



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
NÚCLEO DE MEDICINA TROPICAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DOENÇAS TROPICAIS**

**DETECÇÃO E GENOTIPAGEM DE NOROVÍRUS EM DIFERENTES AMOSTRAS
DE ÁGUA E ESGOTO NÃO TRATADO NA CIDADE DE BELÉM, PARÁ, BRASIL,
2008 A 2010**

DIELLE MONTEIRO TEIXEIRA

**BELÉM
2014**

DIELLE MONTEIRO TEIXEIRA

**DETECÇÃO E GENOTIPAGEM DE NOROVÍRUS EM DIFERENTES AMOSTRAS
DE ÁGUA E ESGOTO NÃO TRATADO NA CIDADE DE BELÉM, PARÁ, BRASIL,
2008 A 2010**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Doenças Tropicais do Núcleo de Medicina Tropical, da Universidade Federal do Pará, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Doenças Tropicais.

Orientador: Profa. Dra. Yvone Benchimol Gabbay

**BELÉM
2014**

DIELLE MONTEIRO TEIXEIRA

DETECÇÃO E GENOTIPAGEM DE NOROVÍRUS EM DIFERENTES AMOSTRAS DE ÁGUA E ESGOTO NÃO TRATADO NA CIDADE DE BELÉM, PARÁ, BRASIL, 2008 A 2010

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Doenças Tropicais do Núcleo de Medicina Tropical, da Universidade Federal do Pará, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Doenças Tropicais.

Aprovada em:
Conceito:

Banca Examinadora

Profa. Dra. Yvone Benchimol Gabbay
Orientadora – Seção de Virologia
Instituto Evandro Chagas, SVS, MS

Profa. Dra. Karla Tereza Silva Ribeiro
Membro titular – Instituto de Ciências Biológicas
Universidade Federal do Pará

Profa. Dra. Máisa Silva Sousa
Membro titular – Núcleo de Medicina Tropical
Universidade Federal do Pará

Prof. Dr. Rodrigo Vellasco Duarte Silvestre
Membro titular - Seção de Virologia
Instituto Evandro Chagas, SVS, MS

Prof. Dr. Hugo Reis Resque
Membro suplente - Seção de Virologia
Instituto Evandro Chagas, SVS, MS

Dedico a Deus autor da minha história, a minha família pelo apoio incondicional, a minha orientadora Dra. Yvone Gabbay pela oportunidade, amizade e grandiosos ensinamentos, e a todos que contribuíram para a realização desta pesquisa.

AGRADECIMENTOS

Ao Senhor Deus, autor da minha história, pelo dom da vida, saúde e bênçãos.

A minha família, meus pais Simão e Orilene, meu irmão Diego e meu sobrinho Pietro, por estarem sempre ao meu lado apoiando-me nas minhas decisões e pelo amor incondicional, a vocês sempre dedicarei as minhas conquistas.

A minha orientadora, Dra Yvone Gabbay, por ser um exemplo de profissional e uma excelente orientadora, pela dedicação e compromisso dispensados a cada um de seus alunos, pela amizade, paciência a cada correção e pela oportunidade e confiança que deposita em mim ao longo desses seis anos no laboratório.

Ao Instituto Evandro Chagas (IEC), na pessoa da Dra. Elizabeth Santos, e à Seção de Virologia, na pessoa do Dr. Alexandre Linhares, pelo suporte na infraestrutura necessária durante o desenvolvimento desse trabalho e de muitos outros realizados nesse grande centro de pesquisa.

Ao laboratório de Microbiologia Ambiental da Seção de Meio Ambiente do IEC, especialmente a Dra Lena de Sá Moraes e sua excelente equipe (Tereza, Sr. Pio, D. Geralda, Denise, Nayara etc.), por conduzirem as coletas de campo, pela gentileza em ceder os dados referentes a colimetria e por oferecer infraestrutura para a realização das concentrações das amostras, especialmente a Tereza companheira a cada concentração.

Ao Dr. Tulio Fumian pelos importantes ensinamentos durante sua passagem pelo laboratório de Vírus Entéricos, principalmente em relação ao sequenciamento genômico.

A Dra. Maísa Sousa, pelo apoio na padronização dos testes de semi *nested* e PCR em tempo real.

Ao Renato Bandeira da Seção de Virologia, pela execução de todas as análises filogenéticas.

A Luana Soares, Mirleide Cordeiro, Luana Barbagelata e Jessylene pela colaboração e gentileza em disponibilizarem um pouco do seu tempo para colocar os nossos testes de sequenciamento no sequenciador automático por elas manuseado.

Ao laboratório de Físico-Química de Águas da Seção de Meio Ambiente do IEC, na pessoa do Dr. Bruno Carneiro por realizar as análises físico-químicas das amostras e por gentilmente ceder esses dados.

Ao Instituto Nacional de Meteorologia (INMET) por fornecer os dados climáticos da cidade de Belém.

Ao Fabrício Aleixo do laboratório de Geoprocessamento do IEC, pela confecção do mapa com os pontos de coleta das águas e esgoto.

Ao CNPq pelo apoio financeiro no primeiro ano de pesquisa, sob a forma de bolsa de mestrado.

A FAPESPA, pelo suporte financeiro ao projeto maior no qual a presente dissertação está inserida.

Aos meus amigos do laboratório de Vírus Entéricos: Evandro, Silvia, Jones, Luciana, Hugo, Paula, Ian, Vanessa, Juliana, Tammy, Thayara, Daniele, Beatriz, Larissa, Kattia, Monica, Abraão e Germano pela companhia diária e pela ajuda no laboratório. Especialmente a Paula e Silvia pela amizade dentro e fora do laboratório, a Luciana pelas grandes dicas e sugestões durante a escrita desta dissertação e ao Jones, pela realização das análises estatísticas dos dados obtidos e por sempre estar disposto a ajudar a todos no laboratório.

Aos colegas do laboratório de Rotavírus do IEC.

A todos os colegas da Seção de Virologia do IEC.

Aos funcionários da biblioteca do IEC, pelo apoio na busca de artigos científicos.

A toda a equipe do PPGDT-NMT/UFPA, corpo técnico administrativo e aos docentes.

Aos membros da banca Prof. Dra. Karla Ribeiro, Prof. Dra. Maísa Sousa, Prof. Dr. Rodrigo Vellasco e Prof. Dr. Hugo Resque, por aceitarem o convite e por todas as considerações valiosas para o aprimoramento deste trabalho.

Aos meus colegas da turma de mestrado 2012 do PPGDT-NMT/UFPA, pela companhia nas aulas, trabalhos e pelos momentos de risadas.

A todos que contribuíram para a realização dessa pesquisa, muito obrigada!

RESUMO

Os vírus entéricos eliminados pelas fezes de indivíduos infectados se dispersam nos ambientes aquáticos por meio do lançamento de esgoto. Dentre esses vírus os norovírus (NoV) são atualmente considerados a principal causa de surtos de gastroenterite mundialmente, decorrentes da ingestão de água e alimentos contaminados, como também estão associados a hospitalizações. O objetivo dessa pesquisa foi detectar e caracterizar parcialmente os NoV humanos (genogrupos I e II) em diferentes tipos de água e esgoto bruto da Região Metropolitana de Belém. O estudo envolveu águas superficiais de baía (Ver-o-Peso), rio (Porto do Açaí), igarapé (Tucunduba) e dois mananciais (Bolonha e Água Preta), como também água tratada (ETA-Bolonha) e esgoto bruto (EEE-UNA), coletadas mensalmente ao longo de dois anos. Essas águas e esgoto (2 litros) foram inicialmente concentradas em membranas filtrantes obtendo-se um volume final de 2mL. O ácido nucléico foi extraído pelo método da sílica e submetido à reação de semi *nested* RT-PCR (reação em cadeia mediada pela Polimerase precedida de transcrição reversa) utilizando iniciadores específicos para NoV GI e GII. O cDNA obtido após transcrição reversa foi utilizado para pesquisa de GI/GII também por TaqMan® PCR em tempo real. As amostras positivas por ambas as metodologias moleculares foram analisadas para a região 5'-terminal da ORF2 por *nested* (GI) e semi *nested* (GII) com o intuito de obter amplicon para identificação das cepas circulantes, sendo posteriormente purificados com uso de kit comercial e submetidos a caracterização molecular em sequenciador automático. As sequências obtidas foram editadas, alinhadas e comparadas com outras depositadas no banco de genes (GenBank - NCBI) e no site *NoV genotyping tool*. No período de novembro de 2008 a outubro de 2010, 168 amostras de água e esgoto foram coletadas e analisadas quanto a presença de NoV, obtendo-se positividade de 33,9% (57/168), das quais 21,1% (12/57) foram positivas somente por TaqMan® PCR em tempo real, 19,3% (11/57) por semi *nested* e 59,6% (34/57) por ambas. Considerando as duas metodologias utilizadas, nos casos positivos, GI (82,5% -47/57) foi mais frequente do que GII (79,0% - 45/57). Porém, na maioria das amostras houve coexistência dos dois genogrupos (61,4% - 35/57), principalmente nas amostras do igarapé Tucunduba e EEE-UNA, considerados os locais mais contaminados por NoV. Por outro lado, na ETA-Bolonha esse agente não foi encontrado. Das 57 amostras positivas por TaqMan® PCR em tempo real e/ou semi *nested* RT-PCR, 53 foram retestadas para a região 5'-terminal da ORF2, uma vez que quatro apresentaram quantidade insuficiente de material que permitisse uma nova análise, assim em 47,2% (25/53) o genoma de NoV foi detectado, das quais 12% (3/25) pertenciam ao GI, 24% (6/25) ao GII e 64% (16/25) para ambos. Os genótipos mais frequentes de GI e GII foram respectivamente GI.8 (n=8) e GII.4 (n=12), porém outros genótipos foram observados com menor incidência como GII.6 (n=3), GII.9 (n=2), GII.12 (n=1), GII.14 (n=1), GI.1 (n=1) e GI.4 (n=2). Devido a baixa qualidade das sequências obtidas oito amostras não puderam ser genotipadas para GI e três para GII. Das 96 amostras com concentração de coliformes termotolerantes acima do recomendado, 34 (35,4%) também foram positivas para NoV. Aumento na condutividade e sólidos totais dissolvidos foi observado nos materiais do Ver-o-Peso e igarapé Tucunduba, assim como a turbidez foi nitidamente mais elevada nesses locais e no Porto do Açaí. No período menos chuvoso (julho a novembro) houve uma tendência no aumento da positividade para NoV, e nos meses de maior pluviosidade (dezembro a junho) notou-se um decréscimo na incidência desse agente. Os resultados obtidos no presente estudo apontam a circulação de NoV GI e GII nos ambientes aquáticos de Belém, revelando a degradação que estes corpos hídricos vêm sofrendo como consequência da precariedade ou ausência de saneamento na nossa cidade, permitindo a permanência nesses ecossistemas, juntamente com seus efluentes, de patógenos causadores de doenças.

Palavras-chave: Norovírus, genotipagem, água, esgoto, Belém

ABSTRACT

Enteric viruses excreted in feces from infected individuals dispersed in aquatic environments by sewage discharge. Among these viruses, the norovirus (NoV) is actually considered the main cause of gastroenteritis outbreaks worldwide, resulting from the ingestion of contaminated food and water as well as is also associated with hospitalizations. This research aimed to detect and partially characterize the human NoV (GI/GII) in different water matrices and in untreated sewage from Metropolitan Region of Belem. The study involved superficial waters from bay (Ver-o-Peso), river (Acai's Port), stream (Tucunduba) and two lakes (Bolonha and Agua Preta), as well as treated water (WTP-Bolonha) and untreated sewage (SLP-UNA), monthly collected over two years. The water and sewage (2 liters) were initially concentrated on filtering membranes to obtain a final volume of 2 mL. The nucleic acid was extracted by silica method and submitted to semi nested RT-PCR (reverse transcription Polymerase chain reaction) using NoV GI and GII specific primers. The cDNA obtained after reverse transcription was also used to investigate the GI/GII by TaqMan® real time PCR. The positive samples for both molecular methods were analyzed for 5'end ORF2 by nested (for GI) and semi nested (for GII) in order to obtain amplicon for identification of circulating strains, being further purified using a commercial kit and submitted to molecular characterization in the automated sequencer. The obtained sequences were edited, aligned and compared to others available in gene bank (NCBI) and in the site NoV genotyping tool. In the period of November 2008 to October 2010, 168 water and sewage samples were collected and analyzed for NoV presence, obtaining a positivity of 33.9% (57/168) of which 21.1% (12/57) were positive only by TaqMan® real time PCR, 19.3% (11/57) only by semi nested and 59.6% (34/57) for both. Considering the two methodologies used, in the positive cases GI (82.5% - 47/57) was most frequent than GII (79.0% - 45/57). However, in most samples there was coexistence of the two genogroups (61.4% - 35/57), mainly in the Tucunduba and SLP-UNA samples, considered the most NoV contaminated sites. On the other hand, in WTP-Bolonha this agent was not found. Of 57 positive samples by TaqMan® real time PCR and/or semi nested RT-PCR, 53 were retested for 5'end ORF2, since four samples showed insufficient quantity of material which allowed a new analyze, so, in 47.2% (25/53) the NoV genome was detected, of these 12% (3/25) belonging to GI, 24% (6/25) to GII and 64% (16/25) for both. The most frequent GI and GII genotypes were GI.8 (n=8) and GII.4 (n=12), respectively, but others genotypes were also observed with lower incidence as GII.6 (n=3), GII.9 (n=2), GII.12 (n=1), GII.14 (n=1), GI.1 (n=1) and GI.4 (n=2). Due to low quality of sequences obtained, eight samples could not be genotyped for GI and three for GII. Of 96 samples with concentration of thermotolerant coliforms above the recommended, 34 (35.4%) were also NoV positive. Increase on conductivity and total dissolved solids was observed in materials from Ver-o-Peso and Tucunduba, as well as the turbidity was notably higher in these places and the Acai's Port. In the less rainy period (July to November) there was a trend in positivity increasing for NoV, and in the highest rainfall (December to June) a decrease in the incidence of this agent was noted. The results obtained in the present study indicate the circulation of NoV GI and GII in aquatic environments in Belem, revealing the degradation that these water bodies have suffered, as a result of poverty or lack of sanitation in our city, allowing the permanence of pathogens in these ecosystems, along with its effluents.

Key-words: Norovirus, genotyping, water, sewage, Belém city.

SUMÁRIO

LISTA DE ILUSTRAÇÕES	10
LISTA DE TABELAS	12
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	13
1. INTRODUÇÃO	15
2. JUSTIFICATIVA	17
3. OBJETIVOS	19
3.1. OBJETIVO GERAL	19
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	19
4. REFERENCIAL TEÓRICO	20
4.1. AMBIENTE E SAÚDE	20
4.2. HISTÓRICO DA VIROLOGIA AMBIENTAL	23
4.3. RESISTÊNCIA VIRAL NO AMBIENTE	25
4.4. TRANSMISSÃO HÍDRICA DE VÍRUS ENTÉRICOS	26
4.5. NOROVÍRUS	27
4.5.1. Histórico	27
4.5.2. Morfologia e classificação genética	28
4.5.3. Epidemiologia dos Norovírus	32
4.5.4. Aspectos clínicos	33
4.5.5. Diagnóstico laboratorial	34
4.5.6. Prevenção e controle	35
4.5.7. Tratamento	36
4.6. DETECÇÃO DE AGENTES VIRAIS EM AMOSTRAS AMBIENTAIS	36
4.6.1. Técnicas de concentração	36
4.6.2. Métodos moleculares	38
5. MATERIAL E MÉTODOS	39
5.1. ÁREA DE ESTUDO	39
5.2. COLETA DAS AMOSTRAS	42
5.3. ANÁLISE DE COLIFORMES TERMOTOLERANTES, PARÂMETROS FÍSICO QUÍMICOS E CLIMÁTICOS	42
5.4. CONCENTRAÇÃO	43
5.5. DETECÇÃO DE NOROVÍRUS	44

5.5.1.	Extração de ácido nucleico	44
5.5.2.	Síntese do DNA complementar por Transcrição reversa	45
5.5.3.	Semi <i>nested</i> RT-PCR	45
5.5.4.	TaqMan® PCR em tempo real	48
5.6.	GENOTIPAGEM DE NOROVÍRUS	50
5.6.1.	<i>Nested</i> e Semi <i>nested</i> PCR	50
5.6.2.	Purificação e quantificação do ácido nucleico	51
5.6.3.	Sequenciamento parcial do genoma de Norovírus	51
5.7.	ANÁLISE ESTATÍSTICA	53
6.	RESULTADOS	54
6.1.	DETECÇÃO DO GENOMA DE NOROVÍRUS	54
6.2.	FREQUÊNCIA DOS GENOGRUPOS I E II DE NOROVÍRUS E CO- CIRCULAÇÃO	54
6.3.	AVALIAÇÃO DOS MÉTODOS MOLECULARES EMPREGADOS	57
6.4.	POSITIVIDADE PARA NOROVÍRUS NOS LOCAIS ESTUDADOS	57
6.5.	GENOTIPAGEM DAS AMOSTRAS POSITIVAS PARA NOROVÍRUS	58
6.6.	ASSOCIAÇÃO ENTRE COLIFORMES TERMOTOLERANTES E CONTAMINAÇÃO POR NOROVÍRUS	63
6.7.	ASSOCIAÇÃO ENTRE PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS E CONTAMINAÇÃO POR NOROVÍRUS	64
6.8.	ASSOCIAÇÃO ENTRE CARACTERÍSTICAS CLIMÁTICAS E POSITIVIDADE PARA NOROVÍRUS	65
7.	DISCUSSÃO	67
8.	CONCLUSÕES	73
9.	PERSPECTIVAS	74
	REFERÊNCIAS	75

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Quadro 1	Patógenos e doenças associados com a via hídrica.....	22
Figura 1	Vias de disseminação dos vírus entéricos pelo ambiente.....	26
Figura 2	Classificação e taxonomia dos calicivírus.....	28
Figura 3	Partículas de NoV visualizadas por microscopia eletrônica de transmissão...	29
Figura 4	Representação esquemática do genoma de NoV.....	30
Figura 5	Classificação dos cinco genogrupos e 35 genótipos de NoV de acordo com a análise da sequência completa da proteína VP1.....	31
Figura 6	Pontos de coleta localizados na cidade de Belém, Pará Brasil.....	39
Quadro 2	Código dos sete pontos de amostragem localizados na cidade de Belém, Pará, Brasil	40
Figura 7	Materiais necessários para a coleta de água e esgoto.....	42
Figura 8	Processo de concentração aplicado nas amostras após a coleta.....	44
Quadro 3	Concentrações e volumes de reagentes utilizados na reação de transcrição reversa (RT).....	45
Quadro 4	Concentrações e volumes dos reagentes utilizados na primeira etapa da reação de semi <i>nested</i> RT-PCR.....	46
Quadro 5	Concentrações e volumes dos reagentes utilizados na segunda etapa da reação de semi <i>nested</i> RT-PCR, para detecção de norovírus genogrupos GI e GII.....	47
Quadro 6	Iniciadores utilizados na detecção de norovírus em amostras de água e esgoto por semi <i>nested</i> RT-PCR.....	48
Quadro 7	Concentrações e volumes dos reagentes utilizados na reação de TaqMan® PCR em tempo real para detecção dos genogrupos I e II de norovírus.....	49
Quadro 8	Iniciadores e sondas utilizados na detecção de norovírus em amostras de água e esgoto por TaqMan® PCR em tempo real.....	50
Quadro 9	Iniciadores utilizados na detecção de norovírus genogrupos GI e GII (região parcial do capsídeo) em amostras de água e esgoto por <i>nested</i> /semi <i>nested</i> PCR.....	51
Figura 9	Fluxograma de todos os procedimentos laboratoriais empregados na análise de norovírus.....	53
Figura 10	Frequência de NoV em 168 amostras de água e esgoto oriundas de sete pontos na cidade de Belém, Pará, novembro/2008 a outubro/2010.....	54
Figura 11	Frequência dos genogrupos I e II de NoV em 168 amostras de água e esgoto.....	55

Figura 12	Genótipos de GI e GII detectados nas amostras positivas para NoV pela região 5' terminal da ORF2 (capsídeo).....	60
Figura 13	Árvore filogenética dos genótipos de NoV GI encontrados nas amostras ambientais de Belém, Pará.....	61
Figura 14	Árvore filogenética dos genótipos de NoV GII encontrados nas amostras ambientais de Belém, Pará.....	62
Figura 15	Resultados médios das variáveis físico-químicas e positividade para NoV de acordo com o local de coleta durante o período do estudo.....	65
Figura 16	Precipitação e positividade para NoV, no período de novembro de 2008 a outubro de 2010.....	66

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Distribuição das amostras positivas e negativas para os genogrupos I e II de norovírus pelo semi <i>nested</i> RT-PCR e TaqMan® PCR em tempo real de acordo com o local de coleta, novembro de 2008 a outubro de 2010.....	56
Tabela 2	Comparação entre os resultados obtidos por TaqMan® PCR em tempo real e semi <i>nested</i> RT-PCR quanto à detecção de norovírus (GI/GII) em 168 amostras de água e esgoto analisadas, novembro de 2008 a outubro de 2010....	57
Tabela 3	Positividade para norovírus (genogrupos I e II) pelo semi <i>nested</i> RT-PCR e/ou TaqMan® PCR em tempo real de acordo com o local de coleta.....	58
Tabela 4	Genogrupos e genótipos detectados por local de coleta nas 25 amostras positivas para norovírus pela região 5' terminal da ORF2 (capsídeo).....	59
Tabela 5	Comparação entre ausência ou presença de norovírus em relação ao resultado de colimetria obtido em 144 amostras de água analisadas e de acordo com o local de coleta, novembro de 2008 a outubro de 2010.....	64

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

aa	Aminoácido
Af	clima tropical úmido ou clima equatorial segundo classificação climática de Köppen
cDNA	DNA complementar
COSANPA	Companhia de Saneamento do Pará
DMSO	Dimetil sulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucléico
EEE-UNA	Estação elevatória de esgoto do canal do UNA
EIE	Ensaio imunoenzimático
ETA	Estação de tratamento de água
ETE	Estação de tratamento esgoto
g	Gramma
GI	Norovírus do genogrupo I
GII	Norovírus do genogrupo II
H ₂ SO ₄	Ácido sulfúrico
IEC	Instituto Evandro Chagas
IME	Imunomicroscopia eletrônica
kb	Kilobase
L	Litro
mg/L	Miligramma por litro
mL	Mililitro
mm	Milímetros
mM	Milimolar
MgCl ₂	Cloreto de magnésio
nm	Nanômetro
NaOH	Hidróxido de sódio
NoV	Norovírus
NV	Vírus Norwalk
OD	Oxigênio dissolvido
ORF	Do inglês <i>open reading frame</i> que significa fase de leitura aberta
PA	Para análise
PCR	Reação em cadeia mediada pela Polimerase

pH	Potencial hidrogeniônico
pb	Pares de base
pmol	Picomol
ppm	Partes por milhão
qPCR	PCR quantitativa em tempo real
RNA	Ácido ribonucleico
rpm	Rotação por minuto
RpRd	RNA Polimerase RNA dependente
RT-PCR	Reação em cadeia mediada pela Polimerase precedida de transcrição reversa
SAMAM	Seção de Meio Ambiente do IEC
SAVIR	Seção de Virologia do IEC
STD	Sólidos totais dissolvidos
UNT	Unidades nefelométrica de turbidez
UV	Radiação ultravioleta
VLPs	Do inglês <i>virus-like particles</i> , que significa “partículas semelhantes à vírus”
<i>xg</i>	Gravidade, unidade de aceleração
μg	Micrograma
μL	Microlitro
μm	Micrômetro
μS	Micro Siemens
°C	Graus Celsius

1. INTRODUÇÃO

A água é um elemento precioso à permanência da vida no planeta e por isso é alvo de muitas preocupações, como o prenúncio de escassez e a manutenção de sua qualidade visando o consumo humano.

A qualidade microbiológica dos ambientes aquáticos utilizados para diversas finalidades (consumo humano, recreação, irrigação, etc) vêm sendo ameaçada, sobretudo em decorrência do impacto provocado pelo desordenado processo de urbanização e pela descarga de efluentes oriundos dos sistemas de saneamento precários, além do escoamento direto para as águas superficiais de dejetos provenientes de animais e humanos infectados, principalmente por vírus entéricos como rotavírus (RV), norovírus (NoV), sapovírus (SaV), astrovírus (AstV), adenovírus (AdV) e enterovírus (EV) (BOSCH, 1998; FONG & LIPP, 2005; IIZUKA *et al.*, 2010; SILVA *et al.*, 2009; WYN-JONES *et al.*, 2011).

Recentemente, o surgimento de metodologias para a concentração de partículas virais presentes na água permitiu a detecção desses vírus em amostras ambientais. O aprimoramento de técnicas moleculares, como a reação em cadeia mediada pela polimerase (PCR) com suas diferentes modalidades (*nested* PCR e PCR quantitativa-qPCR), tem estimulado a realização de diversos estudos em virologia ambiental em diferentes países, o que vem contribuindo para um conhecimento mais preciso da circulação desses agentes virais no ambiente (ALBINANA-GIMENEZ *et al.*, 2009; KATAYAMA *et al.*, 2002; LA ROSA *et al.*, 2010a; PRADO *et al.*, 2011; SILVA *et al.*, 2009; SUFFREDINI *et al.*, 2011; VICTORIA *et al.*, 2010a).

Dentre os vírus entéricos, o NoV assume importância por ser a causa mais comum de surtos de gastroenterites, responsável pela ocorrência de pelo menos 80-90% dos mesmos em âmbito mundial, acometendo pessoas de todas as faixas etárias. Esse agente também tem sido identificado tanto em casos de hospitalizações como em ambulatórios (LE GUYADER *et al.*, 2010; VICTORIA *et al.*, 2010a; CENTRO DE CONTROLE E PREVENÇÃO DE DOENÇAS, 2011).

Os NoV são vírus não envelopados, pertencentes à família *Caliciviridae*, gênero *Norovirus*, com simetria icosaédrica e possuindo cerca de 26 a 35 nm de diâmetro. Seu genoma é constituído de uma fita simples de RNA com polaridade positiva, estando dividido em cinco genogrupos, GI a GV, sendo os genogrupos I, II e IV os que infectam humanos (GREEN, 2007; CENTRO DE CONTROLE E PREVENÇÃO DE DOENÇAS, 2011; SUFFREDINI *et al.*, 2011).

A transmissão do NoV se dá pela via fecal oral, pelo contato pessoa a pessoa, aerossóis provenientes de vômitos, fômites e, principalmente, pela ingestão de água e alimentos contaminados, como mariscos (ostras e mexilhões) e vegetais crus (CENTRO DE CONTROLE E PREVENÇÃO DE DOENÇAS, 2011).

Estudos conduzidos em diversos países apontaram a presença de NoV em águas superficiais, destinadas à recreação e ao consumo humano e efluentes oriundos de esgoto tratado e não tratado, evidenciando o grande risco para a saúde humana após o contato com esses ambientes (CHEONG *et al.*, 2009; FONG & LIPP, 2005; KOH *et al.*, 2011; VICTORIA *et al.*, 2010a; WYN-JONES *et al.*, 2011).

2. JUSTIFICATIVA

A carência nas condições de saneamento e como consequência a má qualidade da água destinada ao consumo são graves problemas de saúde pública, pois estão diretamente relacionadas à transmissão de doenças.

Estudos epidemiológicos já relataram a ocorrência de diversos surtos associados à ingestão de água ou alimentos contaminados, sobretudo os relacionados a quadros de gastroenterite aguda, os quais representam 4,1% do total das doenças ocorridas em todo o mundo, sendo responsáveis por dois a quatro bilhões de episódios e 1,8 milhão de mortes a cada ano, principalmente entre menores de cinco anos (BOSCH, 1998; WYN-JONES & SELLWOOD, 2001; LECLERC *et al.*, 2002; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2004; GILL & HODGES, 2010).

