistema de Filtração Millipore (Millipore®, Brasil), constituído por uma bomba de vácuo, um recipiente de pressão e um suporte de membranas (Figura 2).



**Figura 2.** Sistema de filtração Millipore®. 1 - Bomba de vácuo com manômetros; 2 - Recipiente de pressão; 3 - Suporte de membranas.

**Figure 2.** Millipore® filtration system. 1 - Vacuum pump; 2 - Pressure vessel; 3 - Support of membranes.

Após a clarificação, foram adicionados às amostras 25mL de cloreto de magnésio (MgCl<sub>2</sub>, Vetec, Brasil) a uma concentração final de 25mM. O pH foi ajustado para 5,0 com a adição de ácido clorídrico 6N (HCl, Merck, Brasil). Em seguida, as mesmas foram filtradas em membrana HA carregada negativamente (142mm de diâmetro, malha de 0,45µm, Millipore®, Brasil) acoplada ao suporte do sistema de filtração. A membrana foi rinsada com 350mL de ácido sulfúrico 0,5mM (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, Merck, Brasil). Os vírus foram eluídos em 15mL de hidróxido de sódio 3mM, pH 10,5 (NaOH, Vetec, Brasil) por agitação em placa de petri durante 10 minutos. O eluato foi neutralizado pela adição de 50µL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 50mM e 50µL de tampão Tris-EDTA (TE) 100x (10µM Tris, 1mM EDTA, pH 8,0) e transferido para uma unidade do concentrador Centriprep® YM-50 (Millipore, Brasil) (Figura 3). Em seguida, foi realizada centrifugação a 1500xg por 10 minutos a 4°C, até ser obtido um volume final de 2mL.

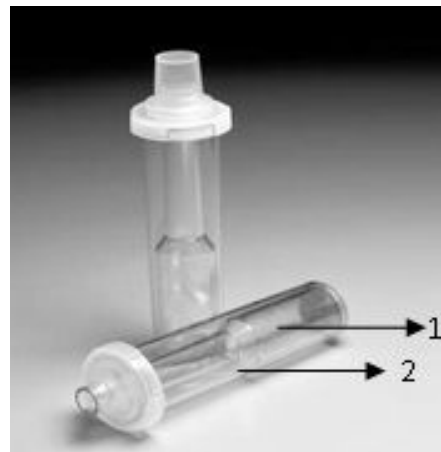
### DETECÇÃO VIRAL

O material genético viral foi extraído das amostras concentradas utilizando-se o conjunto de reagentes

comercial “QIAamp Viral RNA Mini Kit” (Qiagen, Valencia, Espanha), seguindo as recomendações do fabricante. Foram utilizados controles negativo e positivo ao longo de todo o processamento da amostra.

A síntese do DNA complementar (cDNA) de RVA, NoV e HAV foi realizada utilizando-se o iniciador randômico pd(N)<sub>6</sub> (Amersham Biosciences, EUA) (Ferreira *et al.* 2009).

Para detecção viral foram realizados protocolos de reação em cadeia pela polimerase convencional (PCR) e quantitativa em tempo real (qPCR) previamente estabelecidos (Tabela 1). HAdV foram pesquisados somente por qPCR por serem estudados como possíveis marcadores virais de contaminação fecal humana.



**Figura 3.** Concentrador Centriprep® YM-50, Millipore®. 1-Tubo coletor; 2- Recipiente externo para a amostra.

**Figure 3.** Centriprep YM-50® Concentrator, Millipore®. 1- Collection tube; 2- Outer container for the sample.

### CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR

Para o sequenciamento nucleotídico foram utilizados os amplicons obtidos pela PCR convencional (Tabela 1). Os produtos foram purificados utilizando o kit comercial QIAquick® PCR Purification kit (QIAGEN, Valencia, CA, EUA) ou QIAquick® Gel Extraction kit (QIAGEN, Valencia, CA, EUA). Após a purificação, os produtos foram quantificados em espectrofotômetro NanoDrop™ (Thermo Scientific, EUA).

Para o sequenciamento direto dos produtos amplificados e purificados foi utilizado o kit comercial “Big Dye Terminator® v3.1 Cycle Sequencing Kit” (Applied Biosystems®, CA, EUA), conforme recomendações do fabricante. Foram

**Tabela 1.** Protocolos de amplificação genômica pela reação em cadeia pela polimerase convencional e quantitativa para detecção de rotavírus espécie A (RVA), norovírus (NoV), adenovírus humanos (HAdV) e vírus da hepatite A (HAV).**Table 1.** Genomic amplification protocols for species *A rotavirus (RVA)*, *norovirus (NoV)*, *human adenovirus (HAdV)* and *hepatitis A virus (HAV)* detection by conventional and quantitative polymerase chain reaction.

Virus	PCR	Região do genoma	Referência
RVA	RT-PCR	VP6	Iturriza-Gómara <i>et al.</i> 2002
	RT-qPCR	NSP3	Zeng <i>et al.</i> 2008
NoV-GI/GII	Semi-Nested RT-PCR	Polimerase	Boxman <i>et al.</i> 2006
	RT-qPCR	Junção ORF1-ORF2	Kageyama <i>et al.</i> 2003
	RT-PCR	VP1	Vinjé <i>et al.</i> 2004
HAdV	qPCR	Hexon	Heim <i>et al.</i> 2003
HAV	Nested RT-PCR	Junção VP1/2A	De Paula <i>et al.</i> 2002
	RT-qPCR	5' Não codificante	Jothikumar <i>et al.</i> 2005

utilizados os mesmos iniciadores de cadeia utilizados na reação de PCR de cada um dos vírus. As reações de sequência e os cromatogramas das sequências foram obtidos a partir do sequenciador automático de 48 capilares “ABI Prism 3730 Genetic Analyzer” (Applied Biosystems, CA, EUA) do serviço da “Plataforma de Sequenciamento de DNA PDTIS/FIOCRUZ”.

As sequências nucleotídicas foram editadas e alinhadas utilizando o método CLUSTAL W (Thompson *et al.* 1994), contido no programa BioEdit® (Hall *et al.* 1999). As sequências protótipos representantes dos diferentes genótipos de RVA e HAV de origem humana e animal, descritas em diferentes países, foram resgatadas no site do NCBI (National Center for Biotechnology Information - <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) através dos seus números de acesso ou mediante a utilização da ferramenta BLAST (Basic Local Alignment Search Tool), disponível no Genbank.

As relações filogenéticas entre as diferentes sequências foram determinadas mediante a utilização do pacote de programas MEGA v.4.0 (Tamura *et al.* 2007) através do método de reconstrução filogenética Neighbor-joining. As distâncias genéticas entre as diferentes amostras foram calculadas mediante o modelo Kimura-dois-parâmetros como modelo de substituição nucleotídica. A significância estatística das diferentes filogenias obtidas foi estimada através de 2.000 réplicas de bootstrap.

## PARÂMETROS MICROBIOLÓGICOS

Para a quantificação de *Escherichia coli* (*E. coli*) foi utilizado o Kit Colilert®-18 Quanti-Tray®/2000 (IDEXX Laboratories, Westbrook, EUA), seguindo as recomendações do fabricante. Este método baseia-se na observação de fluorescência gerada pela metabolização de nutrientes presentes no meio de cultura pela *E. coli*.

O processamento das amostras foi realizado dentro de até 2 horas após a coleta e foram necessárias diluições seriadas das mesmas. As amostras coletadas nos dez pontos do entorno da Lagoa e no ponto da Praia do Leblon foram analisadas nas diluições  $10^0$ ,  $10^{-1}$  e  $10^{-2}$ . As amostras da desembocadura do Rio dos Macacos foram analisadas nas diluições  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$  e  $10^{-3}$ .

Segundo a Resolução CONAMA n° 274, de 29 de novembro de 2000, as águas destinadas a balneabilidade (recreação de contato primário) têm sua condição avaliada nas categorias próprias e impróprias baseando-se nos valores obtidos para *E. coli*. Em função de as coletas serem realizadas mensalmente, considerou-se o parágrafo 4° do artigo 2° desta para a análise da água por este parâmetro, que considera amostras próprias aquelas cujos valores obtidos encontram-se abaixo de 2000NMP (número mais provável) de *E. coli*/100mL.

Para avaliar-se a possível correlação entre a detecção de HAdV como um possível marcador

viral de contaminação fecal humana e quantificação de *E. coli* dentro e fora do padrão estabelecido pela legislação vigente, foi realizado o teste qui-quadrado ( $\chi^2$ ) cuja hipótese nula foi a distribuição homogênea de detecção viral entre as classes microbiológicas (*E. coli* > 2000NMP/100mL e *E. coli* < 2000NMP/100mL).

As análises de correlação foram realizadas apenas com as 120 amostras provenientes da Lagoa Rodrigo de Freitas, foco de estudo, em função dos pontos Rio dos Macacos e Praia do Leblon não apresentarem uma amostragem adequada para análise (n=12 para cada ponto).

## RESULTADOS

Foram realizadas 12 coletas mensais ao longo de um ano em 12 pontos de coleta, incluindo 10 pontos na Lagoa Rodrigo de Freitas, um no Rio dos Macacos, que desemboca na Lagoa, e um na praia do Leblon, onde a água da Lagoa é escoada, totalizando 144 amostras.

As tabelas 2 e 3 apresentam os resultados obtidos pela análise conjunta da metodologia de concentração com as ferramentas moleculares de detecção convencional e quantitativa dos RVA, NoV, HAdV e HAV nos pontos avaliados.

**Tabela 2.** Detecção de rotavírus espécie A (RVA), norovírus (NoV), adenovírus humanos (HAdV) e vírus da hepatite A (HAV) de acordo com o tipo de matriz aquática (Mendes 2009, Vieira *et al.* in press).

**Table 2.** Detection of species A rotavirus (RVA), norovirus (NoV), human adenovirus (HAdV) and hepatitis A virus (HAV) detection according to water samples matrices (Mendes 2009, Vieira *et al.* in press).

Pontos de coleta (matriz analisada)	No. de positivas/No. de analisadas (%)				Total
	RVA	NoV	HAdV	HAV	
Lagoa Rodrigo de Freitas (salobra)	30/120 (25)	21/120 (17,5)	20/120 (16,7)	27/120 (22,5)	71/120 (59,2) * <sup>1</sup>
Rio dos Macacos (doce)	3/12 (25)	4/12 (33,3)	2/12 (16,7)	1/12 (8,3)	6/12 (50)* <sup>2</sup>
Praia do Leblon (salgada)	2/12 (16,7)	2/12 (16,7)	2/12 (16,7)	3/12 (25)	7/12 (58,3)* <sup>3</sup>
<b>Total</b>	35/144 (24,3)	27/144 (18,8)	24/144 (16,7)	31/144 (21,5)	84/144 (58,3)

\*<sup>1</sup> 10 amostras foram positivas para RVA e HAV; 3 foram positivas para NoV e HAV; 4 foram positivas para RVA e HAdV; 2 foram positivas para RVA, NoV e HAV; 2 foram positivas para RVA, HAdV e HAV; 1 foi positiva para HAdV e HAV; e 1 foi positiva para RVA e NoV

\*<sup>2</sup> 1 amostra foi positiva para HAdV e HAV; 1 foi positiva para NoV e HAdV; 1 foi positiva para RVA e NoV

\*<sup>3</sup> 1 amostra foi positiva para RVA, HAdV e HAV

**Tabela 3.** Quantificação de rotavírus espécie A (RVA), norovírus (NoV), adenovírus humanos (HAdV) e vírus da hepatite A (HAV) nas amostras positivas (Mendes 2009, Vieira *et al.* in press).

