

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE VETERINÁRIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**DETECÇÃO DE ROTAVÍRUS EM AMOSTRAS FECAIS DE BOVINOS E DE  
ÁGUA EM PROPRIEDADES RURAIS DO VALE DO PARANHANA, RS**

**PORTO ALEGRE, ABRIL DE 2012**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE VETERINÁRIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**DETECÇÃO DE ROTAVÍRUS EM AMOSTRAS FECAIS DE BOVINOS E  
ÁGUA EM PROPRIEDADES RURAIS DO VALE DO PARANHANA, RS**

**Autor:** Bianca Bergamaschi

Dissertação apresentada como requisito parcial  
para obtenção do grau de Mestre em Ciências  
Veterinárias na área de Virologia

**Orientador:** Prof. Dr. Paulo Michel Roehle

**Co-orientador:** Prof. Dr. Fernando Rosado  
Spilki

**PORTO ALEGRE, ABRIL DE 2012**

Bianca Bergamaschi

DETECÇÃO DE ROTAVÍRUS EM AMOSTRAS FECAIS DE BOVINOS E ÁGUA  
EM PROPRIEDADES RURAIS DO VALE DO PARANHANA, RS

Aprovada em 30 de abril de 2012.

APROVADA POR:

---

Prof. Dr. Paulo Michel Roehe  
Orientador e Presidente da Comissão

---

Dr<sup>a</sup>. Larissa Heinzelmann (FEEVALE)  
Membro da Comissão

---

Prof. Dr. Cláudio Wageck Canal (UFRGS)  
Membro da Comissão

---

Prof.Dr. Amauri Simonetti (UFRGS)  
Membro da Comissão

**Dedico este trabalho a todos que  
estiveram comigo e me apoiaram  
para que esse projeto se realizasse.**

## AGRADECIMENTOS

Agradeço o coleguismo e apoio dos colegas da Universidade Feevale, do ICBS e IPVDF. Colegas Eloisa Bianchi, Thais Fontana, Gustavo Oliveira, Samuel Cibulski, especial agradecimento pra vocês que tiveram participação essencial neste trabalho! Vocês sabem a importância que tiveram!

É inestimável meu crescimento pessoal e profissional desde quando me integrei ao grupo de pesquisa coordenado pelo Professor Paulo Michel Roehle. Grata pela oportunidade.

Agradeço ao Professor Fernando Rosado Spilki pela confiança investida e a crença em meu trabalho durante esses anos. Além de um amigo, é um cientista que sem seu auxílio, este projeto não alcançaria o sucesso. Obrigada pela confiança, credibilidade e compreensão.

Agradeço à família! Obrigada por compreender minha ausência durante o mestrado e por todo o apoio que me deram. Pai, mãe, não tenho palavras para expressar o que vocês significam para mim! Amo vocês! Um dia vocês sentirão orgulho de mim!

Minhas amadas amigas Márcia Cristina Lange, Manoela Tressoldi Rodrigues e Carine Gusson: obrigada pelo ombro amigo de todas as horas, por me fazerem rir quando eu mais precisava! Vocês estão no meu coração! Meu carinho e admiração é de vocês!

Manu, obrigada pelas palavras de carinho e alento! Muito obrigada pela amizade incondicional...pela super ajuda de hoje e de sempre!

Lucas Baierle, nos conhecemos justamente quando estava finalizando este trabalho. Te agradeço pela compreensão, pelos abraços e por tornar este momento mais colorido e feliz! Te amo.

Agradeço a Santo Expedito junto ao Nosso Senhor Jesus Cristo e Deus por darem-me força, proteção, coragem e serenidade. Serei grata pelo resto de minha vida e levarei seu nome a todos que tem fé. Obrigada! E salve Jorge.

"É durante as fases de maior adversidade que surgem as grandes oportunidades de se fazer o bem a si mesmo e aos outros".

**Dalai Lama**

"Os ventos que as vezes tiram algo que amamos, são os mesmos que trazem algo que aprendemos a amar.. Por isso não devemos chorar pelo que nos foi tirado e sim, aprender a amar o que nos foi dado. Pois tudo aquilo que é realmente nosso, nunca se vai para sempre."

**Bob Marley**

## LISTA DE FIGURAS

Página

- Figura 1.** Ilustração esquemática de padrão de migração dos segmentos genômicos (600 à 3000pb) dos rotavírus. Eletroforese em gel de poliacrilamida (adaptado de Alfieri, 1996)..... 18
- Figura 2.** Estrutura dos capsídeos dos rotavírus. (A) Fotomicrografia obtida por microscopia eletrônica de transmissão de partículas virais de rotavírus (Fonte: University of Liverpool). (B) Esquema mostrando a organização do capsídeo dos rotavírus (Fonte: ViralZone, 2011)..... 18
- Figura 3.** Organização genômica dos rotavírus. .... 19
- Figura 4.** Ciclo replicativo dos rotavírus. A internalização ocorre por endocitose mediada por receptores (1), a penetração ocorre após a desestabilização da partícula vírica e permeabilização da membrana endocítica desencadeadas pelo efluxo de cálcio (2). A penetração direta através da membrana também tem sido proposta (3). A transcrição primária ocorre ainda no interior da partícula semi-íntegra (4) e resulta na produção de mRNA para a síntese protéica (5) e para a replicação do genoma(6).A replicação do genoma (6, 7) e os estágios iniciais da morfogênese (8) ocorrem no interior de estruturas denominadas viroplasmas, que contém RNAs, proteínas virais e partículas virais em formação.As partículas com duplo capsídeo formadas no viroplasma adquirem um envelope lipídico temporário ao penetrarem no RER (9). A remoção do envelope (10) é seguida da adição da VP7, formando o capsídeo externo e estabilizando as partículas (11). Acredita-se que os vírions maduros sejam liberados por lise celular (12). Fonte: adaptado de ESTES, 2001..... 22
- Figura 5.** (A) Imagem de microscopia óptica de efeito citopático de rotavírus em linhagem em monocamada de CRIB com cinco dias de inoculação. Bergamaschi, B., 2011. (B) Imagem de microscopia óptica de efeito citopático de rotavírus em linhagem em monocamada de HEP-2 com cinco dias de inoculação. Bergamaschi, B., 2011..... 26



## LISTA DE TABELAS

Página

<b>Tabela 1.</b> Membros da família <i>Reoviridae</i> (ICTV, 2012).....	17
---	----

## LISTA DE ABREVIÇÕES

Ac: anticorpo

Ag: antígeno

AGMK: cultura primária de células renais de macaco verde africano

BGM, P133: linhagens celulares de rim de macaco (Buffalo Green Monkey)

BSA: albumina sérica bovina

CEP/CPE: efeito citopático característico

dsRNA: ácido ribonucleico dupla-fita

EIA: ensaio imunoenzimático

ELISA: *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*

G: tipo glicoproteína

GARV: rotavirus do genótipo A

HEK: cultura primária de células embrionárias hepáticas humanas

Ig: imunoglobulinas

IM: intramuscular

L929, P566: linhagens celulares de fibroblastos de camundongo

M7: células embrionárias de pulmão humano

MA104, P54; LLC-MK2, P315: linhagens celulares de rim de macaco Rhesus

MET: microscopia eletrônica de transmissão

mRNA: ácido ribonucleico mensageiro

NSP: proteína não-estrutural

P: tipo protease sensível

RER: retículo endoplasmático rugoso

RhMK: cultura primária de células renais de macaco Rhesus

RK13, P146: linhagens celulares de rim de coelho

RT-PCR: *Reverse transcription- polymerase chain reaction* – Transcriptase reversa seguida da reação em cadeia da polimerase

RV: rotavírus

SDS-PAGE: *Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis* - Dodecil Sulfato de sódio Eletroforese em gel de poliacrilamida

VERO, P135; CV-1, P38; BSC-1, P67: linhagens celulares de rim de macaco verde africano

VP: proteína viral

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>15</b>
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>16</b>
2.1. Classificação dos rotavírus.....	16
2.2. Características moleculares dos rotavírus .....	18
2.4. Replicação viral.....	20
2.5. Transmissão .....	22
2.6. Patogenia das infecções por rotavírus .....	23
2.7. Sinais clínicos .....	23
2.8. Imunidade.....	25
2.9. Diagnóstico .....	25
2.9.1. Isolamento viral.....	25
2.9.2. Transcriptase reversa seguida de reação em cadeia da polimerase (RT-PCR) .....	26
2.10. Importância econômica .....	27
2.11. Vírus como indicadores de contaminação do ambiente.....	27
<b>3. OBJETIVOS .....</b>	<b>30</b>
3.1. Objetivo geral.....	30
3.2. Objetivos específicos .....	30
<b>CAPÍTULO 1.....</b>	<b>31</b>
<b>4. CONCLUSÕES.....</b>	<b>41</b>
<b>5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>42</b>