O Instituto Evandro Chagas (IEC), mais especificamente a Seção de Virologia (SAVIR) vem, há mais de 30 anos, pesquisando os principais vírus entéricos como os RV, NoV, SaV, AstV e AdV entéricos (sorotipos 40/41) em amostras fecais e os resultados obtidos apontam para uma participação efetiva destes vírus nos processos diarreicos investigados. No entanto, devido à falta de metodologias para a concentração de partículas virais a partir da água não era possível detectar esses agentes neste material, e com isso, relacionar sua participação como veiculadora desses patógenos.

A partir de 2008, iniciou-se no IEC um estudo colaborativo entre a SAVIR e a Seção de Meio Ambiente (SAMAM), no qual foram estrategicamente selecionados sete pontos de amostragem onde já havia sido realizada uma vigilância ambiental para o *Vibrio cholerae* O1 (SÁ *et al.*, 2007). Na ocasião foi implementada a metodologia de concentração e detecção de RV, NoV, AstV, AdV e vírus da Hepatite A em águas e esgoto por PCR qualitativa, revelando a circulação desses agentes nas amostras ambientais da Região Metropolitana de Belém, Pará (MAESTRI *et al.*, 2010; TEIXEIRA *et al.*, 2010a, 2010b; GURJÃO *et al.*, 2010; SPADA *et al.*, 2011).

Nos últimos anos as técnicas de *nested* PCR e qPCR têm sido consideradas metodologias importantes para a identificação e quantificação dos NoV, sobretudo em estudos ambientais pela capacidade de detectar pequenas quantidades do genoma viral (GREEN *et al.*, 1998; LA ROSA *et al.*, 2009, LA ROSA *et al.*, 2010a; SUFFREDINI *et al.*, 2011). Além disso, ao utilizar a qPCR o risco de contaminação é minimizado, uma vez que os materiais são pouco manipulados.

Em muitos países, incluindo o Brasil, a avaliação da qualidade da água é realizada por meio da quantificação de bactérias, as quais não possuem relação com a presença ou ausência de contaminação viral (FONG & LIPP, 2005; TAVARES *et al.*, 2005; BRASIL, 2011). Para se determinar um bom indicador da qualidade da água algumas características como a persistência e a viabilidade do agente infeccioso no meio aquático e a dose requerida para estabelecer a infecção em indivíduos suscetíveis devem ser consideradas (LECLERC *et al.*, 2002).

Os vírus entéricos, por exemplo, podem permanecer viáveis por longos períodos na água resistindo às condições adversas do ambiente e até aos processos atualmente aplicados no tratamento de água e esgoto (LA ROSA *et al.*, 2010a). Além disso, possuem dose infectante extremamente baixa (1-50 partículas infecciosas) e são eliminados pelas fezes de indivíduos infectados em concentrações bastante elevadas, variando de 10^5 a 10^{11} partículas virais por grama de fezes (LECLERC *et al.*, 2002; FONG & LIPP, 2005; TAVARES *et al.*, 2005). Devido a isso, os vírus vêm sendo sugeridos como possíveis indicadores de contaminação fecal em ambientes aquáticos que, aliados aos atuais indicadores bacteriológicos, permitiriam avaliar a qualidade da água de forma mais eficaz e assim melhorar a saúde da população (FONG & LIPP, 2005; LA ROSA *et al.*, 2010a).

São raros os estudos na área de virologia ambiental na Região Norte e, considerando o impacto que os NoV representam para a saúde pública, e a participação da água como potencial veículo na transmissão desses agentes, é de fundamental importância a investigação da presença dos NoV em amostras ambientais por métodos eficazes, objetivando correlacionar a presença de surtos por provável contaminação hídrica, bem como a identificação das cepas circulantes, auxiliando na definição de estratégias que visem o monitoramento de águas, principalmente aquelas destinadas ao consumo humano.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Detectar a presença de NoV em diferentes amostras de água e esgoto não tratado na cidade de Belém, Pará, Brasil, 2008 a 2010.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar a frequência de NoV humano (genogrupos I e II) nos diferentes locais e amostras ambientais analisadas;
- Comparar a sensibilidade, especificidade e replicabilidade de duas técnicas moleculares quanto a detecção de NoV em amostras ambientais;
- Comparar o nível de contaminação por NoV dos pontos estudados frente ao esgoto e a água tratada;
- Identificar os genótipos de NoV circulantes nestes ambientes aquáticos;
- Correlacionar os achados referentes a presença de coliformes termotolerantes e dos fatores físico-químicos e pluviométricos nos casos positivos para NoV.

4. REFERENCIAL TEÓRICO

4.1. AMBIENTE E SAÚDE

Atualmente a preservação do ambiente em que vivemos é um dos assuntos mais discutidos a nível mundial. Essa preocupação tornou-se imprescindível diante da situação de degradação que se encontram os ecossistemas, o que pode gerar um colapso em relação a sobrevivência na Terra, já que os recursos naturais, considerados pelo homem como um bem inesgotável, tendem a ficar cada vez mais escassos (ORGANIZAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS, 2013).

Um ambiente “saudável” reflete diretamente no bem estar físico humano, e o desequilíbrio nessa relação causa grandes impactos em termos de saúde pública. Estima-se que um quarto da carga global de doenças, sendo mais de um terço somente entre as crianças, é atribuído a fatores ambientais, ocorrendo em maior número nos países em desenvolvimento do que naqueles desenvolvidos (PRÜSS-ÜSTÜN & CORVALÁN, 2006).

Dentre os fatores ambientais que podem ocasionar uma série de doenças estão principalmente a poluição da água e a precariedade e/ou ausência de sistemas de saneamento e abastecimento de água. Segundo Bartram & Cairncross (2010) cerca de 2,4 milhões de mortes em todo o mundo poderiam ser evitadas anualmente se a população adotasse bons hábitos de higiene e fosse atendida por esses sistemas, considerando que muitos desses óbitos estão associados à diarreia e conseqüentemente a desnutrição.

A água é um recurso indispensável para a sobrevivência do ser humano, mas sua quantidade sob a forma de água doce é limitada e sua qualidade vem sendo constantemente ameaçada (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2013).

Do total de água disponível na superfície terrestre apenas 2,5% corresponde a água doce, no entanto 80% destas encontram-se sob a forma de geleiras, logo não pode ser consumida. O Brasil representa um dos maiores potenciais hídricos do planeta possuindo 12% do total de água potável disponível no mundo. A região Amazônica é a maior detentora dessa riqueza, concentrando cerca de 70% desse volume (BRASIL, 2010). Apesar da sua abundância, a preservação e o uso racional da água são de extrema importância (ORGANIZAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS, 2013).

Promover saneamento básico, assegurar à população acesso a água com boa qualidade e tratamento de esgoto são medidas fundamentais que garantem boas condições de

saúde e bem estar à sociedade (BARTRAM & CAIRNCROSS, 2010). Estima-se que 61% da população mundial possuem alguma melhoria de saneamento em suas casas, o que inclui vaso sanitário e descarga, ainda assim uma em cada cinco pessoas defeca a céu aberto. Com relação ao acesso à água potável, aproximadamente 54% recebem água encanada em seus domicílios, entretanto há evidências de que em algumas cidades asiáticas, por exemplo, esse fornecimento não seja tão confiável pelo fato de não atender aos padrões nacionais de qualidade de água (BARTRAM & CAIRNCROSS, 2010).

Atualmente no Brasil, o acesso à água potável parece estar em melhor situação se comparado ao tratamento de esgoto. Mais de 90% da água que é destinada ao abastecimento da população brasileira sofre processo de purificação antes de ser distribuída, enquanto que apenas 7,1% é fornecida sem qualquer tratamento. Dos municípios brasileiros cerca de 55% possuem rede de esgoto, entretanto pouco mais da metade tratam esses efluentes antes de serem lançados no ambiente. Em ambas as situações, a região Norte é a que mais sofre com a precariedade de tratamento de água e esgoto (IBGE, 2011).

Uma variedade de vírus, bactérias e protozoários podem ser eliminados nas fezes de indivíduos infectados, sintomáticos ou não (LECLERC *et al.*, 2002). Com a precariedade dos sistemas de saneamento básico, o lançamento dessas excretas fecais no ambiente é facilitado, podendo causar direta ou indiretamente a contaminação das águas por diversos patógenos e favorecendo a ocorrência de doenças (Quadro 1) (BOSCH, 1998).

Segundo dados da OMS, 88% da carga global de doenças é atribuída ao abastecimento de água sem qualidade, saneamento e higiene, ocorrendo principalmente em países em desenvolvimento. Dentre essas doenças, a diarreia é a maior causa de morbimortalidade, sendo responsável por 1,5 milhão de mortes a cada ano, especialmente entre crianças menores de cinco anos (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2009).

No Brasil, apesar de ter havido um decréscimo nas taxas de internações por doenças relacionadas a saneamento inadequado, elas ainda estão elevadas, sobretudo nas regiões Norte e Nordeste, e as relacionadas com diarreia são o principal motivo dessas hospitalizações. Observa-se ainda que esses índices elevados são encontrados nas regiões onde o acesso aos serviços de saneamento é menor, evidenciando que intervenções em água, esgoto e higiene são bastante eficientes no controle das doenças (IBGE, 2011).

Quadro 1. Patógenos e doenças associados com a via hídrica. Adaptado de Viroclime, 2011.

Patógeno	Doença	Sintomas e sinais clínicos
Vírus		
Hepatite A	Hepatite	Gripe, febre, dor de cabeça, náuseas, dores musculares, fraqueza, icterícia e dor abdominal
Hepatite E		Gripe, febre, fadiga, náuseas e vômitos
Rotavírus Norovírus Astrovírus Adenovírus	Gastroenterite	Diarreia aquosa, vômitos, dor de cabeça, febre e dor abdominal
Enterovírus	Gastroenterite, infecções respiratórias, meningite asséptica, miocardite, diabetes <i>mellitus</i> , encefalite	Diarreia, febre baixa, paralisia flácida e aguda
Vírus BK Vírus JC	Doença Renal	Cistite hemorrágica, doença renal
		Doença renal
Bactérias		
<i>Vibrio cholerae</i>	Cólera	Diarreia aquosa, vômitos, fezes com aspecto de água de arroz, cãibras musculares
<i>Salmonella spp.</i> (incluindo <i>S. Typhi</i>)	Salmonelose, febre tifóide	Dor de cabeça intensa, vômitos, diarreia e dor abdominal
<i>Aeromonas spp.</i>	Aeromonas associada à diarreia	Infecção de ferida e diarreia aguda
<i>Shigella spp.</i>	Shigelose	Diarreia, febre e náusea
<i>Campylobacter spp.</i>	Campilobacteriose	Diarreia, dor abdominal e febre
<i>Escherichia coli</i>	Gastroenterite	Diarreia, dor abdominal, febre leve e anemia
<i>Yersinia spp.</i>	Yersiniose	Febre, diarreia e dor abdominal
<i>Helicobacter pylori</i>	Gastrite	Náuseas, azia e vômito.
<i>Mycobacteria spp.</i> (menos <i>M. tuberculosis</i>)	Várias	Infecções de feridas, doenças de pele e ulceração.
<i>Leptospira spp.</i>	Leptospirose	Febre, dor nas articulações, dor de cabeça e calafrios
<i>Pseudomonas spp.</i>	Várias	Infecções de feridas, doenças de pele e ulceração
Protozoários		
<i>Giardia spp.</i>	Giardíase	Diarreia, dor abdominal, náuseas, vômitos, febre, calafrios e perda de peso
<i>Cryptosporidium spp.</i>	Criptosporidíase	Diarreia, náusea, vômito e febre ligeira
<i>Cyclospora spp.</i>	Ciclosporíase	Diarreia aquosa, vômitos, náuseas, cólicas estomacais e febre
<i>Entamoeba histolytica</i>	Amebíase	Diarreia, dor abdominal e febre
<i>Acanthamoeba spp.</i>	Várias	Dor grave nos olhos, vermelhidão dos olhos, visão turva e lacrimejamento excessivo
Fungos		
<i>Microsporidium spp.</i>	Microsporidíase	Diarreia, perda de peso, desnutrição e fraqueza
<i>Zygomycosis spp.</i>	Zigomicose	Dor ao redor dos olhos, dor facial, dor de cabeça e náuseas

4.2. HISTÓRICO DA VIROLOGIA AMBIENTAL

Os primeiros estudos visando a detecção de vírus em amostras ambientais datam da década de 1940 e foram realizados, principalmente, devido à ocorrência de surtos de doenças associadas com a transmissão hídrica. No ano de 1945, foi relatado o isolamento do poliovírus em amostras de água de um riacho em Ohio (EUA) onde várias pessoas apresentaram problemas gastrintestinais após contato com água de recreação. Um dos principais motivos da contaminação foi o recebimento, ao longo do riacho, de água de drenagem proveniente de fazendas (TOOMEY *et al.*, 1945).

Em 1953 foi descrito um método de detecção de coxsackievírus a partir de amostras de esgoto, baseado em adsorção e eluição utilizando resinas de troca iônica, que possuem a propriedade de liberar íons sódio, hidrogênio ou hidroxila bem como captar cátions ou ânions quando em contato com a água. Com essa metodologia, além da detecção do vírus foi possível avaliar outras variáveis como persistência, flutuação sazonal, tipos isolados e fontes de contaminação (KELLY, 1953).

Entre os anos de 1955 e 1956 ocorreu um surto de hepatite em Nova Delhi (Índia) devido à contaminação por esgoto de um rio que alimentava um sistema de tratamento de água, o qual se mostrou eficiente no controle bacteriano, no entanto cerca de 30.000 casos da doença foram detectados na população (BOSCH, 1998).

Kelly e cols. isolaram os poliovírus e coxsackievírus a partir de amostras de esgoto de Nova York (EUA), utilizando camundongos recém-nascidos para o isolamento viral associado ao cultivo celular (KELLY *et al.*, 1957).

Após os esforços em detectar a presença de vírus em água e esgoto, no final da década de 1950 e início de 1960, surge outra preocupação relacionada com a inativação dos vírus. Nesse sentido, alguns estudos foram desenvolvidos com o objetivo de avaliar o tempo e o pH requerido para inativação viral sob os efeitos de algumas substâncias, como o cloro e cloro combinado (KELLY & SANDERSON, 1958; KELLY & SANDERSON, 1960), que continuam sendo bastante utilizados no tratamento de água e esgoto (TAVARES *et al.*, 2005).

Em 1967 percebeu-se que alguns métodos de adsorção viral a partir de esgoto eram limitados quanto à detecção de pequenas concentrações de vírus e ao uso de grandes volumes de amostras, uma vez que aceitavam analisar no máximo um litro da mesma. Assim, um novo método foi desenvolvido utilizando uma membrana para a concentração desses agentes, que permitiu o uso de maiores volumes de amostra como também a separação de

bactérias livres presentes no esgoto pela realização de uma filtração preliminar sem que houvesse perda viral, sendo possível também a eliminação da toxicidade celular bastante comum nesse tipo de amostra (WALLIS & MELNICK, 1967).

Christovão *et al.* (1967), utilizando o método de adsorção à uma resina de troca iônica, detectaram enterovírus (poliovírus e coxsackievírus) em amostras de água contaminadas por efluentes de esgoto as quais eram utilizadas para irrigação de hortas no estado de São Paulo. A partir de então se destacam trabalhos visando a detecção de rotavírus em amostras esgoto e lagos da mesma cidade (MEHNERT & STEWIEN, 1993).

Nas décadas de 1970 e 1980, além do reconhecimento de novos vírus, houve um aumento crescente nos estudos relacionados à obtenção de novas técnicas de concentração viral de água e esgoto, bem como o surgimento de novas pesquisas envolvendo a detecção de vírus em moluscos (GRINSTEIN *et al.*, 1970; SMITH & GERBA, 1982; LEWIS & METCALF, 1988).

Desde 1990 até o presente momento, o advento e o aprimoramento de técnicas moleculares de detecção trouxe impactos positivos na área de virologia ambiental, já que possibilitou a obtenção de vírus em diversos tipos de matrizes ambientais, além de fornecer dados sobre a circulação dos mesmos nos ambientes aquáticos e os genótipos envolvidos (GREEN *et al.*, 1998; LODDER *et al.*, 1999; KITAJIMA *et al.*, 2012).

No Brasil nos últimos anos, a virologia ambiental vem sendo difundida nos principais centros de pesquisa do país. Atualmente ela é realizada em São Paulo (Laboratório de Vírus Entéricos Humanos e Animais/Universidade de São Paulo; Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental), Rio de Janeiro (Laboratório de Virologia Comparada e Ambiental, Desenvolvimento Tecnológico em Virologia e Virologia Molecular/Fundação Oswaldo Cruz), Santa Catarina (Laboratório de Virologia Aplicada/Universidade Federal de Santa Catarina), Rio Grande do Sul (Laboratório de Microbiologia Molecular/Instituto de Ciências da Saúde/Universidade Feevale), Espírito Santo (Laboratório de Saneamento/Universidade Federal do Espírito Santo), Goiás (Núcleo de Pesquisas em Agentes Emergentes e Re-emergentes/Universidade Federal de Goiás) e Pará (Laboratório de Vírus Entéricos, Laboratório de Microbiologia Ambiental/Instituto Evandro Chagas).

4.3. RESISTÊNCIA VIRAL NO AMBIENTE

Na água os vírus entéricos possuem prolongada resistência, porém podem sofrer inativação por influência de alguns fatores como os ambientais (temperatura, pH, radiação ultravioleta - UV, sais e metais) e outros relacionados ao vírus, como a capacidade de adsorção a sólidos em suspensão/sedimento e características próprias da partícula (FONG & LIPP, 2005; GERBA, 2007).

A temperatura provavelmente é uma das principais adversidades que afetam a resistência viral. De modo geral os vírus são mais estáveis a baixas temperaturas (GERBA, 2007). Diversos estudos apontam persistência prolongada em águas naturais com baixas temperaturas, como a de mares, rios e subterrâneas. Assim como na exposição à radiação UV, este fator também causa danos ao capsídeo viral e ao ácido nucléico, o que pode inibir não somente a adsorção do vírus ao seu hospedeiro, como também inativar enzimas importantes ao processo de replicação (FONG & LIPP, 2005). Em uma investigação que objetivou avaliar a inativação de vírus sob efeito de luz solar foi observado que houve maior inativação de poliovírus, echovírus e coxsackievírus no verão (3 logs) do que no inverno (1 log) (FUJIOKA & YONEYAMA, 2002).

Os vírus são mais resistentes em valores de pH que variam de 3 a 5, mas em águas naturais onde o pH é mais elevado (5 a 9) é possível ainda encontrar estabilidade viral. A sensibilidade ao pH depende da cepa envolvida. Os enterovírus, por exemplo, podem resistir a valores de pH bastante extremos (1 a 2 e de 11 a 11,5). Sabe-se também que os adenovírus e os rotavírus são bastante sensíveis à pH 10 ou mais (GERBA, 2007).

Em água doce, frequentemente, os vírus possuem maior resistência do que em água do mar devido mais à presença de micro-organismos antagonistas do que o aumento da concentração de sal. Entretanto, alguns vírus são protegidos da inativação pelo calor pela presença de certos cátions (sais) (GERBA, 2007).

A ligação dos vírus a sólidos em suspensão ou em sedimento confere maior persistência ambiental aos mesmos, pois essa associação protege a partícula viral de enzimas e outros agentes degradantes, assim como da inativação pela radiação UV (FONG & LIPP, 2005; GERBA, 2007).

As características virais, como tamanho, presença de envelope e tipo de ácido nucleico, também influenciam na resistência ambiental. Vírus com diâmetros maiores são mais estáveis e possuem maior eficácia na adsorção a sólidos e sedimentos, assim como vírus

não envelopados são mais resistentes devido a capacidade de cristalização, enquanto que os envelopados por possuir camada lipídica são facilmente inativados. Vírus de DNA de fita dupla são consideravelmente mais resistentes a radiação UV, pois podem utilizar enzimas de reparo da célula hospedeira para reverter os danos causados pela radiação UV (GERBA, 2007).

4.4. TRANSMISSÃO HÍDRICA DE VÍRUS ENTÉRICOS

Segundo Bosch (1998), aproximadamente 100 espécies de vírus que causam enfermidades em humanos podem ser encontrados no esgoto. Dentre eles destacam-se os vírus entéricos, grupo de vírus que normalmente estão presentes no trato gastrintestinal, podendo causar doença ou infecção assintomática (WYN-JONES & SELWOOD, 2001).

Os vírus entéricos contaminam os ambientes aquáticos por meio do lançamento indiscriminado de efluentes oriundos de esgoto, o qual pode conter excretas fecais de indivíduos infectados. A eliminação desses vírus por pacientes que apresentam quadros de hepatite ou gastroenterite é extremamente alta, cerca de 10^5 a 10^{11} partículas virais por grama de fezes (BOSCH, 1998; LECLERC *et al.*, 2002). No ambiente os vírus entéricos enfrentam um grande percurso até a infecção no hospedeiro humano, a qual pode ocorrer principalmente pelo consumo de água e alimentos contaminados ou devido ao contato com águas destinadas à recreação (Figura 1).

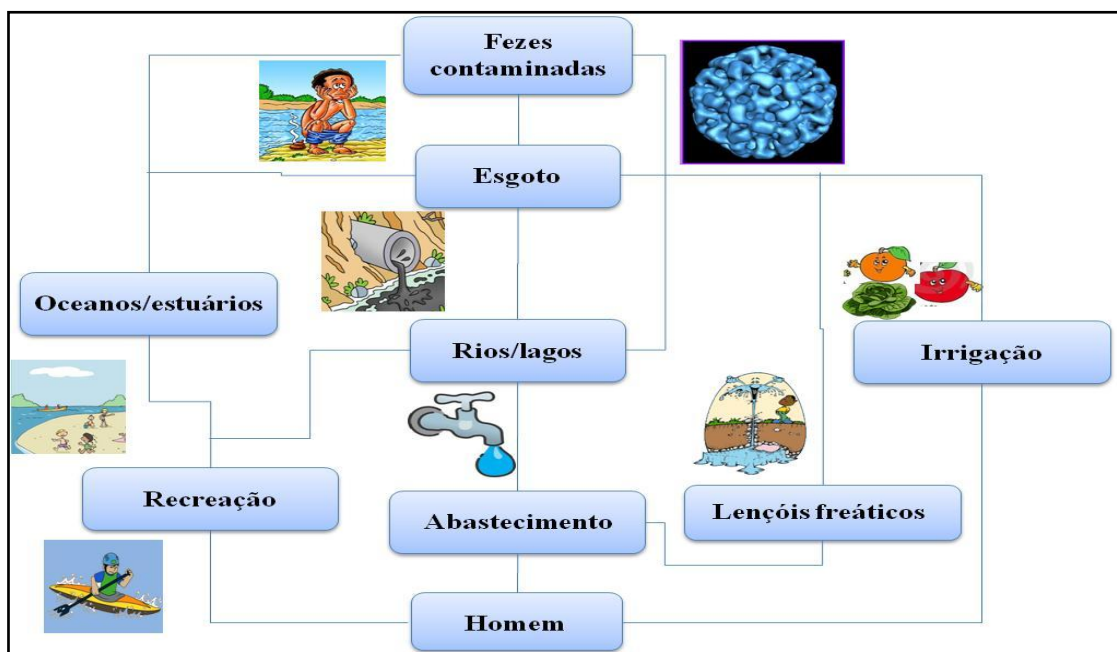


Figura 1. Vias de disseminação dos vírus entéricos pelo ambiente. Fonte: Adaptado de Bosch, 1998. Figuras ilustrativas foram obtidas no site Google Imagens.

Os vírus entéricos causadores de gastroenterite são altamente infecciosos, pequenos (25-100 nm) e geralmente não são envelopados o que contribui para sua dispersão e persistência nos ambientes aquáticos (SCHWAB, 2007). Dentre esse grupo de vírus estão os norovírus, rotavírus, astrovírus, adenovírus 40/41 e enterovírus como agentes responsáveis pela ocorrência de casos esporádicos, surtos e hospitalizações por gastroenterite associada com o consumo ou contato com água contaminada (WYN-JONES & SELWOOD, 2001; SCHWAB, 2007). Além desses patógenos, o vírus da hepatite A e E possuem relevância ambiental e clínica, considerando os diversos surtos descritos envolvendo transmissão hídrica, principalmente em ambientes de recreação e sistemas de abastecimento de água, além da via alimentar por meio do consumo de mariscos (PINTÓ & SAIZ, 2007).

4.5. NOROVÍRUS

4.5.1. Histórico

Nas décadas de 1940 e 1950, bem como nos anos de 1970 e 1971 era muito comum a indução da diarreia a partir da administração via oral de filtrado de fezes em voluntários, as quais eram provenientes de indivíduos que apresentaram quadro de gastroenterite aguda de origem não bacteriana, caracterizada por vômito, diarreia e dor abdominal. Entretanto, muitos desses testes não atingiram seu objetivo, já que não detectaram o agente infeccioso, considerado fastidioso, pois o mesmo não se replicava nas culturas celulares e nem infectavam animais, frequentemente utilizados em laboratório (GREEN, 2007). No entanto, estudo conduzido em 1971, utilizou uma suspensão proveniente de um “*swab*” retal coletado de um caso secundário, obtido durante um surto de gastroenterite ocorrido em uma escola de Norwalk, Ohio (USA), no ano de 1968, que afetou alunos e professores. Esse material foi administrado via oral a três voluntários, dos quais dois desenvolveram a doença (KAPIKIAN *et al.*, 1972).

Deste modo, Kapikian *et al.* (1972), utilizando fezes e soros desses voluntários, observaram pela técnica de imunomicroscopia eletrônica (IME) partículas de 27 nm de diâmetro, as quais foram denominadas inicialmente de vírus Norwalk (NV) devido seu local de origem.

Trabalhos posteriores demonstraram que outros vírus, designados de *small round structured viruses* – SRSVs (pequenos vírus de estrutura arredondada), morfológicamente

similares aos NV, foram associados a outros surtos de gastroenterite ocorridos em diversos lugares, sendo também designados pelo nome do local onde foram isolados. No entanto, o NV permaneceu como protótipo desses pequenos vírus (JIANG *et al.*, 1995).

A partir da década de 1990 houve um grande avanço molecular nos estudos envolvendo os NV, relacionado principalmente a clonagem, em baculovírus, de um fragmento do genoma responsável pela replicação viral. Isto possibilitou o entendimento da organização genômica e estrutural desse agente, o que permitiu o reconhecimento dos NV como um membro da família *Caliciviridae* (JIANG *et al.*, 1990; JIANG *et al.*, 1992; JIANG *et al.*, 1999; GREEN, 2007), passando a ser denominado simplesmente como norovírus (NoV) após aprovação da troca do nome pelo Comitê Internacional de Taxonomia Viral (ICTV) em 2002 (MAYO, 2002).

4.5.2. Morfologia e classificação genética

Os NoV pertencem à família *Caliciviridae* (Figura 2), gênero *Norovirus*. São pequenos vírus esféricos não envelopados, de simetria icosaédrica medindo cerca de 27 a 40 nm de diâmetro (Figura 3) (GREEN, 2007).