**Table 3.** Quantification of species A rotavirus (RVA), norovirus (NoV), human adenovirus (HAdV) and hepatitis A virus (HAV) in the positive water samples (Mendes 2009, Vieira *et al.* in press).

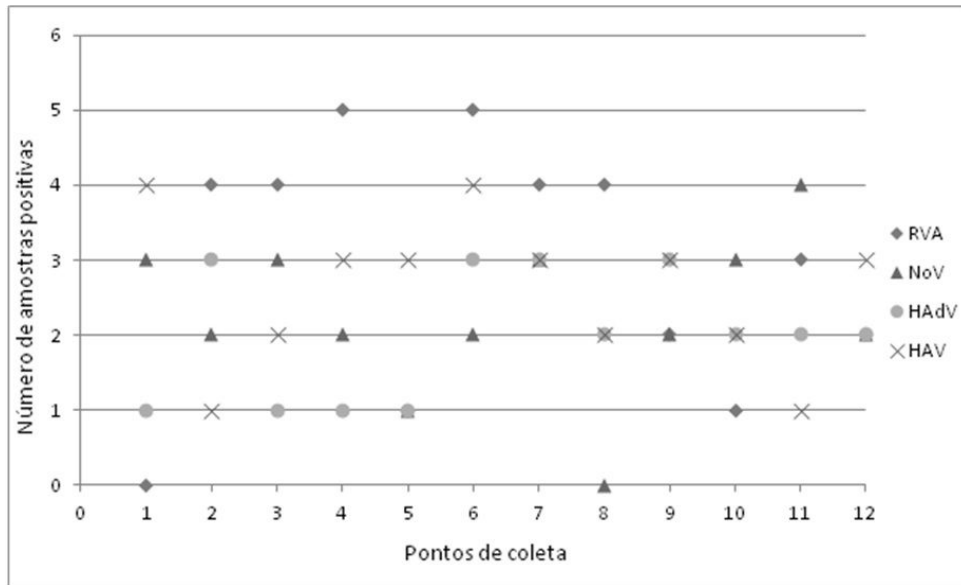
Vírus	Cópias de genoma/litro
RVA	3,0 x 10 <sup>1</sup> - 5,6 x 10 <sup>4</sup>
NoV	1,4 x 10 <sup>0</sup> - 3,2 x 10 <sup>2</sup>
HAdV	1,2 x 10 <sup>1</sup> - 1,2 x 10 <sup>3</sup>
HAV	1,3 x 10 <sup>4</sup> - 2,43 x 10 <sup>5</sup>

A distribuição dos vírus investigados, de acordo com os pontos de coleta, demonstra a disseminação destes em todos os pontos estudados (Figura 4).

Após a detecção por amplificação parcial do gene que codifica a proteína VP6 de RVA pela RT-PCR, sete amostras positivas foram sequenciadas e classificadas como pertencentes a I2 segundo nova classificação proposta (Figura 5). Os valores de identidade nucleotídica variaram de 98,7 a 99,6% entre as amostras da Lagoa e de 97,4 a 99,3% entre as amostras da Lagoa e às provenientes das crianças hospitalizadas por gastroenterites no Rio de Janeiro. Com o objetivo de se realizar a classificação binária

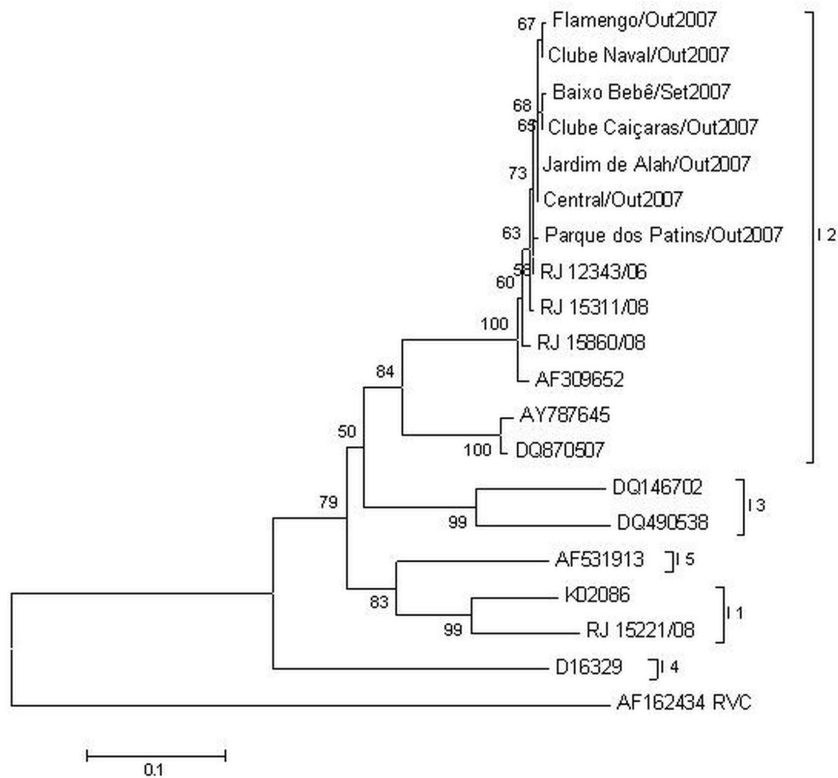
dos RVA, as amostras positivas foram amplificadas com iniciadores específicos para as regiões codificadoras das proteínas VP4 e VP7. Somente

uma amostra apresentou resultado positivo, sendo classificada como P4 (Vieira 2010, Vieira *et al. in press*).



**Figura 4.** Distribuição de rotavírus espécie A (RVA), norovírus (NoV), adenovírus humanos (HAdV) e vírus da hepatite A (HAV) de acordo com os pontos de coleta. Pontos de coleta: 1- Curva do Calombo; 2- Baixo Bebê; 3- Sede Náutica do Vasco da Gama; 4- Clube Naval; 5- Parque dos Patins; 6- Sede Náutica do Flamengo; 7- Jardim de Alah; 8- Clube Caiçaras; 9- Central; 10- Pedalinhos; 11- Rio dos Macacos; 12- Praia do Leblon.

**Figure 4.** Distribution of species A rotavirus (RVA), norovirus (NoV), human adenovirus (HAdV) and hepatitis A virus (HAV) according to collection sites. Collection sites: 1- Curva do Calombo; 2- Baixo Bebê; 3- Sede Náutica do Vasco da Gama; 4- Clube Naval; 5- Parque dos Patins; 6- Sede Náutica do Flamengo; 7- Jardim de Alah; 8- Clube Caiçaras; 9- Central; 10- Pedalinhos; 11- Macacos River; 12- Leblon Beach.



**Figura 5.** Dendrograma de caracterização molecular dos rotavírus espécie A (RVA) a partir do sequenciamento parcial do gene que codifica a proteína VP6 (Vieira 2010).

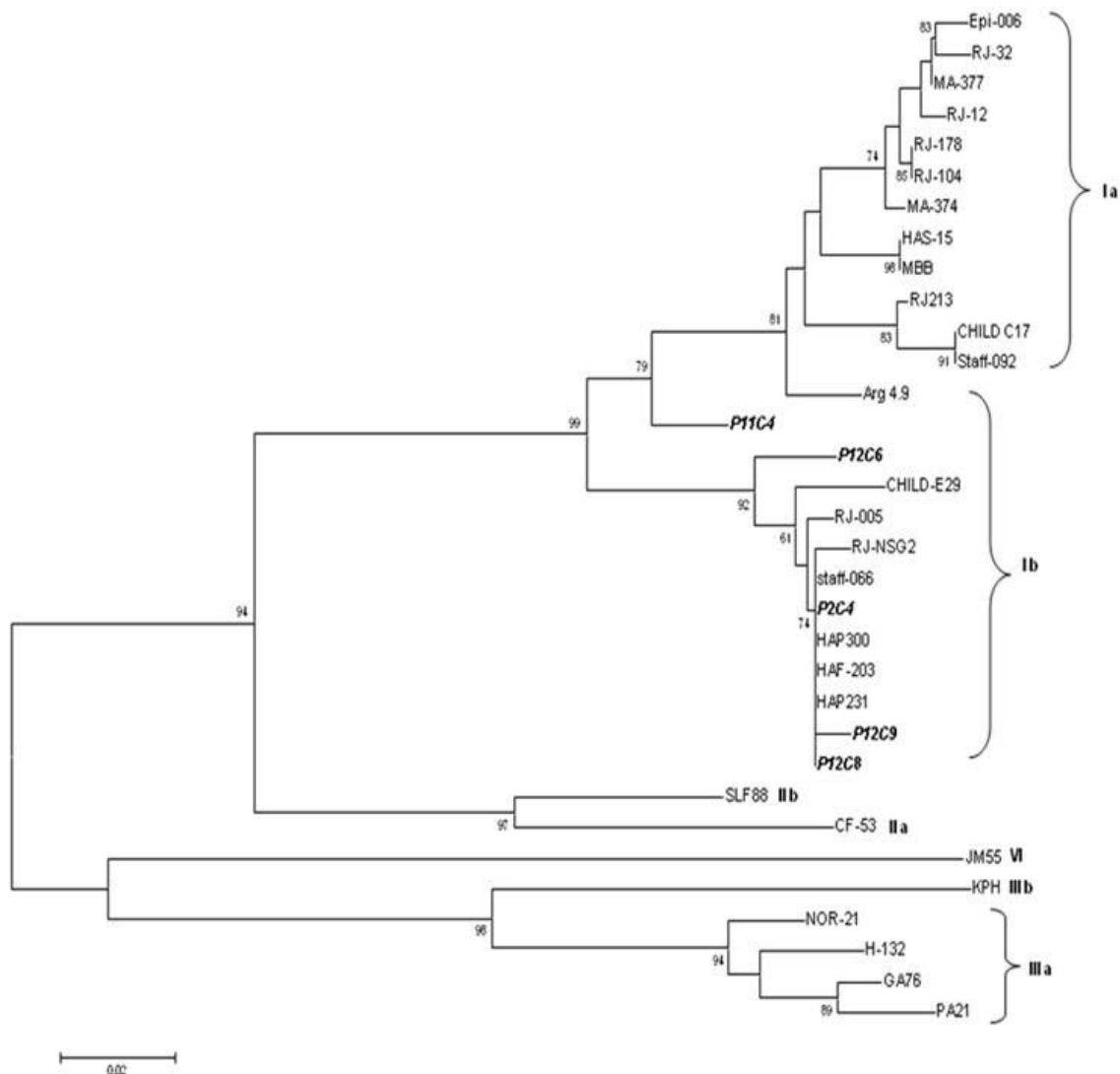
**Figure 5.** Dendrogram of molecular characterization of species A rotavirus (RVA) obtained from partial sequencing of VP6 protein coding region (Vieira 2010).

As seqüências nucleotídicas dos produtos de nested RT-PCR de 218 pares de bases da região VP1/2A do genoma do HAV de cinco amostras positivas foram determinadas para confirmação e caracterização do genótipo circulante no ambiente lagunar e marinho. As amostras foram classificadas como pertencentes aos genótipos IB (Figura 6), apresentando percentual de identidade nucleotídicas de 92,7% a 100% e agruparam com seqüências nucleotídicas provenientes de amostras clínicas isoladas no Rio de Janeiro (Mendes 2009).