## RESUMO

Objetivando aferir uma possível relação entre a contaminação de fontes aquáticas com o manejo de animais, o presente estudo buscou detectar a presença de rotavírus em amostras de fezes bovinas e águas coletadas nos municípios de Rolante, Riozinho e Taquara, no Rio Grande do Sul. Nestas localidades, pertencentes ao Vale do Paranhana, foram coletadas 104 amostras de água de diferentes origens, incluindo água de torneira, açude, poço cavado, poço artesiano, arroio, rio e vertente. As coletas de água foram realizadas nas proximidades das propriedades rurais e nas mesmas. Além disso, foram coletadas 38 amostras de fezes bovinas em propriedades de gado de leite. As amostras de água foram submetidas a um processo de concentração de partículas virais e o RNA foi extraído seguindo metodologia padronizada. Para detecção de RNA genômico, foi empregada a reação de transcriptase reversa seguida de reação em cadeia da polimerase (RT-PCR) tendo como alvo o gene mais conservado dos rotavírus, codificante da proteína VP6. Para avaliar a presença de vírus infeccioso, as amostras foram inoculadas em células MA-104, HEp-2 e CRIB. Das amostras de água, 25 (24%) continham genoma de rotavírus, sendo 8,6% amostras do município de Rolante, 4,8% de Riozinho e 10,6% amostras coletadas em Taquara. Estas 25 amostras contendo genoma viral foram subsequentemente submetidas ao isolamento em cultivos celulares, em nenhuma delas foi observado efeito citopático característico de rotavírus (CPE). A extração de RNA desses cultivos, após três passagens consecutivas, não revelou a presença de genoma viral. Em relação às amostras de fezes examinadas, em nenhuma delas foi detectada a presença de genoma de rotavírus. Conclui-se que o isolamento, como empregado no presente estudo, não teve sensibilidade suficiente para viabilizar seu uso como técnica para identificar rotavírus como contaminante de águas. Vinte e quatro por cento das amostras de água continham rotavírus, mas sua origem ainda deve ser determinada.

**PALAVRAS-CHAVE:** Rotavírus, água, detecção, contaminação ambiental, gastroenterite.

## **ABSTRACT**

The aim of present study was to assess a possible relationship between the contamination of water sources with animal husbandry in the region. In the localities belonging to Paranhana valley, the municipalities of Taquara, Rolante e Riozinho, were collected 104 water samples from different sources including tap water, ponds, dug wells, boreholes, streams, river and slopes. The water samplings were conducted in the vicinity of farms and on them. In addition, 38 fecal samples were collected from cattle dung from animals on propertie of dairy in Taquara. Water samples were subjected to a process of viral particles concentration and RNA extraction following standard methodology. For genomic RNA detection, were used reverse transcriptase followed by polymerase chain reaction (RT-PCR) targeting the most conserved gene of rotaviruses, gene encoded the viral protein 6 (VP6). To evaluate the presence of infective viruses samples were inoculated on MA-104 cells, HEp-2 and CRIB. Of all water samples, 25 (24%) contained genome of rotavirus, 8,66% samples from Rolante, 4,81% samples from Riozinho and 10, 59 samples collected on Taquara. The 25 samples containing viral genome which all were subsequently subjected to isolation in cultured cells, none were observed cytopathic effect typical of rotavirus (CPE). RNA extraction of these inoculations after three consecutive passages did not reveal the presence of rotavirus genomes. Regarding the stool samples, none were detected presence of rotavirus genome. Viral isolation, as used in this study did not have sufficient sensitivity to enable its use as a technique for rotavirus identification as water contamination.

**KEYWORDS:** Rotavirus, water, detection, environmental contamination, gastroenteritis.

## 1. INTRODUÇÃO

A distribuição dos vírus entéricos em diferentes regiões geográficas do mundo está estreitamente relacionada ao desenvolvimento socioeconômico (BANERJEE et al., 2007; GLASS et al., 2006). Estes podem estar presentes naturalmente em ambientes aquáticos, mas mais comumente sua presença deve-se a atividades humanas que acabam por levar resíduos às fontes de águas. Estas atividades podem ser desde fossas sépticas e esgotos até escoamento de dejetos agrícolas (FONG & LIPP, 2005).

A persistência de rotavírus (RV) em ambientes aquáticos e solo, bem como sua resistência a processos de desinfecção, faz com que sua disseminação e transmissão sejam facilitados (RZEZUTKA e COOK, 2004; HIJNEM et al., 2006). As concentrações de vírus em amostras ambientais são baixas, tanto devido à incapacidade de se replicar sem uma célula hospedeira como pela degradação contínua e efeitos de diluição (APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, 2009). Todavia, em contraste com a maioria das infecções bacterianas, mesmo pequenas quantidades de vírus são suficientes para estabelecer uma infecção em um novo hospedeiro (LINDESMITH et al., 2003). Ainda alguns estudos confirmam a ocorrência de vírus entéricos em águas subterrâneas, que também são consumidas, e acredita-se que possam contribuir para gastroenterites (ABBASZADEGAN et al., 1999; FOUT et al., 2003).

As conseqüências da contaminação de mananciais e da utilização de tratamentos que nem sempre apresentam resultados eficazes, podem ser constatadas quando no mundo todo, 88% das doenças diarréicas ainda são transmitidas pela água ou estão relacionadas a ela (JIANG, 2006). No presente estudo buscou-se avaliar a possibilidade de empregar a identificação de rotavírus como marcadores de contaminação ambiental utilizando-se amostras coletadas na região do vale do Paranhana.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. Classificação dos rotavírus

Os rotavírus estão classificados dentro da família *Reoviridae*. A família *Reoviridae* é dividida em duas subfamílias a *Sedoreovirinae*, com seis gêneros, um dos quais é o gênero rotavírus, *Spinareovirinae*, com nove gêneros (Tabela 1). O gênero *Rotavirus* é composto por cinco espécies, diferenciadas pelas letras A, B, C, D e E (ICTV, 2012).

Um sistema adotado para classificação de amostras de rotavírus baseia-se na análise de padrão eletroforético de migração de segmentos genômicos de dsRNA por eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE). Com base nos perfis eletroforéticos obtidos, denominados eletroferotipos, foram definidos sete grupos - ou eletroferogrupos - distintos, denominados - "A" a "G" - (PEREIRA et al., 1983; TANIGUCHI et al., 1995; ESTES et. al., 1989; PAUL e LYOO, 1993). Os rotavírus do grupo A tem um perfil de segmentos genômicos cuja classificação de segmentos (de acordo com suas massas moleculares) (Figura 1) é a seguinte: Classe I (segmentos 1 a 4); Classe II (segmentos 5 e 6) ; Classe III (segmentos 7, 8 e 9) e Classe IV (segmentos 10 e 11). Contudo, a classificação dos rotavírus não deve ser baseada exclusivamente em PAGE, pois as alterações genômicas frequentes (rearranjos e deleções) resultam em alterações nos padrões de migração.

Adicionalmente, os rotavírus podem ser classificados de acordo com os proteínas que constituem o capsídeo externo, a partir de um sistema de classificação denominado Sistema Binário de Classificação, que se utiliza de métodos moleculares e sorológicos. A proteína sensível à protease ( P ou VP4) possui 27 tipos diferentes determinados por este método de classificação. A glicoproteína VP7 ( ou G) possui 15 tipos já classificados, resultando em 405 possíveis combinações (LEITE et al., 2008; ALFIERI et al., 2007).