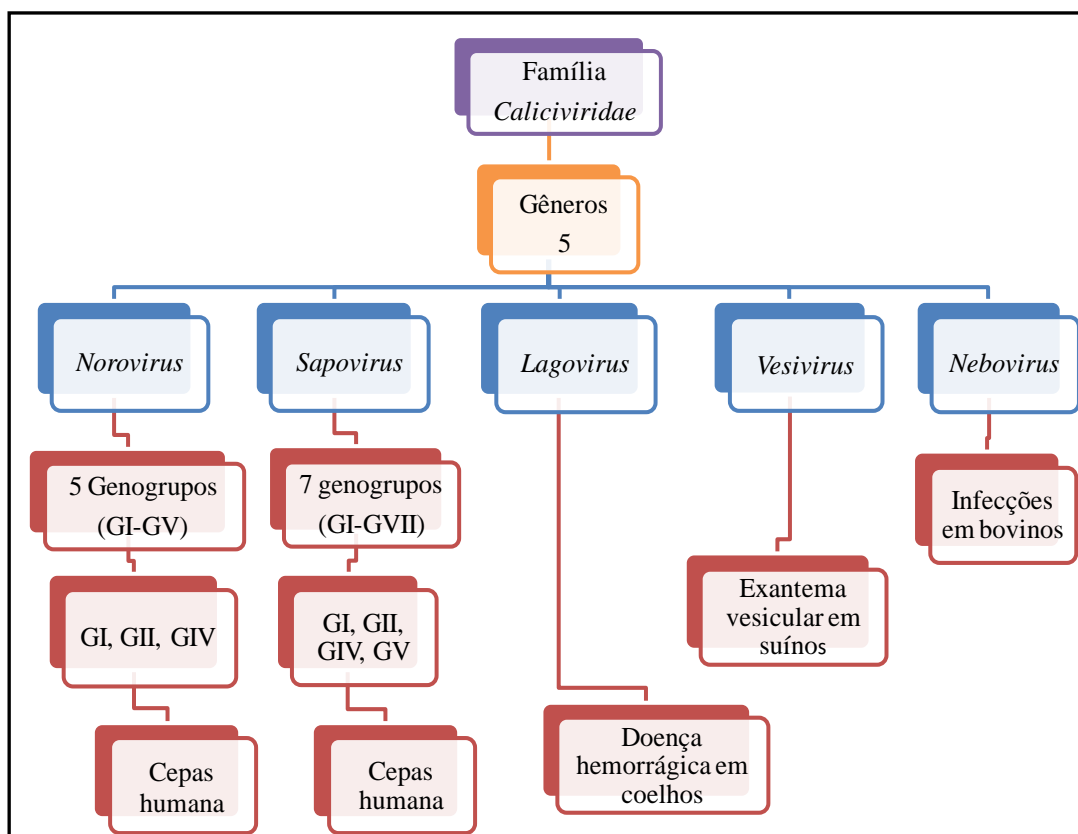


Figura 2. Classificação e taxonomia dos calicivírus.

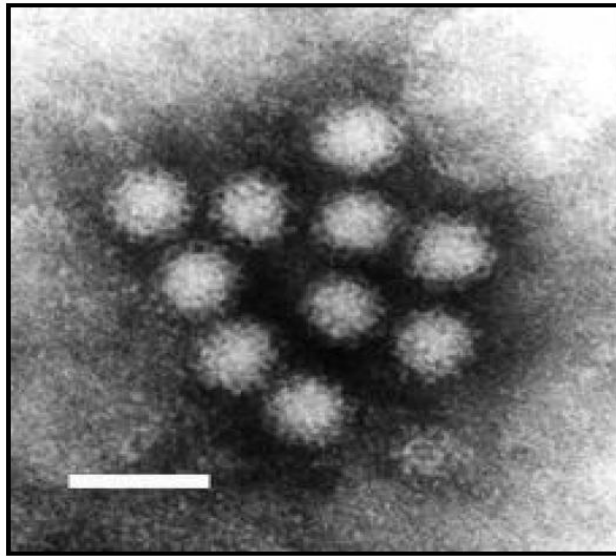


Figura 3. Partículas de NoV visualizadas por microscopia eletrônica de transmissão. Barra = 50 nm. Fonte: Williams F. P., United States, Environmental Protection Agency (EPA).

O genoma dos NoV (Figura 4) é constituído de RNA de fita simples de polaridade positiva, com tamanho aproximado de 7,5 kb. Na extremidade 5' o genoma está associado as proteínas e na região 3' possui uma cauda poli A, a qual é adicionada após a síntese do gene e tem a função de estabilizar a molécula e auxiliar na tradução. Entre as extremidades são observadas três fases de leitura aberta (ORFs 1, 2 e 3). A ORF1 codifica uma grande poliproteína que após a tradução é clivada em seis proteínas não estruturais (incluindo a RNA polimerase RNA dependente - RpRd) envolvidas na replicação viral. A ORF2 codifica uma importante proteína estrutural, a VP1, que participa da composição do capsídeo. Já a ORF3, codifica uma pequena proteína estrutural, a VP2 (ATMAR & ESTES, 2001; VINJÉ *et al.*, 2004; HARDY, 2005; ZHENG *et al.*, 2006; GREEN, 2007).

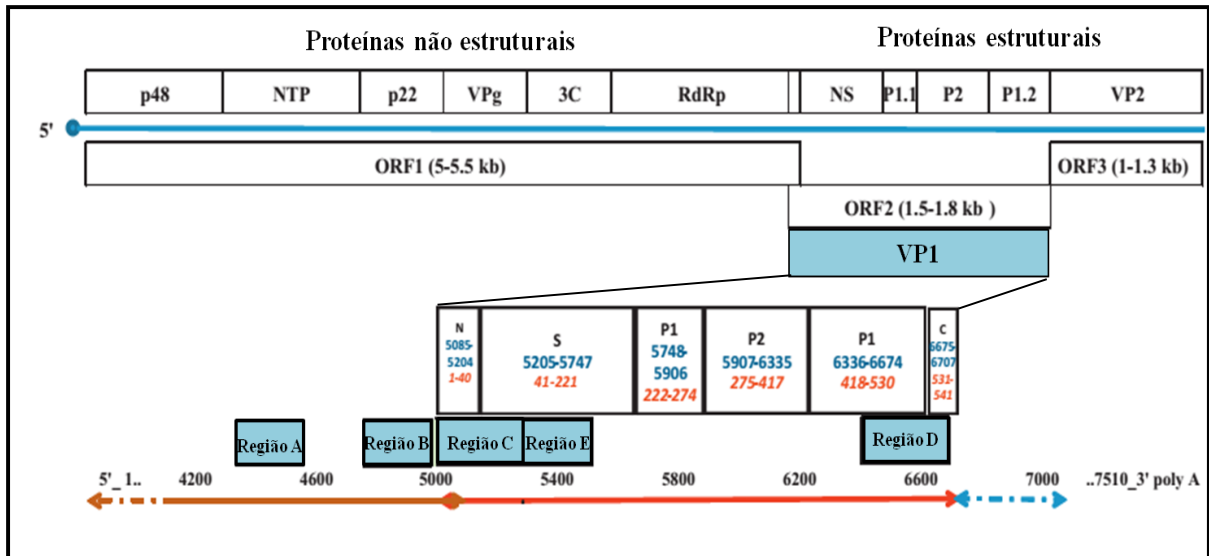


Figura 4. Representação esquemática do genoma de NoV. Destaque para as três fases de leitura aberta (ORF) e as regiões que comumente são utilizadas nos métodos de detecção e genotipagem. Adaptado de HOA TRAN *et al.*, 2013.

A proteína capsidial VP1 forma dois domínios, P (P1 e P2) e S. Acredita-se que no sub-domínio P2 ocorra a maioria das interações celulares e as características de reconhecimento do sistema imune. Já a função da VP2 parece estar associada com a regulação da expressão da VP1 *in cis* e na estabilização dessa proteína na estrutura viral (ZHENG *et al.*, 2006).

Com base em análises filogenéticas da ORF2 e da sequência aminoacídica completa da proteína por ela codificada, a VP1, os NoV são divididos em 35 grupos genéticos ou genótipos (Figura 5), cada qual sendo representado por uma cepa protótipo. Esses genótipos estão distribuídos nos cinco genogrupos identificados: oito genótipos no GI; 21 no GII; três no GIII; dois no GIV e, um no GV. Dos cinco genogrupos, apenas GI, GII e GIV infectam humanos, sendo que GII e GIV também infectam animais, como suínos (GII.11, GII.18, GII.19) e caninos (GIV.2), respectivamente (WANG *et al.*, 2005; ZHENG *et al.*, 2006; MESQUITA *et al.*, 2010; CENTRO DE CONTROLE E PREVENÇÃO DE DOENÇAS, 2011).

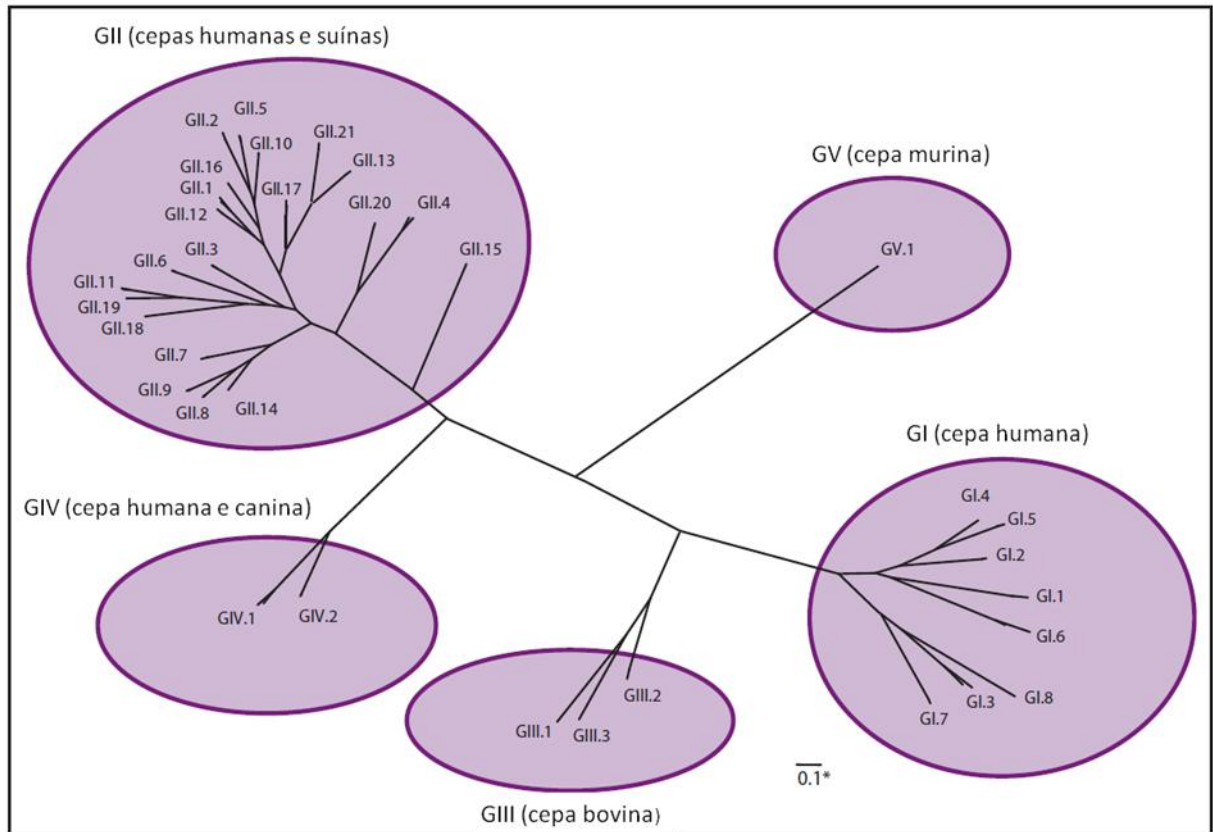


Figura 5. Classificação dos cinco genogrupos e 35 genótipos de NoV de acordo com a análise da sequência completa da proteína VP1. Fonte: CENTRO DE CONTROLE E PREVENÇÃO DE DOENÇAS, 2011.

Tendo em vista o surgimento de novos genótipos e variantes, recentemente foi proposta por um grupo de renomados pesquisadores da Comunidade Europeia e de outras instituições de pesquisa que estudam os NoV, uma nomenclatura consenso assim como ocorre para o vírus influenza, envolvendo um sistema binário de classificação baseado na sequência do capsídeo (VP1) e na região parcial da polimerase (1.300 nucleotídeos) (KRONEMAN *et al.*, 2013).

Não há sistemas de cultivo celular e modelos animais de pequeno porte disponíveis para a replicação dos NoV humanos, o que dificulta tanto o entendimento sobre a biologia desse vírus como a sua classificação em sorotipos. Embora os NoV humanos possam natureza fastidiosa, estudos têm demonstrado que NoV murinos são capazes de se replicar em cultura de células e em modelos animais, o que vem auxiliando na elucidação dos processos de replicação e patogênese desse vírus (WOBUS *et al.*, 2006).

4.5.3. Epidemiologia dos Norovírus

Os NoV são considerados mundialmente a principal causa de surtos de gastroenterite aguda, como também são detectados em âmbito hospitalar e ambulatorial, sendo denominados como “agente da doença do vômito do inverno” (KOOPMANS, 2008; CENTRO DE CONTROLE E PREVENÇÃO DE DOENÇAS, 2011). Embora as infecções por NoV ocorram ao longo do ano, em países de clima temperado são observados picos expressivos durante os meses mais frios (PATEL *et al.*, 2009).

A transmissão deste patógeno ocorre pela via fecal oral, sobretudo pela ingestão de água e alimentos contaminados, contato com fômites e aerossóis provenientes de episódios de vômito. Assim, sua disseminação torna-se rápida e extensiva, principalmente em ambientes fechados, como hospitais, cruzeiros, creches e asilos (WIKSWO *et al.*, 2011; CENTRO DE CONTROLE E PREVENÇÃO DE DOENÇAS, 2011). Geralmente a maioria dos surtos (54%) relacionados aos NoV possui como fonte de transmissão a via alimentar e o contato pessoa a pessoa (26%), sendo que aqueles envolvendo a veiculação hídrica ou ambiental correspondem a 20% (MATTHEWS *et al.*, 2012).

Em termos gerais, o genogrupo GII é amplamente distribuído no mundo, sendo o genótipo GII.4 o mais prevalente, porém outros genótipos como GII.6, GII.7, GII.12, GII.16 e GII.17 tem sido descritos em menores proporções (FIORETTI *et al.*, 2011; SIQUEIRA *et al.*, 2013). No ano de 2012 foi relatada pela primeira vez a ocorrência do GII.21 no Brasil (FERREIRA *et al.*, 2012a). No Pará, Aragão *et al.* (2013) verificaram a diversidade genética desse agente em uma comunidade quilombola relativamente isolada, onde diferentes genótipos foram detectados (GII.4, GII.6, GII.7, GII.17, GII.20, GI.2) como também um caso de rearranjo gênico (GII.7/GII.20).

A detecção de GI em espécimes fecais é menos frequente em relação à GII (FIORETTI *et al.*, 2011), entretanto no ambiente, ambos parecem circular simultaneamente. Como os vírus detectados no ambiente refletem sua circulação na comunidade (IWAI *et al.*, 2009), é possível inferir que as infecções causadas por GI em humanos sejam normalmente assintomáticas, leves ou brandas. Estudos conduzidos no Japão mostraram a alta frequência destes dois genogrupos em amostras de rio e esgoto analisadas e a grande diversidade de genótipos encontrados, além da presença do genogrupo GIV (KITAJIMA *et al.*, 2010; KITAJIMA *et al.*, 2012).

A detecção de NoV em mariscos, especialmente ostras, é bem documentado. Em uma pesquisa que avaliou a causa de 46 surtos associados com o consumo de bivalves, os calicivírus (no qual se inclui os NoV) foram responsáveis por 18 deles (POTASMAN *et al.*, 2002). Nenonen *et al.* (2009) estudando surto ocorrido pelo consumo de ostras, demonstraram por meio de análises moleculares que as cepas de NoV encontradas nos pacientes foram similares (99%) às detectadas nas ostras.

4.5.4. Aspectos clínicos

Os NoV são agentes virais causadores de gastroenterite aguda em todas as faixas etárias (PATEL *et al.*, 2009). Após um período de 12 a 48 horas de incubação, a doença se manifesta, sendo caracterizada principalmente por vômitos, náuseas, diarreia não sanguinolenta e dor abdominal. Apesar de a maioria dos indivíduos infectados apresentarem a combinação de vários sintomas, alguns desenvolvem apenas vômitos e/ou diarreia (CENTRO DE CONTROLE E PREVENÇÃO DE DOENÇAS, 2011). O vômito foi o principal sintoma apresentado por crianças, adultos e idosos hospitalizados, com variação de 67 a 94% dos casos, seguido da diarreia e febre, com percentuais de 81 e 66, respectivamente. A maioria dessas crianças (47%) apresentou gastroenterite em associação com febre (LOPMAN *et al.*, 2004; NARKEVICIUTE & TAMUSAUSKAITE, 2008).

Embora a doença apresente certa gravidade, a resolução dos sintomas ocorre de um a três dias em pessoas saudáveis, podendo ser prolongado para quatro a seis dias em crianças, idosos e indivíduos hospitalizados (CENTRO DE CONTROLE E PREVENÇÃO DE DOENÇAS, 2011). De fato foi observada recuperação mais lenta em pacientes idosos (\geq 85 anos) hospitalizados, dos quais 40% ainda apresentavam sintomas após quatro dias de doença (LOPMAN *et al.*, 2004). Os indivíduos suscetíveis podem apresentar infecção crônica, com eliminação do vírus por pelo menos oito meses (MORILLO & TIMENETSKY, 2011).

Das pessoas acometidas por gastroenterite causada por NoV, somente cerca de 10% procuram auxílio médico, que pode incluir internação e tratamento da desidratação pela administração de soro via oral ou intravenosa. Os óbitos acontecem raramente, principalmente em idosos que necessitam internação (CENTRO DE CONTROLE E PREVENÇÃO DE DOENÇAS, 2011).

O pico de excreção viral ocorre normalmente dois a cinco dias após a infecção, com carga viral de aproximadamente 100 bilhões de cópias por grama de fezes, sendo que o

vírus pode ser eventualmente eliminado até quatro semanas após início dos sintomas (CENTRO DE CONTROLE E PREVENÇÃO DE DOENÇAS, 2011).

4.5.5. Diagnóstico laboratorial

Devido os NoV humanos não se replicarem nos diversos sistemas celulares disponíveis, nem infectarem os animais comumente utilizados nos laboratórios de pesquisa, outras metodologias têm sido utilizadas. Dentre as moleculares destaca-se a reação em cadeia mediada pela polimerase precedida de transcrição reversa (RT-PCR), a *nested* e semi *nested* PCR e a PCR quantitativa (qPCR) também conhecida como PCR em tempo real. Entre as técnicas não moleculares ressaltam-se principalmente a imunomicroscopia eletrônica (IME), os ensaios imunoenzimáticos (EIE) e a imunocromatografia (KAPIKIAN *et al.*, 1972; FANKHAUSER *et al.*, 2002; SCHMID *et al.*, 2004; BORGES & CARDOSO, 2005; SIQUEIRA *et al.*, 2013).

A IME foi utilizada por Kapikian *et al* (1972) para o reconhecimento desse vírus como agente causador de gastroenterite não bacteriana. Este método é específico e reprodutível, pois permite a visualização do vírus com a utilização de soro contendo anticorpos específicos para o agente pesquisado, no entanto é considerado trabalhoso, demandando tempo e equipe treinada para a sua execução (BORGES & CARDOSO, 2005).

Os EIE são utilizados devido a sua facilidade e rapidez na execução. Esta metodologia baseia-se na detecção de antígenos dos genótipos GI e GII, presentes nas amostras fecais sendo uma boa alternativa para a detecção de NoV, principalmente durante a ocorrência de surtos (BORGES & CARDOSO, 2005; MORILLO & TIMENETSKY, 2011). No estudo de Siqueira *et al.* (2011), o EIE de terceira geração (RIDASCREEN® Norovirus EIA kit) mostrou concordância de 88% com os resultados obtidos por RT-PCR, o que foi considerado um resultado satisfatório para a detecção de NoV em espécimes fecais oriundos de casos esporádicos de gastroenterite. O teste imunocromatográfico também é um teste rápido que apresenta boa correlação com o EIE. Zhao *et al.* (2012) ao avaliarem o kit “RIDA QUICK Norovirus detection”, verificaram que a sensibilidade, especificidade e exatidão foi de 98,4%, 92,4% e 97,6% respectivamente, comparado com os resultados obtidos em um EIE, mostrando ser um bom teste para a detecção rápida de antígenos de NoV.

Os métodos moleculares têm sido muito utilizados na detecção dos NoV em amostras fecais e são bastante sensíveis e específicos. A RT-PCR foi um dos primeiros testes a ser empregado na detecção molecular desses agentes (LEON *et al.*, 1992; JIANG *et al.*,

1999) e até hoje é o método padrão estabelecido na maioria dos laboratórios de pesquisa com NoV. Entretanto, mais recentemente a qPCR, considerada um método mais sofisticado, vêm sendo também utilizada não apenas para detecção, mas também para quantificação da infecção por NoV e outros vírus entéricos, como rotavírus, adenovírus, astrovírus, sapovírus e enterovírus (BEURET, 2004; LOGAN *et al.*, 2007; JOTHIKUMAR *et al.*, 2009).

4.5.6. Prevenção e controle

O controle das infecções por NoV, assim como para todos os patógenos causadores de gastroenterite, ainda está baseado na melhoria da qualidade do saneamento e abastecimento de água tratada assim como na adoção de boas práticas de higiene (CENTRO DE CONTROLE E PREVENÇÃO DE DOENÇAS, 2011; ARIAS *et al.*, 2013).

As medidas relacionadas ao saneamento e abastecimento de água podem reduzir a morbidade por diarreia na escala de 25 a 32% (BARTRAM & CAIRNCROSS, 2010). Assim, é extremamente necessário enfatizar a importância dessas intervenções no sentido de controlar doenças, principalmente as gastroenterites.

O processo de tratamento da água para consumo humano é constituído das etapas de pré-cloração, pré-alkalinização, coagulação, floculação, decantação, filtração, cloração, correção de pH e fluoretação. As etapas de filtração e cloração são cruciais no tratamento da água, uma vez que são responsáveis pela eliminação de patógenos, como vírus e bactérias. Portanto, é importante analisar a concentração de cloro necessária para inativar os vírus. Os NoV, por exemplo, são bastante resistentes a inativação por cloro em concentrações de 3,75 mg/L a 6,26 mg/L, sendo sensíveis a concentrações de 10 mg/L (TAVARES *et al.*, 2005).

O cuidado com a higienização das mãos é uma medida de controle da infecção muito importante, já que atua como veículo na transmissão de vírus e bactérias e fonte de contaminação para superfícies e alimentos, este último associado aos manipuladores de alimentos (SAIR *et al.*, 2002). Em estudo conduzido por Sickbert-Bennett *et al.* (2005) demonstrou que a contaminação viral nas mãos foi reduzida pela lavagem das mesmas, com água corrente e sabão por pelo menos 30 segundos. Liu *et al.* (2010) verificou que a redução de cópias genômicas de NoV ocorreu após uma exposição por 30 segundos ao hipoclorito de sódio a uma concentração maior que 160 ppm, enquanto que para o etanol não houve uma redução significativa.

Por serem altamente infecciosos, indivíduos infectados por NoV devem ser isolados para assim evitar a continuidade da transmissão desse vírus e a provável contaminação do ambiente (CENTRO DE CONTROLE E PREVENÇÃO DE DOENÇAS, 2011).

4.5.7. Tratamento

Segundo o Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC/EUA), não há um tratamento específico para pessoas infectadas por NoV e que as mesmas não devem ser medicadas com antibióticos, uma vez se tratar de um agente viral e não bacteriano. Para prevenir a desidratação que ocorre durante os episódios de vômitos e diarreia, recomenda-se a hidratação com líquidos. Em casos de desidratação grave, a fluidoterapia administrada via oral ou intravenosa é necessária (CENTRO DE CONTROLE E PREVENÇÃO DE DOENÇAS, 2013).

Uma vacina baseada em VLPs (partículas semelhantes a vírus, no inglês *virus-like particles*), que são partículas não replicantes sem genoma viral, tem sido sugerida como candidata, pois induz anticorpos séricos e mucosos (VINJÉ, 2010; ATMAR *et al.*, 2011; ATMAR & ESTES, 2012). Atmar *et al.* (2011) observaram que indivíduos que receberam por via intranasal a vacina monovalente de VLPs de NoV foram menos propensos a ter gastroenterite e serem infectados pelo vírus se comparados com o grupo placebo.

Recentemente foi relatada que as partículas do complexo do domínio P de NoV apresentam eficácia para as respostas imunológicas celular e humoral e são facilmente produzida em *Escherichia coli*, sendo portanto um bom alvo para o desenvolvimento de uma vacina contra NoV (FANG *et al.*, 2013).

4.6. DETECÇÃO DE AGENTES VIRAIS EM AMOSTRAS AMBIENTAIS

4.6.1. Técnicas de concentração

Nas amostras ambientais, sobretudo águas, as partículas virais encontram-se diluídas, ou seja, em baixas concentrações, sendo necessário reduzir para mililitros o volume inicial da amostra a ser testada (BOSCH, 1998). Nesse sentido, é essencial a realização de

uma etapa de concentração que permita agrupar o maior número de partículas virais que estejam presentes na amostra.

Ainda não existe um consenso quanto a utilização de um método padrão de concentração para amostras ambientais. A metodologia de escolha deve seguir alguns critérios como o tipo de matriz ambiental a ser analisada (água doce/salgada, esgoto bruto/tratado) e o volume de amostra a ser concentrado (WYN-JONES & SELWOOD, 2001).

Um bom método de concentração deve ser tecnicamente simples, acessível e rápido, além de fornecer uma elevada e diversificada recuperação viral e um pequeno volume final de material concentrado. Basicamente, as técnicas disponíveis são aquelas baseadas em adsorção-eluição/precipitação, ultrafiltração e ultracentrifugação (BOSCH, 1998, TAVARES *et al.*, 2005).

Os métodos fundamentados em adsorção-eluição/precipitação são considerados o estágio inicial em um procedimento de concentração, pois reduz o volume da amostra para pequenos volumes. Essa técnica utiliza diferentes tipos de dispositivos para adsorção viral: membranas ou cartuchos eletronegativos ou eletropositivos, cartuchos constituídos de fibra de vidro e floculação orgânica. Após a adsorção viral à matriz sólida, é então realizada a etapa de eluição com uma solução básica (pH 9-11,5). O volume inicial de amostra que essa técnica permite concentrar é bastante variável (1 a 1000 litros) e dependendo do dispositivo utilizado pode ser aplicada em todos os tipos de água e até mesmo em esgotos antes e após tratamento (WYN-JONES & SELWOOD, 2001; CALGUA *et al.*, 2008).

A ultrafiltração consiste em uma técnica baseada na retenção de macromoléculas (SILVA *et al.*, 2011) em que a amostra atravessa uma membrana ou um capilar os quais retém a partícula viral permitindo somente a passagem da água e solutos com baixa massa molecular. Filtragem por vórtex ou tangencial tem sido empregadas como forma de evitar a saturação das membranas. Este método pode ser aplicado para águas com melhor qualidade, como efluentes tratados (WYN-JONES, 2007).

A ultracentrifugação utiliza velocidade de rotação superior a 100.000xg facilitando a precipitação e eluição das partículas. Uma limitação deste método é que não permite o processamento de grandes volumes de água, sendo recomendado, portanto, para amostras em que se suponha haver maior concentração de vírus, como por exemplo, as provenientes de esgoto bruto (SILVA *et al.*, 2011).

4.6.2. Métodos moleculares

Os avanços na biologia molecular refletiram positivamente nos estudos em virologia ambiental. Houve um aumento significativo das pesquisas nesta área, as quais evidenciaram a presença de uma diversidade de agentes virais em um amplo espectro de amostras ambientais, principalmente água, esgoto e mariscos, utilizando a detecção qualitativa por RT-PCR, *nested* e *semi nested* (BOXMAN *et al.*, 2006; LA ROSA *et al.*, 2007) e/ou quantitativa por meio da qPCR (GENTRY *et al.*, 2009; LA ROSA *et al.*, 2009; VIEIRA *et al.*, 2012).