Considerando o parágrafo 4º do artigo 2º da Resolução CONAMA 274 (2000), que considera amostras próprias aquelas cujos valores obtidos

encontram-se abaixo de 2000NMP *E. coli*/100mL, 95% (114/120) das águas da Lagoa, 16,7% (2/12) das águas provenientes do Rio dos Macacos e 83,3% (10/12) da Praia do Leblon foram consideradas próprias, totalizando 87,5 % (126/144) de amostras com valores abaixo do estabelecido para este parâmetro (Vieira 2010, Vieira *et al. in press*). Os pontos do Rio dos Macacos e Jardim de Alah (ponto 7) apresentaram índices mais elevados de contaminação para este parâmetro (Tabela 4).

RVA, NoV, HAdV e HAV foram detectados em 23,8% (30/126), 16,7% (21/126), 15,1% (19/126) e 23,0% (29/126), respectivamente, com um total de 57,1% (72/126) das amostras consideradas



**Figura 6.** Dendrograma construído pela análise filogenética de 218 nucleotídeos da região VP1/2A do genoma do vírus da hepatite A (HAV). 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: Lagoa Rodrigo de Freitas (P2C4), Rio dos Macacos (P11C4) e Praia do Leblon (P12C6, P12C8 e P12C9) (Mendes 2009).

**Figure 6.** Dendrogram obtained from the phylogenetic analysis of 218 nucleotide sequencing of hepatitis A virus (HAV) VP1/2A coding region. HAV sequences related to Rodrigo de Freitas Lagoon, Macacos River and Leblon Beach water samples are represented by P2C4 (Rodrigo de Freitas Lagoon), P11C4 (Macacos River) and P12C6, P12C8 and P12C9 (Leblon Beach), (Mendes 2009).

**Tabela 4.** Valores absolutos obtidos na análise microbiológica de *E. coli* em Número mais provável (NMP)/100mL nas amostras coletadas na Lagoa Rodrigo de Freitas, Rio dos Macacos e Praia do Leblon no período de Agosto de 2007 a Julho de 2008. Os valores em negrito e itálico indicam não conformidade com a legislação vigente (Mendes 2009, Vieira 2010).

**Table 4.** Quantification of *E. coli* in most probable number (MPN)/100 mL in water samples from Rodrigo de Freitas Lagoon, Macacos River and Leblon Beach from August 2007 to July 2008. The values in bold and italic indicate no accordance with current regulation (Mendes 2009, Vieira 2010).

Pontos Meses	Curva do Calombo	Baixo bebê	Sede Náutica do Vasco da Gama	Clube Naval	Parque dos Patins	Sede Náutica do Flamengo	Jardim de Alah	Clube 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	<b>12400</b>	<b>7170</b>
Outubro	496	757	294	504	368	1290	<b>2952</b>	612	203	236	<b>13000</b>	504
Novembro	74	104	144	310	386	345	359	116	630	134	<b>7358</b>	30
Dezembro	10	74	31	41	20	92	75	10	100	10	<b>2180</b>	41
Janeiro	328	272	322	111	377	546	<b>8704</b>	<b>6294</b>	170	91	<b>3224</b>	669
Fevereiro	74	518	276	175	116	20	393	63	100	96	<b>4471</b>	934
Março	126	30	185	84	100	234	234	10	10	121	<b>5348</b>	450
Abril	222	194	160	295	116	74	235	67	233	1388	<b>5120</b>	164
Maior	38	104	1946	61	644	195	<b>12760</b>	1430	605	75	1354	239
Junho	55	<b>10700</b>	12	763	488	269	1362	249	216	132	<b>8960</b>	289
Julho	58	240	250	68	60	238	<b>7520</b>	331	70	172	<b>5912</b>	<b>9528</b>

próprias. Considerando o HAdV como um possível marcador viral de contaminação fecal humana, a análise estatística demonstrou uma distribuição não homogênea entre positivos e negativos para HAdV com a classificação da água segundo a análise do parâmetro *E. coli* ( $p < 0,01$ ), entretanto não se pode afirmar que há uma relação positiva entre valores elevados de *E. coli* e detecção viral (Mendes 2009, Vieira 2010, Vieira *et al. in press*).

## DISCUSSÃO

Muitas águas utilizadas para recreação em zonas balneares de todo o mundo estão localizadas próximas a zonas urbanas e, portanto, estão sujeitas à contaminação por dejetos humanos, sendo, por isto, objeto de monitoramento para determinação da qualidade microbiológica da água. A Lagoa Rodrigo de Freitas está situada na zona sul da cidade do Rio de Janeiro e, em função da intensa ocupação urbana em seu entorno, sofreu com o aumento das atividades antropogênicas, ligações clandestinas de esgoto na rede pluvial e lançamentos de esgoto “in natura” diretamente em suas águas.

Indicadores bacterianos de contaminação fecal são utilizados rotineiramente para avaliar a qualidade microbiológica da água. Os resultados obtidos na quantificação de *E. coli* demonstraram que 87,5% das amostras estudadas encontravam-se dentro dos padrões de balneabilidade estabelecidos pela legislação vigente, demonstrando que o programa de despoluição estabelecido na Lagoa Rodrigo de Freitas vem gerando melhora na qualidade das suas águas. Os pontos do Rio dos Macacos e Jardim de Alah apresentaram índices mais elevados de contaminação para este parâmetro. Vale lembrar que estes dois ambientes influenciam diretamente a qualidade da água da Lagoa, o primeiro pelo aporte de água doce e carga orgânica e o segundo pela realização do balanço hídrico com o mar. Entretanto, a detecção de vírus em 57,1% das amostras consideradas próprias a balneabilidade evidencia uma contaminação de origem humana, uma vez que esses vírus são espécie-específicos, não constituem a microbiota gastrointestinal normal e são eliminados em fezes de indivíduos infectados (Abad *et al.* 1997, Grabow 2007). Estes resultados ressaltam a necessidade de se avaliar o risco de infecção humana, uma vez que a

detecção de *E. coli* dentro dos padrões aceitos para água de recreação não significou a ausência de RVA, NoV, HAdV ou HAV, comprovando que este padrão de qualidade não é suficiente para garantir a qualidade virológica da água. Desta forma, 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 potencial de risco para a saúde, uma vez que a presença de vírus não pode ser descartada (Gerba *et al.* 1979, Goyal *et al.* 1984, Skraber *et al.* 2004, Jiang 2006, Rose *et al.* 2006, Rajal *et al.* 2007, Miagostovich *et al.* 2008, Espinosa *et al.* 2009, Silva *et al.* 2010).

O presente estudo também avaliou o método de concentração viral utilizando filtração por membranas carregadas negativamente em água salobra. Este método foi selecionado por utilizar soluções inorgânicas na eluição viral não apresentando efeito inibitório quando associado às metodologias moleculares de detecção, sendo uma alternativa útil para superar as limitações de técnicas convencionais como culturas de células, recomendado assim para detecção de vírus fastidiosos como os RVA e HAV (Katayama *et al.* 2002). A detecção de ambos os vírus RNA e DNA revelou que a associação de métodos aqui descritos representa uma abordagem viável para se detectar os principais vírus entéricos responsáveis pela gastroenterite aguda assim como o HAV. Metodologias moleculares de detecção genômica não fornecem informações sobre a infecciosidade da partícula viral, podendo detectar genomas provenientes de partículas infecciosas e/ou derivados de vírus inativados ou defectivos (Gassilloud *et al.* 2003, Haramoto *et al.* 2007, Hamza *et al.* 2009). Entretanto, a baixa estabilidade do RNA livre no ambiente sugere que estas metodologias detectem partículas virais intactas e não o genoma viral livre da partícula, apesar de o mesmo poder ser detectado mesmo quando os vírus estão inativados por desinfecção química, calor ou proteases presentes na água (Meleg *et al.* 2006, Carducci *et al.* 2008). Haramoto *et al.* (2007) demonstraram que o método de concentração aplicado neste trabalho concentra partículas virais completas preferencialmente a genomas virais livres no ambiente, indicando uma possível infecciosidade destes vírus. Espinosa *et al.* (2008) sugeriram que a detecção do genoma viral

pode ser um indicador adequado para a contaminação de águas superficiais, uma vez que encontrou uma correlação entre infecciosidade e detecção do genoma viral.

Até o momento não há relatos na literatura referentes à detecção viral em lagoas de água salobra. Entretanto, estudos em amostras de água de estuários demonstram a circulação de NoV e HAV (Gentry *et al.* 2009, Hernandez-Morga *et al.* 2009). A detecção de vírus na Praia do Leblon (58,3%) revelou a disseminação destes vírus nesta matriz aquática, assim como demonstrado em outros países (Calgua *et al.* 2008, Wong *et al.* 2009, Silva *et al.* 2010). Vale lembrar, que os percentuais de detecção destes vírus nas diferentes matrizes aquáticas são influenciados não apenas pelo nível de contaminação viral, como também pelos diferentes métodos de recuperação e detecção utilizados.

Alguns estudos têm sugerido os HAdV como indicadores virais de contaminação fecal humana em função de sua disseminação no ambiente, estabilidade em esgotos domésticos e amostras ambientais e resistência aos processos de tratamento de água e esgoto (Puig *et al.* 1994, van Heerden *et al.* 2003, Pusch *et al.* 2005, Bofill-Mas *et al.* 2006). No presente estudo, foi estatisticamente observada uma distribuição não homogênea de amostras positivas e negativas para HAdV e *E. coli*, porém não pôde ser afirmada a associação entre eles.

O percentual de detecção de HAdV obtido neste estudo foi inferior aos percentuais encontrados para RVA, NoV e HAV, corroborando dados obtidos por outros trabalhos (Pusch *et al.* 2005, Miagostovich *et al.* 2008). Por outro lado, Prado e colaboradores (2011) demonstraram alto percentual de detecção de HAdV (71% e 85%) em amostras obtidas no afluente de duas estações de tratamento de esgoto, onde foram detectados RVA (50%-95%), HAV (28%-70%), NoV-GII (28%-45%) e NoV-GI (7%-10%).

A análise das sequências nucleotídicas do genoma viral permite a classificação destes em genótipos e subgenótipos distintos, como no caso do HAV. Também demonstra a similaridade dos vírus circulantes em uma determinada região, podendo evidenciar a fonte de contaminação em um surto.

A caracterização molecular dos RVA demonstrou a circulação de amostras I2 de origem humana, segundo nova classificação proposta por Matthijnssens *et al.* (2008a, 2008b). As sequências nucleotídicas obtidas apresentaram 99% de identidade nucleotídica com sequências de VP6 de amostras G2P4 (dados não demonstrados). Os RVA I2, detectados em humanos e bovinos, são descritos como associados ao genótipo G2P4, enquanto I1, suínos e humanos, estão associados a G1P8 (Iturriza-Gómara *et al.* 2002, Lin *et al.* 2008, Matthijnssens *et al.* 2008a, 2008b). No Brasil, o genótipo G2P4 vem sendo detectado em elevado percentual em amostras clínicas e tem se apresentado como o mais predominante em amostras de populações vacinadas (Santos & Hoshino 2005, Leite *et al.* 2008, Ribeiro *et al.* 2008). No estado do Rio de Janeiro, segundo levantamento do Laboratório de Virologia Comparada e Ambiental/Instituto Oswaldo Cruz/Fundação Oswaldo Cruz (LVCA/IOC/FIOCRUZ), Referência Regional em Rotavíruses, os RVA do genótipo G2P4 foram detectados em 57% e 75% das amostras clínicas estudadas nos anos de 2007 e 2008, respectivamente. O percentual de identidade nucleotídica observado entre os RVA detectados em amostras provenientes da Lagoa e de espécimes clínicos de casos de GA ocorridos na cidade do Rio de Janeiro demonstra como a abordagem ambiental pode fornecer dados sobre a circulação de um determinado vírus na população.