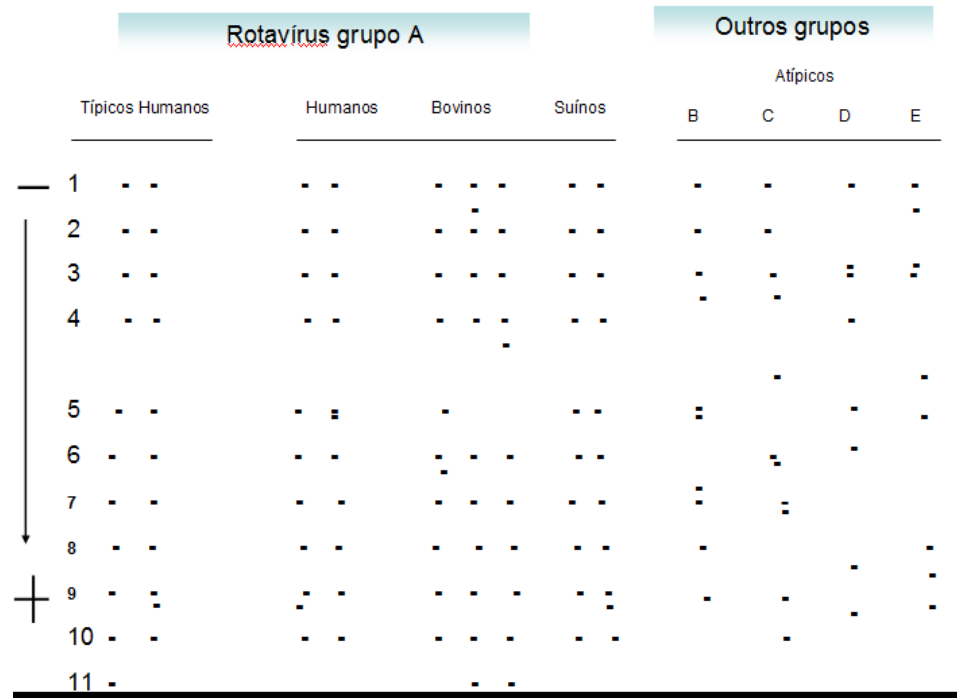
Considerando as diferenças antigênicas na proteína viral VP6, que é a proteína mais abundante nos vírions, os rotavírus podem ser classificados em sete sorogrupos distintos, denominados grupos A a G. Os grupos A, B e C têm sido encontrados tanto em humanos quanto em animais. Já os grupos D a G são identificados somente em animais. Dentre estes, os grupos A, B e C incluem as amostras associadas a enfermidades, sendo assim de grande importância clínica, epidemiológica e zoonótica



(ESTES, 2007). Na grande maioria dos casos de diarreia ou até mesmo de infecções subclínicas em humanos e em animais o grupo A está envolvido. Os grupos B e C estão presentes de maneira menos frequente em animais causando gastroenterites, sendo o grupo C raramente identificado em fezes de bovinos.

**Tabela 1.** Membros da família *Reoviridae* (de acordo com o ICTV, revisão de 2012).

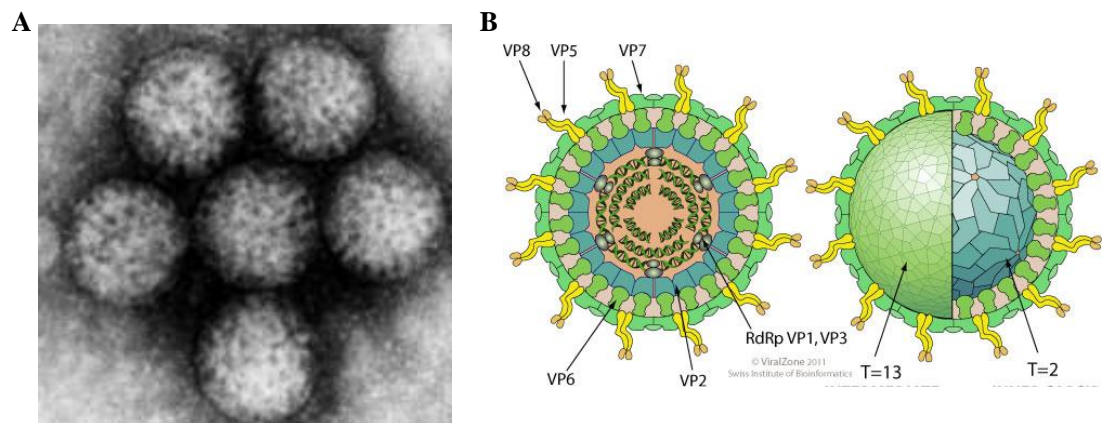
	<b>Gênero</b>	<b>Espécie</b>
<b>Subfamília: Sedoreovirinae</b>	<i>Cardoreovirus</i>	<i>Eriocheir sinensis reovirus</i>
	<i>Mimoreovirus</i>	<i>Micromonas pusilla reovirus</i>
	<i>Orbivirus</i>	<i>Bluetongue vírus</i>
	<i>Phytoreovirus</i>	<i>Wound tumor vírus</i>
	<b><i>Rotavirus</i></b>	<b><i>Rotavirus A</i></b> <b><i>Rotavirus B</i></b> <b><i>Rotavirus C</i></b> <b><i>Rotavirus D</i></b> <b><i>Rotavirus E</i></b>
	<i>Seadornavirus</i>	<i>Banna vírus</i>
<b>Subfamília: Spinareovirinae</b>	<i>Aquareovirus</i>	<i>Aquareovirus A</i>
	<i>Coltivirus</i>	<i>Colorado tick fever virus</i>
	<i>Cypovirus</i>	<i>Cypovirus 1</i>
	<i>Dinovernavirus</i>	<i>Aedes pseudoscutellaris reovirus</i>
	<i>Fijivirus</i>	<i>Fiji disease vírus</i>
	<i>Idnoreovirus</i>	<i>Idnoreovirus 1</i>
	<i>Mycoreovirus</i>	<i>Mycoreovirus 1</i>
	<i>Orthoreovirus</i>	<i>Mammalian orthoreovirus</i>
<i>Oryzavirus</i>	<i>Rice ragged stunt virus</i>	



**Figura 1.** Ilustração esquemática de padrão de migração dos segmentos (600 à 3000pb) genômicos dos rotavírus. Eletroforese em gel de poliacrilamida (adaptado de Alfieri, 1996).

## 2.2. Características moleculares dos rotavírus

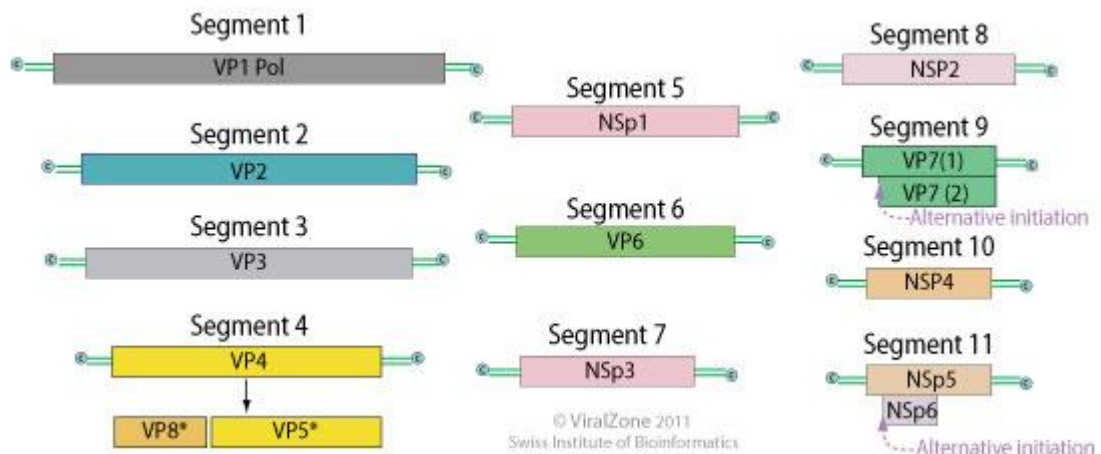
Os rotavírus são livres de envelope e medem aproximadamente 85 nm de diâmetro (HOWLEY et al., 2001, LEITE et al., 2008). Sua denominação tem origem da palavra *rota*, que em latim significa roda. Este nome foi adotado devido sua aparência quando observado por microscopia eletrônica (Figura 2). O capsídeo do vírus é de simetria icosaédrica e composto por três camadas protéicas concêntricas (capsídeo externo, intermediário e interno).



**Figura 2.** Estrutura dos capsídeos dos rotavírus. (A) Fotomicrografia obtida por microscopia eletrônica de

transmissão (Fonte: University of Liverpool). (B) Esquema mostrando a organização do capsídeo viral dos rotavírus (Fonte: ViralZone, 2011)

O genoma viral é constituído por 11 segmentos de dupla fita de RNA, sendo que cada um destes codifica uma proteína (seis estruturais e seis não-estruturais). A única exceção a esta regra, é o segmento 11 que codifica duas proteínas (Figura 3). Os segmentos variam de 667 a 3,302 nt. O genoma total é constituído por 18,550pb. O RNA mensageiro (mRNA) tem a extremidade 5' - *cap* metilada mas não possui cauda da poli A. Ao invés disso, mRNA possui na extremidade 3' a sequencia consenso UGACC que é conservada em todos os 11 segmentos. Coinfecção em células com diferentes cepas de rotavírus pertencentes ao mesmo sorogrupo podem causar um rearranjo de segmentos, ocasionando rearranjo genético (HOWLEY et al., 2001, LEITE et al., 2008).