Apesar de serem considerados bons métodos, quando se trata de amostra ambiental deve-se considerar a possível presença de compostos inibidores da enzima DNA polimerase. Por exemplo, amostras ambientais apresentam polissacarídeos, ácidos húmico, fúlvico e tânico, os quais são também concentrados durante a etapa de concentração e podem ser purificados simultaneamente com o ácido nucléico, interferindo assim na sua amplificação (RODRÍGUEZ *et al.*, 2012). A utilização de membranas filtrantes, cromatografia em coluna de centrifugação e extração de ácido nucléico com tiocianato de guanidina e com solventes podem reduzir esses inibidores e assim permitir a obtenção de concentrados virais altamente purificados (QUEIROZ *et al.*, 2001; RODRÍGUEZ *et al.*, 2012).

Os NoV têm sido recuperados em percentuais relevantes quando da utilização do *nested* PCR, como observado na Itália, onde esse patógeno foi detectado em 96,9% e 78,8% das amostras de esgoto antes e após tratamento, respectivamente (LA ROSA *et al.*, 2010b). No Brasil (Rio de Janeiro) esse mesmo agente foi detectado em 29,2% das amostras de esgoto analisadas pelo *semi nested* PCR (VICTORIA *et al.*, 2010b).

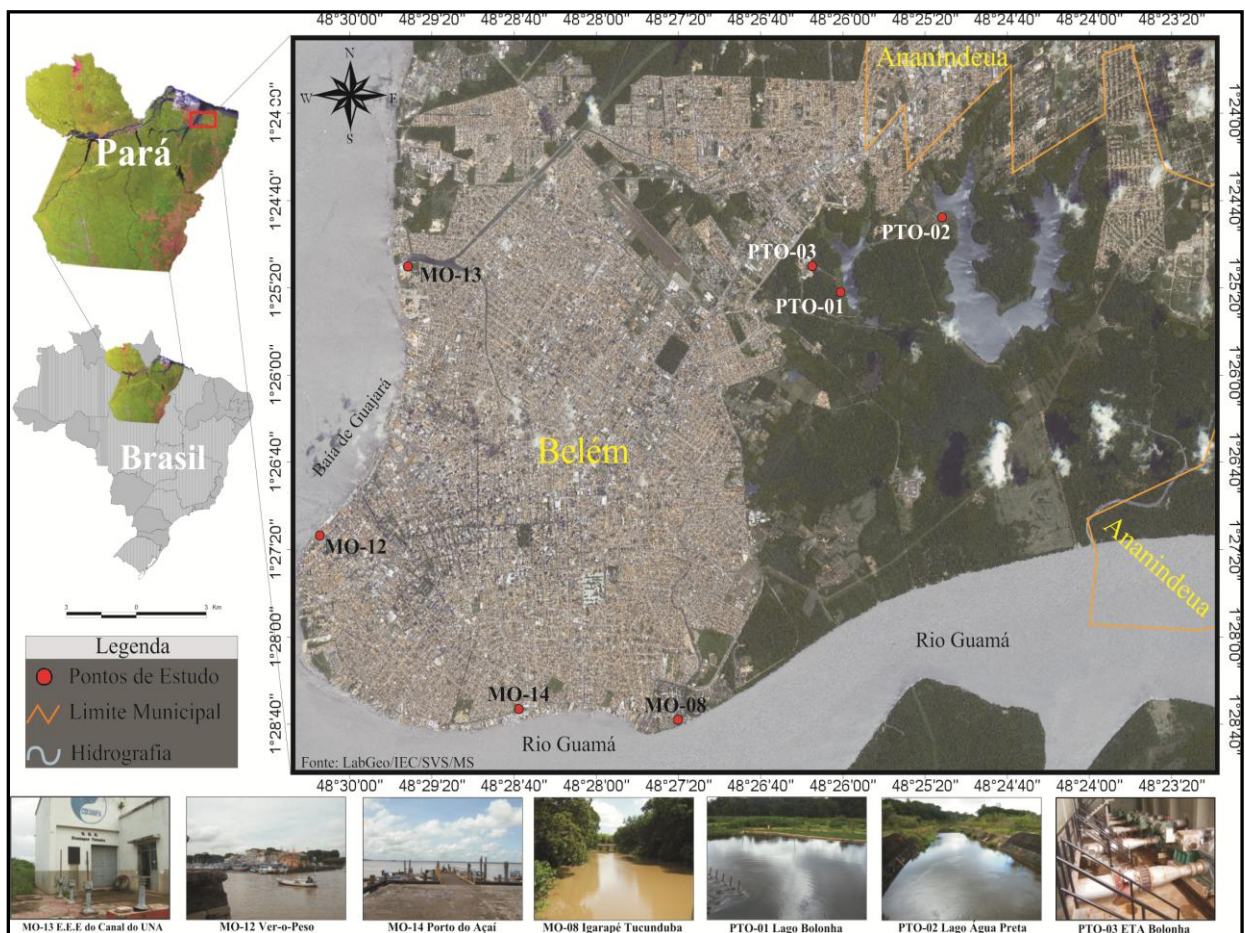
A qPCR é um método bastante sensível, pois detecta baixas concentrações de partículas virais, porém inibidores presentes na amostra podem afetar seu resultado. No Brasil (Rio de Janeiro), Vieira *et al.* (2012), por exemplo, ao analisaram água destinada à recreação proveniente de uma lagoa, observaram maior taxa de detecção de NoV pela PCR qualitativa (16%) do que na qPCR (4,2%) relacionando este achado com a interferência de inibidores na atividade de fluorescência essencial neste teste. Já no estudo de Victoria *et al.* (2010b) realizado na mesma cidade e com amostras de esgoto, a qPCR exibiu maior positividade para NoV (58,3%) quando comparada com os testes moleculares qualitativos (PCR-14,6% e *semi nested* PCR-29,2%).

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1. ÁREA DE ESTUDO

O estudo foi realizado na cidade de Belém, que possui aproximadamente 1.437.600 habitantes sendo dividida em oito distritos administrativos de acordo com o Anuário Estatístico do Município (PREFEITURA MUNICIPAL DE BELÉM, 2010).

Sete pontos de amostragem (Figura 6) foram estrategicamente selecionados sendo que os códigos dos locais e a natureza da amostra estão detalhados no quadro 2.



Quadro 2. Código dos sete pontos de amostragem localizados na cidade de Belém, Pará, Brasil.

Natureza da amostra	Local de coleta	Código
Água tratada	ETA-Bolonha	PTO3
Água superficial de manancial	Lago Bolonha	PTO1
Água superficial de manancial	Canal que liga lago Água Preta ao Bolonha	PTO2
Água superficial do Rio Guamá	Porto do Açaí	MO14
Água superficial da baía do Guajará	Ver-o-Peso	MO12
Água superficial do igarapé Tucunduba	Tucunduba	MO08
Esgoto bruto	EEE-UMA	MO13

Nesta pesquisa contemplaram-se quatro diferentes tipos de amostras: água destinada a consumo após tratamento, coletada na saída da Estação de Tratamento de Água Bolonha (ETA Bolonha); água superficial de manancial coletada no canal que liga o Lago Água Preta ao Bolonha e no Lago Bolonha; água superficial coletada no Ver-o-Peso, no Igarapé Tucunduba e no Porto do Açaí; esgoto não tratado, coletado na Estação Elevatória de Esgoto do Canal do UNA (EEE-UNA). Todos os sete locais de coleta encontram-se detalhados na figura 6.

A mata do Utinga abriga o Parque Ambiental de Belém, com cerca de 1.348 hectares, os mananciais hídricos que abastecem a Região Metropolitana de Belém, lagos Bolonha e Água Preta, além de uma estação de tratamento de água operada pela Companhia de Saneamento do Pará (COSANPA). É uma floresta tropical úmida perenifólia, de terra firme, com alguns pontos sujeitos a inundações. Seu clima é do tipo Af (tropical úmido ou equatorial), com umidade média anual de 70%. Os lagos Bolonha e Água Preta são abastecidos pelas águas drenadas de sua bacia hidrográfica (Rio Aurá a parte do Igarapé Tucunduba e Uriboquinha, sub-bacias do igarapé Mucutu e Água Preta), bem como por um sistema de bombeamento de água do rio Guamá, implantado pela COSANPA que tem por objetivo suprir o “déficit” de água destinada ao abastecimento de Belém. O lago Água Preta é o principal abastecedor de água da Região Metropolitana de Belém, ocupando uma área de 7.199, 5 m². Após sua ampliação em 1973, passou a suportar cerca de 10,55x10⁶ m³ de água acumulada com uma profundidade máxima de aproximadamente 8,5 m. Um sistema de

comportas controla a saída de água do lago por um canal a céu aberto, que por gravidade é conduzida até o lago Bolonha, que ocupa uma área de 1.790.00 m², suportando cerca de 2,10x10⁶ m³ de água acumulada com profundidade máxima em torno de 7,5m. A água tratada na ETA-Bolonha é distribuída em nove setores de abastecimento da zona central (Belém) e em oito setores da zona de expansão (Ananindeua) (SECRETARIA DE ESTADO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA E MEIO AMBIENTE, 1992; MACHADO *et al.*, 2002).

O complexo Ver-o-Peso é um centro comercial, localizado às margens da baía do Guajará (água superficial), sendo bastante conhecido pela venda de verduras, frutas regionais, hortaliças, bem como de carnes e peixes. Nesse local as coletas foram realizadas atrás do Mercado de Ferro, também conhecido como Mercado de Peixe.

A bacia do Tucunduba, que inclui o igarapé Tucunduba, é a segunda maior da Região Metropolitana de Belém, abrange a totalidade dos bairros de Canudos e Terra Firme e se estende por parte dos bairros do Guamá, São Braz, Marco e Curió-Utinga. A espinha dorsal da bacia é o Canal do Tucunduba com 3.900 metros de extensão, sendo 100% em estado natural, que sofre grande influência das marés e é habitado por um contingente populacional significativo, cerca de 1400 domicílios, no qual a maioria não é beneficiada pelo saneamento básico, além disso, recebe efluentes de dois hospitais. As coletas ocorreram na ponte que interliga o campus básico ao profissional, no interior da Universidade Federal do Pará (UFPA).

O Porto do Açaí está localizado ao sul da cidade de Belém, às margens do rio Guamá, que recebe diariamente um contingente acentuado de pessoas provenientes das ilhas situadas próximas de Belém, por meio de pequenas embarcações. Neste local observa-se uma precariedade nas condições de higiene, onde pequenos produtores comercializam farinha e frutas regionais, sobretudo o açaí, que dá nome ao porto. As coletas se deram no trapiche do porto, representada por amostras do rio Guamá.

A EEE-UNA é operada pela COSANPA e está localizada às margens do Canal que dá nome à estação. A EEE-UNA possui emissário em concreto armado, com diâmetro nominal de 800 mm, com lançamento sub-aquático na Baía do Guajará a 334,0 m da margem, tem vazão média de 1800 m³/h e atualmente recebe cerca de 250 m³/h, para uma rede de coleta com aproximadamente 78,10 km e população de 127.210 hab. A veia principal da bacia do UNA (Canal do UNA) recebe os efluentes de 20 bairros de Belém, sendo que somente 8% desses são tratados na EEE-UNA antes de serem lançados na baía do Guajará. Os restantes

92% são lançados *in natura*, o que contribui de forma bastante significativa para a sua lenta e gradual degradação (PANTOJA FILHO s/a; PREFEITURA MUNICIPAL DE BELÉM, s/a).

5.2. COLETA DAS AMOSTRAS

As amostras foram coletadas mensalmente, no período de novembro de 2008 a outubro de 2010, totalizando 168 materiais.

Para a coleta, utilizaram-se baldes e cordas estéreis. Frascos de polipropileno esterilizados com capacidade para quatro litros foram utilizados no armazenamento das amostras, sendo acondicionados em isopores contendo gelo, com a finalidade de se manter em baixa temperatura até sua chegada ao laboratório para processamento.



Figura 7. Materiais necessários para a coleta de água e egoto. Corda, funil e balde estéreis (A); armazenamento da amostra em frascos de polipropileno esterilizados (B e C); acondicionamento dos frascos contendo a amostra em isopores (D).

5.3. ANÁLISE DE COLIFORMES TERMOTOLERANTES, PARÂMETROS FÍSICO QUÍMICOS E CLIMÁTICOS

As análises da concentração de coliformes termotolerantes foram efetuadas pelo laboratório de Microbiologia Ambiental da Seção de Meio Ambiente do Instituto Evandro Chagas (IEC) e os resultados gentilmente cedidos pela coordenadora do mesmo, Dra. Lena

Lillian Canto de Sá Morais. Foi utilizada a técnica do substrato cromogênico definido ONPG-MUG (COLLILERT/QUANTI-TRAY[®]) de acordo com as recomendações do fabricante e do *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (ASSOCIAÇÃO AMERICANA DE SAÚDE PÚBLICA, 1998).

As análises físico-químicas foram realizadas pelo laboratório de Físico-Química de Águas da Seção de Meio Ambiente do IEC, e as médias das variáveis obtidas foram gentilmente cedidas pelo Dr. Bruno S. Carneiro. O pH, temperatura (°C), condutividade (μS), oxigênio dissolvido (DO; mg/L) e sólidos totais dissolvidos (TDS) foram determinados no momento da coleta com o equipamento HI 9828 da HANNA[®], já a turbidez foi determinada por espectrofotometria no equipamento DR2000 da HACH[®].

Os dados climáticos como temperatura (°C), umidade relativa do ar (%) e precipitação (mm) foram gentilmente cedidos pela Divisão de Meteorologia – DIVMET, Centro Regional de Belém – Cr-Be, Sistema de Proteção da Amazônia – SIPAM.

5.4. CONCENTRAÇÃO

O método de concentração (Figura 8) das partículas virais utilizado no desenvolvimento do trabalho foi adaptado de Katayama *et al.* (2002). De forma resumida, 1,2g de MgCl_2 foi adicionado em 2 L de amostra ajustando-se o pH para 5,0 (Figuras 7B e 7C). Posteriormente as amostras foram submetidas à adsorção em membrana filtrante com 0,45 μm de porosidade e 142 nm de diâmetro (Millipore) por meio de filtração com o auxílio de bomba à vácuo (Figura 7D). Após passagem pela membrana, descartou-se a água filtrada. A seguir a membrana foi colocada em uma placa de Petri de tamanho adequado adicionando-se 300 mL da solução de H_2SO_4 (0,5 mM, pH 3,0) com o objetivo de remover os cátions excedentes. Após 10 minutos, retirou-se o ácido e então com 15 mL de NaOH (1mM, pH 10,5-10,8) a membrana foi eluída, sob agitação constante por 10 minutos (Figura 7E). Para neutralizar a solução, ao final da agitação se adicionou 50 μL de H_2SO_4 (50mM) e 50 μL de 100X TE (pH 8,0). Por fim, o eluído foi filtrado em um tubo concentrador de amostras líquidas Amicon Ultra-15 (Millipore) a 5000 rpm/4°C por 15 minutos sendo repetida três vezes, obtendo-se um volume final de 2 mL, o qual foi estocado a -70°C para posterior extração do material genético.



Figura 8. Processo de concentração aplicado nas amostras após a coleta. Conexão dos equipamentos, da direita para a esquerda bomba à vácuo, vasilhame de pressão e filtro (A); adição de $MgCl_2$ e ajuste do pH (B); volume de 2L de amostra é colocado no vasilhame (C); adsorção à membrana das possíveis partículas virais presentes na amostra (D); Lavagem e eluição da membrana (E). Fotos do arquivo pessoal.

5.5. DETECÇÃO DE NOROVÍRUS

5.5.1. Extração do ácido nucléico

A extração do ácido nucléico foi realizada pela técnica da sílica (isotiocianato de guanidina) descrita por Boom *et al.* (1990) com algumas modificações. Em 400 μL de amostra adicionou-se 20 μL de Proteinase K (Invitrogen) e 800 μL de tampão L6, incubando-se em banho-maria a 56°C por 10 minutos. Após a incubação, foram acrescentados 200 μL de etanol absoluto PA (gelado) e 20 μL de sílica, sendo realizada a agitação e homogeneização da amostra em agitador horizontal por 20 minutos, seguido de centrifugação a 14.000 rpm por 40 segundos. Descartou-se o sobrenadante em frasco contendo NaOH 10N. Etapas de agitação em vortex, centrifugação (14.000 rpm por 40 segundos) e descarte do sobrenadante foram realizadas a cada adição de 500 μL de tampão L2, Etanol 70% e Acetona PA ao sedimento. Os tubos foram mantidos abertos em banho-maria a 56°C por 15 minutos para evaporação do álcool. Para ressuspensão do ácido nucléico, uma mistura de 50 μL de tampão AE e 1 μL de Inibidor de RNase (Invitrogen) foi adicionada, incubando-se em banho-maria por 15 minutos, logo após homogeneização em vórtex. Ao final, centrifugou-se a 14.000 rpm

por 4 minutos, colhendo-se posteriormente com cuidado o sobrenadante contendo o RNA, o qual foi estocado a -70°C . Também foi utilizado o RNA diluído 1:10 em água ultra pura (Gibco), nas amostras de esgoto e água provenientes da EEE-UNA e Igarapé Tucunduba respectivamente.

5.5.2. Síntese do DNA complementar por Transcrição reversa

Para a obtenção do DNA complementar (cDNA), necessário para a realização da TaqMan® PCR em tempo real, o RNA viral foi submetido à reação de transcrição reversa utilizando um iniciador randômico (PdN₆; 50 A₂₆₀ units). Um volume de 10 µL de RNA juntamente com 2 µL de dimetil sulfóxido (DMSO) foi desnaturado em termociclador a 97°C por 7 minutos, seguido de choque térmico em banho de gelo durante 2 minutos. A seguir, adicionou-se ao RNA desnaturado 38 µL da mistura de reagentes apresentada no quadro 3, a qual foi inserida em termociclador por uma hora a 42°C e 10 minutos a 95°C , para a realização da reação de transcrição reversa (RT).

Quadro 3. Concentrações e volumes de reagentes utilizados na reação de transcrição reversa (RT).

Reagente	Concentração	Volume (µL)
H ₂ O ultra pura livre de DNase e RNase (Gibco)	-	23,50
dNTP's (Invitrogen)	200 µM	4,0
Tampão 10X (Biotools)	1X	5,0
MgCl ₂ (Biotools)	2,5 mM	2,5
Iniciador randômico	0,12 µg	2,0
SuperScript II Reverse Transcriptase (Invitrogen)	10 U	1,0
Total	-	38,0

5.5.3. Semi *nested* RT-PCR

A detecção de material genético dos NoV por semi *nested* RT-PCR foi adaptada de Boxman *et al.* (2006). Essa metodologia foi dividida em duas etapas: na primeira ocorreu a transcrição reversa (RT) seguida de amplificação do material genético pela PCR e, na segunda houve a reação de semi *nested* propriamente dita.

Na primeira etapa 2,0 μL do RNA viral foi adicionado a 8,0 μL da mistura de reação apresentada no quadro 4, utilizando iniciadores descritos por Vennema *et al.*, (2002) que detectam os genogrupos I e II de NoV e amplificam uma região da RNA polimerase RNA dependente, com fragmento de 327 pares de base (pb). Realizou-se a amplificação sob as seguintes condições: incubação a 42°C por 60 minutos; desnaturação inicial a 94°C por 3 minutos; 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento a 37°C por 1 minuto e 30 segundos e, extensão a 72°C por 1 minuto; extensão final a 72°C por 7 minutos. Todos os produtos dessa primeira etapa foram diluídos 1:10 e 1:100 conforme a necessidade de se obter produtos sem fragmentos inespecíficos.

Quadro 4. Concentrações e volumes dos reagentes utilizados na primeira etapa da reação de semi *nested* RT-PCR.

Reagente	Concentração	Volume (μL)
H ₂ O ultra pura livre de DNase e RNase (Gibco)	-	5,15
dNTP's (Invitrogen)	0,2 mM	0,5
Tampão 10X (Biotools)	1X	1,0
MgCl ₂ (Biotools)	1,5 mM	0,3
Iniciador JV13I (anti-senso)	15,0 pmol	0,375
Iniciador JV12Y (senso)	15,0 pmol	0,375
SuperScript II Reverse Transcriptase (Invitrogen)	2 U	0,1
Taq DNA polimerase (Biotools)	2 U	0,2
Total	-	8,0

Para a semi *nested*, 1,0 μL do produto da reação de RT-PCR (1ª etapa) foi adicionado a 11,5 μL da mistura de reação apresentada no quadro 5. Os iniciadores G1 (GREEN *et al.*, 1998) e NoroII-R (BOXMAN *et al.*, 2006) foram utilizados como senso e anti-senso aos iniciadores JV13I e JV12Y para detecção dos genogrupos I e II dos NoV, respectivamente.

Quadro 5. Concentrações e volumes dos reagentes utilizados na segunda etapa da reação de semi *nested* RT-PCR, para detecção de norovírus genogrupos GI e GII.

	Reagente	Concentração	Volume (µL)
NoV GI	H ₂ O ultra pura livre de DNase e RNase (Gibco)	-	8,54
	dNTP's (Invitrogen)	0,25 mM	0,5
	Tampão 10X (Biotools)	1X	1,25
	MgCl ₂ (Biotools)	2,0 mM	0,5
	Iniciador JV13I (anti-senso)	12,5 pmol	0,325
	Iniciador G1 (senso)	12,5 pmol	0,325
	Taq DNA polimerase (Biotools)	0,6 U	0,06
	Total	-	11,5
NoV GII	H ₂ O ultra pura livre de DNase e RNase (Gibco)		8,54
	dNTP's (Invitrogen)	0,25 mM	0,5
	Tampão 10X (Biotools)	1X	1,25
	MgCl ₂ (Biotools)	2,0 mM	0,5
	Iniciador JV12Y (senso)	12,5 pmol	0,325
	Iniciador NoroII-R (anti-senso)	12,5 pmol	0,325
	Taq DNA polimerase (Biotools)	0,6 U	0,06
	Total	-	11,5

A amplificação da semi *nested* consistiu em desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos, seguida de 30 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento a 37°C por 1 minuto e 30 segundos e, extensão a 72°C por 1 minuto, acrescido de um ciclo de extensão final a 72°C por 7 minutos. Após a reação, todos os produtos amplificados, os controles (positivo e negativo) e o peso molecular foram submetidos à eletroforese horizontal em gel de agarose a 1,5% e visualizados em aparelho de foto-documentação para gel (Gel-Doc da Vilber Lourmat). Amostras positivas para o genogrupo I e II apresentaram amplicons de 187 e 236 pb, respectivamente. As sequências de todos os iniciadores utilizados nesse método estão detalhadas no quadro 6.

Quadro 6. Iniciadores utilizados na detecção de norovírus em amostras de água e esgoto por semi *nested* RT-PCR.

Primer	Sequência 5'-3'	Polaridade	Tamanho	Referência
JV13I	TCATCATCACCATAGAAIGAG	-	327 pb	Vennema <i>et al.</i> , 2002
JV12Y	ATACCACTATGATGCAGAYTA	+	327 pb	Vennema <i>et al.</i> , 2002
G1	TCNGAAATGGATGTTGG	+	187 pb	Green <i>et al.</i> , 1998
NoroII-R	AGCCAGTGGGCGATGGAATTC	-	236 pb	Boxman <i>et al.</i> , 2006, adaptado de Green <i>et al.</i> , 1998

I: inosina; Y: C/T; N: A/T/C/G

5.5.4. TaqMan® PCR em tempo real

A TaqMan® PCR em tempo real foi adaptada de Pang *et al.* (2005), com iniciadores e sondas fluorescentes previamente descritos por Kageyama *et al.* (2003), os quais são genogrupos específicos. O par de iniciadores COG1-F/COG1-R juntamente com as sondas G1a/G1b foram utilizados para detectar o genogrupo I de NoV, enquanto que o genogrupo II foi detectado pelo uso do par COG2-F/COG2-R em combinação com a sonda G2. As sondas G1 e G2 são marcadas com os fluoróforos VIC e FAM, respectivamente. Vale ressaltar que esta metodologia foi utilizada de maneira qualitativa, somente para avaliar a presença ou ausência do genoma de NoV nas amostras testadas, visto que nesta ocasião ainda não se possuía curva padrão para NoV. Todas as amostras foram testadas em duplicatas.

As concentrações e os volumes dos reagentes utilizados para a reação estão apresentados no quadro 7.

Quadro 7. Concentrações e volumes dos reagentes utilizados na reação de TaqMan® PCR em tempo real para detecção dos genótipos I e II de norovírus.

	Reagente	Concentração	Volume (µL)
NoV GI	H ₂ O ultra pura livre de DNase e RNase (Gibco)	-	3,3
	TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems)	2x	7,5
	Iniciador COG1-F (senso)	400 µM	0,3
	Iniciador COG1-R (anti-senso)	400 µM	0,3
	Sonda G1a (anti-senso)	200 µM	0,3
	Sonda G1b (anti-senso)	200 µM	0,3
	Total	-	12,0
NoV GII	H ₂ O ultra pura livre de DNase e RNase (Gibco)	-	3,6
	TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems)	2x	7,5
	Iniciador COG2-F (senso)	400 µM	0,3
	Iniciador COG2-R (anti-senso)	400 µM	0,3
	Sonda G2 (senso)	200 µM	0,3
	Total	-	12,0

A reação foi realizada no equipamento *7500 Real Time PCR System* (Applied Biosystems) nas seguintes condições: 95°C por 10 minutos, 45 ciclos de 94° C por 20 segundos e 56° C por 1 minuto, seguido de um ciclo final de 95° C por 5 minutos.

As sequências de todos os iniciadores e sondas utilizados na reação estão detalhadas no quadro 8.

Quadro 8. Iniciadores e sondas utilizados na detecção de norovírus em amostras de água e esgoto por TaqMan® PCR em tempo real.

Primer/ Sonda*	Sequência 5'-3'	Polaridade	Tamanho (pb)
Genogrupo I de NoV			
COG1-F	CGYTGGATGCGNTTYCATGA	+	85
COG1-R	CTTAGACGCCATCATCATTYAC	-	85
G1-a	VIC-AGATYGCGATCYCCTGTCCA-TAMRA	-	85
G1-b	VIC-AGATCGCGGTCTCCTGTCCA-TAMRA	-	85
Genogrupo II de NoV			
COG2-F	CARGARBCNATGTTYAGRTGGATGAG	+	98
COG2-R	TCGACGCCATCTTCATTCACA	-	98
G2	FAM-TGGGAGGGCGATCGCAATCT-TAMRA	+	98

*Kageyama *et al.*, 2003 ; R: A/G; B: C/G/T; Y: C/T ; N: A/C/G/T

5.6. GENOTIPAGEM DE NOROVÍRUS

5.6.1. *Nested* e *semi nested* PCR

As amostras positivas para GI e GII tanto por *semi nested* RT-PCR como por TaqMan® PCR em tempo real foram submetidos ao *nested* (para GI) ou *semi nested* PCR (para GII) para a região 5' terminal da ORF2 (parcial do capsídeo) com o objetivo de obter amplicons para realizar a genotipagem dos NoV, utilizando os iniciadores Mon 431/432 (ANDERSON *et al.*, 2001; FANKHAUSER *et al.*, 2002) e G2SKR (KOJIMA *et al.*, 2002) na primeira etapa (PCR) e, na segunda, os pares COG1F/G1SKR (*nested*) e COG2F/G2SKR (*semi nested*) para detecção específica de GI e GII, respectivamente (KOJIMA *et al.*, 2002; KAGEYAMA *et al.*, 2003).

A amplificação da PCR consistiu em desnaturação inicial a 94°C por 2 minutos, seguida de 40 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento a 53.6°C por 30 segundos e, extensão a 72°C por 1 minuto, acrescido de um ciclo de extensão final a 72°C por 7 minutos. A reação de *nested/semi nested* para detecção de NoV GI e GII respectivamente foi executada sob as seguintes condições: 94°C por 3 minutos seguido de 35 (GI)/30 (GII) repetições de desnaturação a 94°C por 30 segundos; anelamento a 50° (GI) e 55°C (GII) por 30 segundos; extensão a 72°C por 1 minuto; extensão final de 72°C por 7 minutos.