Para a detecção de NoV, a aplicação de técnicas moleculares vem sendo amplamente utilizada, uma vez que estes vírus não dispõem de cultura celular e modelos animais para sua replicação (Duizer *et al.* 2004). Descrita como a região mais variável da ORF-2, a região D foi utilizada para caracterização molecular dos NoV em função de apresentar regiões com percentual de identidade que possibilitam a distinção entre genogrupos e genótipos (Vinjé *et al.* 2004). Dentre as 27 amostras positivas, apenas 10 foram positivas para a região D, sendo que os cromatogramas gerados não permitiram a construção de um dendograma. A grande quantidade de materiais inespecíficos e inibidores presentes nos concentrados de água, a baixa concentração de produtos gerados nos ciclos de amplificação e a não hibridação dos iniciadores com as sequências alvo devido à alta variabilidade genética desta região podem ser



responsáveis pelos resultados negativos encontrados e pela baixa qualidade das sequências nucleotídicas obtidas.

Dados de sequências nucleotídicas do HAV demonstram que 99% das amostras foram classificadas como genótipo I e que, embora todas as cinco amostras analisadas nesse estudo tenham sido 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. Os genótipos de HAV 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, 2007, Villar *et al.* 2004, 2006).

O risco de transmissão de doenças virais por veiculação hídrica depende da capacidade dos vírus de se manterem infecciosos por um determinado período de tempo até que entrem em contato com um hospedeiro suscetível. Nesse contexto, é fundamental que se realize uma correlação dos dados virológicos com fatores ambientais para avaliação dos efeitos que estes exercem na persistência de partículas virais nestas águas, de modo a se avaliar o potencial risco à saúde pública associado ao seu uso (Ward *et al.* 1986, Espinosa *et al.* 2008).

A utilização da água para fins recreativos suscita uma série de riscos para a saúde, que dependem de diversos fatores, como a natureza do perigo, a característica do corpo d'água e o estado imunológico do usuário. Embora evidências obtidas a partir de estudos epidemiológicos e relatórios de surtos tenham demonstrado uma relação entre os efeitos adversos à saúde e a imersão em água de recreação de má qualidade, as dificuldades associadas à atribuição de uma infecção em função do contato com a água são numerosas (Pond 2005). Entretanto, muitos estudos epidemiológicos realizados em águas marinhas e doce têm mostrado que há um aumento significativo na incidência de doenças, incluindo gastrointestinais,

de pele, oculares e de ouvido, nas vias respiratórias ou infecção da ferida entre aqueles que se envolvem em atividades aquáticas recreativas (Cabelli *et al.* 1979, D'Alessio *et al.* 1981, Cabelli *et al.* 1982, Seyfried *et al.* 1985, Craun *et al.* 2005). Além disso, os sistemas de vigilância de surtos de doenças transmitidas pela água nos EUA e Reino Unido revelaram inúmeros surtos associados a piscinas sem tratamento e águas recreacionais de baixa qualidade ao longo dos anos, a maioria deles associado a quadros de GA (Schets *et al.* 2010).

Os dados apresentados neste capítulo demonstraram a disseminação de agentes virais na Lagoa Rodrigo de Freitas, no Rio dos Macacos e na Praia do Leblon, enfatizando a necessidade do estabelecimento de parâmetros virais para a avaliação da qualidade da água e a necessidade de se disponibilizar protocolos de detecção viral que auxiliem no monitoramento da qualidade da água, na adoção de medidas de controle de contaminação ambiental, assim como futuros trabalhos de análise de risco como parte dos planos de segurança da água.

**AGRADECIMENTOS:** Este estudo contou com apoio do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular do Instituto Oswaldo Cruz/Fundação Oswaldo Cruz (PGBCM/IOC/FIOCRUZ), da Vice-Presidência de Pesquisa e Laboratórios de Referência (VPPLR)/FIOCRUZ, do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e da Coordenação Geral de Vigilância em Saúde Ambiental/Secretaria de Vigilância em Saúde/Ministério da Saúde (CGVAM/SVS/MS) e está no âmbito das atividades da FIOCRUZ como Centro Colaborador da Organização Pan-Americana da Saúde/Organização Mundial da Saúde (OPAS/OMS) em Saúde Pública e Ambiental.

## REFERÊNCIAS

- ABAD, F.X.; PINTÓ, R.M.; VILLENA, C. & BOSCH, A. 1997. Astrovirus survival in drinking water. *Applied and Environmental Microbiology*, 63: 3119-3122.
- ALVES, D.T.M.; ARGENTO, M.S.F.; CRUZ, C.B.M. & ZEE, D. 1998. Qualidade Ambiental da Lâmina d'água da Lagoa Rodrigo de Freitas – RJ. Subsídios aos Estudos de Impactos Ambientais em Lagoas Costeiras. Pp. 79-88. *In: IX Simpósio Brasileiro de Sensoriamento Remoto*. Santos, SP, Brasil.
- BERK, A.J. 2007. Adenoviridae: The Viruses and Their Replication. Pp. 2355-2394. *In: D.M. Knipe & P.M. Howley (eds.). Fields Virology*, 5th edition. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA. 3091p.

- BEURET, C.; KHOELER D.; BAUMGARTNER, A. & LUTHI, T.M. 2002. Norwalk-like virus sequences in mineral water: one-year monitoring of three brands. *Applied and Environmental Microbiology*, 68: 1925-1931, <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.68.4.1925-1931.2002>
- BISHOP, R.F.; DAVIDSON, G.P.; HOLMES, I.H. & RUCK, B.J. 1973. Virus particles in epithelial cells of duodenal mucosa from children with acute non-bacterial gastroenteritis. *Lancet*, 2: 1281-1283, [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(73\)92867-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(73)92867-5)
- BOFILL-MAS, S.; ALBINANA-GIMENEZ, N.; CLEMENTE-CASARES, P.; HUNDESA, A.; RODRIGUEZ-MANZANO, J.; ALLARD, A.; CALVO, M. & GIRONES, R. 2006. Quantification and stability of human adenoviruses and polyomavirus JCPyV in wastewater matrices. *Applied and Environmental Microbiology*, 72: 7894-7896, <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.00965-06>
- BON, F.; AMBERT-BALAY, K.; GIRAUDON, H.; KAPLON, J.; LE GUYADER, S.; POMMEPUY, M.; GALLAY, A.; VAILLANT, V.; DE VALK, H.; CHIKHI-BRACHET, R.; FLAHAUT, A.; POTHIER, P. & KOHLI, E. 2005. Molecular epidemiology of caliciviruses detected in sporadic and outbreak cases of gastroenteritis in France from December 1998 to February 2004. *Journal of Clinical Microbiology*, 43: 4659-4664, <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.43.9.4659-4664.2005>
- BOSCH, A. 1998. Human enteric viruses in the water environment: a minireview. *International Microbiology*, 1: 191-196.
- BOSCH, J.; COLL, M.; PUIG, A.; ESPAÑOL, T.; IBÁÑEZ, V.M.; INFANTE, D. & TORMO, R. 1991. Autoimmune hepatitis with fatal outcome. *Journal of Pediatrics*, 118: 823-824, [http://dx.doi.org/10.1016/S0022-3476\(05\)80058-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0022-3476(05)80058-7)
- BOSCH, A.; GUIX, S.; SANO, D. & PINTÓ, R.M. 2008. New tools for the study and direct surveillance of viral pathogens in water. *Current Opinion in Biotechnology*, 19: 295-301, <http://dx.doi.org/10.1016/j.copbio.2008.04.006>
- BOXMAN, I.L.; VENNEMA, H.; JONKER, K.; BOER, E.D. & KOOPMANS, M. 2006. Detection of noroviruses in shellfish in the Netherlands. *International Journal of Food Microbiology*, 108: 391-396, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2006.01.002>
- BRUMMITT, C.F.; CHERRINGTON, J.M.; KATZENSTEIN, D.A.; JUNI, B.A.; VAN DRUNEN, N.; EDELMAN, C.; RHAME, F.S. & JORDAN, M.C. 1988. Nosocomial adenovirus infections: molecular epidemiology of an outbreak due to adenovirus 3a. *Journal of Infectious Diseases*, 158: 423-432, <http://dx.doi.org/10.1093/infdis/158.2.423>
- BULL, R.A.; TU, E.T.; MCIVER, C.J.; RAWLINSON, W.D. & WHITE, P.A. 2006. Emergence of a new norovirus genotype II.4 variant associated with global outbreaks of gastroenteritis. *Journal of Clinical Microbiology*, 44: 327-333, <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.44.2.327-333.2006>
- CABELLI, V.J.; DUFOUR, A.P.; LEVIN, M.A.; MCCABE, L.J. & HABERMAN, P.W. 1979. Relationship of microbial indicators to health effects at marine bathing beaches. *American Journal of Public Health*, 69: 690-696, <http://dx.doi.org/10.2105/AJPH.69.7.690>
- CABELLI, V.J.; DUFOUR, A.P.; MCCABE, L.J. & LEVIN, M.A. 1982. Swimming-associated gastroenteritis and water quality. *American Journal of Epidemiology*, 115: 606-616.
- CALGUA, B.; MENGEWEIN, A.; GRUNERT, A.; BOFILL-MAS, S.; CLEMENTE-CASARES, P.; HUNDESA, A.; WYN-JONES, A.P.; LÓPEZ-PILA, J.M. & GIRONES, R. 2008. Development and application of a one-step low cost procedure to concentrate viruses from seawater samples. *Journal of Virological Methods*, 153: 79-83, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jviromet.2008.08.003>
- CAMPOS, G.S.; MOREAU, V.H.; BANDEIRA, A.; BARBERINO, G.; ALMEIDA, P.F.; AMADOR, D.M.; DE LIMA, M.O. & SARDI, S.I. 2008. Molecular detection and genetic diversity of norovirus in hospitalized young adults with acute gastroenteritis in Bahia, Brazil. *Archives of Virology*, 153: 1125-1129, <http://dx.doi.org/10.1007/s00705-008-0078-x>
- CARDUCCI, A.; MORICI, P.; PIZZI, F.; BATTISTINI, R.; ROVINI, E. & VERANI, M. 2008. Study of the viral removal efficiency in a urban 12 wastewater treatment plant. *Water Science & Technology*, 58: 893-897, <http://dx.doi.org/10.2166/wst.2008.437>
- CARVALHO-COSTA, F.A.; VOLOTÃO, E. de M.; DE ASSIS, R.M.; FIALHO, A.M.; DE ANDRADE, J.da S.; ROCHA, L.N.; TORT, L.F.; DA SILVA, M.F.; GÓMEZ, M.M.; DE SOUZA, P.M. & LEITE, J.P. 2011. Laboratory-based rotavirus surveillance during the introduction of a vaccination program, Brazil, 2005-2009. *The Pediatric Infectious Disease Journal*, 30: S35-S41, <http://dx.doi.org/10.1097/INF.0b013e3181fef5f>
- CASTIGNOLLES, N.; PETIT, F.; MENDEL, I.; SIMON, L.; CATTOLICO, L. & BUFFET-JANVRESSE, C. 1998. Detection of adenovirus in the waters of the Seine River estuary by nested-PCR. *Molecular and Cellular Probes*, 12: 175-180, <http://dx.doi.org/10.1006/mcpr.1998.0166>