**Figura 3.** Organização genômica dos rotavírus. Extraído de ViralZone, 2012.

### 2.3. Proteínas virais

As proteínas estruturais (VP) são designadas pela sigla VP seguida por números sequenciais usualmente referindo-se à massa molecular. As proteínas presentes no core são: VP1 (125 kDa), VP2 (94 kDa) e VP3 (88 kDa). No capsídeo intermediário encontra-se a VP6 (46 kDa). As proteínas VP4 (88 kDa) e VP7 (38 kDa) constituem o capsídeo viral externo (Figura 3). A proteína VP1 tem função de RNA polimerase RNA dependente. A VP3 está envolvida na adição da estrutura 5'-*cap* aos mRNAs (RNAs mensageiros) possuindo atividade de guanililtransferase. A VP4 e a VP7 são

responsáveis pela interação inicial entre vírus e célula hospedeira. As proteínas não-estruturais (NSP) são encontradas em partículas virais imaturas enquanto ocorre a replicação e estão relacionadas com os processos de replicação e formação da progênie viral (LEITE et al., 2008; ALFIERI ET al., 2007)

#### **2.4. Replicação viral**

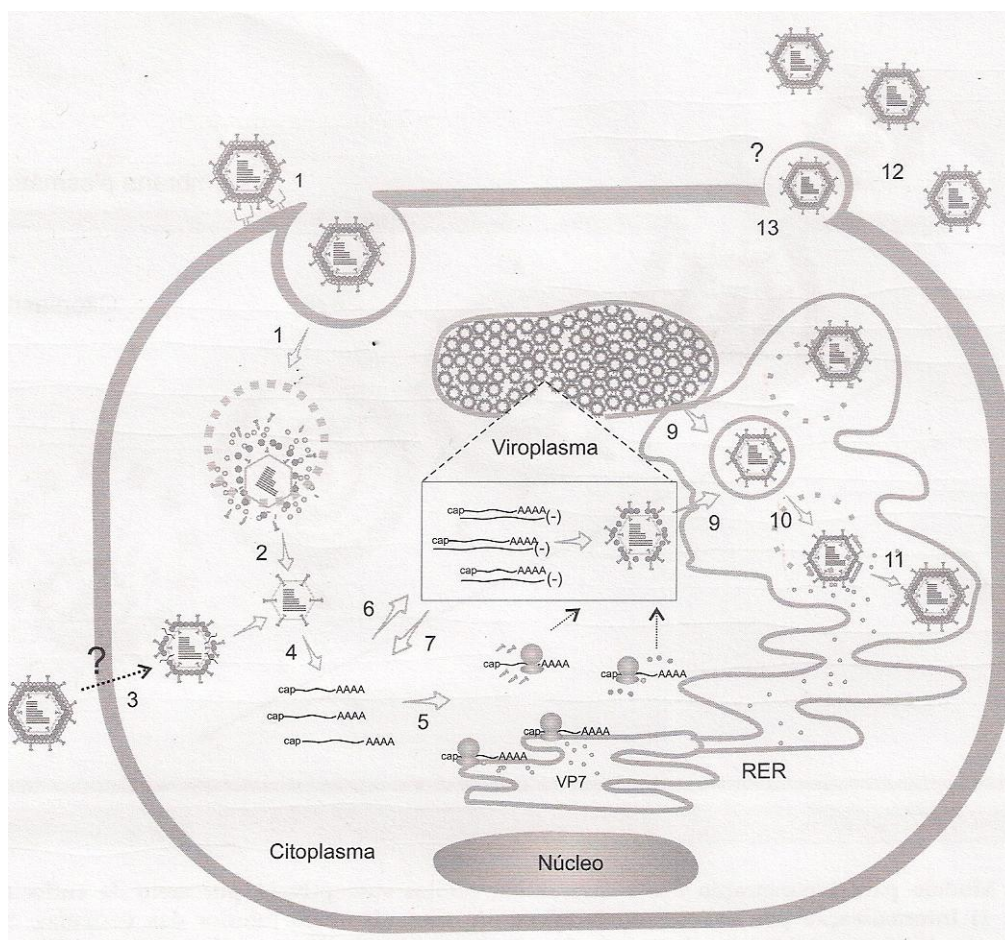
A adsorção viral ocorre mediada pela proteína VP4 ou por seus produtos de clivagem. Estudos apontam que a interação célula - vírion é complexa e não está totalmente elucidada (LEITE et al., 2008; ALFIERI ET al., 2007; LI et al., 2010). Sabe-se que a proteína estrutural VP7 também desempenha papel na virulência dos rotavírus e está juntamente com a VP4 envolvida na ligação célula-vírion. (LEITE et al., 2008; ALFIERI et al., 2007; LI et al., 2010).

*In vivo*, a infecção é restrita às células do topo das vilosidades do intestino delgado, sugerindo assim a existência de receptores específicos nessas células. Em infecções *in vitro*, as linhagens permissivas aos rotavírus, são as de origem epitelial provenientes de intestino e rins (LEITE et al., 2008; ALFIERI ET al., 2007; LI et al., 2010, KAPIKIAN, 1990, 2010). A infectividade de algumas cepas de origem animal depende da presença de ácido siálico (AS) na superfície celular. Entretanto, para algumas cepas esta condição não parece ser essencial, visto que já houve identificação de moléculas AS-independentes (PRASAD et al., 1997). Desta maneira, sugere-se a existência de receptores AS-dependentes e AS-independentes (PRASAD et al., 1997). Os RV utilizam os receptores celulares RV-A (integrinas) e Po-RV (ácido siálico) como meio de adsorção. Após interação com os receptores integrina e ácido siálico-dependentes (LEITE et al., 2008; ALFIERI et al., 2007; ESTES, 2001, 1989), a partícula penetra no citoplasma celular por endocitose. A clivagem proteolítica da VP4 gerando o peptídeo VP5 permite a penetração direta na membrana plasmática. Estudos demonstram que o vírus sofre internalização por endocitose cálcio-dependente e seu desnudamento ocorre por enzimas lisossomais (LEITE et al., 2008; ALFIERI et al., 2007). A redução de concentração de cálcio no interior da vesícula faz com que ocorram mudanças conformacionais no capsídeo. Nesta etapa, ocorre o rompimento da membrana lisossomal permitindo a penetração da partícula subviral ao citoplasma. Nesse momento ocorre a ativação da transcriptase viral iniciando a transcrição dos 11 segmentos genômicos (LEITE et al., 2008; ALFIERI et al., 2007).

O ciclo replicativo dos rotavírus é independente de estruturas nucleares, ocorrendo integralmente no citoplasma celular (LEITE et al., 2008; ALFIERI ET al., 2007). A proteína VP1 (polimerase RNA-dependente) modula a síntese de RNA viral (LEITE et al., 2008; ALFIERI et al., 2007). Os mRNA recém transcritos atuam como mensageiros para tradução de proteínas e também tem função de molde para síntese de RNA de dupla fita (dsRNA) constituinte da progênie viral. A transcrição é denominada assimétrica já que todos os transcritos são fitas de polaridade positiva que utilizaram como molde as fitas de sentido negativo dos RNAs genômicos (KAPIKIAN, 1990, 2010; LEITE et al., 2008; ALFIERI ET al., 2007; LI et al., 2010). Durante a síntese protéica, grande quantidade de proteínas estruturais e não estruturais (VP e NSPs) acumulam-se resultando em inclusões citoplasmáticas nas células hospedeiras chamadas de viroplasmas (LEITE et al., 2008; ALFIERI et al., 2007) ( Figura 4).

Ocorrem estágios intermediários à replicação que são os precursores das partículas com duplo capsídeo. Após a formação de partículas de duplo capsídeo, estas passam do viroplasma para o interior do retículo endoplasmático rugoso (RER) adjacente (LEITE et al., 2008; ALFIERI et al., 2007). A maturação é dependente de concentrações de cálcio para promover a estabilização das proteínas do capsídeo externo. No interior do RER a VP7 é adicionada para formar a partícula viral madura (obtenção de triplo capsídeo). Ao final do ciclo replicativo a progênie viral é liberada por lise celular (ALFIERI et al., 2007).