Ao final das reações todos os produtos amplificados, os controles positivo, negativo e o peso molecular foram submetidos à eletroforese horizontal em gel de agarose a 1,5% e visualizados em aparelho de foto-documentação para gel (Gel-Doc da Vilber Lourmat). Amostras positivas para NoV GI e GII apresentaram fragmentos com tamanho de 380 e 390 pb, respectivamente. As sequências de todos os iniciadores utilizados nesse método estão detalhadas no quadro 9.

Quadro 9. Iniciadores utilizados na detecção de norovírus genogrupos GI e GII (região parcial do capsídeo) em amostras de água e esgoto por *nested*/semi *nested* PCR.

Primer	Sequência 5'-3'	Polaridade	Referência
Mon 431	TGGACIAGRGGICCYAAYCA		Anderson et al., 2001 Fankhauser et al., 2002
Mon 432	TGGACICGYGGICCYAAYCA		Anderson et al., 2001 Fankhauser et al., 2002
G2SKR	CCRCCNGCATRHCCRTTTRTACAT	-	Kojima et al., 2002
COG1F	CGYTGGATGCGNTTYCATGA	+	Kageyama et al., 2003
G1SKR	CCAACCCARCCATTRTACA	-	Kojima et al., 2002
COG2F	CARGARBCNATGTTYAGRTGGATGAG	+	Kageyama et al., 2003

R: A/G; B: C/G/T; Y: C/T ; N: A/C/G/T

5.6.2. Purificação e quantificação do ácido nucléico

A purificação das amostras positivas para NoV foi realizada com o uso dos kits comerciais “*QIAquick Gel Extraction*” e “*QIAquick PCR Purification*” (QIAGEN), escolhidos criteriosamente de acordo com a qualidade da amostra (ausência de fragmentos inespecíficos) e seguindo o protocolo do fabricante. Em seguida, os ácidos nucléicos purificados foram quantificados em gel de agarose (2%) a partir da comparação do padrão de fragmentos com os dos contidos no “*Low DNA Mass™ Ladder*” (Invitrogen).

5.6.3. Sequenciamento parcial do genoma de Norovírus

Após a purificação do ácido nucléico, as amostras foram submetidas à reação de sequenciamento por meio da utilização do Kit “*BigDye Terminator v. 3.1 Cycle Sequencing*”

(Life Technologies). O processo foi dividido em duas etapas: a) reação no termociclador; b) precipitação de DNA com Isopropanol e Etanol.

Na primeira etapa, em uma placa óptica de 96 poços (Life Technologies), 5 μL de DNA purificado foi adicionado a 1 μL de BigDye, 2 μL do iniciador senso/anti-senso a uma concentração de 3,2 pmol (reação individual para cada iniciador) e 2 μL do “5x Sequencing Buffer” e submetido ao termociclador sob as seguintes condições: desnaturação a 96°C por 20 segundos, hibridização a 50°C por 15 segundos e extensão a 60°C por 4 minutos.

Na segunda etapa, adicionou-se 40 μL de Isopropanol (70%) em cada amostra, e em seguida a placa foi agitada levemente em vortex, incubada a temperatura ambiente por 15 minutos e centrifugada durante 45 minutos a 4000 g. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e então se adicionou 200 μL de Etanol (70%) em cada poço da placa, a qual foi levemente agitada em vortex, centrifugada por 10 minutos a 4000 g e o sobrenadante descartado. Para propiciar a evaporação de resquícios de Etanol, a placa foi invertida sobre papel absorvente e, em seguida, submetida ao termociclador a uma temperatura de 60°C por 4 minutos. Ao final, o DNA foi ressuspensionado com 10 μL de “Hi-DiTM Formamida” (Applied Biosystems), desnaturado por 5 minutos a 95°C e realizado choque térmico por 2 minutos em banho de gelo e, por fim, realizou-se o sequenciamento nucleotídico no equipamento “ABI 3130xl Genetic Analyzer” (Applied Biosystems).

No programa BioEdit (v. 7.0.5.3), as sequências obtidas foram alinhadas, editadas e comparadas com as já depositadas no banco de genes (GenBank) da plataforma do NCBI (National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine) e NoV “genotyping tool” (KRONEMAN *et al.*, 2011).

As árvores filogenéticas foram construídas no programa MEGA 6.0 (TAMURA *et al.*, 2013), utilizando-se o algoritmo de Neighbor-Joining (NJ) e empregando-se o teste de confiabilidade não paramétrico de “bootstrap”.

Todos os procedimentos laboratoriais desde a coleta das amostras até a caracterização molecular estão resumidamente apresentados na figura 9.

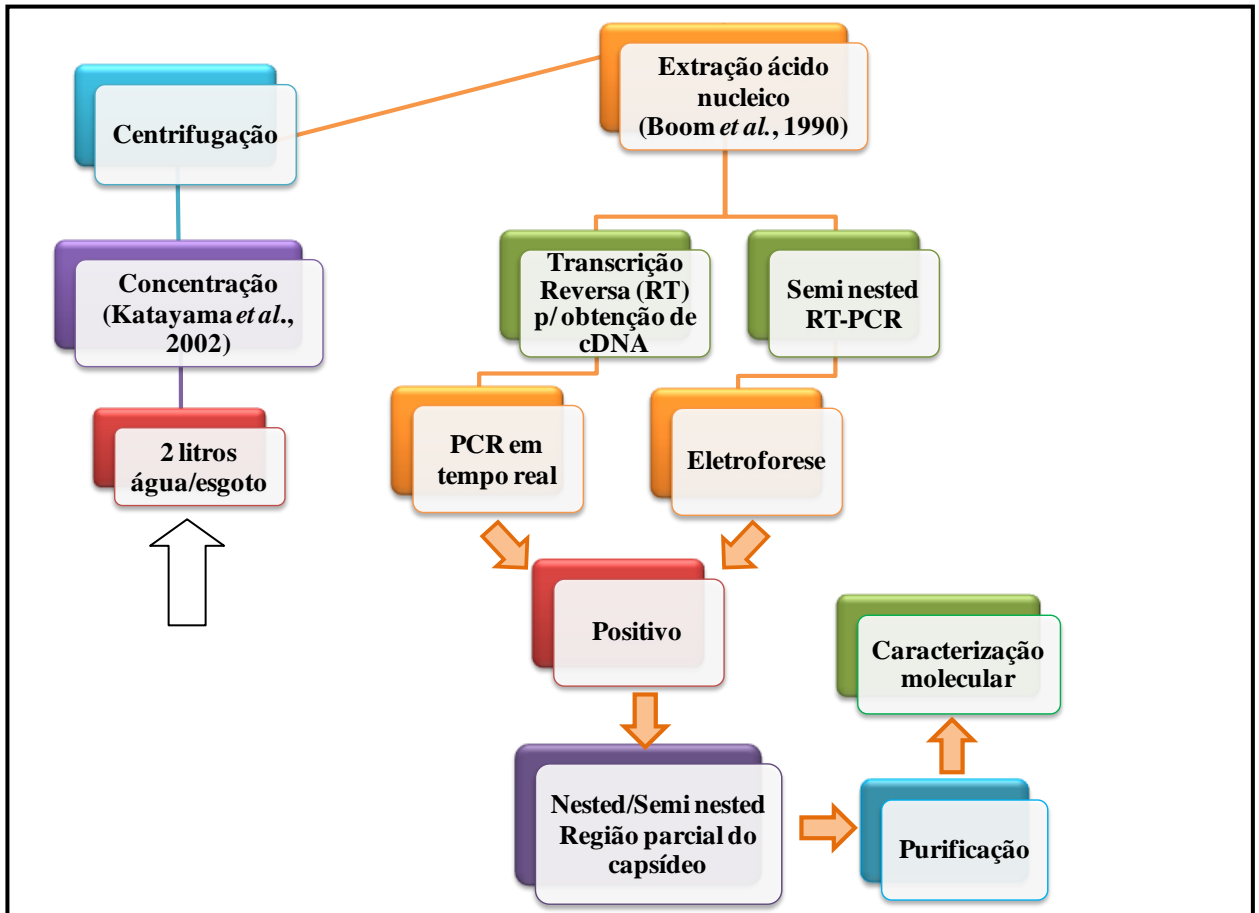


Figura 9. Fluxograma de todos os procedimentos laboratoriais empregados na análise de norovírus.

5.7. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para verificar a especificidade/sensibilidade e a reprodutibilidade dos métodos moleculares foram aplicados o *Screening Test* (teste do crivo) e o índice de Kappa, respectivamente. Teste-G foi empregado para avaliar se houve ou não diferença significativa na contaminação por NoV entre um local específico com relação à água tratada e ao esgoto. Utilizou-se o teste de Regressão Logística Simples para correlacionar positividade para NoV e concentração de coliformes termotolerantes. Todas as análises foram executadas no programa BioEstat. 5.0 (AYRES *et al.*, 2007) e valores estatisticamente significantes foram expressos por p -valor $\leq 0,05$.

6. RESULTADOS

6.1. DETECÇÃO DO GENOMA DE NOROVÍRUS

No período de novembro de 2008 a outubro de 2010 foram testadas 168 amostras de água e esgoto quanto a presença de NoV, obtendo-se positividade de 33,9% (57/168) utilizando as técnicas de semi *nested* RT-PCR e/ou TaqMan® PCR em tempo real (Figura 10).

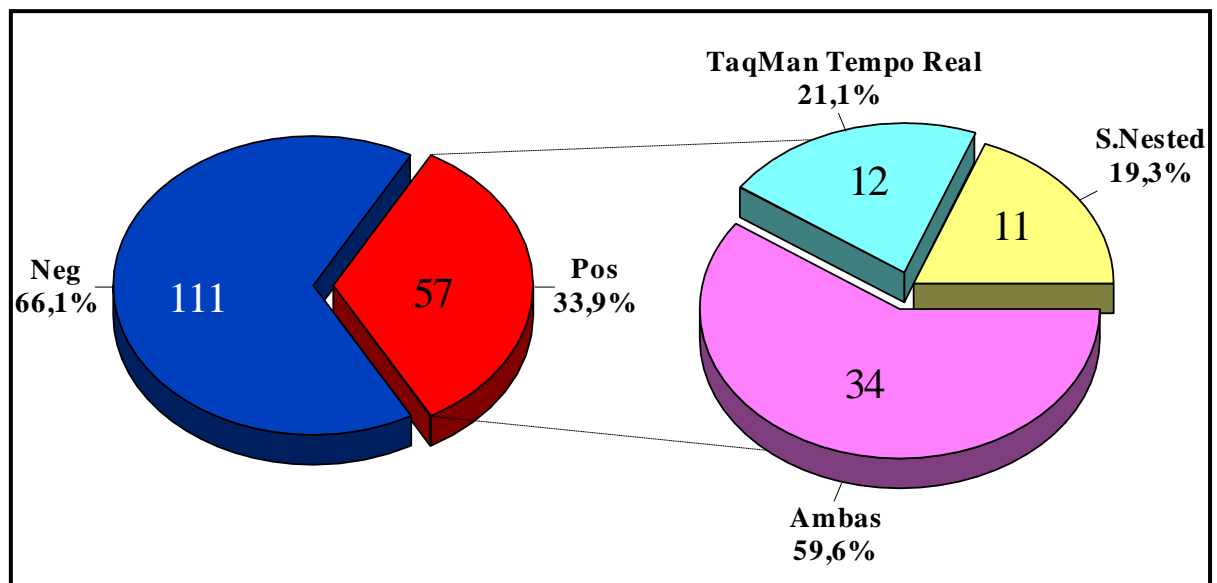


Figura 10. Frequência de NoV em 168 amostras de água e esgoto oriundas de sete pontos na cidade de Belém, Pará, novembro/2008 a outubro/2010.

6.2. FREQUÊNCIA DOS GENOGRUPOS I E II DE NOROVÍRUS E CO-CIRCULAÇÃO

A positividade para os genogrupos I, II ou ambos foi de 7,1% (12/168), 6,0% (10/168) e 20,8% (35/168) respectivamente, independente da técnica de detecção molecular utilizada (Figura 11 A). Considerando apenas o semi *nested* RT-PCR (Figura 11 B) GI, GII e GI+GII foram detectados em 6% (10/168), 4,8% (8/168) e 16,1% (27/168), respectivamente. Por TaqMan® PCR em tempo real (Figura 11 C) GI esteve presente em 5,4% (9/168) das amostras e GII em 4,2% (7/168), enquanto ambos foram observados em 17,9% (30/168).

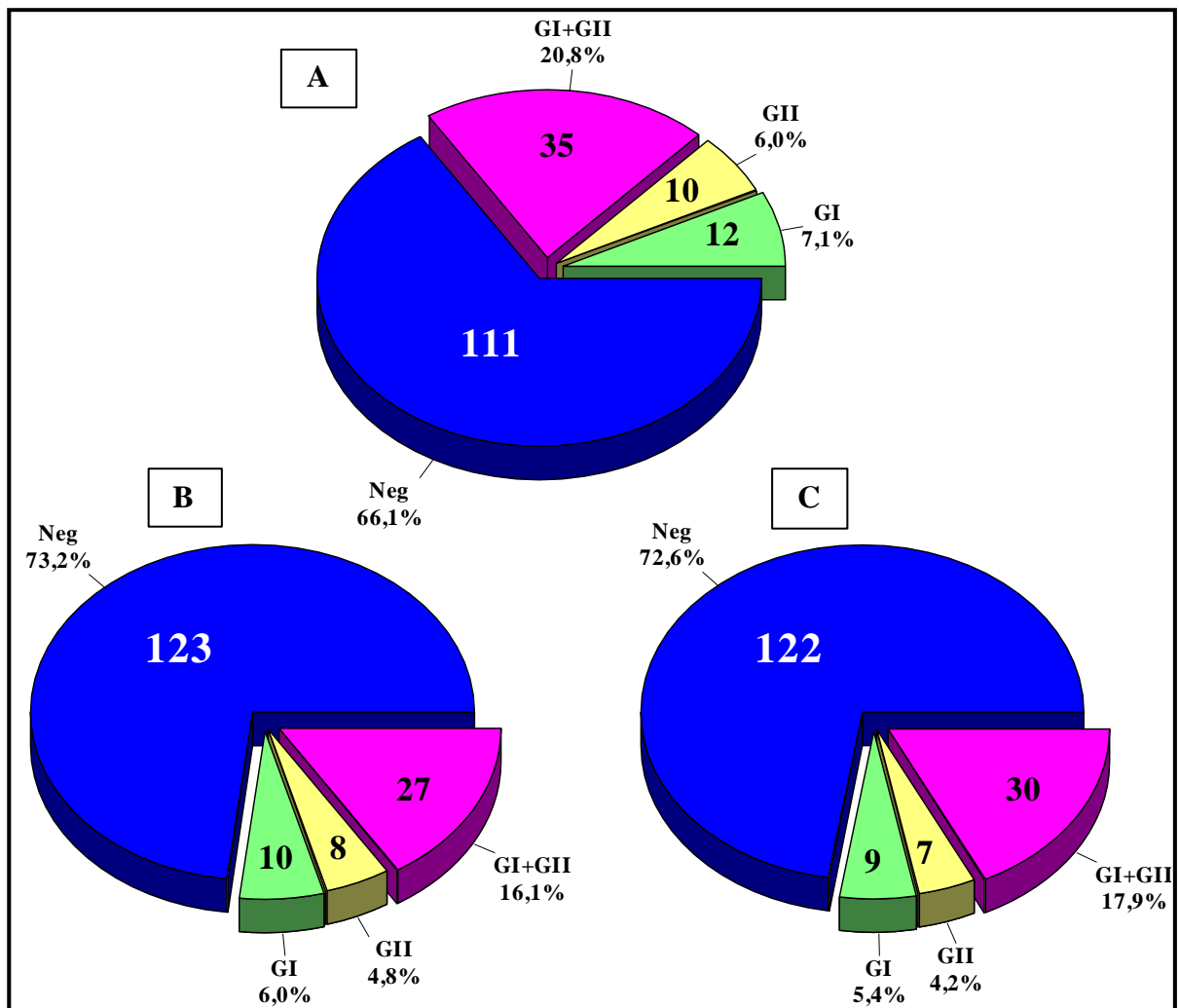


Figura 11. Frequência dos genogrupos I e II de NoV em 168 amostras de água e esgoto. Por semi *nested* RT-PCR e/ou TaqMan® PCR em tempo real (A), apenas por semi *nested* (B) e apenas por TaqMan® PCR em tempo real (C).

O NoV foi detectado ao longo de todos os meses em pelo menos um local de amostragem, com exceção do mês de dezembro de 2008 em que não houve casos positivos em nenhum dos pontos estudados (Tabela 1).

Tabela 1. Distribuição das amostras positivas e negativas para os genogrupos I e II de norovírus pelo semi *nested* RT-PCR e TaqMan® PCR em tempo real de acordo com o local de coleta, novembro de 2008 a outubro de 2010.

Mês/Ano	Locais de coleta													
	ETA		Bolonha		Á.Preta		P.Açaí		Ver-o-Peso		Tucunduba		EEE-UNA	
	N	R	N	R	N	R	N	R	N	R	N	R	N	R
Nov/2008	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	GI/II
Dez/2008	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Jan/2009	-	-	-	-	GII	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Fev/2009	-	-	GII	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Mar/2009	-	-	GII	-	-	-	-	GI/II	-	-	-	-	-	-
Abr/2009	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	GII	GII	GI	GI
Mai/2009	-	-	GII	-	-	-	-	-	-	-	GI/II	GII	GI/II	GI/II
Jun/2009	-	-	-	-	-	-	-	GII	-	-	-	-	GI	-
Jul/2009	-	-	-	-	-	-	-	GI	-	GII	-	GI/II	GI/II	GI
Ago/2009	-	-	-	-	GI	-	-	-	-	GI	-	-	GI/II	GI/II
Set/2009	-	-	-	-	-	-	-	GI	-	-	GI/II	GI/II	GI/II	GI/II
Out/2009	-	-	-	-	-	-	-	GI	-	GI/II	GI	GI/II	GI/II	GI/II
Nov/2009	-	-	-	-	-	-	-	-	GII	GII	GI/II	GI/II	GI/II	GI/II
Dez/2009	-	-	GII	-	-	-	-	-	-	-	GI/II	-	GI/II	GI/II
Jan/2010	-	-	-	-	GII	GII	-	-	-	-	GI/II	GI/II	GI/II	GI
Fev/2010	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	GI/II	GI/II	GI/II	GI/II
Mar/2010	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	GI/II	GI/II	GI/II	GI/II
Abr/2010	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	GI	GI/II
Mai/2010	-	-	-	-	-	GI	-	-	-	-	-	GI/II	GI/II	GI/II
Jun/2010	-	-	GI	-	-	-	-	-	-	-	GI/II	GI/II	GI/II	GI/II
Jul/2010	-	-	GI	-	-	-	-	-	-	-	GI/II	GI/II	GI	GI/II
Ago/2010	-	-	GI	-	-	-	GI	GI	GI/II	GII	GI/II	GI/II	-	-
Set/2010	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	GI/II	GI/II	GI/II	GI/II
Out/2010	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	GI/II	GI/II	GI/II	GI/II
% Pos/Test	0	0	29,2	0	12,5	8,3	4,2	25,0	8,3	20,8	58,3	62,5	75	75
	0/24	0/24	7/24		3/24	2/24	1/24	6/24	2/24	5/24	14/24	15/24	18/24	18/24
% Pos/Test*	0		29,2		16,7		25,0		20,8		66,7		79,2	
	0/24		7/24		4/24		6/24		5/24		16/24		19/24	

*por local independente do método; N: semi *nested* RT-PCR; R: TaqMan® PCR em tempo real; -: amostra negativa

6.3. AVALIAÇÃO DOS MÉTODOS MOLECULARES EMPREGADOS

Para avaliar a sensibilidade e a especificidade das técnicas de detecção molecular empregadas foi utilizado o *Screening Test* (teste do crivo), o qual revelou sensibilidade e especificidade de 73,91% e 90,98%, respectivamente, considerando a TaqMan® PCR em tempo real como metodologia de referência (Tabela 2). O teste de Kappa indicou boa replicabilidade nos resultados obtidos por ambas as técnicas (Kappa = 0,6534, p-valor <0,0001) e foi demonstrada concordância de 86,3% (145/168).

Tabela 2. Comparação entre os resultados obtidos por TaqMan® PCR em tempo real e semi *nested* RT-PCR quanto à detecção de norovírus (GI/GII) em 168 amostras de água e esgoto analisadas, novembro de 2008 a outubro de 2010.

Semi <i>nested</i> RT-PCR	TaqMan® PCR em tempo real*		Totais
	Nº de amostras positivas	Nº de amostras negativas	
Nº de amostras positivas	34/168	11/168	45/168
Nº de amostras negativas	12/168	111/168	123/168
Totais	46/168	122/168	168

*Sensibilidade de 73,91%, especificidade de 90,98%, concordância de 86,3% e Kappa = 0,6534 (p-valor <0,0001)

6.4. POSITIVIDADE PARA NOROVÍRUS NOS LOCAIS ESTUDADOS

NoV foi detectado em maior e menor escala nas amostras provenientes da EEE-UNA (79,2% - 19/24, p-valor <0,0001) e ETA-Bolonha (0%, p-valor <0,0001), respectivamente (Tabela 3).. As águas provenientes do lago Água Preta (p-valor = 0,0981) mostraram-se menos contaminadas por NoV assemelhando-se com o padrão encontrado na ETA, enquanto às oriundas do igarapé Tucunduba (p-valor = 0,5153) exibiram grau de contaminação semelhante ao de esgoto bruto.

Tabela 3. Positividade para norovírus (genogrupos I e II) pelo semi *nested* RT-PCR e/ou TaqMan® PCR em tempo real de acordo com o local de coleta.

Local de coleta	NoV (GI/GII)		Teste-G	
	% (Pos/Total)	<i>p</i> -valor ¹	<i>p</i> -valor ² local x água tratada	<i>p</i> -valor ³ local x esgoto
ETA	0 (0/24)	<0,0001	-	-
Bolonha	29,2 (7/24)	0,7462	0,0082	0,0012
Á. Preta	16,7 (4/24)	0,0767	0,0981	<0,0001
P. Açaí	25,0 (6/24)	0,4370	0,0193	0,0004
Ver-o-Peso	20,8 (5/24)	0,2056	0,0441	0,0001
Tucunduba	66,7 (16/24)	0,0009	<0,0001	0,5153
EEE-UNA	79,2 (19/24)	<0,0001	-	-
Total	33,9 (57/168)	-	-	-

¹Para avaliar se não houve (H0) ou houve (H1) diferença de contaminação por NoV entre os locais

²Para avaliar se o nível de contaminação é semelhante (H0) ou não (H1) ao de água tratada.

³Para avaliar se o nível de contaminação é semelhante (H0) ou não (H1) ao de esgoto.

6.5. GENOTIPAGEM DAS AMOSTRAS POSITIVAS PARA NOROVÍRUS

Das 57 amostras positivas para NoV, 53 foram submetidas a um outro *nested* (para GII) ou semi *nested* PCR (para GI) baseado na região 5' terminal da ORF2 (capsídeo), pois quatro amostras apresentaram material esgotado para realizar uma nova análise. Em 47,2% (25/53) o genoma de NoV foi detectado, dos quais 12,0% (3/25) foram classificados como GI, 24% (6/25) como GII e 64,0% (16/25) para ambos (Tabela 4).

Tabela 4. Genogrupos e genótipos detectados por local de coleta nas 25 amostras positivas para norovírus pela região 5' terminal da ORF2 (capsídeo).

Local	<i>S.nested</i> ou TaqMan®		5' terminal da ORF2 (parcial capsídeo)		
	N Positivas	N Positivas	GI	GII	GI+GII
			Genótipo (N)	Genótipo (N)	Genótipo (N)
ETA	0	-	-	-	-
Bolonha	7	1	-	GII.4 (1)	-
Á. Preta	4*	-	-	-	-
P. Açai	6*	1	GI.8 (1)	-	-
Ver-o-Peso	5	1	-	-	NT/NT (1) GI.8/GII.4 (1) GI.8/GII.9 (1)
Tucunduba	16*	11	NT (1)	GII.4 (3) GII.6 (1)	GI.8/NT (1) NT/GII.4 (2) NT/GII.14 (1)
EEE-UMA	19*	11	GI.4 (1)	GII.4 (1)	GI.1/GII.4 (1) GI.4/GII.12 (1) GI.8/GII.4 (3) GI.8/GII.9 (1) NT/GII.6 (2) NT/NT (1)
Total	57	25	12,0% (3/25)	24,0% (6/25)	64,0% (16/25)

*uma amostra positiva de cada local não foi testada para a região capsídeo, pois o material se encontrava esgotado para uma nova análise. NT: amostra não tipada.

Das 19 amostras sequenciadas como GI o genótipo mais frequente foi GI.8 (n=8) seguido de GI.4 (n=2), GI.1 (n=1) e não genotipadas (n=8) (Figuras 12 e 13). Com relação à GII, 22 foram sequenciadas encontrando-se os genótipos GII.4 (n=12), GII.6 (n=3), GII.9 (n=2), GII.12 (n=1), GII.14 (n=1) e não genotipadas (n=3) (Figuras 12 e 14).

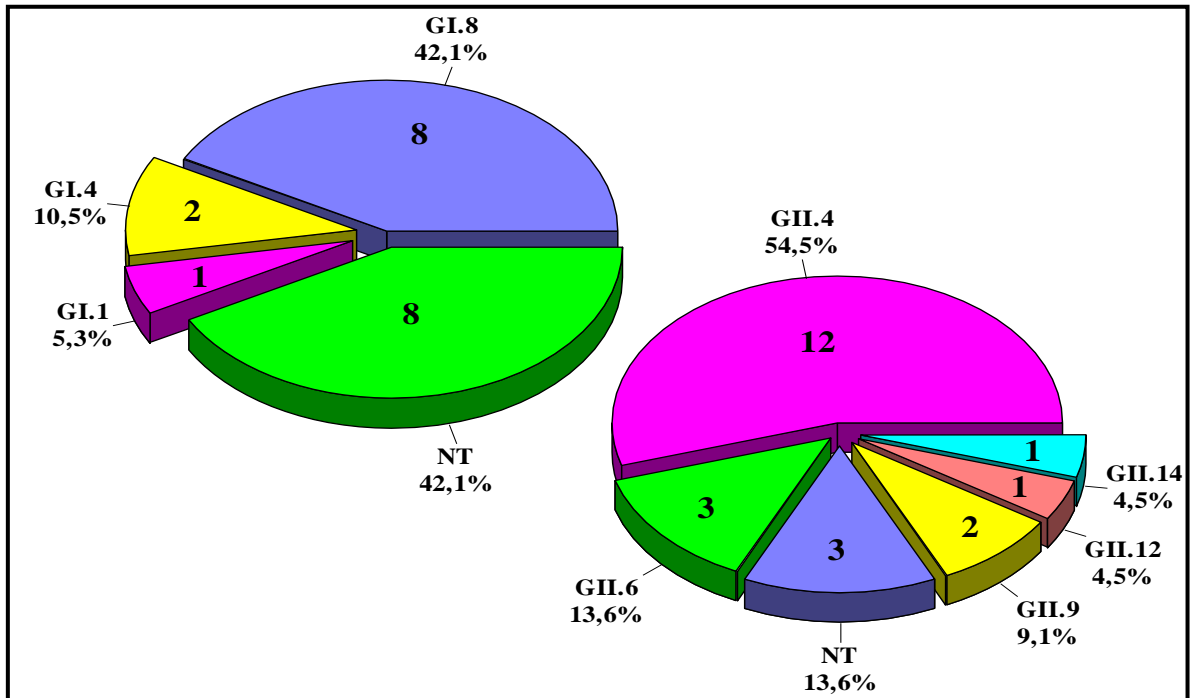


Figura 12. Genótipos de GI e GII detectados nas amostras positivas para NoV pela região 5' terminal da ORF2 (capsídeo). NT: amostras não tipadas.