- CASTILHO, J.G.; MUNFORD, V.; RESQUE, H.R.; FAGUNDES-NETO, U.; VINJÉ, J. & RÁCZ, M.L. 2006. Genetic diversity of Norovirus among children with gastroenteritis in São Paulo State, Brazil. *Journal of Clinical Microbiology*, 44: 3947-3953, <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.00279-06>
- CDC (Center of Disease Control and Prevention). 2008. Rotavirus surveillance worldwide, 2001-2008. *MMWR Morbidity and Mortality Weekly Report*, 57: 1255-1257.
- CHANDRAN, A.; FITZWATER, S.; ZHEN, A. & SANTOSHAM, M. 2010. Prevention of rotavirus gastroenteritis in infants and children: rotavirus vaccine safety, efficacy, and potential impact of vaccines. *Biologics: targets & therapy*, 4: 213-229, <http://dx.doi.org/10.2147/BTT.S6530>
- CHAPRON, C.D.; BALLESTER, N.A.; FONTAINE, J.H.; FRADES, C.N. & MARGOLIN, A.B. 2000. Detection of astroviruses, enteroviruses, and adenovirus types 40 and 41 in surface waters collected and evaluated by the information collection rule and an integrated cell culture-nested PCR procedure. *Applied and Environmental Microbiology*, 66: 2520-2525, <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.66.6.2520-2525.2000>
- CHIBA, S.; NAKATA, S.; NAKAMURA, I.; TANIGUCHI, K.; URASAWA, S.; FUJINAGA, K. & NAKAO, T. 1983. Outbreak of infantile gastroenteritis due to type 40 adenovirus. *Lancet* 2: 954-957, [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(83\)90463-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(83)90463-4)
- CHO, H.B.; LEE, S.H.; CHO, J.C. & KIM, S.J. 2000. Detection of adenoviruses and enteroviruses in tap water and river water by reverse transcription multiplex PCR. *Canadian Journal of Microbiology*, 46: 417-424, <http://dx.doi.org/10.1139/w00-014>
- CIARLET, M.; HOFFMANN, C.; LORUSSO, E.; BASELGA, R.; CAFIERO, M.A.; BÁNYAI, K.; MATTHIJNSSENS, J.; PARREÑO, V.; DE GRAZIA, S.; BUONAVOGLIA, C. & MARTELLA, V. 2008. Genomic characterization of a novel group A lamb rotavirus isolated in Zaragoza, Spain. *Virus Genes*, 37: 250-265, <http://dx.doi.org/10.1007/s11262-008-0257-6>
- CLARK, B. & MCKENDRICK, M. 2004. A review of viral gastroenteritis. *Current Opinion in Infectious Diseases*, 17: 461-469, <http://dx.doi.org/10.1097/00001432-200410000-00011>
- COHEN, J.I.; ROSENBLUM, B.; TICEHURST, J.R.; DAEMER, R.J.; FEINSTONE, S.M. & PURCELL, R.H. 1987. Complete nucleotide sequence of an attenuated hepatitis A virus: comparison with wild-type virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 84: 2497-2501, <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.84.8.2497>
- COLOMBA, C.; DE GRAZIA, S.; GIAMMANCO, G.M.; SAPORITO, L.; SCARLATA, F.; TITONE, L. & ARISTA, S. 2006. Viral gastroenteritis in children hospitalised in Sicily, Italy. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 25: 570-575, <http://dx.doi.org/10.1007/s10096-006-0188-x>
- CONAMA (Conselho Nacional do Meio Ambiente). 2000. Ministério do Meio Ambiente. Resolução nº 274, de 29 de novembro de 2000. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*, Poder Executivo, Brasília, DF.
- CRAUN, G.F. 1992. Causes of waterborne outbreaks in the United States. *Water Science & Technology*, 24: 17-20.
- CRAUN, G.F.; CALDERON, R.L. & CRAUN, M.F. 2005. Outbreaks associated with recreational water in the United States. *International Journal of Environmental Health Research*, 15: 243-262, <http://dx.doi.org/10.1080/09603120500155716>
- CUTHBERT, J.A. 2001. Hepatitis A: old and new. *Clinical Microbiology Reviews*, 14: 38-58, <http://dx.doi.org/10.1128/CMR.14.1.38-58.2001>
- D'ALESSIO, D.; MINOR, T.E.; ALLEN, C.I.; TSIATIS, A.A. & NELSON, D.B. 1981. A study of the proportions of swimmers among well controls and children with enterovirus-like illness shedding or not shedding an enterovirus. *American Journal of Epidemiology*, 113: 533-541.
- DE PAULA, V.S.; BAPTISTA, M.L.; LAMPE, E.; NIEL, C. & GASPARG, A.M.C. 2002. Characterization of hepatitis A virus isolates from subgenotypes IA e IB Rio de Janeiro, Brazil. *Journal of Medical Virology*, 66: 22-27, <http://dx.doi.org/10.1002/jmv.2106>
- DE PAULA, V.S.; DINIZ-MENDES, L.; VILLAR, L.M.; LUZ, S.L.; SILVA, L.A.; JESUS, M.S.; DA SILVA, N.M. & GASPARG, A.M. 2007. Hepatitis A virus in environmental water samples from the Amazon Basin. *Water Research*, 41: 1169-1176, <http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2006.11.029>
- DINGLE, J.H. & LANGMUIR, A.D. 1968. Epidemiology of acute, respiratory disease in military recruits. *American Review of Respiratory Disease*, 97: 1-65.
- DUIZER, E.; BIJKERK, P.; ROCKX, B.; DE GROOT, A.; TWISK, F. & KOOPMANS, M. 2004. Inactivation of Caliciviruses. *Applied and Environmental Microbiology*, 70: 4538-4543, <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.70.8.4538-4543.2004>
- EPA (ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY). 1998. Drinking water contamination candidate list. Notice. Federal Regulation, 63: 10274-10287.
- ESPINOSA, A.C.; MAZARI-HIRIART, M.; ESPINOSA, R.; MARURI-AVIDAL, L.; MÉNDES, E. & ARIAS, C.F. 2008.

- Infectivity and genome persistence of rotavirus and astrovirus in groundwater and surface water. *Water Research*, 42: 2618-2628, <http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2008.01.018>
- ESPINOSA, A.C.; ARIAS, C.F.; SÁNCHEZ-COLÓN, S. & MAZARI-HIRIART, M. 2009. Comparative study of enteric viruses, coliphages and indicator bacteria for evaluating water quality in a tropical high-altitude system. *Environmental Health*, 8: 49, <http://dx.doi.org/10.1186/1476-069X-8-49>
- ESTES, M.K.; BALL, J.M.; GUERRERO, R.A.; OPEKUN, A.R.; GILGER, M.A. & PACHECO, S.S. 2000. Norwalk virus vaccines: Challenges and progress. *Journal of Infectious Diseases*, 181: S367-S373, <http://dx.doi.org/10.1086/315579>
- ESTES, M. & KAPIKIAN, A.Z. 2007. Rotaviruses. Pp 1917-1974. In: D.M. Knipe & P.M. Howley (eds.). *Fields Virology*, 5th ed. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA. 3091p.
- FANKHAUSER, R.L.; MONROE, S.S.; NOEL, J.S.; HUMPHREY, C.D.; BRESEE, J.S.; PARASHAR, U.D.; ANDO, T. & GLASS, R.I. 2002. Epidemiologic and molecular trends of "Norwalk-like Viruses" associated with outbreaks of gastroenteritis in the United States. *Journal of Infectious Diseases*, 186: 1-7, <http://dx.doi.org/10.1086/341085>
- FEINSTONE, S.M.; KAPIKIAN, A.Z. & PURCELL, R.H. 1973. Hepatitis A: detection by immune electron microscopy of a viruslike antigen associated with acute illness. *Science*, 182: 1026-1028, <http://dx.doi.org/10.1126/science.182.4116.1026>
- FERREIRA, M.S.R.; XAVIER, M.P.T.P.; FUMIAN, T.M.; VICTORIA, M.; OLIVEIRA, S.A.; PENA, L.H.A.; LEITE, J.P. & MIAGOSTOVICH, M.P. 2008. Acute gastroenteritis cases associated with noroviruses infection in the State of Rio de Janeiro. *Journal of Medical Virology*, 80: 338-344, <http://dx.doi.org/10.1002/jmv.21059>
- FERREIRA, F.F.; GUIMARÃES, F.R.; FUMIAN, T.M.; VICTORIA, M.; VIEIRA, C.B.; LUZ, S.; SHUBO, T.; LEITE, J.P. & MIAGOSTOVICH, M.P. 2009. Environmental dissemination of group A rotavirus: P-type, G-type and subgroup characterization. *Water Science and Technology*, 60: 633-642, <http://dx.doi.org/10.2166/wst.2009.413>
- FERREIRA, M.S.; VICTORIA, M.; CARVALHO-COSTA, F.A. VIEIRA, C.B.; XAVIER, M.P.; FIORETTI, J.M.; ANDRADE, J.; VOLOTÃO, E.M.; ROCHA, M.; LEITE, J.P. & MIAGOSTOVICH, M.P. 2010. Surveillance of norovirus infections in the state of Rio de Janeiro, Brazil 2005-2008. *Journal of Medical Virology*, 82: 1442-1448, <http://dx.doi.org/10.1002/jmv.21831>
- FLEWETT, T.H.; BRYDEN, A.S. & DAVIES, H. 1973. Letter: Virus particles in gastroenteritis. *Lancet*, 2: 1497, [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(73\)92760-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(73)92760-8)
- FLEWETT, T.H. & WOODE, G.N. 1978. The rotaviruses. *Archives of Virology*, 57: 1-23, <http://dx.doi.org/10.1007/BF01315633>
- FORMIGA-CRUZ, M.; TOFIÑO-QUESADA, G.; BOFILL-MAS, S.; LEES, D.N.; HENSHILWOOD, K.; ALLARD, A.K.; CONDÉN-HANSSON, A.C.; HERNROTH, B.E.; VANTARAKIS, A.; TSIBOUXI, A.; PAPAPETROPOULOU, M.; FURONES, M.D. & GIRONES, R. 2002. Distribution of human virus contamination in shellfish from different growing areas in Greece, Spain, Sweden, and the United Kingdom. *Applied and Environmental Microbiology*, 68: 5990-5998, <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.68.12.5990-5998.2002>
- FORMIGA-CRUZ, M.; ALLARD, A.K.; CONDÉN-HANSSON, A.C.; HENSHILWOOD, K.; HERNROTH, B.E.; JOFRE, J.; LEES, D.N.; LUCENA, F.; PAPAPETROPOULOU, M.; RANGDALE, R.E.; TSIBOUXI, A.; VANTARAKIS, A. & GIRONES, R. 2003. Evaluation of potential indicators of viral contamination in shellfish and their applicability to diverse geographical areas. *Applied and Environmental Microbiology*, 69: 1556-1563, <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.69.3.1556-1563.2003>
- FOUT, G.S.; MARTINSON, B.C.; MOYER, M.W. & DAHLING, D.R. 2003. A multiplex reverse transcription-PCR method for detection of human enteric viruses in groundwater. *Applied and Environmental Microbiology*, 69: 3158-3164, <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.69.6.3158-3164.2003>
- FRETZ, R.; HERRMANN, L.; CHRISTEN, A.; SVOBODA, P.; DUBUIS, O.; VIOLLIER, E.H.; TANNER, M. & BAUMGARTNER, A. 2005. Frequency of *Norovirus* in stool samples from patients with gastrointestinal symptoms in Switzerland. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 24: 214-216, <http://dx.doi.org/10.1007/s10096-005-1300-3>
- FROGGATT, P.C.; VIPOND, B.I.; ASHLEY, C.R.; LAMBDEN, P.R.; CLARKE, I.N. & CAUL, E.O. 2004. Surveillance of norovirus infection in a study of sporadic childhood gastroenteritis in South West England and South Wales during one winter season (1999-2000). *Journal of Medical Virology*, 72: 307-311, <http://dx.doi.org/10.1002/jmv.10569>
- FUMIAN, T.M.; LEITE, J.P.; CASTELLO, A.A.; GAGGERO, A.; CAILLOU, M.S. & MIAGOSTOVICH, M.P. 2010. Detection of rotavirus A in sewage samples using multiplex qPCR and an evaluation of the ultracentrifugation and adsorption-elution