Monitorando os estágios de replicação viral, foi observado que apenas partículas com triplo capsídeo são capazes de penetrar nas células pelas quais os rotavírus possuem afinidade. Assim, somente as partículas virais com VP4 íntegra, sujeita a sofrer clivagem que dará origem à VP5 e VP8, são potencialmente virulentas (ALTENBURG et al., 1980; KAPIKIAN, 1990, 2010; LEITE et al., 2008; ALFIERI et al., 2007; LI et al., 2010).



**Figura 4.** Ciclo replicativo dos rotavírus. A internalização ocorre por endocitose mediada por receptores (1), a penetração ocorre após a desestabilização da partícula vírica e permeabilização da membrana endocítica desencadeadas pelo efluxo de cálcio (2). A penetração direta através da membrana também tem sido proposta (3). A transcrição primária ocorre ainda no interior da partícula semi-integra (4) e resulta na produção de mRNA para a síntese proteica (5) e para a replicação do genoma (6). A replicação do genoma (6, 7) e os estágios iniciais da morfogênese (8) ocorrem no interior de estruturas denominadas viroplasma, que contém RNAs, proteínas virais e partículas virais em formação. As partículas com duplo capsídeo formadas no viroplasma adquirem um envelope lipídico temporário ao penetrarem no RER (9). A remoção do envelope (10) é seguida da adição da VP7, formando o capsídeo externo e estabilizando as partículas (11). Acredita-se que os vírions maduros sejam liberados por lise celular (12). Fonte: adaptado de ESTES, 2001.

## 2.5. Transmissão

A transmissão viral ocorre por via fecal-oral. Altos títulos de vírus são excretados quando há um animal infectado com rotavírus, aproximadamente  $10^{11}$  partículas por grama de fezes, sendo apenas necessárias 10 a 100 partículas para infectar um indivíduo (EDITORIAL LANCET, 1975). O indivíduo infectado excreta

víriões nas fezes até sete dias após a infecção (ALFIERI et al., 2004, 2007). Isso pode levar à disseminação viral e infecção de outros animais ou humanos (BOSH, 1998; FONG & LIPP, 2005).

O primeiro mês de vida é o período em que os hospedeiros são mais susceptíveis à infecção (LINHARES, 2008). A susceptibilidade dos animais jovens e humanos ocorre devido à reposição do epitélio apical das vilosidades intestinais se dá de maneira lenta, facilitando o ciclo replicativo viral, resultando em progênies virais (ABAD et al., 1994; CANDEIAS, 1989). Os animais na fase adulta tornam-se mais resistentes ao agente patogênico devido à reposição mais freqüente dos enterócitos competindo com a replicação viral (BISHOP, 1983). Durante a primeira semana de vida, não é frequente a ocorrência de doença devido à presença de anticorpos maternos passivamente adquiridos, capazes de neutralizar o vírus nesse período (VERSIKARI et al., 1981). Não obstante, cepas mais virulentas são capazes de causar sinais clínicos em hospedeiros adultos (BISHOP et al., 1983; ABAD et al., 1994).

A existência de portadores tanto com infecções subclínicas quanto os que apresentam sintomatologia, além da resistência do vírion ao ambiente, contribuem para a disseminação do vírus (LINHARES, 2000; GERBA et al., 1996; MELEG et al., 2008). Partículas encontradas no meio ambiente como em água de beber, alimentos e água de recreação no caso de humanos, também são fontes de contaminação. Considerando que o tratamento da água para consumo humano ainda não é eficaz no caso dos vírus, a água também se torna uma importante fonte de disseminação desses agentes (GERBA et al., 1996; MELEG et al., 2008).

## **2.6. Patogenia das infecções por rotavírus**

O período de incubação da infecção varia de 16 a 24 horas, sendo uma doença autolimitante que, dependendo das condições do hospedeiro infectado, pode evoluir para cura ou óbito, dependendo de diversos fatores que podem levar a complicações do quadro clínico (ALFIERI, 2007). A morte pode ocorrer por complicações de infecções secundárias e desidratação. Os indivíduos que evoluem para a cura desenvolvem resposta imune frente à amostra infectante.

## **2.7. Sinais clínicos**

A maioria das infecções agudas em hospedeiros jovens são caracterizadas por sinais clínicos que consistem em diarreia, desidratação e consequente desequilíbrio

eletrolítico somado à acidose (LUNDGREN et al., 2001). A infecção é comumente assintomática ou branda; permitindo que, os hospedeiros sejam portadores e potenciais transmissores do vírus (LORROT et al., 2005). Dependendo da virulência de uma determinada amostra, eventuais infecções em adultos podem levar à manifestação de sinais clínicos tão graves quanto às observadas em jovens (ALFIERI, 2001).

Após a ingestão do vírus, estes têm tropismo pelo intestino delgado. Os vírions penetram nos enterócitos maduros dando início ao ciclo replicativo do vírus, o que resulta na lise celular e descamação das vilosidades dos enterócitos (LORROT et al., 2005) (Figura 3). Em decorrência da perda das vilosidades dos enterócitos, a reposição celular é realizada por células imaturas, células cubóides que não apresentam as vilosidades desenvolvidas, as quais são provenientes das criptas intestinais e não apresentam receptores para tal vírus, gerando uma infecção autolimitada (ALFIERI et al., 2007). Essa sucessão de fatores culmina na má absorção de nutrientes por parte do indivíduo, sendo denominada diarreia por má absorção (LUNDGREN et al., 2001). Os enterócitos também são secretores de lactase, enzima que não é secretada devido à degeneração das células da luz intestinal, o que ocasiona falha na digestão da lactose, cuja sua fermentação ocorre devido presença das bactérias intestinais, que por sua vez aumenta a pressão osmótica no interior do intestino agravando o quadro de diarreia (LUNDGREN et al., 2001).

Além do quadro de diarreia estão relacionados à infecção viral os sinais clínicos como depressão, anorexia, vômito, desidratação, pelo eriçado e sinais relacionados a conseqüente acidose metabólica (ALFIERI et al., 2007). Os sinais clínicos perduram durante aproximadamente três a quatro dias evoluindo para cura ou óbito principalmente no caso de animais jovens (ALFIERI et al., 2007).

Além dos fatores já abordados, a proteína não-estrutural NSP4 atua como uma enterotoxina capaz de induzir diarreia (TIAN et al., 1994, 1995; DONG et al., 1997; MORRIS et al., 1999; ALFIERI et al., 2007). O desenvolvimento do quadro clínico que nesses casos se assemelha ao observado em infecções por *Escherichia coli* enterotoxigênica. A NSP4 atua no aumento dos níveis de  $Ca^{2+}$  intracelular resultando no aumento da permeabilidade celular ao cloro, que por sua vez, é secretado (TIAN et al., 1994, 1995; DONG et al., 1997; MORRIS et al., 1999;). Também desestabiliza e interfere nas *tight junctions* (TIAN et al., 1996; BROWNE et al., 2000; TAFAZOLI et al., 2001; HUANG et al., 2001, 2004). Estes fatores ocasionam a diarreia devido à hipersecreção. Além desta característica, a NSP4 pode atuar no sistema nervoso entérico



estimulando a secreção de água pelas células intestinais (TIAN et al., 1994, 1995; DONG et al., 1997; MORRIS et al., 1999).

Em bovinos, o início da doença é rápida e os sinais clínicos incluem depressão, anorexia, diarreia e desidratação. Um grande número de partículas virais são excretados nas fezes de animais infectados ao longo de um período de dois a dez dias. (MULHERIN et al., 2008).

## **2.8. Imunidade**

Os mecanismos imunológicos relacionados à resposta frente aos rotavírus não estão totalmente elucidados. A imunoglobulina de mucosas IgA parece ser a imunoglobulina de principal defesa do organismo devido sua presença no intestino (ALFIERI et al., 2007). As proteínas virais relacionadas com a ativação de resposta imune, em especial IgG, são as proteínas externas VP7 e VP4 bem como a proteína do capsídeo intermediário VP6 e a não estrutural NSP4 (ALFIERI et al., 2007). Até o momento não está esclarecido o real papel destas imunoglobulinas na proteção imunológica contra as rotavirose (ALFIERI et al., 2007).