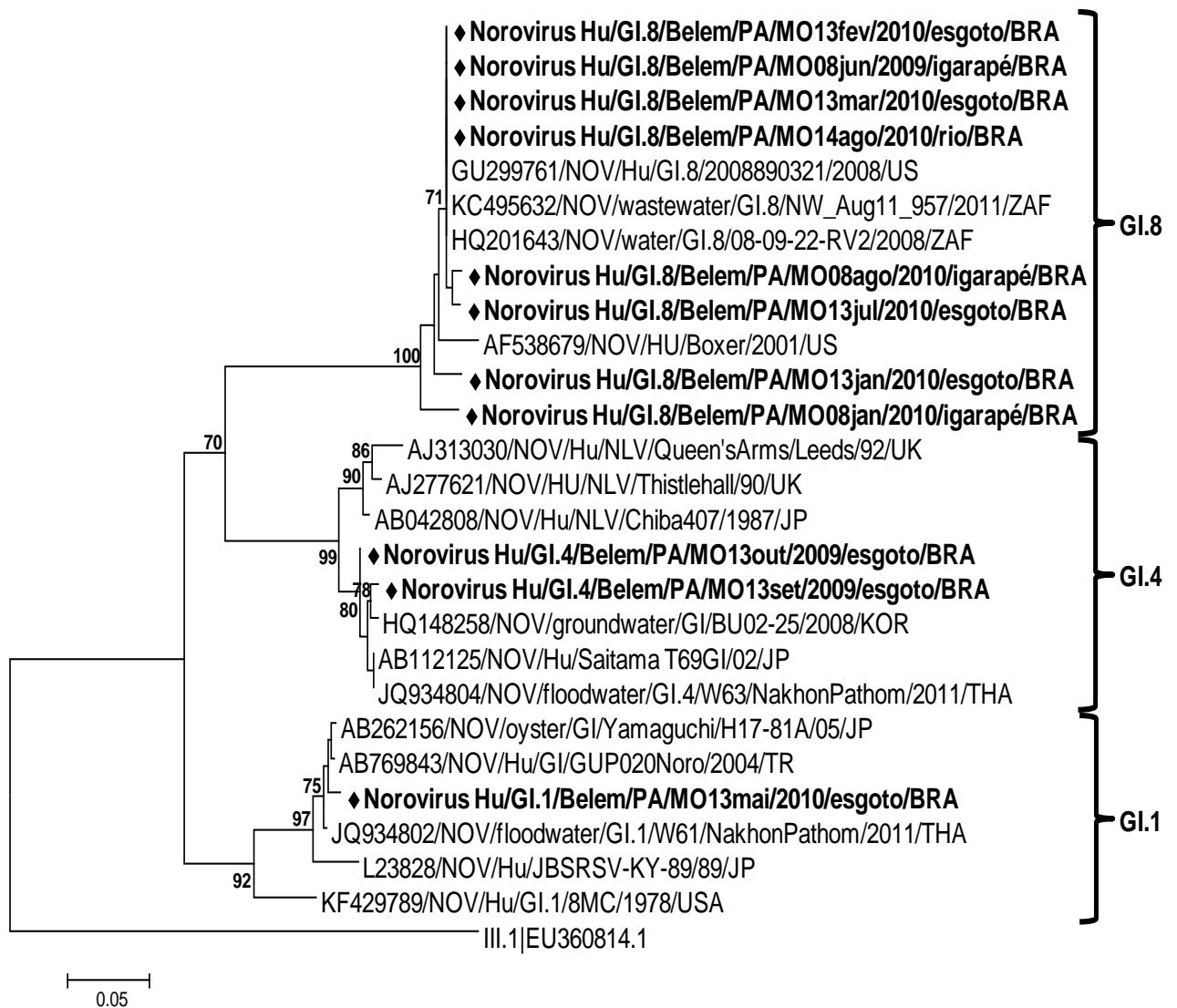


Figura 13. Árvore filogenética dos genótipos de NoV GI encontrados nas amostras ambientais de Belém, Pará. Construída utilizando o método de Neighbor-Joining, pela análise de Kimura 2-Parâmetros. O teste foi realizado com 1000 réplicas de *bootstrap*. Amostras do estudo estão marcadas em negrito. Protótipos foram retirados do site NoV genotyping tool (<http://www.rivm.nl/mpf/norovirus/typingtool/>). A barra de escala é proporcional à distância genética. As amostras do estudo estão marcadas com um losango e em negrito.

A média da distância nucleotídica observada entre as amostras classificadas como GI.1, GI.4 e GI.8 foram de 4%, 3% e 2% respectivamente, com pequena alteração de aminoácidos (variação de 1 - 3 aa) em comparação com as sequências de referência de cada cepa.

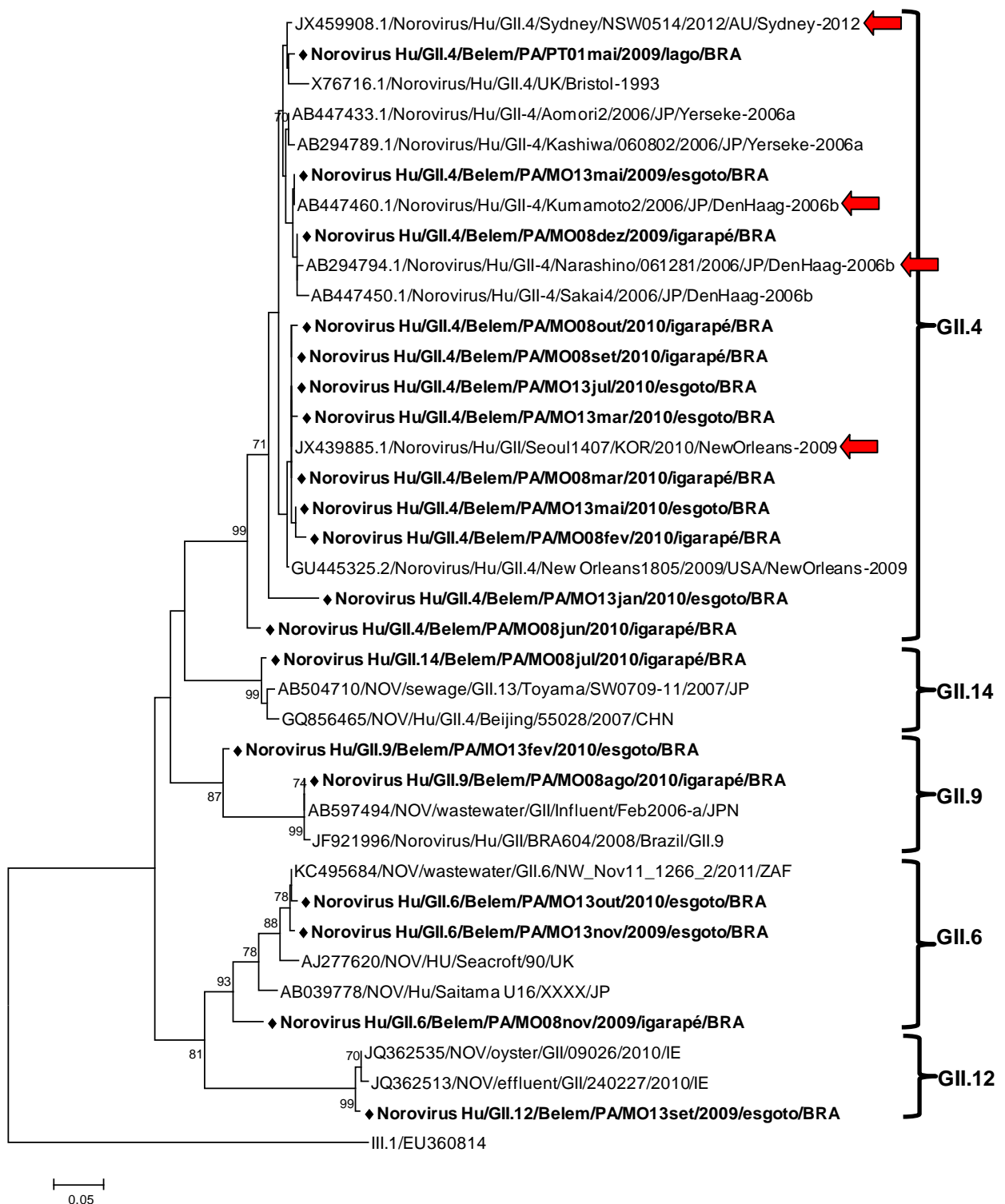


Figura 14. Árvore filogenética dos genótipos de NoV GII encontrados nas amostras ambientais de Belém, Pará. Construída utilizando o método de Neighbor-Joining, pela análise de Kimura 2-Parâmetros. O teste foi realizado com 1000 réplicas de *bootstrap*. Amostras do estudo estão marcadas em negrito. Protótipos retirados do site NoV genotyping tool (<http://www.rivm.nl/mpf/norovirus/typingtool/>). A barra de escala é proporcional à distância genética. As amostras do estudo estão marcadas com um losango e em negrito. Os protótipos de cada variante GII.4 estão assinalados com uma seta.

Em relação ao grupo GII.4, duas amostras apresentaram uma divergência significativa de 8% (MO13-Jan/2010) e 6% (MO08-Jun/2010) com relação às demais amostras genotipadas neste grupo. Ao comparar estas amostras com os protótipos, ocorreu troca de aminoácidos que variou 10-12 aa na primeira amostra e, 12-14 aa na segunda. As demais amostras GII.4 se agruparam em três diferentes *clusters*. Duas amostras (20% - 2/10) foram semelhantes à variante GII.4 2006-b, sete (70% - 7/10) à GII.4 Nova Orleans 2009 e uma detectada em 2009 (10% - 1/10) à GII.4 Sidney 2012.

Nos outros genótipos GII, a média da distância nucleotídica encontrada foi de: 5% nos grupos GII.6 e GII.9; 1% no GII.12 e 2% no GII.14. Vale ressaltar que uma amostra (MO13-Jan/2010) agrupada no GII.9 mostrou uma evidente divergência aminoacídica com relação aos protótipos utilizados, com troca de 11 e 12 aa, respectivamente.

6.6. ASSOCIAÇÃO ENTRE COLIFORMES TERMOTOLERANTES E CONTAMINAÇÃO POR NOROVÍRUS

Das 96 amostras de água em que a concentração de coliformes termotolerantes ultrapassou o limite recomendado (1000 coliformes – água doce classe II) pela resolução nº 357/2005 do Conselho Nacional de Meio Ambiente – CONAMA (BRASIL, 2005), 34 (35,4%) também foram positivas para NoV (Tabela 5). Entretanto, em quatro amostras se observou a presença dos NoV e os valores encontrados para coliformes termotolerantes estavam de acordo com o máximo permitido (Tabela 5), sendo duas oriundas do lago Bolonha (dezembro/2009 - $1,53 \times 10^2$ NMP/100 mL; agosto/2010 - $6,89 \times 10^2$ NMP/100 mL) e duas do Água Preta (agosto/2009 - $1,0 \times 10^1$ NMP/100 mL; maio/2010 - $2,46 \times 10^2$ NMP/100 mL).

O resultado de qui-quadrado obtido após o teste de Regressão Logística Simples referente à presença ou ausência de NoV face da contaminação por coliformes mostrou que não há relação de dependência entre esses dois fatores nesses pontos de amostragem (Bolonha: p -valor=0,5573; Água Preta: p -valor=0,5765). Todas as amostras (n=72) provenientes do Porto do Açaí, Ver-o-Peso e Tucunduba apresentaram valores de bactérias fora do padrão estabelecido, sendo que em 37,5% (27/72) das mesmas também se observou a presença de NoV (Tabela 5).

Não há uma legislação vigente no país que se refira a um limite de coliformes termotolerantes para amostras de esgoto, não havendo dessa forma um valor de referência para esse parâmetro. Na EEE-UNA a concentração desses indicadores bacteriológicos variou

de $9,85 \times 10^4$ a $6,488 \times 10^6$ e em 79,2% (19/24) das amostras os NoV estavam presentes. Já na ETA-Bolonha tanto os NoV como coliformes termotolerantes foram ausentes, estando este último parâmetro de acordo com o preconizado (CONAMA 357/2005) para água tratada destinada ao consumo humano.

Tabela 5. Comparação entre ausência ou presença de norovírus em relação ao resultado de colimetria[♦] obtido em 144 amostras de água analisadas e de acordo com o local de coleta, novembro de 2008 a outubro de 2010.

Locais	NoV ausente	NoV ausente	NoV presente	NoV presente
	Colif. $\leq 1000^*$	Colif. $\geq 1000^*$	Colif. $\leq 1000^*$	Colif. $\geq 1000^*$
	N	N	N	N
ETA	24	0	0	0
Bolonha	7	10	2	5
Á. Preta	13	7	2	2
P.Açaí	0	18	0	6
Ver-o-Peso	0	19	0	5
Tucunduba	0	8	0	16
Totais[□]	44	62	4	34

[♦] Resultados gentilmente cedidos pela pesquisadora Lena L. C. S. Morais, Seção de Meio Ambiente, IEC/SVS/MS.

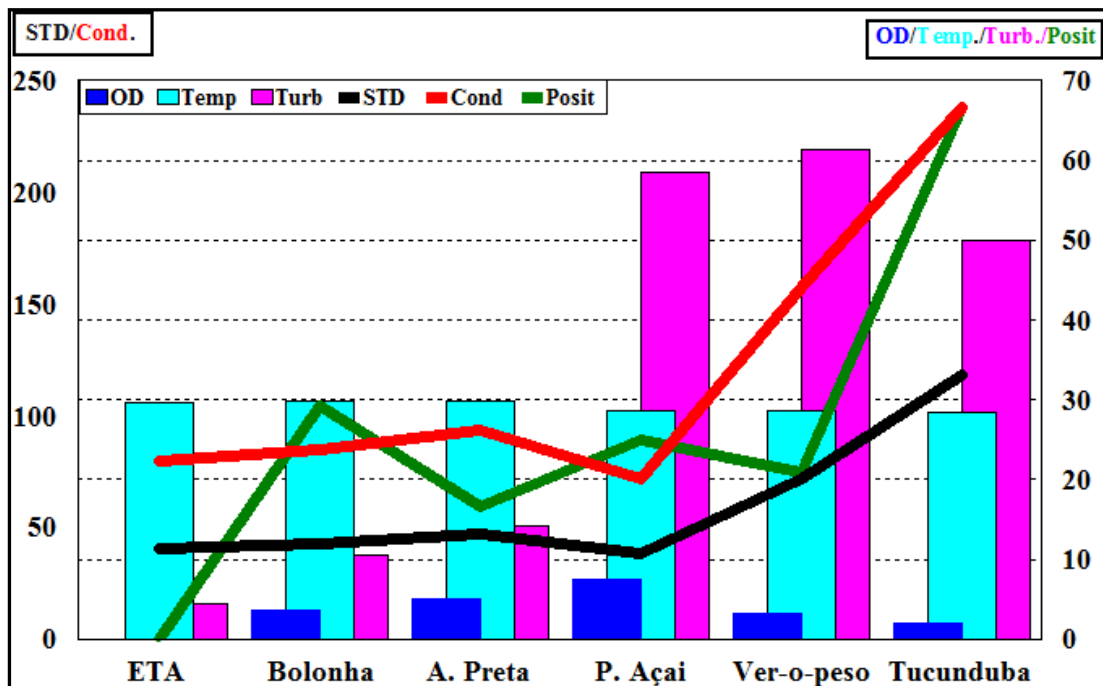
* Baseado na resolução nº 357/2005 do CONAMA para água doce de classe II

[□] A EEE-UNA não foi incluída nesta tabela por se tratar de esgoto, sendo que todas as suas 24 amostras apresentaram alto nível de coliformes e em 19 os NoV foram detectados.

6.7. ASSOCIAÇÃO ENTRE PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS E CONTAMINAÇÃO POR NOROVÍRUS

As médias das variáveis físico-químicas estão apresentadas na figura 15. A temperatura se manteve praticamente constante em todos os pontos de amostragem com variação de 28,5°C a 29,8°C. Os valores de condutividade (μS) e sólidos totais dissolvidos - STD (mg/L) - apresentaram alteração mínima nas amostras da ETA, Bolonha, Água Preta e Porto do Açaí, elevando-se apenas nas amostras do Ver-o-Peso e igarapé Tucunduba, assim como a turbidez (unidades nefelométrica de turbidez – UNT) foi mais evidente nesses

mesmos locais e no Porto do Açaí. A maior média de oxigênio dissolvido – OD (mg/L) foi detectada no Porto do Açaí, já nos demais locais a mudança foi discreta.



◆ Resultados médios gentilmente cedidos pelo pesquisador Bruno S. Carneiro, IEC/SVS/MS.

Figura 15. Resultados médios das variáveis físico-químicas[♦] e positividade para NoV de acordo com o local de coleta durante o período do estudo. OD= oxigênio dissolvido, Temp= temperatura, Turb= turbidez, STD= sólidos totais dissolvidos, Cond= condutividade, Posit= positividade.

Com relação ao pH, as médias mínimas e máximas encontradas foram de: 5,1 e 6,4 (ETA); 5,3 e 6,8 (Bolonha); 5,7 e 6,7 (Água Preta); 6,0 e 6,9 (Porto do Açaí); 5,0 e 6,4 (Ver-o-Peso); 4,8 e 7,6 (Tucunduba). A EEE-UNA exibiu características físico-químicas bastante alteradas, característica peculiar de esgoto bruto (condutividade= 742,3; STD= 383,1; OD= 0,9; turbidez= 74,4; pH mín/máx= 5,0/7,4).

6.8. ASSOCIAÇÃO ENTRE CARACTERÍSTICAS CLIMÁTICAS E POSITIVIDADE PARA NOROVÍRUS

A temperatura se manteve praticamente constante durante todo o período do estudo, com mínima de 25,7°C no mês de fevereiro/2009 e máxima de 28,5°C em setembro/2010, não havendo relação entre este parâmetro e a ocorrência de NoV. Assim como ocorrido na temperatura, se observou pequenas variações na umidade relativa do ar, apresentando valores elevados no período de maior precipitação (dezembro a junho),

comparado com a de menor intensidade chuvosa (julho a novembro). NoV foram mais detectados nos meses de julho e outubro de 2009 e agosto de 2010, onde a pluviosidade foi mais baixa (Figura 16). Deste modo, foi possível notar flutuação no que diz respeito à precipitação e positividade para NoV. No período menos chuvoso (julho a novembro) há uma tendência no aumento da positividade para NoV nos ambientes aquáticos e esgoto pesquisados, conforme pode ser observado na figura 16, ocorrendo também o inverso nos meses de maior pluviosidade, com decréscimo da mesma.

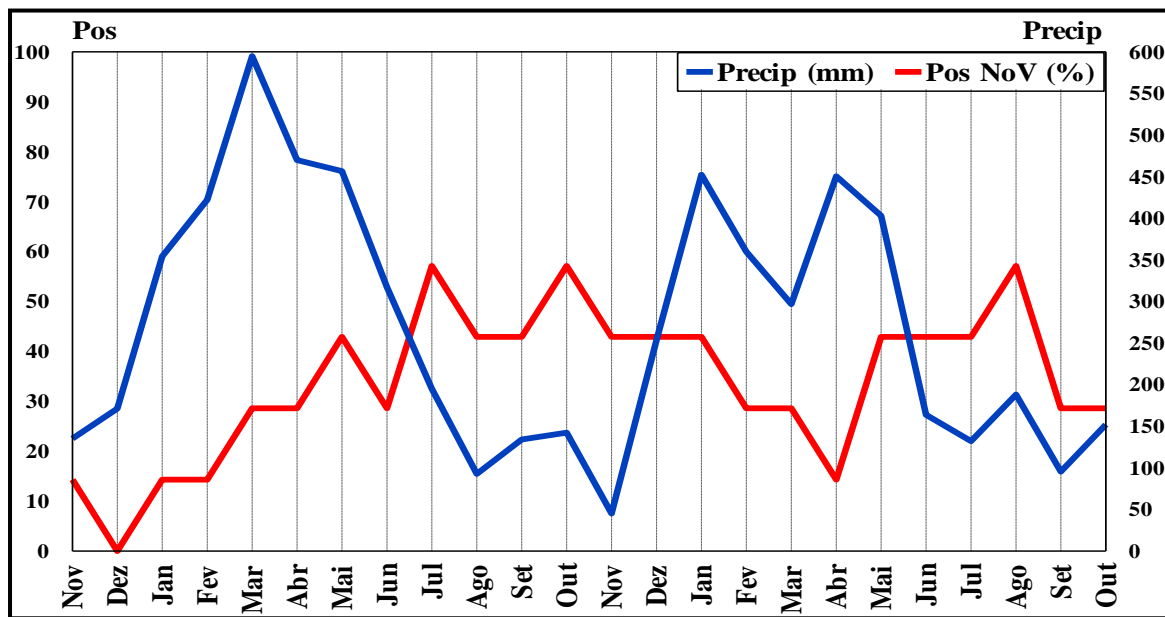


Figura 16. Precipitação e positividade para NoV, no período de novembro de 2008 a outubro de 2010. Precip: precipitação, Pos: positividade.

7. DISCUSSÃO

O NoV possui características de um agente infeccioso ideal o que o torna um patógeno altamente eficaz no estabelecimento da infecção e da doença (HALL, 2012) e que, por isso, é atualmente considerado o principal causador de surtos de gastroenterite aguda em todo o mundo, como também está associado a casos esporádicos (MARSHALL & BRUGGINK, 2011).

Esse “sucesso” se deve, dentre outros fatores, a eficácia com que esse vírus é propagado, pois é altamente estável, resistindo a processos químicos de desinfecção e persistindo por longos períodos no ambiente (HALL, 2012). Nesse sentido, a falta de intervenções em saneamento, higiene e abastecimento de água com qualidade e microbiologicamente segura alertam para a ocorrência da doença diarreica na comunidade (FEWTRELL *et al.*, 2005), pois a água atua como um importante veículo na disseminação de prováveis agentes etiológicos dessa doença, incluindo NoV.

O presente estudo avaliou águas superficiais (baía, rio, igarapé, mananciais), esgoto não tratado e água tratada coletadas na região metropolitana de Belém-PA quanto à presença do genoma viral de NoV, obtendo-se 33,9% (57/168) de positividade, utilizando as técnicas de semi *nested* RT-PCR e/ou TaqMan® PCR em tempo real.

Estudos semelhantes desenvolvidos em outras cidades brasileiras também já revelaram a circulação de NoV, entretanto em percentuais inferiores ao obtido em Belém (5,8 em Manaus; 18,8 no Rio de Janeiro; 23,0 em Florianópolis) analisando amostras de águas superficiais de igarapés (MIAGOSTOVICH *et al.*, 2008), lagoa destinada a recreação (VIEIRA *et al.*, 2012), mar, além de água e esgoto após tratamento (VICTORIA *et al.*, 2010a). Em outros países, como no Japão, no entanto, se constata percentuais superiores ao de Belém, variando de 50% (KITAJIMA *et al.*, 2010) a 63% (KISHIDA *et al.*, 2012) em água de rio, enquanto nos EUA foi de 8,3% em água estuarina (GENTRY *et al.*, 2009), cerca de quatro vezes menor ao encontrado no presente estudo.

A alta positividade (79,2%) encontrada na EEE-UNA já era esperada por se tratar de amostras de esgoto que não recebem qualquer tratamento de desinfecção. Esse achado é preocupante, pois somente 8% dos efluentes oriundos dos 20 bairros atendidos por essa estação são tratados antes de serem lançados no corpo receptor (Baía do Guajará) na forma *in natura*.

No igarapé Tucunduba os NoV também foram recuperados em percentual relativamente alto (66,7%), que confirma a natureza impactada desse local, principalmente pelo lançamento indiscriminado de resíduos oriundos de esgoto doméstico podendo conter fezes contaminadas. Esses dados nos alerta para a falta de políticas públicas que visem diminuir a degradação que esses corpos hídricos vêm sofrendo.

A baixa positividade para NoV no Porto do Açaí (25%) e no Ver-o-Peso (20,8%) são bastante intrigantes, uma vez que são ambientes aquáticos impactados, onde se observa o lançamento de grande quantidade de resíduos os quais são produzidos principalmente durante as atividades comerciais lá desenvolvidas. Essas águas são consideradas do tipo brancas (DA SILVA, 2006) onde se observa riqueza de cátions (cálcio, potássio, sódio, magnésio, etc.) que contribuem para proteção da partícula contra a inativação do calor (GERBA, 2007). Entretanto, é provável que a intensa hidrodinâmica peculiar desses ecossistemas aquáticos aliada às fortes correntes e marés possa ter facilitado a diluição dos poluentes e, assim, dificultado a detecção deste patógeno. Outra característica que deve ser levada em consideração na baixa ocorrência de NoV é a alta turbidez encontrada nesses pontos, uma vez que esse parâmetro é determinado pela presença de partículas em suspensão na água, as quais podem ter sido concentradas simultaneamente aos NoV e terem atuado como compostos inibidores (RODRÍGUEZ *et al.*, 2012) nas reações moleculares.

Essa hipótese foi evidenciada em estudo conduzido no México (FÉLIX *et al.*, 2010) com água marinha destinada a recreação, o qual demonstrou que o aumento de uma unidade de turbidez diminui o risco da presença de NoV no tipo de amostra em questão. Já em outra pesquisa realizada no Brasil, na cidade do Rio de Janeiro (VIEIRA *et al.*, 2012) envolvendo uma lagoa, rio e praia, uma possível associação foi mencionada entre turbidez e presença de rotavírus, estando os NoV neste trabalho mais correlacionados com valores de pH.

Os NoV também foram detectados em algumas amostras dos mananciais Bolonha (29,2%) e Água Preta (16,7%), no entanto, o processo de tratamento aplicado na ETA se mostrou bastante eficiente, pois não houve casos positivos para NoV nas águas após tratamento. Embora o presente estudo tenha evidenciado a eficácia de desinfecção, já há relato na literatura de um grande surto de gastroenterite por NoV associado ao consumo de água contaminada (KUKKULA *et al.*, 1999) ocorrido na Finlândia, onde a cepa de NoV GII foi idêntica tanto nos espécimes fecais colhidos dos pacientes, como na água de torneira do

município de Heinavesi, demonstrando que a cloração efetuada não foi suficiente para eliminar os NoV.

Além de apontar a circulação dos NoV nas águas e esgoto de Belém, nossos resultados ainda revelam alto percentual de coexistência entre os genogrupos I e II (20,8%) que são associados com infecção em humanos, principalmente nas amostras oriundas da EEE-UNA e Igarapé Tucunduba. La Rosa *et al.* (2010b) na Itália também observou alta incidência de GI+GII (89,1%) em esgoto bruto utilizando *nested* PCR, além disso GI foi mais prevalente do que GII (4,7% x 3,1%), o que também ocorreu em Belém e em outra pesquisa desenvolvida no Sul do Brasil, na cidade de Florianópolis (MORESCO *et al.*, 2012) analisando águas costeiras por PCR quantitativo em tempo real (qPCR).

Avaliando algumas pesquisas realizadas no ambiente pode-se observar como é comum tanto nos ambientes aquáticos (KITAJIMA *et al.*, 2010; MORESCO *et al.*, 2012) como em esgoto (IWAI *et al.*, 2009; LA ROSA *et al.*, 2010b; KITAJIMA *et al.*, 2012) a detecção de GI em percentuais iguais ou superiores a GII. Isto difere dos achados clínicos relatados na literatura, em que GII é mais comumente encontrado e intimamente associado a casos esporádicos e surtos de gastroenterite (GLASS *et al.*, 2009), sendo GI de baixa prevalência. Na Austrália, por exemplo, apenas 4,3% dos surtos ocorridos nos anos de 2002 a 2010 foram ocasionados por GI, enquanto GII foi responsável por 95,2% dos mesmos, e GI+GII corresponde a uma pequena parcela equivalente a 0,5% (BRUGGINK *et al.*, 2012). Mesmo que GII seja a principal causa de infecção por NoV, surtos associados com a via hídrica são geralmente atribuídos à cepas GI (MATTHEWS *et al.*, 2012).