- methods for virus concentration. *Journal of Virological Methods*, 170: 42-46, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jviromet.2010.08.017>
- GASSILLOUD, B.; SCHWARTZBROD, L. & GANTZER, C. 2003. Presence of viral genomes in mineral water: a sufficient condition to assume infectious risk?. *Applied and Environmental Microbiology*, 69: 3965-3969, <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.69.7.3965-3969.2003>
- GENTRY, J.; VINJE, J.; GUADAGNOLI, D. & LIPP, E.K. 2009. Norovirus distribution within an estuarine environment. *Applied and Environmental Microbiology*, 75: 5474-5480, <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.00111-09>
- GERBA, C.P.; GOYAL, S.M.; LABELLE, N.L.; CECH, I. & BOGDAN, G.F. 1979. Failure of indicator bacteria to reflect the occurrence of enterovirus in marine waters. *American Journal of Public Health*, 69: 1116-1119, <http://dx.doi.org/10.2105/AJPH.69.11.1116>
- GERBA, C.P.; GRAMOS, D.M. & NWACHUKU, N. 2002. Comparative inactivation of enteroviruses and adenovirus 2 by UV light. *Applied and Environmental Microbiology*, 68: 5167-5169, <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.68.10.5167-5169.2002>
- GLASS, R.I.; NOEL, J.; ANDO, T.; FANKHAUSER, R.; BELLLOT, G.; MOUNTS, A.; PARASHAR, U.D.; BRESEE, J.S. & MONROE, S.S. 2000. The epidemiology of enteric caliciviruses from humans: a reassessment using new diagnostics. *Journal of Infectious Diseases*, 181: S254-S261, <http://dx.doi.org/10.1086/315588>
- GOYAL, S.M.; ADAMS, W.N.; O'MALLEY, L. & LEAR, D.W. 1984. Human pathogenic viruses at sewage sludge disposal sites in the middle atlantic region. *Applied and Environmental Microbiology*, 48: 758-763.
- GRABOW, W.O.K. 2007. Overview of health-related water virology. Pp. 1-25. In: A. Bosch (ed.). *Human viruses in water*. Elsevier, Amsterdam, AS. 299p, [http://dx.doi.org/10.1016/S0168-7069\(07\)17001-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0168-7069(07)17001-4)
- GREENBERG, H.B. & ESTES, M.K. 2009. Rotavirus: from pathogenesis to vaccination. *Gastroenterology*, 136: 1939-1951, <http://dx.doi.org/10.1053/j.gastro.2009.02.076>
- GRIFFIN, D.W.; GIBSON, C.J. III; LIPP, E.K.; RILEY, K.; PAUL, J.H. III & ROSE, J.B. 1999. Detection of viral pathogens by reverse transcriptase PCR and of microbial indicators by standard methods in the canals of the Florida Keys. *Applied and Environmental Microbiology*, 65: 4118-4125. Erratum in: *Applied and Environmental Microbiology*, 2000. 66: 876.
- GUST, I.D. 1992. Epidemiological patterns of hepatitis A in different parts of the world. 10: S56-S58, [http://dx.doi.org/10.1016/0264-410X\(92\)90544-T](http://dx.doi.org/10.1016/0264-410X(92)90544-T)
- HALL, T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, 41: 95-98.
- HALLIDAY, M.L.; KANG, L.Y.; ZHOU, T.K.; HU, M.D.; PAN, Q.C.; FU, T.Y.; HUANG, Y.S. & HU, S.L. 1991. An epidemic of hepatitis A attributable to the ingestion of raw clams in Shanghai, China. *Journal of Infectious Diseases*, 164: 852-859, <http://dx.doi.org/10.1093/infdis/164.5.852>
- HAMZA, I.A.; JURZIK, L.; STANG, A.; SURE, K.; UBERLA, K. & WILHELM, M. 2009. Detection of human viruses in rivers of a densely-populated area in Germany using a virus adsorption elution method optimized for PCR analyses. *Water Research*, 43: 2657-2668, <http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2009.03.020>
- HARAMOTO, E.; KATAYAMA, H.; OGUMA, K. & OHGAKI, S. 2007. Recovery of naked viral genomes in water by virus concentration methods. *Journal of Virological Methods*, 142: 169-173, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jviromet.2007.01.024>
- HEIM, A.; EBNET, C.; HARSTE, G. & PRING-AKERBLOM, P. 2003. Rapid and quantitative detection of human adenovirus DNA by real-time PCR. *Journal of Medical Virology*, 70: 228-239, <http://dx.doi.org/10.1002/jmv.10382>
- HERNANDEZ-MORGA, J.; LEON-FELIX, J.; PERAZA-GARAY, F.; GIL-SALAS, B.G. & CHAIDEZ, C. 2009. Detection and characterization of hepatitis A virus and Norovirus in estuarine water samples using ultrafiltration – RT-PCR integrated methods. *Journal of Applied Microbiology*, 106: 1579-1590, <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2672.2008.04125.x>
- IKE, A.C.; BROCKMANN, S.O.; HARTELT, K.; MARSCHANG, R.E.; CONTZEN, M.C. & OEHME, R.M. 2006. Molecular epidemiology of Norovirus in outbreaks of gastroenteritis in southwest Germany from 2001 to 2004. *Journal of Clinical Microbiology*, 44: 1262-1267, <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.44.4.1262-1267.2006>
- INEA (Instituto Estadual do Ambiente). 2009. Rio de Janeiro, Brasil. <[www.inea.rj.gov.br/fma/lagoa-rodrigo-freitas](http://www.inea.rj.gov.br/fma/lagoa-rodrigo-freitas)>. (Acesso em 20/12/2009).
- ITURRIZA-GOMARA, M.; WONG, C.; BLOME, S.; DESSELBERGER, U. & GRAY, J. 2002. Molecular characterization of VP6 genes of human rotavirus isolates: correlation of genogroups with subgroups and evidence of

- independent segregation. *Journal of Virology*, 76: 6596-6601, <http://dx.doi.org/10.1128/JVI.76.13.6596-6601.2002>
- JIANG, S. 2006. Human Adenoviruses in Water: Occurrence and Health Implications: A critical Review. *Environmental Science & Technology*, 40: 7132-7140, <http://dx.doi.org/10.1021/es060892o>
- JOTHIKUMAR, N.; CROMEANS, T.L.; SOBSEY, M.D. & ROBERTSON, B.H. 2005. Development and evaluation of a broadly reactive detection TaqMan assay for rapid detection of hepatitis A virus. *Applied and Environmental Microbiology*, 71: 3359-3363, <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.71.6.3359-3363.2005>
- KAPIKIAN, A.Z.; WYATT, R.G.; DOLIN, R.; THORNHILL, T.S.; KALICA, A.R. & CHANOCK, R.M. 1972. Visualization by immune electron microscopy of a 27-nm particle associated with acute infectious nonbacterial gastroenteritis. *Journal of Virology*, 10: 1075-1081.
- KAGEYAMA, T.; KOJIMA, S.; SHINOHARA, M.; UCHIDA, K.; FUKUSHI, S.; HOSHINO, F.B.; TAKEDA, N. & KATAYAMA, K. 2003. Broadly Reactive and Highly Sensitive Assay for Norwalk-Like Viruses Based on Real-Time Quantitative Reverse Transcription-PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 41: 1548-1557, <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.41.4.1548-1557.2003>
- KATAYAMA, H.; SHIMASAKI, A. & OHGAKI, S. 2002. Development of a virus concentration method and its application to detection of enterovirus and norwalk virus from coastal seawater. *Applied and Environmental Microbiology*, 68: 1033-1039, <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.68.3.1033-1039.2002>
- KRAJDEN, M.; BROWN, M.; PETRASEK, A. & MIDDLETON, P.J. 1990. Clinical features of adenovirus enteritis: a review of 127 cases. *The Pediatric Infectious Disease Journal*, 9: 636-641.
- KUKKULA, M.; MAUNULA, L.; SILVENNOINEM, E.; VON BONDSORF, C.V. & JAATINEM, P. 1999. Outbreak of viral gastroenteritis due to drinking water contaminated by Norwalk-like viruses. *Journal of Infectious Diseases*, 180: 1771-1776, <http://dx.doi.org/10.1086/315145>
- LA ROSA, G.; FONTANA, S.; DI GRAZIA, A.; IACONELLI M.; POURSHABAN, M. & MUSCILLO, M. 2007. Molecular Identification and Genetic Analysis of Norovirus Genogroups I and II in Water Environments: Comparative Analysis of Different Reverse Transcription-PCR Assays. *Applied and Environmental Microbiology*, 73: 4152-4161, <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.00222-07>
- LEDNAR, W.M.; LEMON, S.M.; KIRKPATRICK, J.W.; REDFIELD, R.R.; FIELDS, M.L. & KELLEY, P.W. 1985. Frequency of illness associated with epidemic hepatitis A virus infections in adults. *American Journal of Epidemiology*, 122: 226-233.
- LEE, H. ; KIM, M. ; LEE, J.E. ; LIM, M. ; KIM, M. ; KIM, J.M. ; JHEONG, W.H. ; KIM, J. & KO, G. 2011. Investigation of norovirus occurrence in groundwater in metropolitan Seoul, Korea. *Science of the Total Environment*, 409: 2078-2084, <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2011.01.059>
- LEITE, J.P.; CARVALHO-COSTA, F.A. & LINHARES, A.C. 2008. Group A rotavirus genotypes and the ongoing Brazilian experience: a review. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 103: 745-753.
- LIN, Y.-P.; KAO, C.-L.; CHANG, S.-Y.; TANIGUCHI, K.; HUNG, P.-Y.; LIN, H.-C.; HUANG, L.M.; HUANG, H.H.; YANG, J.Y. & LEE, C.N. 2008. Determination of human rotavirus VP6 genogroups I and II by reverse transcription-PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 46: 3330-3337, <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.00432-08>
- LINHARES, A.C.; PINHEIRO, F.P.; SCHMETZ, C.; MÜLLER, G. & PETERS, D.L. 1977. Duovirus (rotavirus) em Belém do Pará. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 19: 278-279.
- MALUQUER DE MOTES, C.; CLEMENTE-CASARES, P.; HUNDESA, A.; MARTÍN, M. & GIRONES, R. 2004. Detection of bovine and porcine adenoviruses for tracing the source of fecal contamination. *Applied and Environmental Microbiology*, 70: 1448-1454, <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.70.3.1448-1454.2004>
- MATTHIJNSSENS, J.; CIARLET, M.; HEIMAN, E.; ARIJS, I.; DELBEKE, T.; MCDONALD, S.M.; PALOMBO, E.A.; ITURRIZA-GÓMARA, M.; MAES, P.; PATTON, J.T.; RAHMAN, M. & VAN RANST, M. 2008a. Full genome-based classification of rotaviruses reveals a common origin between human Wa-Like and porcine rotavirus strains and human DS-1-like and bovine rotavirus strains. *Journal of Virology*, 82: 3204-3219, <http://dx.doi.org/10.1128/JVI.02257-07>
- MATTHIJNSSENS, J.; CIARLET, M.; RAHMAN, M.; ATTOUI, H.; BÁNYAI, K.; ESTES, M.K.; GENTSCH, J.R.; ITURRIZA-GÓMARA, M.; KIRKWOOD, C.D.; MARTELLA, V.; MERTENS, P.P.; NAKAGOMI, O.; PATTON, J.T.; RUGGERI, F.M.; SAIF, L.J.; SANTOS, N.; STEYER, A.; TANIGUCHI, K.; DESSELBERGER, U. & VAN RANST, M. 2008b. Recommendations for the classification of group A rotaviruses using all 11 genomic RNA segments. *Archives of Virology*, 153: 1621-1629, <http://dx.doi.org/10.1007/s00705-008-0155-1>
- MCMINN, P.C.; STEWART, J. & BURRELL, C.J. 1991. A community outbreak of epidemic keratoconjunctivitis in central