Estudos demonstram que anticorpos rotavírus-específicos são importante proteção primária contra reinfecção (LEITE et al., 2008; ALFIERI et al., 2007; KAPIKIAN, 1990, 2010; LI et al., 2010). Cepas homólogas ativam resposta humoral local mais potente do que cepas heterólogas. Além destes achados, sabe-se que os linfócitos T CD8<sup>+</sup> têm função principal na resolução da enfermidade, além dos linfócitos T CD4<sup>+</sup> que têm menor efetividade (ALFIERI et al., 2007). Citocinas e células NK estão envolvidas (ALFIERI et al., 2007).

## **2.9. Diagnóstico**

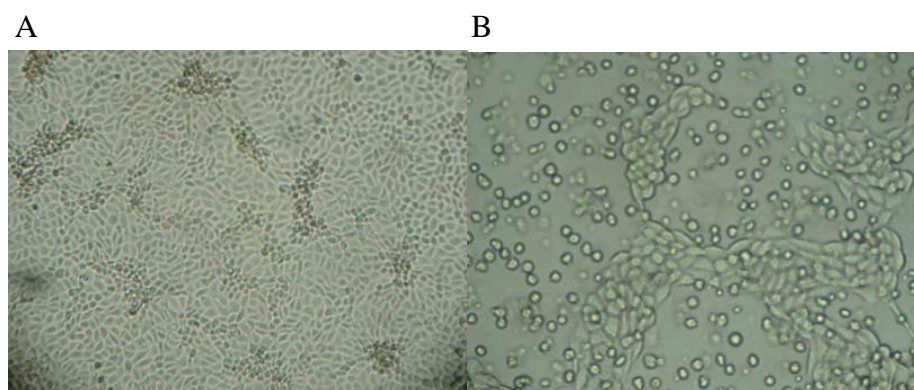
Diferentes métodos têm sido propostos para o diagnóstico de rotavírus. A seguir é apresentada uma breve descrição das técnicas atualmente mais empregadas com essa finalidade.

### **2.9.1. Isolamento viral**

O isolamento viral é amplamente utilizado com a finalidade de complementar resultados de técnicas moleculares. Esse método permite aferir a viabilidade viral da amostra. A confirmação acerca da viabilidade dos rotavírus era comumente realizada pela conjugação de técnicas celulares juntamente com técnicas de imunofluorescência

(BIRCH et al.,1983) ou citometria de fluxo (BARARDI et al., 1998). Atualmente, as técnicas moleculares vêm sendo aplicadas na detecção viral, que juntamente com o cultivo e inoculação viral permitem a detecção e a viabilidade do vírus (LI et al., 2010) (Figura 5). Uma vez que a detecção da presença de genomas virais não indica a viabilidade da partícula viral, sendo necessário para isso a utilização de diagnósticos por isolamento viral em cultivo. Em contrapartida, a detecção da presença de genomas virais não indica a viabilidade da partícula viral, sendo para isso necessário a utilização de outros métodos diagnósticos.

Isolamento viral em cultivo é oneroso, demorado e considerado de pouco valor prático para diagnóstico laboratorial. Usualmente são utilizadas células da linhagem MA-104 (linhagem celular de rim de macaco Rhesus) ou HT-29 (linhagem celular de tumor retal humano). As células são inoculadas com amostras potencialmente portadoras de partículas virais e observadas por 5 a 10 dias, sendo realizados pelo menos três subcultivos sucessivos.



**Figura 5.** (A) Imagem de microscopia óptica de efeito citopático de rotavírus em linhagem em monocamada de CRIB com cinco dias de inoculação. (B) Imagem de microscopia óptica de efeito citopático de rotavírus em linhagem em monocamada de MA-104 com cinco dias de inoculação. Aumento de 40X em microscopia óptica.

### **2.9.2. Transcriptase reversa seguida de reação em cadeia da polimerase (RT-PCR)**

Métodos moleculares estão sendo empregados na genotipagem das cepas de rotavírus. Essas técnicas possibilitam a caracterização dos genótipos G e P de cepas de amostras clínicas e ambientais circulantes em um período ou região, por exemplo.

A transcriptase reversa seguida de reação em cadeia da polimerase permite a identificação de infecções mistas ocasionada por diferentes genótipos - infecções heterólogas (recombinação genética ou *reassortment*).

### **2.10. Importância econômica**

Em animais de produção e de interesse econômico, as rotaviroses têm especial importância epidemiológica na criação de bovinos, suínos e eqüinos, uma vez que as infecções apresentam comumente alta morbidade quando ocorridas em neonatos (FLEWETT et al., 1978; McNULTY et al., 1978, 1980). Além disso, perdas econômicas importantes podem advir destas infecções, ocasionando diminuição de ganho de peso e mortalidade. Rotavírus são os principais agentes etiológicos das diarreias neonatais bovinas e suínas, sendo que a origem da infecção é considerada multifatorial, dependendo de fatores relacionados ao manejo zootécnico e sanitário (FLEWETT et al., 1978; TAKAHASHI et al., 1979; KAPIKIAN et al., 1990; CASTRUCCI et al., 1994; KAMINJOLO et al., 1994; PEJSAK et al., 1996). A rotavirose é considerada a principal causa de perda econômica em criação de suínos (WOOD et al., 1986; WILL et al., 1994; BELANCHE et al., 1995; PEJSAK et al., 1996).

A influência econômica dessa doença reflete-se na saúde pública uma vez que há registros de 600.000 mortes de pessoas e dois milhões de hospitalizações anualmente em todo o mundo causadas pela contaminação por rotavírus e subsequente diarreia severa (PARASHAR et al.; 2006).

### **2.11. Vírus como indicadores de contaminação do ambiente**

A partir da década de 80, estudos sobre virologia ambiental avançaram. Em surtos e relatos de casos, os vírus entéricos têm sido reconhecidos como agentes causais de gastroenterites não bacterianas (BOSCH, 1998).

Os relatos sobre os rotavírus demonstram que estes permanecem infecciosos por mais de 130 dias em águas do mar, por mais de 120 dias em águas de esgoto e por mais de 100 dias no solo na temperatura de 20 a 30°C (U.S. MANUAL ON GUIDELINES FOR WATER REUSE, 1992; JIANG et al., 2001).

Métodos moleculares baseados em Reação em Cadeia da Polimetase têm sido aplicados com sucesso na detecção e quantificação de patógenos e microorganismos em amostras ambientais. (SCHWARZ et al., 2002; MIN et al., 2006). Entretanto, ainda há certas limitações nos métodos de detecção de vírus no ambiente (MELEG et al., 2008). A baixa quantidade ou concentração de vírus em amostras de água requer que a água seja concentrada. Deste modo os fatores inibitórios presentes na água são simultaneamente concentrados juntamente com os vírus, o que pode levar a

interferência nos testes que envolvem amplificação de fragmentos, por exemplo. Além disso, as reações de amplificação indicam somente a presença de material genômico de vírus, não elucidando seu potencial infectante. A viabilidade do vírus reflete diretamente no risco à saúde humana e animal (KO et al., 2003; LI et al., 2009).

Apesar da rota fecal-oral ser a principal via de infecção e transmissão de rotavírus, a água tratada nas estações de tratamento podem conter rotavírus que tenham sido excretados em altos números por indivíduos infectados, sendo uma importante fonte de disseminação deste agente patogênico. Este fator implica em uma possível fonte para gastroenterites (GERBA et al., 1996; MELEG et al., 2008). A persistência de rotavírus em ambientes aquáticos como água tratada, bem como sua resistência a processos de desinfecção, faz com que sua transmissão seja facilitada para humanos e animais (RZEZUTKA e COOK, 2004; HIJNEN et al., 2006).

Atualmente são utilizadas bactérias termotolerantes como marcadores de contaminação fecal (MEDEIROS E SOUZA, 2009; WU et al., 2011), sendo que estas persistem em solos argilosos por 30 dias. A presença de *Escherichia coli* nos cursos d'água indica contaminação fecal e possivelmente presença de parasitos e patógenos virais (AMARAL et al., 2003; WU et al., 2011). Entretanto a ausência de bactérias termotolerantes não exclui a presença de vírus entéricos, uma vez que estes microorganismos persistem por períodos mais longos no ambiente. (GERBA et al., 1996; LEY et al., 2002; GRIFFIN et al., 2003; WU et al., 2011).