Siqueira *et al.* (2011, 2013), analisando casos de crianças hospitalizadas com gastroenterite em Belém no período de maio/2008 a abril/2010, demonstrou que todas as amostras que foram caracterizadas pertenciam ao genogrupo II. Porém o GI já foi detectado em estudos conduzidos nos municípios de Belém em 2003 (ARAGÃO *et al.*, 2010) e Ananindeua em 2009 (ARAGÃO *et al.*, 2013), sendo o primeiro durante uma vigilância para rotavírus do grupo A em episódios graves de diarreia aguda e, o segundo, em amostras fecais provenientes de uma comunidade semi-fechada, de remanescentes de afro descendentes (Quilombola).

Assim, a detecção nas amostras ambientais não apenas de GII, mas também de GI demonstra que este último tem circulado na comunidade em Belém, visto que este genogrupo inclui apenas cepas que infectam humanos (CENTRO DE CONTROLE E PREVENÇÃO DE DOENÇAS, 2011). Essa detecção expressiva no ambiente de GI sugere que o mesmo esteja

associado com infecções mais brandas ou até mesmo assintomáticas, o que subestima o real impacto deste genótipo nas infecções por NoV, já que GII é o mais frequente em casos (ARAGÃO *et al.*, 2010; FIORETTI *et al.*, 2011; SIQUEIRA *et al.*, 2013) e surtos (MATTHEWS *et al.*, 2012) de gastroenterite.

Comparando os resultados obtidos nas duas metodologias de detecção molecular não houve muita diferença com relação ao número de amostras positivas para NoV por semi *nested* (n=45) e TaqMan® PCR em tempo real (n=46) nas amostras ambientais analisadas. Contudo, outras pesquisas apontam recuperação de NoV em percentuais mais elevados qPCR comparado com os resultados obtidos por PCR qualitativa. Victoria *et al.* (2010b) detectaram NoV em 29% das amostras de influente/efluente por semi *nested*, elevando-se para 58% quando do uso da qPCR. Esse aumento perceptível já foi observado também na detecção do vírus da hepatite A em amostras de água, nas quais De Paula *et al.* (2007) verificou um elevado percentual de positividade pelo qPCR (92%) em contrapartida ao uso de *nested* RT-PCR (23%).

Os genótipos de GI e GII mais detectados nas amostras ambientais de Belém foram GI.8 (n=8) e GII.4 (n=12), respectivamente. O genótipo GI.8 já foi associado à gastroenterite entre crianças hospitalizadas e atendidas em ambulatório no Paraguai (GALEANO *et al.*, 2013), bem como em um surto na Austrália em uma unidade de saúde (BRUGGINK *et al.*, 2012). No Brasil esta cepa foi primeiramente encontrada em um caso esporádico ocorrido em 1995 em uma creche no Rio de Janeiro (FERREIRA *et al.*, 2012b). A ocorrência do genótipo GI.4 já foi relatada no Brasil, na cidade de Belém-PA, (ARAGÃO *et al.*, 2010), como GI.1 e GI.4 no estado do Espírito Santo (VICENTINI *et al.*, 2013), ambos em casos clínicos. Já em outros estudos voltados à virologia ambiental estes genótipos já foram detectados no Japão, em amostras de esgoto (KITAJIMA *et al.*, 2012) e rio (KITAJIMA *et al.*, 2010). De acordo com nosso levantamento bibliográfico esta é a primeira descrição de GI.1 e GI.8 a partir de amostras ambientais no Brasil.

A cepa GII.4 foi a mais detectada nos ambientes aquáticos e esgoto de Belém. De fato esse genótipo é o mais associado a infecção em humanos de acordo com o relatado na literatura no Brasil (FIORETTI *et al.*, 2011; SIQUEIRA *et al.*, 2011, 2013; ARAGÃO *et al.*, 2010, 2013; VICENTINI *et al.*, 2013) e no mundo, sendo responsável por 43,7% dos casos esporádicos e 85,8% dos surtos (BULL *et al.*, 2006).

O fato pelo qual NoV GII.4 ainda se mantém como o genótipo dominante entre os casos e surtos de gastroenterite pode estar relacionado com a frequência com que esses vírus

sofrem mudanças genéticas, principalmente mutação e recombinação (MARSHALL & BRUGGINK, 2011), as quais culminam com o surgimento de novas formas, denominadas “variantes” (BULL *et al.*, 2006; SIEBENGA *et al.*, 2009), a exemplo da cepa NoV GII.4 variante Sidney 2012 (VAN BEEK *et al.*, 2013), a qual foi recentemente associada à alta incidência nos casos ou surtos em diversos países, como no Brasil (SILVA *et al.*, 2013), Itália (GIAMMANCO *et al.*, 2013), Dinamarca (FONAGER *et al.*, 2013), Inglaterra (ALLEN *et al.*, 2014) dentre outros.

Uma amostra do lago Bolonha obtida em maio/2009 mostrou uma grande semelhança nucleotídica e aminoacídica em relação à GII.4 variante Sidney 2012, o que indicaria que a mesma já estaria circulando nas águas antes de acometer humanos. Deste modo, foi testada outra região do genoma, denominada subdomínio P2 da proteína VP1 do capsídeo viral, onde ocorre a maioria das mutações entre os genótipos (VEGA *et al.*, 2011), sendo dessa forma uma região bastante variável, entretanto os produtos amplificados obtidos não apresentaram boa qualidade, sendo impossível completar a análise.

Além de GII.4, os genótipos GII.6 (13,6%), GII.9 (9,1%), GII.12 e GII.14 (4,5%) também foram observados, porém em menor incidência. GII.6 foi detectado no igarapé Tucunduba em 2009 e na EEE-UNA em 2010 e o mesmo foi descrito em fezes de humanos no município de Ananindeua-PA em 2008 (ARAGÃO *et al.*, 2013) assim como em outros locais do país, como Rio de Janeiro (FERREIRA *et al.*, 2012b) e Espírito Santo (VICENTINI *et al.*, 2013) em amostras clínicas e, no Japão, em esgoto (KITAJIMA *et al.*, 2012) e rio (KITAJIMA *et al.*, 2010).

No presente estudo, a circulação de GII.12 ocorreu em uma amostra de esgoto em setembro de 2009, sendo detectada também no mesmo ano em Sergipe, Minas Gerais e Rio Grande do Sul em espécimes fecais provenientes de casos ou surtos de gastroenterite aguda, de acordo com estudo de Fioretti *et al.* (2011) sobre a diversidade genética de NoV no Brasil. O genótipo GII.14 encontrado no igarapé Tucunduba em julho de 2010 já foi responsável por um surto nosocomial em hospital do Rio de Janeiro no ano de 2007 (FERREIRA *et al.*, 2010).

O NoV foi detectado em 35,4% (34/96) das amostras que também apresentaram concentração de coliformes termotolerantes maior do que o estabelecido pela legislação vigente, não havendo correlação entre detecção de NoV e quantificação de coliformes nas amostras provenientes dos mananciais Bolonha e Água Preta. Ao avaliar correlação entre quantificação de *Escherichia coli* e detecção de NoV, Vieira *et al.* (2012) observaram distribuição homogênea entre esses dois parâmetros não sendo possível estabelecer se houve

uma associação positiva ou negativa entre eles. Moresco *et al.* (2012) também não evidenciaram correlação entre vírus e coliformes fecais, esclarecendo a importância da inclusão da análise virológica na avaliação da qualidade da água, principalmente naquelas utilizadas para recreação e cultura de moluscos.

Não foi possível verificar nenhuma interferência dos parâmetros físico-químicos com relação à presença ou ausência de NoV nos locais estudados, com exceção do Porto do Açai e Ver-o-Peso como já mencionado anteriormente.

Pela análise dos parâmetros climáticos foi observado que houve relação negativa entre precipitação e presença de NoV, ou seja, no período caracterizado como mais chuvoso (dezembro a junho) há um decréscimo na positividade para esse agente nas amostras ambientais, o qual só retorna a ascender quando inicia a temporada de menor índice pluviométrico. Em Belém, a forte intensidade de chuvas provoca a subida das águas que banham a região, gerando maior diluição nesses ambientes aquáticos. Dessa forma é possível supor que esse fator tenha influenciado diretamente na diminuição da positividade para NoV observada nos meses em que há maior índice pluviométrico, ocorrendo claro aumento na presença desse vírus justamente quando as chuvas diminuem de intensidade.

Os resultados obtidos no presente estudo revelaram pela primeira vez a circulação relativamente alta de NoV nas águas e esgoto de Belém. Embora esse agente possua natureza fastidiosa e dessa forma não seja possível comprovar sua viabilidade e infectividade nas amostras analisadas, a detecção do genoma viral nos ecossistemas aquáticos estudados demonstra a existência de contaminação fecal nesses locais, os quais também podem conter outros patógenos humanos, como bactérias, protozoários e helmintos, representando assim um risco para a saúde humana caso haja contato e/ou consumo dessas águas.

Sabendo da importância da água como um bem indispensável para a manutenção da vida no planeta, torna-se extremamente essencial o estabelecimento de políticas que visem à promoção de saúde ambiental, por meio de intervenções em saneamento e acesso a água tratada, os quais terão impactos positivos no sentido de que sociedade terá mais qualidade de vida, diminuindo não somente os gastos com saúde como também a degradação do ambiente.

8. CONCLUSÕES

- Norovírus dos genogrupos I e II foram detectados na cidade de Belém em percentuais relativamente altos;
- Os locais mais contaminados por norovírus foram o Igarapé Tucunduba e a EEE-UNA. Esse vírus também foi detectado nos demais pontos de amostragem, porém em menor incidência, com exceção da ETA-Bolonha onde não houve amostras positivas;
- O semi *nested* RT-PCR e o TaqMan® PCR em tempo real no presente estudo se mostraram bons métodos de detecção molecular de norovírus a partir de amostras ambientais, com boa concordância de resultados entre essas metodologias (>80%);
- Todos os genótipos de norovírus GI e GII detectados nas águas e esgoto de Belém já foram descritos em associação à casos clínicos, seja no Brasil ou em outros países;
- Nas amostras oriundas dos mananciais Bolonha e Água Preta não houve relação de dependência entre contaminação por norovírus e concentração de coliformes termotolerantes acima do recomendado pela legislação;
- A intensa hidrodinâmica peculiar do Porto do Açaí e Ver-o-Peso parece ter afetado a detecção de norovírus nas amostras provenientes desses locais;
- No período de menor pluviosidade na cidade de Belém (julho a novembro) observou-se aumento na positividade para norovírus, a qual diminui notavelmente durante o período de maior precipitação (dezembro a junho);
- Este foi um estudo pioneiro na detecção de norovírus na cidade de Belém, e os resultados obtidos demonstram que as águas de Belém sofrem com o despejo de efluentes contaminados com esse patógeno. Mais pesquisas são necessárias no sentido de monitorar a presença de norovírus, principalmente nas águas destinadas a consumo humano, como as do Bolonha e Água Preta e da ETA-Bolonha.

9. PERSPECTIVAS

- Iniciar a pesquisa do genogrupo IV de norovírus que também está associado com infecção em humanos em outros pontos de amostragem;
- Clonar a amostra proveniente do lago Bolonha (maio/2009) que mostrou similaridade com a variante GII.4 Sidney 2012, no sentido de obter produto com qualidade satisfatória que permita uma nova análise pela região P2 da proteína capsial VP1 utilizada para determinar variantes específicas;
- Realizar mais análises nas amostras que apresentaram divergências, quando de sua caracterização;
- Tentar estabelecer outros métodos de concentração de amostras ambientais, como a floculação com leite desnatado.

REFERÊNCIAS

- ALBINANA-GIMENEZ, N.; CLEMENTE-CASARES, P.; CALGUA, B.; HUGUET, J. M.; COURTOIS, S.; GIRONES, R. Comparison of methods for concentrating human adenoviruses, polyomavirus JC and noroviruses in source Waters and drinking water using quantitative PCR. **Journal of Virological Methods**, v. 158, p. 104-109, 2009.
- ALLEN, D. J.; ADAMS, N. L.; ALADIN, F.; HARRIS, J. P.; BROWN, D. W. G. Emergence of the GII-4 Norovirus Sydney2012 Strain in England, Winter 2012–2013. **Plos One**, v. 9, n. 2, e88978. doi:10.1371/journal.pone.0088978, 2014.
- ANDERSON, A. D.; GARRETT, V. D.; SOBEL, J.; MONROE, S. S.; FANKHAUSER, R. L.; SCHWAB, K. J.; BRESEE, J. S.; MEAD, P. S.; HIGGINS, C.; CAMPANA, J.; GLASS, R. I.; OUTBREAK INVESTIGATION TEAM. Multistate outbreak of Norwalk-like virus gastroenteritis associated with a common caterer. **American Journal of Epidemiology**, v. 154, p. 1013-1019, 2001.
- ARAGÃO, G. C.; OLIVEIRA, D. S.; SANTOS, M. C.; MASCARENHAS, J. D. P.; OLIVEIRA, C. S.; LINHARES, A. C.; GABBAY, Y. B. Caracterização molecular de norovírus, sapovírus e astrovírus em crianças com gastroenterite aguda em Belém, Pará, Brasil. **Rev Pan-Amazônica de Saúde**, v. 1, n. 1, p.149-158, 2010.
- ARAGÃO, G. C.; MASCARENHAS, J. D. P.; KAIANO, J. H. L.; LUCENA, M. S. S.; SIQUEIRA, J. A. M.; FUMIAN, T. M.; HERNANDEZ, J. M.; OLIVEIRA, C. S. O.; OLIVERIA, D. S.; ARAÚJO, E. C.; SOARES, L. S.; LINHARES, A. C.; GABBAY, Y. B. Norovirus diversity in diarrheic children from na african-descendant settlement in Belém, Northern Brazil. **Plos One**, v. 8, n. 2, 2013.
- ARIAS, A., EMMOTT, E., VASHIST, S., GOODFELLOW, I. Progress towards the prevention and treatment of norovirus infections. **Future Microbiology**, v. 8, n. 11, p. 1475-1487, 2013.
- ASSOCIAÇÃO AMERICANA DE SAÚDE PÚBLICA. APHA (AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION). Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 20^aed. Washington, D.C., EUA, 1998.
- ATMAR, R. L.; ESTES, M. K. Diagnosis of noncultivable gastroenteritis viruses, the human caliciviruses. **Clinical Microbioloy Reviews**, v. 14, n. 1, p. 15-37, 2001.
- ATMAR, R. L.; BERNSTEIN, D. I.; HARRO, C. D.; AL-IBRAHIM, M. S.; CHEN, W. H.; FERREIRA, J.; ESTES, M. K.; GRAHAM, D. Y.; OPEKUN, A. R.; RICHARDSON, C.; MENDELMAN, P. M. Norovirus vaccine against experimental human Norwalk Virus illness. **The New England Journal of Medicine**, v. 365, p. 2178-2187, 2011.
- ATMAR, R. L.; ESTES, M. K. Norovirus vaccine development: next steps. **Expert Reviews Vaccines**, v. 11, n. 9, p. 1023-1025, 2012.
- AYRES, M., AYRES JR, M., AYRES, D.L., dos SANTOS, A.S. **BioEstat 5.0: Aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas**. 5ed. Belém, Instituto de Desenvolvimento Sustentável Mamirauá – IDSM/MCT/CNPq. 2007. 364pp.

BARTRAM, J.; CAIRNCROSS, S. Hygiene, sanitation and water: forgotten foundations of health. **Plos Medicine**, v. 7, n. 11, p. 1-9, 2010.

BEURET, C. Simultaneous detection of enteric viruses by multiplex real-time RT-PCR. **Journal of Virological Methods**, v. 115, p. 1-8, 2004.

BOOM, R.; SOL, C. J. A.; SALIMANS, M. M. M.; JANSEN, C. L.; WERTHEIM-VAN DILLEN, P. M. E.; VAN DER NOORDAA, J. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 28, p. 495-503. 1990.

BORGES, A. M. T.; CARDOSO, D. D. P. Calicivírus humanos. **Revista de Patologia Tropical**, v. 34, n. 1, p. 17-26, 2005.

BOSCH, A. Human enteric viruses in the water environment: a minireview. **Internatl. Microbiol.**, Espanha, v. 1, p. 191-196, 1998.

BOXMAN, I. L. A.; TILBURG, J. J. H. C.; TE LOEKE, N. A. J. M.; VENNEMA, H.; JONKER, K.; DE BOER, E. KOOPMANS, M. Detection of noroviruses in shellfish in the Netherlands. **International Journal of Food Microbiology**, v. 108, p. 391-396, 2006.

BRASIL. Conselho Nacional de Meio Ambiente. Resolução nº 357, de 17 de março de 2005. Brasília, 2005.

BRASIL. **Água doce: água e consumo consciente**. 2010. Disponível em: <http://www.brasil.gov.br/inovacao/Cases/agua-doce/agua-e-consumo-consciente>. Acesso em: 25 fev. 2013.

BRASIL, Ministério da Saúde. Portaria nº 2.914, de 12 de dezembro de 2011. Brasília, 2011.

BRUGGINK, L. D.; OLUWATOYIN, O.; SAMEER, R.; WITLOX, K. J.; MARSHALL, J. A. Molecular and epidemiological features of gastroenteritis outbreaks involving genogroup I norovirus in Victoria, Australia, 2002-2010. **Journal of Medicine Virology**, v. 84, p. 1437-1448, 2012.

BULL, R. A.; TU, E. T. V.; McIVER, C. J.; RAWLINSON, W. D.; WHITE, P. A. Emergence of a new norovirus genotype II.4 variant associated with global outbreaks of gastroenteritis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, n. 2, p. 327-333, 2006.

CALGUA, B.; MENGEWEIN, A.; GRUNERT, A.; BOFILL-MAS, S.; CLEMENTE-CASARES, P.; HUNDESA, A.; WYN-JONES, A. P.; LÓPEZ-PILA, J. M.; GIRONES, R. Development and application of a one-step low cost procedure to concentrate viruses from seawater samples. **Journal of Virological Methods**, v. 153, n. 2, p. 79-83, 2008.

CENTRO DE CONTROLE E PREVENÇÃO DE DOENÇAS. Updated norovirus outbreak management and disease prevention guidelines. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, v. 60, n. 3, p. 1-15, 2011.

CENTRO DE CONTROLE E PREVENÇÃO DE DOENÇAS. 2013. **Norovirus Treatment**. Disponível em: <http://www.cdc.gov/norovirus/about/treatment.html>. Acesso em: 10 mai. 2013.

CHEONG, S.; LEE, C.; SONG, S. W.; CHOI, W. C.; LEE, C. H.; KIM, S. J. Enteric viruses in raw vegetables and groundwater used for irrigation in South Korea. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, p. 7745-7751, 2009.

CHRISTOVÃO, D. A.; CANDEIAS, J. A. N.; IARIA, S. T. Condições sanitárias das águas de irrigação de hortas do município de São Paulo. II – Isolamento de vírus entéricos. **Revista de Saúde Pública**, v. 1, n. 1, p. 12-17, 1967.

DA SILVA, D. F. **Utilização de indicadores biológicos na avaliação da qualidade da água da Baía do Guajará e do Rio Guamá (Belém-Pará)**. 2006. 72 f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Universidade Federal do Pará, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Belém, 2006.

DE PAULA, V. S.; DINIZ-MENDES, L.; VILLAR, L. M.; LUZ, S. L.; SILVA, L. A.; JESUS, M. S.; DA SILVA, N. M.; GASPAS, A. M. Hepatitis A virus in environmental water samples from the Amazon Basin. **Water Research**, v. 41, p. 1196-1176, 2007.

FANG, H.; TAN, M.; XIA, M.; WANG, L.; JIANG, X. Norovirus p particle efficiently elicits innate, humoral and cellular immunity. **Plos One**, v. 8, n. 4, p. 1-10, 2013

FANKHAUSER, R. L.; MONROE, S. S.; NOEL, J. S.; HUMPHREY, C. D.; BRESEE, J. S.; PARASHAR, U. D.; ANDO, T.; GLASS, R. I. Epidemiologic and molecular trends of “Norwalk-like viruses” associated with outbreaks of gastroenteritis in the United States. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 186, p. 1-7, 2002.

FÉLIX, J. L.; FERNANDEZ, Y. C.; VELARDE-FÉLIX, J. S.; TORRES, B. V.; CHÁIDEZ, C. Detection and phylogenetic analysis of hepatitis A virus and norovirus in marine recreational Waters of Mexico. **Journal of Water and Health**, doi 10.2166/wh.2009.114, 2010.

FERREIRA, M. S. R.; VICTORIA, M.; CARVALHO-COSTA, F. A.; VIEIRA, C. B.; XAVIER, M. P. T. P.; FIORETTI, J. M.; ANDRADE, J.; VOLOTÃO, E. M.; ROCHA, M.; LEITE, J. P. G.; MIAGOSTOVICH, M. P. Surveillance of norovirus infections in the state of Rio de Janeiro, Brazil 2005-2008. **Journal of Medical Virology**, v. 82, p. 1442-1448, 2010.

FERREIRA, M. S. R.; GARCIA, R. C. C.; XAVIER, M. P. T. P.; RIBEIRO, R. L.; ASSIS, R. M.; MOTA, M. C. M. S.; LEITE, J. P. G.; MIAGOSTOVICH, M. P.; OLIVEIRA, S. A. Genotyping of gastroenteric viruses in hospitalised children: first report of norovirus GII.21 in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 107, n. 8, p. 1064-1067, 2012a.

FERREIRA, M. S. R.; XAVIER, M. P. T. P.; TINGA, A. C. C.; ROSE, T. L.; FUMIAN, T. M.; FIALHO, A. M.; ASSIS, R. M.; COSTA, F. A. C.; OLIVEIRA, S. A.; LEITE, J. P. G.; MIAGOSTOVICH, M. P. Assessment of gastroenteritis viruses frequency in a children’s day care center in Rio de Janeiro, Brazil: a fifteen years study (1994-2008). **Plos One**, v. 7, n. 3, e33754. doi:10.1371/journal.pone.0033754, 2012b.

FEWTRELL, L.; KAUFMANN, R. B.; KAY, D.; ENANORIA, W.; HALLER, L.; COLFORD JR, J. M. Water, sanitation, and hygiene interventions to reduce diarrhoea in less developed countries: a systematic review and meta-analysis. **Lancet Infectious Disease**, v. 5, p. 42-52, 2005.

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

FONAGER, J.; HINDBAEK, L. S.; FISCHER, T. K. Rapid emergence and antigenic diversification of the norovirus 2012 Sydney variant in Denmark, October to December, 2012. **Euro Surveillance**, v. 18, n. 9, pii=20413, 2013.

FONG T.; LIPP, E. K. Enteric viruses of humans and animals in aquatic environments: health risks, detection, and potential water quality assessment tools. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, Washington, v. 69, n. 2, p. 357-371, 2005.

FUJIOKA, R. S.; YONEYAMA, B. S. Sunlight inactivation of human enteric viruses and fecal bacteria. **Water Science and Technology**, v. 46, p. 291-295, 2002.

GALEANO, M. E.; MARTINEZ, M.; AMARILLA, A. A.; RUSSOMANDO, G.; MIAGOSTOVICH, M. P. ; PARRAB, G. I.; LEITE, J. P. Molecular epidemiology of norovirus strains in Paraguayan children during 2004-2005. Description of a possible new GII.4 cluster. **Journal of Clinical Virology**, v. 58, p. 378-384, 2013.

GENTRY, J.; VINJÉ, J.; LIPP, E. K. A rapid and efficient method for quantification of genogroups I and II norovirus from oysters and application in other complex environmental samples. **Journal of Virological Methods**, v. 156, p. 59-65, 2009.

GENTRY, J.; VINJÉ, J.; GUADAGNOLI, D.; LIPP, E. K. Norovirus distribution within and estuarine environment. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, n. 17, p. 5474-5480, 2009.

GERBA, C. P. Virus occurrence and survival in the environmental waters. In: BOSCH, A.; ZUCKERMAN, A. J.; MUSHAHWAR, I. K. **Human viruses in water**. Oxford: Elsevier, 2007, p. 91-108.

GIAMMANCO, G. M.; DE GRAZIA, S.; TUMMOLO, F.; BONURA, F.; CALDERARO, A.; BUONAVOGLIA, A.; MARTELLA, V.; MEDICI, M. C. Norovirus GII.4/Sydney/2012 in Italy, winter 2012-2013. **Emerging Infectious Diseases**, v. 19, n. 8, 2013.

GILL, R. & HODGES, K. Infectious diarrhea cellular and molecular mechanisms. **Gut Microbes**, v. 1, p. 4-21. 2010.

GLASS, R. I.; PARASHAR, U. D.; ESTES, M. K. Norovirus gastroenteritis. **The New England Journal of Medicine**, v. 361, p. 1176-1185. 2009.

GREEN, J.; HENSHILWOOD, K.; GALLIMORE, C. I.; BROWN, D. W. G.; LEES, D. N. A nested reverse transcriptase PCR assay for detection of small round-structured viruses in environmentally contaminated molluscan shellfish. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, n. 3, p.858-863, 1998.

GREEN, K. Y. Caliciviridae: The Noroviruses. In: KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M. **Fields Virology**. 5^a ed. Lippincott Williams & Williams, 2007, p. 949-979.

GRINSTEIN, S.; MELNICK, J. L.; WALLIS, C. Virus isolations from sewage and from a stream receiving effluents of sewage treatment plants. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 42, p. 291-296, 1970.

GURJÃO, T. C. M.; DE PAULA, V. S.; TEIXEIRA, D. M.; SOARES, L. S.; MASCARENHAS, J. D. P.; GABBAY, Y. B.; SÁ, L. L. C. Detection and phylogenetical analysis of Hepatitis A Virus in superficial Waters and sewage from Belém, Pará, Brazil. In: I LATIN AMERICA SYMPOSIUM OF ENVIRONMENTAL VIROLOGY, 2010. Rio de Janeiro. **Anais do I Latin America Symposium of Environmental Virology**, 2010. p. 49.

HALL, A. Noroviruses: the perfect human pathogens?. **The Journal of Infectious Diseases**, v.205, p. 1622-1624, 2012.

HARDY, M. E. Norovirus protein structure and function. **FEMS Microbiology Letters**, v. 253, p. 1-8, 2005.

HOA TRAN, T. N.; TRAINOR, E.; NAKAGOMI, T.; CUNLIFFE, N. A.; NAKAGOMI, O. Molecular epidemiology of noroviruses associated with acute sporadic gastroenteritis in children: global distribution of genogroups, genotypes and GII.4 variants. **Journal of Clinical Virology**, v. 56, n. 3, p. 185-193, 2013.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. 2011. **Atlas de saneamento 2011**. Disponível em: http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/atlas_saneamento/default_zip.shtm. Acesso em: 03 fev. 2013.

IIZUKA, S.; OKA, T.; TABARA, K.; OMURA, T.; KATAYAMA, K.; TAKEDA, N.; NODA, M. Detection of Sapoviruses and Noroviruses in an outbreak of gastroenteritis linked genetically to shellfish. **Journal of Medical Virology**, v. 82, n. 7, p. 1247-1254, 2010.

IWAI, M.; HASEGAWA, S.; OBARA, M.; NAKAMURA, K.; HORIMOTO, E.; TAKIZAWA, T.; KURATA, T.; SOGEN, S.; SHIRAKI, K. Continuous presence of noroviruses and sapoviruses in raw sewage reflects infections among inhabitants of Toyama, Japan (2006 to 2008). **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, n. 5, 2009.

JIANG, X.; GRAHAM, D.; WANG, K.; ESTES, M. K. Norwalk vírus genome cloning and characterization. **Science**, v. 250, p. 1580-1583, 1990.

JIANG, X.; WANG, J.; ESTES, M. K. Expression, self-assembly, and antigenicity of the Norwalk virus capsid protein. **Journal of Virology**, v. 66, n. 11, p. 6557-6532, 1992.

JIANG, X.; WANG, J.; ESTES, M. K. Characterization of SRSVs using RT-PCR and a new antigen ELISA. **Archives of Virology**, v. 140, n. 2, p. 363-374, 1995.