- Australia due to adenovirus type 8. *Journal of Infectious Diseases*, 164: 1113-1118, <http://dx.doi.org/10.1093/infdis/164.6.1113>
- MEIKLEJOHN, G. 1983. Viral respiratory disease at Lowry Air Force Base in Denver, 1952–1982. *Journal of Infectious Diseases*, 148: 775-784, <http://dx.doi.org/10.1093/infdis/148.5.775>
- MELEG, E.; JAKAB, F.; KOCSIS, B.; BANYAI, K.; MELEGH, B. & SZUCS, G. 2006. Human astroviruses in raw sewage samples in Hungary. *Journal of Applied Microbiology*, 101: 1123-1129, <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2672.2006.02997.x>
- MELNICK, J.L. 1947. Poliomyelitis virus in urban sewage in epidemic and non-epidemic times. *American Journal of Hygiene*, 45: 240-253.
- MELNICK J.L. 1995. History and epidemiology of hepatitis A. *Journal of Infectious Diseases*, 171: S2-S8, [http://dx.doi.org/10.1093/infdis/171.Supplement\\_1.S2](http://dx.doi.org/10.1093/infdis/171.Supplement_1.S2)
- MENA, K.D. & GERBA, C.P. 2008. Waterborne Adenovirus. Pp. 133-167. In: D.M. Whitacre, H.N. Nigg & D.R. Doerge (eds.). *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*. Volume 198. Springer Science + Business, New York, NY, USA. 205p, [http://dx.doi.org/10.1007/978-0-387-09647-6\\_4](http://dx.doi.org/10.1007/978-0-387-09647-6_4)
- MENDES, A.C.O. 2009. Monitoramento do vírus da hepatite A na lagoa Rodrigo de Freitas, do município do Rio de Janeiro, RJ. *Dissertação de Mestrado*. Instituto Oswaldo Cruz/Fundação Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro, RJ. 98p.
- METCALF, T.G.; MELNICK, J.L. & ESTES, M.K. 1995. Environmental virology: from detection of virus in sewage and water by isolation to identification by molecular biology - a trip of over 50 years. *Annual Review of Microbiology*, 49: 461-487, <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.mi.49.100195.002333>
- MIAGOSTOVICH, M.P.; FERREIRA, F.F.M.; GUIMARAES, F.R.; FUMIAN, T.M.; DINIZ-MENDES, L.; LUZ, S.L.B.; SILVA, L.A. & LEITE, J.P.G. 2008. Molecular Detection and Characterization of Gastroenteritis Viruses Occurring Naturally in the Stream Waters of Manaus, Central Amazonia, Brazil. *Applied and Environmental Microbiology*, 74: 375-382, <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.00944-07>
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. 2004. Secretaria de Vigilância em Saúde, Coordenação- Geral de Vigilância em Saúde Ambiental. Portaria nº 518, de 25 de março de 2004. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*, Poder Executivo, Brasília, DF.
- MORENO, S.; ALVARADO, M.V.; BERMÚDEZ, A. & GUTIÉRREZ, M.F. 2009. Phylogenetic analysis indicates human origin of rotavirus and hepatitis A virus strains found in the drinking water of western Colombia. *Biomédica*, 29: 209-217.
- NAINAN, O.V.; XIA, G.; VAUGHAN, G. & MARGOLIS, H.S. 2006. Diagnosis of hepatitis a virus infection: a molecular approach. *Clinical Microbiology Reviews*, 19: 63-79, <http://dx.doi.org/10.1128/CMR.19.1.63-79.2006>
- NAKAGOMI, T.; CORREIA, J.B.; NAKAGOMI, O.; MONTENEGRO, F.M.U.; CUEVAS, L.E.; CUNLIFFE, N.A. & HART, C.A. 2008. Norovirus infection among children with acute gastroenteritis in Recife, Brazil: disease severity is comparable to rotavirus gastroenteritis. *Archives of Virology*, 153: 957-960, <http://dx.doi.org/10.1007/s00705-008-0060-7>
- OKADA, M.; OGAWA, T.; KAIHO, I. & SHINOZAKI, K. 2005. Genetic analysis of noroviruses in Chiba Prefecture, Japan, between 1999 and 2004. *Journal of Clinical Microbiology*, 43: 4391-4401, <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.43.9.4391-4401.2005>
- PAPAPETROPOULOU, M. & VANTARAKIS, A.C. 1998. Detection of adenovirus outbreak at a municipal swimming pool by nested PCR amplification. *Journal of Infection*, 36: 101-103, [http://dx.doi.org/10.1016/S0163-4453\(98\)93414-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0163-4453(98)93414-4)
- PARASHAR, U.D.; LI, J.F.; CAMA, R.; DEZALIA, M.; MONROE, S.S.; TAYLOR, D.N.; FIGUEROA, D.; GILMAN, R.H. & GLASS, R.I. 2004. Human caliciviruses as a cause of severe gastroenteritis in Peruvian children. *Journal of Infectious Diseases*, 190: 1088-1092, <http://dx.doi.org/10.1086/423324>
- PATEL, M.M.; WIDDOWSON, M.-A.; GLASS, R.I.; AKAZAWA, K.; VINJÉ, J. & PARASHAR, U.D. 2008. Systematic literature review of role of noroviruses in sporadic gastroenteritis. *Emerging Infectious Diseases*, 14: 1224-1231, <http://dx.doi.org/10.3201/eid1408.071114>
- PATEL, M.M.; HALL, A.J.; VINJÉ, J. & PARASHAR, U.D. 2009. Noroviruses: A comprehensive review. *Journal of Clinical Virology*, 44: 1-8, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcv.2008.10.009>
- PAYNE, S.B.; GRILLI, E.A.; SMITH, A.G. & HOSKINS, T.W. 1984. Investigation of an outbreak of adenovirus type 3 infection in a boys' boarding school. *The Journal of Hygiene*, 93: 277-283, <http://dx.doi.org/10.1017/S0022172400064809>
- PEREZ-VARGAS, J.; ISA, P.; LOPEZ, S. & ARIAS, C.F. 2006. Rotavirus vaccine: early introduction in Latin America-risks and benefits. *Archives of Medical Research*, 37: 1-10, <http://dx.doi.org/10.1016/j.arcmed.2005.06.004>
- PINA, S.; PUIG, M.; LUCENA, F.; JOFRE, J. & GIRONES, R. 1998. Viral pollution in the environment and in shellfish: human 11 adenovirus detection by PCR as an index of human viruses. *Applied and Environmental Microbiology*, 64: 3376-3382.

- PINA, S.; BUTI, M.; JARDÍ, R.; CLEMENTE-CASARES, P.; JOFRE, J. & GIRONES, R. 2001. Genetic analysis of hepatitis A virus strains recovered from the environment and from patients with acute hepatitis. *Journal of General Virology*, 82: 2955-2963.
- POND, K. 2005. *Water recreation and disease*. Plausibility of Associated Infections: Acute Effects, Sequelae and Mortality. IWA Publishing, London, GL. 239p.
- PRADO, T.; SILVA, D.M.; GUILAYN, W.C.; ROSE, T.L.; GASPAR, A.M. & MIAGOSTOVICH, M.P. 2011. Quantification and molecular characterization of enteric viruses detected in effluents from two hospital wastewater treatment plants. *Water Research*, 45: 1287-1297, <http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2010.10.012>
- PROJETO AMBIENTAL LAGOA LIMPA. 2009. Rio de Janeiro, Brasil. < [www.lagoalimpa.com.br/oprojeto](http://www.lagoalimpa.com.br/oprojeto)>. (Acesso em 20/12/2009).
- PUIG, M.; JOFRE, J.; LUCENA, F.; ALLARD, A.; WADELL, G. & GIRONES, R. 1994. Detection of adenoviruses and enteroviruses in polluted waters by nested PCR amplification. *Applied and Environmental Microbiology*, 60: 2963-2970.
- PUSCH, D.; OH, D.Y.; WOLF, S.; DUMKE, R.; SCHROTER-BOBSIN, U.; HOHNE, M.; RÖSKE, I. & SCHREIER, E. 2005. Detection of enteric viruses and bacterial indicators in German environmental waters. *Archives of Virology*, 150: 929-947, <http://dx.doi.org/10.1007/s00705-004-0467-8>
- RAJAL, V.B.; MACSWAIN, B.S.; THOMPSON, D.E.; LEUTENEGGER, C.M. & WUERTZ, S. 2007. Molecular quantitative analysis of human viruses in California stormwater. *Water Research*, 41: 4287-4298, <http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2007.06.002>
- RIBEIRO, L.R.; GIUBERTI, R.S.O.; BARREIRA, D.M.P.G.; SAICK, K.W.; LEITE, J.P.G.; MIAGOSTOVICH, M.P. & SPANO, L.C. 2008. Hospitalization due to norovirus and genotypes of rotavirus in pediatric patients, state of Espírito Santo. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 103: 201-206, <http://dx.doi.org/10.1590/S0074-02762008000200013>
- RICHARDSON, S.; GRIMWOOD, K.; GORRELL, R.; PALOMBO, E.; BARNES, G. & BISHOP, R. 1998. Extended excretion of rotavirus after severe diarrhoea in young children. *Lancet*, 351: 1844-1848, [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(97\)11257-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(97)11257-0)
- RIGOTTO, C.; VICTORIA, M.; MORESCO, V.; KOLESNIKOVAS, C.K.; CORRÊA, A.A.; SOUZA, D.S.; MIAGOSTOVICH, M.P.; SIMÕES, C.M. & BARARDI, C.R. 2010. Assessment of adenovirus, hepatitis A virus and rotavirus presence in environmental samples in Florianópolis, South Brazil. *Journal of Applied Microbiology*, 109: 1979-1987, <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2672.2010.04827.x>
- ROBERTSON, B.H.; JANSEN, R.W.; KHANNA, B.; TOTSUKA, A.; NAINAN, O.V.; SIEGL, G.; WIDELL, A.; MARGOLIS, H.S.; ISOMURA, S.; ITO, K.; ISHIZU, T.; MOTITSUGU, Y. & LEMON, S.M. 1992. Genetic relatedness of hepatitis A virus strains recovered from different geographical regions. *Journal of General Virology*, 73: 1365-1377, <http://dx.doi.org/10.1099/0022-1317-73-6-1365>
- ROSE, M.A.; DHAR, A.K.; BROOKS, H.A.; ZECCHINI, F. & GERSBERG, R.M. 2006. Quantitation of hepatitis A virus and enterovirus levels in the lagoon canals and Lido beach of Venice, Italy, using real-time RT-PCR. *Water Research*, 40: 2387-2396, <http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2006.03.030>
- SANTOS, N. & HOSHINO, Y. 2005. Global distribution of rotavirus serotypes/genotypes and its implication for the development and implementation of an effective rotavirus vaccine. *Reviews in Medical Virology*, 15: 29-56, <http://dx.doi.org/10.1002/rmv.448>
- SANTOS, N. & SOARES, C. 2008. Víroses entéricas. Pp. 160-166. In: N.S.O. Santos; M.T.V. Romanos & M.D. Wigg (eds.). *Introdução à Virologia Humana*. 2 edição. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, RJ. 532p.
- SCHETS, F.M.; DE RODA HUSMAN, A.M. & HAVELAAR, A.H. 2010. Disease outbreaks associated with untreated recreational water use. *Epidemiology and Infection*, 10: 1-12, <http://dx.doi.org/10.1017/S0950268810002347>
- SEYFRIED, P.L.; TOBIN, R.S.; BROWN, N.E. & NESS, P.F. 1985. A prospective study of swimming-related illness. I. Swimming-associated health risk. *American Journal of Public Health*, 75: 1068-1070, <http://dx.doi.org/10.2105/AJPH.75.9.1068>
- SILVA, A.M.; VIEIRA, H.; MARTINS, N.; GRANJA, A.T.; VALE, M.J. & VALE, F.F. 2010. Viral and bacterial contamination in recreational waters: a case study in the Lisbon bay area. *Journal of Applied Microbiology*, 108: 1023-1031, <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2672.2009.04503.x>
- SKRABER, S.; GASSIOLLOU, B.; SCHWARTZBROD, L. & GANTZER, C. 2004. Survival of infectious Poliovirus-1 in river water compared to the persistence of somatic coliphages, thermotolerant coliforms and Poliovirus-1 genome. *Water Research*, 38: 2927-2933, <http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2004.03.041>