Por possuir características peculiares, os vírus, em especial os livres de envelope, possuem alta resistência no ambiente quando comparados às bactérias (PATTI, et al., 1996; CZAJKOWSKA, et al., 2008; OLSZEWSKA, et al., 2008; FUJIOKA e YONEYAMA, 2002; SAHLSTROM, et al., 2008; CHARLES, et al., 2009). Resistentes a adversidades ambientais, os vírus podem resistir a variação de pH entre 3 a 10, temperaturas que variam desde muito altas ( 50°C) até muito baixas, por longos períodos (CZAJKOWSKA, et al., 2008; OLSZEWSKA, et al., 2008). Há de se considerar que estes vírus resistem à metodologia adotada para tratamento de água de bebida vigente no Brasil (HURST et al., 1980; VINATEA et al., 2006).

Somente em casos de surtos há a recomendação para avaliar a qualidade da água no que se refere a vírus (MINISTÉRIO DA SAÚDE Nº 2914, BRASIL, 2011).

A principal limitação de avaliação dos riscos de infecção veiculada pela água contaminada com rotavírus é a falta de dados sobre a ocorrência e o potencial de exposição para humanos (GERBA et al., 1996).

A cada ano, vírus entéricos como norovírus, astrovírus, rotavírus e vírus da hepatite A são responsáveis pela grande maioria das gastroenterites não bacterianas em humanos (FANKHAUSER et al., 1998; MEAD et al., 1999; SAIR et al., 2002; GOFTI-LAROCHE et al., 2003; WILHELMI et al., 2003). Estes vírus são transmitidos por via fecal-oral, usualmente por água de bebida ou alimentos contaminados (BOSCH, 1998; RICHARDS, 2001; DUBOIS et al., 2002; KINGSLEY et al., 2002).

A qualidade microbiológica da água é baseada em métodos quantitativos para indicadores de bactérias termotolerantes (STRAUB e CHANDLER, 2003). Entretanto, diversas pesquisas indicam que o monitoramento de indicadores bacterianos não pode indicar presença ou contaminação da água por vírus entéricos (MORRIS, 1993; TREE et al., 1997, 2003). Já se tem reportado que mesmo a água estando livre de coliformes, pode conter, entretanto, vírus entéricos suficientes para causar infecção (BOSCH, 1998). A resistência de bactérias e vírus a sistemas de tratamento, especialmente tratamento de água de bebida, tanto para consumo humanos e animal, é extremamente diferente. Historicamente os sistemas de tratamento de água visavam reduzir ou eliminar os riscos de contaminação bacteriana apenas. Estes sistemas se mostram não muito eficientes e adequados na eliminação de vírus entéricos que são, por sua vez, bastante resistentes (PAYMENT, 1999).

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. Objetivo geral**

- Detectar rotavírus em amostras de fezes e água coletadas em propriedades rurais no Vale do Paranhana.

#### **3.2. Objetivos específicos**

- Padronizar o isolamento de rotavírus em linhagens celulares;
- Isolar em cultivos celulares distintos, cepas de rotavírus provenientes de amostras de campo;
- Avaliar se as técnicas de isolamento viral e RT-PCR podem ser utilizadas para o monitoramento do meio ambiente, como indicativo de contaminação ambiental.

## **CAPÍTULO 1**

### **DETECCÃO DE ROTAVIRUS EM AMOSTRAS FECAIS DE BOVINOS E ÁGUA DE PROPRIEDADES RURAIS NO SUL DO BRASIL**

**Manuscrito em preparação**

## DETECÇÃO DE ROTAVÍRUS EM AMOSTRAS FECAIS DE BOVINOS E ÁGUA DE PROPRIEDADES RURAIS NO SUL DO BRASIL

BERGAMASCHI, B.<sup>1,2\*</sup>; RODRIGUES, M.T.<sup>1</sup>; BIANCHI, E.<sup>1</sup>; SPILKI F.R.<sup>1</sup>;  
ROEHE P.M.<sup>2,3</sup>

<sup>1</sup>Molecular Microbiology Laboratory, Institute of Health Sciences, Feevale University, RS-239 2755, Novo Hamburgo, RS, CEP 93352-000, Brazil

<sup>2</sup>Virology Laboratory, Department of Microbiology, Institute of Basic Health Sciences, Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS), Av. Sarmento Leite 500, Porto Alegre, RS, CEP 90050-170, Brazil

<sup>3</sup>FEPAGRO Animal Health – Institute for Veterinary Research “Desidério Finamor” (IPVDF), Estrada do Conde 6000, Eldorado do Sul, RS, CEP 92990-000, Brazil

\* Author for correspondence: bia@feevale.br +55 51 9569-9700

### RESUMO

O presente trabalho teve por objetivo avaliar a qualidade e a potabilidade da água pela detecção de rotavírus nos municípios de Rolante, Riozinho e Taquara. Uma RT-PCR foi empregada para amplificar o gene da proteína VP6 localizada no capsídeo intermediário dos rotavírus. Cento e quatro amostras de água e 38 amostras de fezes de bovinos foram coletadas em propriedades rurais nestes municípios. Do total de 142 amostras, 25 amostras apresentaram genoma de rotavírus (17%). No entanto, em nenhuma delas foi possível isolar rotavírus em cultivo de células MA-104, HeP-2 e CRIB. Após as passagens em células, as amostras foram novamente testadas por RT-PCR. Todas as amostras anteriormente positivas na detecção de genoma viral por RT-PCR foram negativas no segundo teste. Concluiu-se que as três passagens em células não foram suficientes para causar efeito citopático devido ausência de vírus infeccioso.

**PALAVRAS-CHAVE:** Água, rotavírus, fezes, RT-PCR, ambiente.



## **ABSTRACT**

This study aimed to evaluate the quality and potability of water detecting the presence of rotavirus in the towns of Rolante, Riozinho e Taquara. A RT-PCR was designed to amplify the gene of protein VP6 located in the middle capsid of rotavirus. A total of 104 water samples and 38 bovine stool samples were collected in farms at these towns. Of the 142 samples, 25 (17%) were positive for rotavirus genome (all water samples). These samples were inoculated on MA-104, HEp-2 and CRIB cell monolayers to assess the viability of the virus. During three passages in cells no cytopathic effect (CPE) was observed. After the cell passages, the samples were again tested by RT-PCR. All samples previously positive were negative in the second test. It was concluded that the three passages were not a good method to detect infective rotavirus in environmental samples. In this study only viral genome was detected but no infective viruses.

**KEYWORDS:** Water, rotavirus, bovine faeces, RT-PCR.

## **INTRODUÇÃO**

Localizada no Vale do Paranhana, os municípios de Taquara, Rolante e Riozinho são locais de prática rural familiar. A agricultura e a pecuária fazem parte da vida cotidiana onde ainda é feito pouco uso de tecnologias mais avançadas. No entanto, o Vale do Paranhana está perto da região metropolitana de Porto Alegre, Rio Grande do Sul, altamente urbanizada e industrializada.

Em propriedades onde há criação de bovinos, suínos e equinos, por exemplo, a maior ocorrência de mortalidade acontece nos primeiros meses de vida (FLEWETT et al., 1978; McNULTY et al., 1978, 1980). Um grande número destas mortes ocorrem devido a diarreia neonatal causada pelas rotavíruses.

Estudos relatam que os rotavirus sobrevivem em água filtrada de rios. Os títulos virais permanecem os mesmos na temperatura de 4 a 20°C por um período de 64 dias. (RAPHAEL et al., 1985). Um estudo semelhante utilizando água de torneira demonstrou que não há redução de títulos virais por 64 dias a 4°C e somente 2 log de redução neste mesmo período quando à 20°C. Desta maneira, a contaminação viral pode ser um problema sério em ambientes aquáticos (RAPHAEL et al., 1985).

Avaliação da qualidade da água foi o objetivo deste estudo que buscou detectar rotavirus em amostras de água e fezes coletadas em propriedades rurais.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### *Amostras de água e concentração de vírus em água*

Partículas virais presentes na água foram concentradas usando método de adsorção e eluição com filtro de carga negativa (HA, Millipore, USA) como previamente descrito por Katayama et al. (2002) com pequenas modificações. Resumidamente, 500 mL de cada amostra de água foram misturados com 0,3 g de  $MgCl_2$ , pH 5,0. Subsequentemente, a amostra foi filtrada através de membrana estéril carregado negativamente (tamanho do poro de 0,45  $\mu m$ ; 47 mm de diâmetro). Com o auxílio de uma bomba de vácuo, uma pressão de entrada de 1 atm foi introduzida no sistema a uma velocidade de filtração de aproximadamente 100 mL/min. A membrana foi enxaguada com 87,5 mL de  $H_2SO_4$  0,5 mM (pH 3,0). A eluição de partículas virais foi realizada com 2,5 mL de NaOH 1 mM (pH 10,5). O filtrado foi então neutralizado com 12,5  $\mu L$   $H_2SO_4$  (50 mM) e 12,5  $\mu L$  de 100x Tris EDTA (TE). A mistura resultante foi distribuída em alíquotas, que foram armazenadas a  $-70^\circ C$  até posterior processamento.