JIANG, X.; HUANG, P. W.; ZHONG, W. M.; FARKAS, T.; CUBITT, D. W.; MATSON, D. O. Design and evaluation of a primer pair that detects both Norwalk- and Sapporo-like caliciviruses by RT-PCR. **Journal of Virological Methods**, v. 83, p. 145-154, 1999.

JOTHIKUMAR, N.; KANG, G.; HILL, V. R. Broadly reactive TaqMan assay for real-time RT-PCR detection of rotavirus in clinical and environmental samples. **Journal of Virological Methods**, v. 155, p. 126-131, 2009.

KAGEYAMA, T.; KOJIMA, S.; SHINOHARA, M.; UCHIDA, K.; FUKUSHI, S.; HOSHINO, F.; TAKEDA, N.; KATAYAMA, K. Broadly reactive and highly sensitive assay for Norwalk-like viruses based on real-time quantitative reverse transcription-PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, p. 1548-1557, 2003.

KAPIKIAN, A. Z.; WYATT, R. G.; DOLIN, R.; THORNHILL, T. S.; KALICA, A. R.; CHANOCK, R. M. Visualization by immune electron microscopy of a 27-nm particle associated with acute infectious nonbacterial gastroenteritis. **Journal of Virology**, v. 10., n. 5, p. 1075-1081, 1972.

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

KELLY, S. M. Detection and occurrence of Coxsackie viruses in sewage. **American Journal of Public Health**, v. 43, p. 1532-1538, 1953.

KELLY, S.; WINSSER, J.; WINKELSTEIN, W. Poliomyelitis and other enteric viruses in sewage. **Poliomyelitis**, v. 47, p. 72-77, 1957.

KELLY, S.; SANDERSON, W. The effect of chlorine in water on enteric viruses. **American Journal of Public Health**, v. 48, n. 10, p. 1323-1334, 1958.

KELLY, S.; SANDERSON, W. The effect of chlorine in water on enteric viruses. II. The effect of combined chlorine on Poliomyelitis and Coxsackie viruses. **American Journal of Public Health**, v. 50, n. 1, p. 14-20, 1960.

KITAJIMA, M.; OKA, T.; HARAMORO, E.; TAKEDA, N.; KATAYAMA, K.; KATAYAMA, H. Seasonal distribution and genetic diversity in the Tamagawa river, Japan. **Environmental Science & Technology**, v. 44, n. 18, p. 7116-7122, 2010.

KITAJIMA, M.; HARAMOTO, E.; PHANUWAN, C.; KATAYAMA, H.; FURUMAI, H. Molecular detection and genotyping of human noroviruses in influent and effluent water at a wastewater treatment plant in Japan. **Journal of Applied Microbiology**, v. 112, p. 605-613, 2012.

KISHIDA, N.; MORITA, H.; HARAMOTO, E.; ASAMI, M.; AKIBA, M. One-year weekly survey of noroviruses and enteric adenoviruses in the Tone River water in Tokyo metropolitan area, Japan. **Water Research**, doi:10.1016/j.watres.2012.03.010, p. 2905-2910, 2012.

KOH, S. J.; CHO, H. G.; KIM, B. H.; CHOI, B. Y. An outbreak of gastroenteritis caused by Norovirus-contaminated groundwater at a waterpark in Korea. **Journal of Korean Medical Science**, v. 26, p. 28-32, 2011.

KOJIMA, S.; KAGEYAMA, T.; FUKUSHI, S.; HOSHINO, F. B.; SHINOHARA, M.; UCHIDA, K.; NATORI, K.; TAKEDA, N.; KATAYAMA, K. Genogroup-specific PCR primers for detection of Norwalk-like viruses. **Journal of Virological Methods**, v 100, n. 1-2, p. 107-114, 2002.

KOOPMANS, M. Progress in understanding norovirus epidemiology. **Current Opinion in Infectious Disease**, v. 21, p. 544-552, 2008.

KRONEMAN, A., VENNEMA, H., DEFORCHE, K., AVOORT, H. V., PEÑARANDA, S., OBERSTE, M. S., VINJÉ, J., KOOPMANS, M. An automated genotyping tool for enteroviruses and noroviruses. **Journal of Clinical Virology**, v. 51, n. 2, p.121-125, 2011.

KRONEMAN, A.; VEGA, E.; VENNEMA, H.; VINJÉ, J.; WHITE, P. A.; HANSMAN, G.; GREEN, K.; MARTELLA, V.; KATAYAMA, K.; KOOPMANS, M. Proposal for a unified norovirus nomenclature and genotyping. *Archives of Virology*, DOI 10.1007/s00705-013-1708-5, 2013.

KUKKULA, M.; MAUNULA, L.; SILVENNOINEN, E.; BONSDORFF, C. H. V. Outbreak of viral gastroenteritis due to drinking water contaminated by norwalk-like viruses. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 180, p. 1771-76, 1999.

LA ROSA, G.; FONTANA, S.; DI GRAZIA, A.; IACONELLI, M.; PORSHABAN, M.; MUSCILLO, M. 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**, v. 73, n. 13, p. 4152-4161, 2007.

LA ROSA, G.; POURSHABAN, M.; IACONELLI, M.; MUSCILLO, M. Quantification of norovirus genogroups I and II in environmental and clinical samples using TaqMan real-time RT-PCR. **Food and Environmental Virology**, v. 1, p. 15-22, 2009.

LA ROSA, G.; POURSHABAN, M.; IACONELLI, M.; MUSCILLO, M. Quantitative real-time PCR of enteric viruses in influent and effluent samples from wastewater treatment plants in Italy. **Annali dell'Istituto Superiore di Sanità**, v. 46, p. 266-273, 2010a.

LA ROSA, G.; IACONELLI, M.; POURSHABAN, M.; MUSCILLO, M. Detection and molecular characterization of noroviruses from five sewage treatment plants in central Italy. **Water Research**, v. 44, p. 1777-1784, 2010b.

LECLERC, H.; SCHWARTZBROD, L.; DEI-CAS, E. Microbial agents associated with waterborne diseases. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 28, n. 4, p. 371-409, 2002.

LE GUYADER, F. S.; KROL, J.; AMBERT-BALLAY, K.; RUVOEN-CLOUET, N.; DESAUBLIAUX, B.; PARNAUDEAU, S.; LE SAUX, J. C.; PONGE, A.; POTHIER, P.; ATMAR, R. L.; LE PENDU, J. Comprehensive analysis of a Norovirus-associated gastroenteritis outbreak, from the environment to the consumer. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 48, p. 915-920, 2010.

LEON, R.; MATSUI, S. M.; BARIC, R. S.; HERRMANN, J. E.; BLACKLOW, N. R.; SOBSEY, M. D. Detection of Norwalk virus in stools specimens by reverse transcriptase-

polymerase chain reaction and nonradioactive oligoprobes. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 30, n. 12, p. 3151-3157, 1992.

LEWIS, G.; METCALF, T. G. Polyethylene glycolprecipitation for recovery of pathogenic viruses, including hepatitis A virus and human rotavirus, from oyster, water, and sediment samples. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 54, n. 8, p. 1983-1988, 1988.

LIU, P.; YUEN, Y.; HSIAO, H.; JAYKUS, L.; MOE, C. Effectiveness of Liquid Soap and Hand Sanitizer against Norwalk Virus on Contaminated Hands. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 76, n. 2, p. 394-399, 2010.

LODDER, W.J.; VINJE, J.; VAN DE HEIDE, R.; RODA HUSMAN, A. M.; LEENEN, E. J. T. M.; KOOPMANS, M. P. G. Molecular detection of norwalk-like caliciviruses in sewage. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, n. 12, p. 5624-5627, 1999.

LOGAN, C.; O' LEARY, J. J.; SULLIVAN, N. O. Real-time reverse transcription PCR detection of norovirus, sapovirus and astrovirus as causative agents of acute viral gastroenteritis. **Journal of Virological Methods**, v. 146, p. 36-44, 2007.

LOPMAN, B. .; REACHER, M. H.; VIPOND, I. B.; SARANGI, J.; BROWN, D. W. Clinical manifestation of norovirus gastroenteritis in health care settings. **Clinical Infectious Disease**, v. 39, p. 318-324, 2004.

MACHADO, L. C. G. T.; PEREIRA, J. A. R.; CUNHA, M. V. P. O.; DA SILVA, M. N. A.; DE SOUSA, E. C. M. **Resíduos produzidos na Estação de Tratamento de Água do Bolonha**. 2002. Disponível em: <http://www.bvsde.paho.org/bvsaidis/mexico26/i-019.pdf>
Acesso em: 21 nov. 2011.

MAESTRI, R. P.; NERI, D. L.; TEIXEIRA, D. M.; GURJÃO, T. C. M.; SÁ, L. L. C.; GABBAY, Y. B.; MASCARENHAS, J. D. P. Detection of Rotavirus in water and untreated sewage samples collected in the city of Belém, Pará, Brazil. In: I LATIN AMERICA SYMPOSIUM OF ENVIRONMENTAL VIROLOGY, 2010. Rio de Janeiro. **Anais do I Latin America Symposium of Environmental Virology**, 2010. p. 43.

MARSHALL, J. A.; BRUGGINK, L. D. The dynamics of norovirus outbreak epidemics: recent insights. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 8, p. 1141-1149, 2011.

MATTHEWS, J. E.; DICKEY, B. W.; MILLER, R. D.; FELZER, J. R.; DAWSON, B. P.; LEE, A. S.; ROCKS, J. J.; KIEL, J.; MONTES, J. S.; MOE, C. L.; EISENBERG, J. N. S.; LEON, J. S. Systematic review the epidemiology of published norovirus outbreaks: a review of risk factors associated with attack rate and genogroup. **Epidemiology & Infection**, v. 140, p. 1161-1172, 2012.

MAYO, M. A. A summary of taxonomic changes recently approved by ICTV. **Archives of Virology**, v. 147, n. 8, p. 1655-1663, 2002.

MEHNERT, D. U.; STEWIEN, K. E. Detection and distribution of rotavirus in raw sewage and creeks in Sao Paulo, Brazil. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 59, n. 1, p. 140-143, 1993.

MESQUITA, J. R.; BARCLAY, L.; NASCIMENTO, M. S.; VINJÉ, J. Novel norovirus in dogs with diarrhea. ***Emerging Infectious Disease***, v. 16, n. 6, p. 980-982, 2010.

MIAGOSTOVICH, M. P.; FERREIRA, F. F. M.; GUIMARÃES, F. R.; FUMIAN, T. M.; DINIZ-MENDES, L.; LUZ, S. L. B.; SILVA, L. A.; LEITE, J. P. G. Molecular detection and characterization of gastroenteritis viruses occurring naturally in the stream waters of Manaus, Central Amazônia, Brazil. ***Applied and Environmental Microbiology***, v. 74, n. 2, 2008.

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

MORILLO, S. G.; TIMENETSKY, M. C. S. T. Norovírus: uma visão geral. ***Revista da Associação Médica Brasileira***, v. 57, n. 4, p. 462-467, 2011.

NARKEVICIUTE, I.; TAMUSAUSKAITE, I. Peculiarities of norovirus and rotavirus infections in hospitalized young children. ***Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition***, v. 46, p. 289-292, 2008.

NENONEN, N.; HANNOUN, C.; OLSSON, M. B.; BERGSTROM, T. Molecular analysis of an oyster-related norovirus outbreak. ***Journal of Clinical Virology***, v. 45, p. 105-108, 2009.

ORGANIZAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS. **Alertando para escassez de água doce, ONU pede esforços globais para proteger recursos naturais**. 2013. Disponível em: <http://www.onu.org.br/alertando-para-escassez-de-agua-doce-onu-pede-esforcos-globais-para-proteger-recursos-naturais/>. Acesso em: 12 mai 2014.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. **Burden of disease and cost-effectiveness estimates**. 2004. Disponível em: http://www.who.int/water_sanitation_health/diseases/burden/en/index.html. Acesso em: 30 out. 2011.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. **Diarrhoeal disease**. 2009. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs330/en/index.html>. Acesso em 27 fev. 2013.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. **Water Sanitation Health: water resource quality**. 2013. Disponível em: http://www.who.int/water_sanitation_health/resources/resquality/en/index.html. Acesso em: 14 fev. 2013.

PANG, X. L.; PREIKSAITIS, J. K.; LEE, B. Multiplex real time RT-PCR for the detection and quantitation of norovirus genogroups I and II in patients with acute gastroenteritis. ***Journal of Clinical Virology***, v. 33, p. 168-171, 2005.

PANTOJA FILHO, J. L. R.; ROCHA, E. G.; DA SILVA, V. M.; SOARES, J. M.; PEREIRA, J. A. R. **Elaboração de hidrograma de vazão na Estação Elevatória de Esgoto do UNA, Região Metropolitana de Belém/PA.** s/a. Disponível em: <http://www.bvsde.paho.org/bvsacd/abes23/II-189.pdf> Acesso em 16 nov. 2011.

PATEL, M. M.; HALL, A. J.; VINJÉ, J.; PARASHAR, U. D. Noroviruses: a comprehensive review. **Journal of Clinical Virology**, v. 44, p. 1-8, 2009.

PINTÓ, R. M.; SAIZ, J. C. Enteric hepatitis viruses. In: BOSCH, A.; ZUCKERMAN, A. J.; MUSHAHWAR, I. K. **Human viruses in water.** Oxford: Elsevier, 2007, p. 39-67.

POTASMAN, I.; PAZ, A.; ODEH, M. Infectious outbreaks associated with bivalve shellfish consumption: a worldwide perspective. **Clinical Infectious Diseases**, v. 35, p. 921-928, 2002.

PRADO, T.; SILVA, D. M.; GUILAYN, W. C.; ROSE, T. L.; GASPAR, A. M.; MIAGOSTOVICH, M. P. Quantification and molecular characterization of enteric viruses detected in effluents from two hospital wastewater treatment plants. **Water Research**, v. 45, p. 1287-1297, 2011.

PREFEITURA MUNICIPAL DE BELÉM. **Plano Diretor Participativo.** s/a. Disponível em: <http://www.belem.pa.gov.br> Acesso em: 10 de jun. 2007.

PREFEITURA MUNICIPAL DE BELÉM. **Anuário Estatístico do município de Belém 2010: Demografia e caracterização do território.** 2010. Disponível em: <http://www.belem.pa.gov.br/app/c2ms/v/?id=1&conteudo=2995> Acesso em: 25 set. 2011.

PRÜSS-ÜSTÜN, A.; CORVALÁN, C. **Preventing disease through healthy environments: towards an estimate of the environmental burden of disease.** Organização Mundial da Saúde. 2006. 104 p. Disponível em: http://www.who.int/quantifying_ehimpacts/publications/preventingdisease.pdf. Acesso em: 24 jan. 2013.

QUEIROZ, A. P. S.; SANTOS, F. M.; SASSAROLI, A.; HÁRSI, C. M.; MONEZI, T. A.; MEHNERT, D. U. Electropositive filter membrane as an alternative for the elimination of PCR inhibitors from sewage and water samples. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, n. 10, p. 4614-4618, 2001.

RODRÍGUEZ, R. A.; THIE, L.; GIBBONS, C. D.; SOBSEY, M. D. Reducing the effects of environmental inhibition in quantitative real-time PCR detection of adenovirus and norovirus in recreational seawaters. **Journal of Virological Methods**, v. 181, p. 43-50, 2012.

SÁ, L. L. C.; VALE, E. R.; SANTOS, E. C. O.; DE JESUS, I. M.; MENDONÇA, N. M.; THEOPHILO, N. D.; FERREIRA, F. S. F.; HOFER, E.; LOUREIRO, E. C. B. Vigilância ambiental para cólera na região metropolitana de Belém, Pará, no período de 1999 a 2006. **Caderno de Saúde Coletiva**, v. 15, n. 4, 449-466, 2007.

SAIR, A. I.; D'SOUZA, D. H.; JAYKUS, L. A. Human enteric viruses as causes of foodborne disease. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 1, p. 73-89, 2002.

SCHMID, M.; OEHME, R.; SCHALASTA, G.; BROCKMANN, S.; KIMMIG, P.; ENDERS, G. Fast detection of noroviruses using a real-time PCR assay and automated sample preparation. **BMC Infectious Diseases**, p. 1-8, 2004.

SCHWAB, K. Waterborne gastroenteritis viruses. In: BOSCH, A.; ZUCKERMAN, A. J.; MUSHAWAR, I. K. **Human viruses in water**. Oxford: Elsevier, 2007, p. 27-38.

SECRETARIA DE ESTADO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA E MEIO AMBIENTE (SECTAM). **Parque Estadual do Utinga: estudo ambiental**. Belém: Secretaria de Estado de Ciência Tecnologia e Meio Ambiente. 107 p. Relatório Técnico SOFREL-018/92. 1992

SICKBERT-BENNETT, E. E.; WEBER, D.J.; GERGEN-TEAGUE, M. F.; SOBSEY, M. D.; SAMSA, G. P.; RUTALA, W. A. Comparative efficacy of hand hygiene agents in the reduction of bacteria and viruses. **American Journal of Infection Control**, v. 33, p. 67-77, 2005.

SIEBENGA, J. J.; VENNEMA, H.; ZHENG, D. P.; VINJÉ, J.; LEE, B. E.; PANG, X. L.; HO, E. C. M.; LIM, W.; CHOUDEKAR, A.; BROOR, S.; HALPERIN, T.; RASOOL, N. B.; HEWITT, J.; GREENING, G. E.; JIN, M.; DUAN, Z. J.; LUCERO, Y.; O'RYAN, M.; HOEHNE, M.; SCHREIER, E.; RATCLIFF, R. M.; WHITE, P. A.; IRITANI, N.; REUTER, G.; KOOPMANS, M. Norovirus illness is a global problem: emergence and spread of norovirus GII.4 variants, 2001-2007. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 200, p. 802-812, 2009.

SILVA, H. D.; WOSNJUK, L. A. C.; SANTOS, S. F. O.; VILANOVA-COSTA, C. A. S. T.; PEREIRA, F. C.; SILVEIRA-LACERDA, E. P.; GARCÍAZAPATA, M. T. A.; ANUNCIACÃO, C. E. Molecular detection of adenoviruses in lakes and rivers of Goiânia, Goiás, Brazil. **Food and Environmental Virology**, 2009.

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

SILVA, L. D.; RODRIGUES, E. L.; LUCENA, M. S. S.; LIMA, I. C. G.; OLIVEIRA, D. S.; SOARES, L. S.; MASCARENHAS, J. D. P.; LINHARES, A. C.; GABBAY, Y. B. Detection of the pandemic norovirus variant GII.4 Sydney 2012 in Rio Branco, state of Acre, northern Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, doi: 10.1590/0074-0276130293, p. 1-3, 2013.

SIQUEIRA, J. A. M.; LINHARES, A. C.; OLIVEIRA, D. S.; SOARES, L. S.; LUCENA, M. S. S.; WANZELLER, A. L. M.; MASCARENHAS, J. D. P.; GABBAY, Y. B. Evaluation of third-generation RIDASCREEN enzyme immunoassay for the detection of norovirus antigens in stool samples of hospitalized children in Belém, Pará, Brazil. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 71, p. 391-395, 2011.

SIQUEIRA, J. A. M.; LINHARES, A. C.; CARVALHO, T. C. N.; ARAGÃO, G. C.; OLIVEIRA, D. S.; SANTOS, M. C. S.; SOUSA, M. S.; JUSTINO, M. C. A.; MASCARENHAS, J. D. P.; GABBAY, Y. B. Norovirus infection in children admitted to hospital for acute gastroenteritis in Belém, Pará, Northern Brazil. **Journal of Medical Virology**, v. 85, p. 737-744, 2013.

SMITH, E. M.; GERBA, C. P. Development of a method for detection of human rotavirus in water and sewage. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 43, n. 6, p. 1440-1450, 1982.

SPADA, P. K. P.; TEIXEIRA, D. M.; GURJÃO, T. C. M.; ARAGÃO, G. C.; SIQUEIRA, J. A. M.; SOARES, L. S.; OLIVEIRA, D. S.; MASCARENHAS, J. D. P.; SÁ, L. L. C.; GABBAY, Y. B. Presença de Adenovírus em amostras ambientais coletadas na cidade de Belém-PA, Brasil. In: XLVII CONGRESSO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE MEDICINA TROPICAL, 2011, Natal. **Anais do XLVII Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 2011.

SUFFREDINI, E.; PEPE, T.; VENTRONE, I.; CROCI, L. Norovirus detection in shellfish using two Real-Time RT-PCR. **New Microbiology**, v. 34, p. 9-16, 2011.

TAMURA, K.; STECHER, G.; PETERSON, D.; FILIPSKI, A.; KUMAR, S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics analysis version 6.0. **Molecular Biology and Evolution**, v. 30, p. 2725-2729, 2013.

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

TEIXEIRA, D. M. GURJÃO, T. C. M.; FLECK, E.; DE PAULA, V. S.; SOARES, L. S.; OLIVEIRA, D. S.; LUCENA, M. S. S.; SÁ, L. L. C.; MASCARENHAS, J. D. P.; GABBAY, Y. B. Detection of Norovirus and Astrovirus in surface water and untreated sewage samples collected in the years of 2008 to 2010 in Belém, Pará, Brazil. In: I LATIN AMERICA SYMPOSIUM OF ENVIRONMENTAL VIROLOGY, 2010. Rio de Janeiro. **Anais do I Latin America Symposium of Environmental Virology**, 2010a. p. 61.

TEIXEIRA, D. M.; SPADA, P. K. P.; GURJÃO, T. C. M.; ARAGÃO, G. C.; SIQUEIRA, J. A. M.; CARVALHO, T. C. N.; HERNANDEZ, J. M.; LUCENA, M. S. S.; LIMA, I. C. G.; SÁ, L. L. C.; MASCARENHAS, J. D. P.; GABBAY, Y. B. Detecção de Norovírus, Astrovírus e Adenovírus entéricos em amostras ambientais oriundas de uma estação de esgoto não tratado na cidade de Belém, Estado do Pará, Brasil. In: 1º SIMPÓSIO BRASILEIRO DE SAÚDE AMBIENTAL, 2010, Belém. **Anais do 1º Simpósio Brasileiro de Saúde Ambiental**, 2010b. p. 346.

TOOMEY, J. A.; TAKACS, W. S.; WEAVER, H. M. Isolation of Poliomyelitis virus from creek water by direct transmission to the cotton rat. **Am. J. Dis. Child.**, v. 70, n. 5, p. 293-297, 1945.

VAN BEEK, J., AMBERT-BALAY, K., BOTTELDOORN, N., EDEN, J. S., FONAGER, J., HEWITT, J., IRITANI, N., KRONEMAN, A., VENNEMA, H., VINJÉ, J., WHITE, P. A., KOOPMANS, M., ON BEHALF OF NORONET. Indications for worldwide increased norovirus activity associated with emergence of a new variant of genotype II.4, late 2012. **Euro Surveillance**, v. 18, n. 1, pii=20345, 2013.

VEGA, E.; BARCLAY, L.; GREGORICUS, N.; WILLIAMS, K.; LEE, D.; VINJÉ, J. Novel surveillance network for norovirus gastroenteritis outbreaks, United States. **Emerging Infectious Disease**, v. 17, n. 8, p. 1389-1395, 2011.

VENNEMA, H.; DE BRUIN, E.; KOOPMANS, M. Rational optimization of generic primers used for Norwalk-like virus detection by reverse transcriptase polymerase chain reaction. **Journal of Clinical Virology**, v. 25, p. 233-235, 2002.

VICENTINI, F.; DENADAI, W.; GOMES, Y. M.; ROSE, T. L.; FERREIRA, M. S. R.; LE MOULLAC-VAIDYE, B.; LE PENDU, J.; LEITE, J. P. G.; MIAGOSTOVICH, M. P.; SPANO, L. C. Molecular characterization of noroviruses and HBGA from infected quilombola children in Espírito Santo state, Brazil. **Plos One**, v. 8, n. 7, e69348. doi:10.1371/journal.pone.0069348, 2013.

VICTORIA, M.; RIGOTTO, C.; MORESCO, V.; DE ABREU CORRÊA, A.; KOLESNIKOVA, C.; LEITE, J. P. G.; MIAGOSTOVICH, M. P.; BARARDI, C. R. M. Assessment of norovirus contamination in environmental samples from Florianópolis city, southern Brazil. **Journal of Applied Microbiology**, v. 1, p. 231-238, 2010a.

VICTORIA, M.; GUIMARÃES, F. R.; FUMIAN, T. M.; FERREIRA, F. F. M.; VIEIRA, C. B.; SHUBO, T.; LEITE, J. P. G.; MIAGOSTOVICH, M. P. One year monitoring of norovirus in a sewage treatment plant in Rio de Janeiro, Brazil. **Journal of Water and Health**, doi: 10.2166/wh.2009.012, p. 158-165, 2010b.

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**, v. 107, n. 6, p. 778-784, 2012.

VINJÉ, J.; HAMIDJAJA, R. A.; SOBSEY, M. D. 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**, v. 116, n. 2, p. 109-117, 2004.

VINJÉ, J. A norovirus vaccine on the horizon?. **The Journal of Infectious Disease**, v. 202, n. 11, p. 1623-1625, 2010.

VIROCLIME. 2011. **Systematic review of waterborne disease outbreaks following extreme water events**. Disponível em: www.viroclime.org/downloads/viroclime_survey_wp7.pdf. Acesso em: 25 fev. 2013.

WALLIS, C.; MELNICK, J. L. Concentration of viruses from sewage by adsorption on Millipore membranes. **Bull. Org. Mond. Santg.**, v. 36, p. 219-225, 1967.

WANG, Q.; HAN, M. G.; CHEETHAM, S.; SOUZA, M.; FUNK, J. A.; SAIF, L. J. Porcine noroviruses related to human noroviruses. **Emerging Infectious Disease**, v. 11, n. 12, p. 1874-1881, 2005.

WILLIAMS, F. P. **Norwalk virus (Norovirus) Image**. Disponível em: <http://www.epa.gov/microbes/norwalk.html>. Acesso em 13 nov. 2011.

WIKSWO, M. E.; CORTES, J.; HALL, J. A.; VAUGHAN, G.; HOWARD, C.; GREGORICUS, N.; CRAMER, E. H. Disease transmission and passenger behaviors during a high morbidity norovirus outbreak on a cruise ship, January 2009, **Clinical Infectious Diseases**, v. 52, n. 9, p. 1116-1122, 2011.

WOBUS, C. E.; THACKRAY, L. B.; VIRGIN, H. W. Murine norovirus: a model system to study norovirus biology and pathogenesis. **Journal of Virology**, v. 80, n. 11, p. 5104-5112, 2006.

WYN-JONES, A. P.; SELWOOD, J. Enteric viruses in the aquatic environment: a review. **Journal of Applied Microbiology**, v. 91, p. 945-962, 2001.

WYN-JONES, P. The detection of waterborne viruses. In: BOSCH, A.; ZUCKERMAN, A. J.; MUSHAHWAR, I. K. **Human viruses in water**. Oxford: Elsevier, 2007, p. 177-204.

WYN-JONES, A. P.; CARDUCCI, A.; COOK, N.; D'AGOSTINO, M.; DIVIZIA, M.; FLEISCHER, J.; GANTZER, C.; GAWLER, A.; GIRONES, R.; HOLLER, C.; HUSMAN, A. M. R.; KAY, D.; KOZYRA, I.; LÓPEZ-PILA, J.; MUSCILLO, M.; NASCIMENTO, M. S. J.; PAPAGEORGIOU, G.; RUTJES, S.; SELLWOOD, J.; SZEWZYK, R.; WYER, M. Surveillance of adenoviruses and noroviruses in European recreational waters. **Water Research**, v. 45, p. 1025-1038, 2011.

ZHAO, G. C.; WU, S. N.; XU, A. J.; JI, Q. E. Evaluation of norovirus rapid detection kit. **Zhonghua Shi Yan He Lin Chuang Bing Du Xue Za Zhi**, v. 26, n. 1, p. 75-77, 2012.

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