- SOARES, C.C.; SANTOS, N.; BEARD, R.S.; ALBUQUERQUE, M.C.; MARANHÃO, A.G.; ROCHA, L.N.; RAMÍREZ, M.L.; MONROE, S.S.; GLASS, R.I. & GENTSCH, J. 2007. Norovirus detection and genotyping for children with gastroenteritis, Brazil. *Emerging Infectious Diseases*, 13: 1244-1246, <http://dx.doi.org/10.3201/eid1308.070300>
- TAMURA, K.; DUDLEY, J.; NEI, M. & KUMAR, S. 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*, 24: 1596-1599, <http://dx.doi.org/10.1093/molbev/msm092>
- THOMPSON, J.D.; HIGGINS, D.G. & GIBSON, T.J. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, 22: 4673-4680, <http://dx.doi.org/10.1093/nar/22.22.4673>
- THORNTON, A.C.; JENNINGS-CONKLIN, K.S. & MCCORMICK, MI. 2004. Noroviruses: agents in outbreaks of acute gastroenteritis. *Disaster Management & Response*, 2: 4-9, <http://dx.doi.org/10.1016/j.dmr.2003.11.001>
- VAIDYA, S.R.; CHITAMBAR, S.D. & ARANKALLE, VA. 2002. Polymerase chain reaction-based prevalence of hepatitis A, hepatitis E and TT viruses in sewage from an endemic area. *Journal of Hepatology*, 37: 131-136, [http://dx.doi.org/10.1016/S0168-8278\(02\)00106-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0168-8278(02)00106-X)
- VAN HEERDEN, J.; EHLERS, M.M.; VAN ZYL, W.B. & GRABOW, H.O.K. 2003. Incidence of adenoviruses in raw and treated water. *Water Research*, 37: 3704-3708, [http://dx.doi.org/10.1016/S0043-1354\(03\)00245-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0043-1354(03)00245-8)
- VICTORIA, M.; CARVALHO-COSTA, F.Q.; HEINEMANN, M.B.; LEITE, J.P. & MIAGOSTOVICH, M. 2007. Prevalence and molecular epidemiology of noroviruses in hospitalized children with acute gastroenteritis in Rio de Janeiro, Brazil, 2004. *The Pediatric Infectious Disease Journal*, 26: 602-606, <http://dx.doi.org/10.1097/INF.0b013e3180618bea>
- VICTORIA, M.; GUIMARÃES, F.R.; FUMIAN, T.M.; FERREIRA, FF.; VIEIRA, C.B., SHUBO, T.; LEITE, J.P. & MIAGOSTOVICH, M.P. 2010a. One year monitoring of Norovirus in a Sewage Treatment Plant in Rio de Janeiro, Brazil. *Journal of Water and Health*, 8: 158-165, <http://dx.doi.org/10.2166/wh.2009.012>
- VICTORIA, M.; RIGOTTO, C.; MORESCO, V.; DE ABREU CORRÊA, A.; KOLESNIKOVAS, C.; LEITE, J.P.; MIAGOSTOVICH, M.P. & BARARDI, C.R. 2010b. Assessment of norovirus contamination in environmental samples from Florianópolis City, Southern Brazil. *Journal of Applied Microbiology*, 109: 231-238, <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2672.2009.04646.x>
- VIDAL, R.; SOLARI, V.; MAMAMI, N.; JIANG, X.; VOLLAIRE, J.; ROESSLER, P.; PRADO, V.; MATSON, D.O. & O'RYAN, M.L. 2005. Caliciviruses and Foodborne Gastroenteritis, Chile. *Emerging Infectious Diseases*, 11: 1134-1136, <http://dx.doi.org/10.3201/eid1107.041062>
- VIEIRA, C.B. 2010. Detecção, quantificação e caracterização molecular de vírus gastroentéricos na Lagoa Rodrigo de Freitas, 2007-2008. *Dissertação de Mestrado*. Instituto Oswaldo Cruz/Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, RJ, Brasil. 101p.
- VIEIRA, C.B.; MENDES, A.C.O.; GUIMARÃES, F.R.; FUMIAN, T.M.; LEITE, J.P.G.; GASPAS, A.M.C. & MIAGOSTOVICH, M.P. Detection of enteric viruses in recreational waters of an urban lagoon in the city of Rio de Janeiro, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. (in press).
- VILLAR, L.M.; LAMPE, E.; MEYER, A. & GASPAS, A.M. 2004. Genetic variability of hepatitis A virus isolates in Rio de Janeiro: implications for the vaccination of school children. *Brazilian Journal of Medical and Biology Research*, 37: 1779-1787, <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-879X2004001200003>
- VILLAR, L.M.; de PAULA, V.S.; DINIZ-MENDES, L.; LAMPE, E. & GASPAS, A.M. 2006. Evaluation of methods used to concentrate and detect hepatitis A virus in water samples. *Journal of Virological Methods*, 137: 169-176, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jviromet.2006.06.008>
- VINJÉ, J.; HAMIDJAJA, R.A. & SOBSEY, M.D. 2004. Development and application of a capsid VP1 (region D) based reverse transcription PCR assay for genotyping of genogroup I and II noroviruses. *Journal of Virological Methods*, 116: 109-117, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jviromet.2003.11.001>
- VITRAL, C.L.; YOSHIDA, C.F.; LEMOS, E.R.; TEIXEIRA, C.S. & GASPAS, A.M. 1998. 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. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 93: 1-5, <http://dx.doi.org/10.1590/S0074-02761998000100001>
- VITRAL, C.L.; GASPAS, A.M. & SOUTO, F.J. 2006. Epidemiological pattern and mortality rates for hepatitis A in Brazil, 1980-2002--a review. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 101: 119-127, <http://dx.doi.org/10.1590/S0074-02762006000200001>
- VITRAL, C.L.; SOUTO, F.J. & GASPAS, A.M. 2008. Changing epidemiology of hepatitis A in Brazil: reassessing immunization

- policy. *Journal of Viral Hepatitis*, 15: 22-25, <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2893.2008.01024.x>
- WARD, R.L.; KNOWLTON, D.R. & WINSTON, P.E. 1986. Mechanism of inactivation of enteric viruses in fresh water. *Applied and Environmental Microbiology*, 52: 450-459.
- WIDDOWSON, M.A.; SULKA, A.; BULENS, S.N.; BEARD, R.S.; CHAVES, S.S.; HAMMOND, R.; SALEHI, E.D.; SWANSON, E.; TOTARO, J.; WORON, R.; MEAD, P.S.; BRESEE, J.S.; MONROE, S.S. & GLASS, R.I. 2005. Norovirus and foodborne disease, United States, 1991–2000. *Emerging Infectious Diseases*, 11: 95-102, <http://dx.doi.org/10.3201/eid1101.040426>
- WINOKUR, P.L.; MCLINDEN, J.H. & STAPLETON, J.T. 1991. The hepatitis A virus polyprotein expressed by a recombinant vaccinia virus undergoes proteolytic processing and assembly into viruslike particles. *Journal of Virology*, 65: 5029-5036.
- WINOKUR, P.L. & STAPLETON, J.T. 1992. Immunoglobulin prophylaxis for hepatitis A. *Clinical Infectious Diseases*, 14: 580-586, <http://dx.doi.org/10.1093/clinids/14.2.580>
- WONG, M.; KUMAR, L.; JENKINS, T.M.; XAGORARAKI, I.; PHANIKUMAR, M.S. & ROSE, J.B. 2009. Evaluation of public health risks at recreational beaches in Lake Michigan via detection of enteric viruses and a human-specific bacteriological marker. *Water Research*, 43: 1137-1149, <http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2008.11.051>
- WYN-JONES, A.P.; PALLIN, R.; DEDOUSSIS, C.; SHORE, J. & SELLWOOD, J. 2000. The detection of small round-structured viruses in water and environmental materials. *Journal of Virological Methods*, 87: 99-107, [http://dx.doi.org/10.1016/S0166-0934\(00\)00157-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0166-0934(00)00157-9)
- WYN-JONES, A.P.; CARDUCCI, A.; COOK, N.; D'AGOSTINO, M.; DIVIZIA, M.; FLEISCHER, J.; GANTZER, C.; GAWLER, A.; GIRONES, R.; HÖLLER, C.; DE RODA HUSMAN, A.M.; KAY, D.; KOZYRA, I.; LÓPEZ-PILA, J.; MUSCILLO, M.; NASCIMENTO, M.S.; PAPAGEORGIOU, G.; RUTJES, S.; SELLWOOD, J.; SZEWCZYK, R. & WYER, M. 2011. Surveillance of adenoviruses and noroviruses in European recreational waters. *Water Research*, 45: 1025-1038, <http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2010.10.015>
- ZENQ, S.Q.; HALKOSALO, A.; SALMINEN, M.; SZAKAL, E.D.; PUUSTINEN, L. & VESIKARI, T. 2008. One-step quantitative RT-PCR for the detection of rotavirus in acute gastroenteritis. *Journal of Virological Methods*, 153: 238-240, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jviromet.2008.08.004>
- ZHENG, D.P.; ANDO, T.; FANKHAUSER, R.L.; BEARD, R.S.; GLASS, R.I. & MONROE, S.S. 2006. Norovirus classification and proposed strain nomenclature. *Virology*, 346: 312-323, <http://dx.doi.org/10.1016/j.virol.2005.11.015>

Submetido em: 31/08/2011

Aceito em: 21/11/2011