### *Cepas controle de Rotavirus, amostras clínicas e de água- preparação das amostras para inoculação*

Uma linhagem celular de referencia e outras duas experimentais foram utilizadas para pesquisa dos rotavírus: MA-104, HeP-2 e CRIB. As 27 amostras positivas para RV por RT-PCR foram inoculadas em monocamadas com confluência de 70 % destas três linhagens.

As amostras foram primeiramente diluídas (1:5) utilizando meio MEM sem SFB (soro fetal bovino) e filtradas em membrana 0,22  $\mu m$ . Após ocorreu a inativação da proteína VP4.

O protocolo de ativação da proteína VP4 foi estabelecido da seguinte maneira: em uma diluição 1:100 de tripsina e meio MEM sem soro fetal bovino (SFB), 200  $\mu L$  de amostra foi adicionada e mantida por 30min a  $37^\circ C$ . Após o tempo de ativação foram utilizados 100  $\mu L$  de meio MEM (Eagle's minimal essential medium) contendo 10% de SFB. A ativação da proteína VP4 tem como finalidade a sua lise mediada pela tripsina a qual resulta em proteína VP5 e VP8. A proteína VP4 ativada faz com que a cepa de rotavírus se torne virulenta. Este processo *in vitro* reproduz o que sofre o vírus no interior do corpo do indivíduo quando ingerido.

Foram utilizados dois controles positivos. Estes controles são rotavirus humano tipo A (GARV), sendo que um controle pertence ao genótipo I e outro ao genótipo II. Estas informações foram obtidas mediante seqüenciamento do fragmento VP6. As amostras foram provenientes de crianças menores de três anos de vida. As amostras clínicas foram coletadas em um pronto atendimento de um hospital de Porto Alegre.

#### *Cultivos celulares e ensaio de placa*

Uma linhagem celular padrão (MA-104) derivada de rim de macaco Rhesus neonato foi obtida, juntamente com HEp-2 e CRIB para desenvolver o estudo. As monocamadas celulares foram propagadas em frascos de cultivo celular de 150cm<sup>2</sup> contendo Eagle's Minimal Essential Medium (MEM) suplementados com 10% de soro fetal bovino. Para realizar os ensaios de placa, as linhagens foram propagadas em placas contendo 24 poços. Os cultivos celulares eram mantidos em estufa a 37°C umedecidas em uma atmosfera contendo 5% CO<sub>2</sub> por duas horas.

Quando as monocamadas se encontravam confluentes, o meio de manutenção era removido e a amostra clínica foi inoculada. Primeiramente, como já descrito anteriormente, as amostras passaram por banho de tripsina com a finalidade de inativar a proteína do capsídeo externo VP4. O inóculo consistiu na adição de 200 µL da amostra previamente inativada nas três linhagens. O período de adsorção adotado foi de duas horas em estufa a 37°C. Após o período de adsorção, o sobrenadante foi removido e substituído por meio de manutenção MEM suplementado com 10% de SFB.

#### *Análise das sequências para construção dos primers para RT-PCR VP6*

Os primers selecionados para o estudo da amplificação do gene VP6 provêm da busca de genes no GenBank. Após arrecadar 65 seqüências distintas no NCBI utilizou-se o programa ClustalX para realizar o alinhamento. BioEdit e Mega4 foram utilizados para identificar as regiões mais conservadas do gene para que se pudesse desenhar os primers. OligoExplorer 1.2 foi a ferramenta de escolha para a seleção dos primers e OligoAnalyzer 1.2 para análise de interações e melhorias estruturais dos mesmos. As sequências resultantes (5'-GATGTCCTGTACTCCTTGT-3'; 5'-GGTAGATTACCAATTCCTCC-3') amplificam um fragmento de 110pb.

### *Extração de ácidos nucléicos virais e amplificação de segmentos genômicos*

Os ácidos nucléicos virais foram extraídos a partir de 400 µL de amostras concentradas de água ou 2 g de fezes diluídas 1:5 em meio MEM sem SFB. Foi utilizado kit comercial à base de sílica RTP<sup>®</sup> DNA/RNA Virus Mini Kit (Invitex, Berlin, Germany). O procedimento seguiu as instruções do fabricante. As amostras foram estocadas a -80°C até posterior análise. A síntese de cDNA foi realizada utilizando-se o kit High Capacity cDNA Reverse Transcription commercial kit (Applied Biosciences, USA), o qual utiliza primers randômicos, seguindo as instruções do fabricante. Após a otimização da técnica, a reação de RT-PCR foi estabelecida para um total de 50 µL nas seguintes proporções: 25 µL of GoTaq<sup>®</sup> Green Master Mix (Promega), 18 µL de água, 1 µL do par de *primers* (20 pM) e 5 µL da amostra. Água foi utilizada como controle negativo em todas as reações de RT-PCR em um termociclador MultiGene, Labnet International, USA. As condições para a reação de amplificação da VP6 foram as seguintes: 94°C por 5 min, 40 ciclos por 94°C por 1 min, 54°C por 1 min (em cada um dos subsequentes 39 ciclos houve decréscimo de 0,5°C), 72°C por 1 min. Todas as amostras foram testadas por RT-PCR antes e depois dos ensaios de placa.

**Tabela 1.** Oligonucleotídeos e condições para amplificação de VP6 de GARV

Virus	Gene alvo	Primer			Posição	Temperatura de anelamento	Amplicon
		Nome	Sequencia	Polaridade			
GARV	VP6	ROTAFAEEVALE -FW	5'-GATGTCCTGTACTCCTTGT-3'	Senso	7-25 <sup>d</sup>	54 °C <sup>f</sup>	160 bp
		ROTAFAEEVALE -REV	5'-GGTAGATTACCAATTCCTCC-3'	Reverso	148-167 <sup>d</sup>		

## RESULTADOS

### *Análise das sequencias e primers para RT-PCR VP6*

Para a amplificação da sequencia de VP6 os primers construídos (Tabela 2), amplificaram sequencias de cepas humanas e de animais. Nenhuma das amostras fecais

coletadas no município de Taquara foi positiva para RV. Entretanto, 25 amostras de água foram positivas para presença de segmentos genômicos de RV.

**Tabela 2.** Resultados da amplificação de VP6 por RT-PCR para rotavírus

Município	Amostra	Resultados		% Positivo amostras de água
		Total 142	Positivo RV	
Rolante	água	31	9	36%
	fezes	-	-	
Riozinho	água	27	5	20%
	fezes	-	-	
Taquara	água	46	11	44%
	fezes	38	0	

#### *Cultivo celular e ensaio de placa*

Em nenhum dos cultivos inoculados foi encontrado efeito citopático (CEP) de rotavírus. Possivelmente este resultado deve-se à quantidade viral muito baixa em amostras de água (KU et. al., 2003; LEE et al., 2005).

Para excluir a possibilidade de haver vírus em baixa quantidade que não permitisse a visualização de CPE em microscopia óptica, submeteu-se novamente as amostras a PCR, utilizando o sobrenadante dos cultivos celulares da terceira passagem das amostras inoculadas em todas as linhagens. Não houve amplificação do gene da VP6 em qualquer amostra testada.

## **DISCUSSÃO**

Encontramos neste estudo 24% das fontes de água positivas na RT-PCR para rotavírus. Até o presente momento, não há um “padrão ouro” para a detecção viral em amostras ambientais. Pesquisadores divergem quanto à técnica de concentração viral. A concentração proposta utiliza filtros carregados positivamente ou filtros com fibra de vidro (MYRMEL et al., 2000; HUANG et al., 2000; HARAMOTO et al., 2007; LOCAS et al., 2008). A metodologia ainda não foi definida por completo e os resultados apresentados podem ser considerados ainda maiores do que aqui encontrados pelos métodos de detecção adotados (MA et al., 1994; HUANG et al., 2000 ; HWANG et al.,

2007). Nossos achados poderiam ser ainda mais expressivos, visto que se desconhece a sensibilidade da RT-PCR adotada. Sabe-se que sua detecção é eficaz, mas as amostras com baixa concentração viral podem ter ocasionado resultados falso - negativos. Esta implicação vai de encontro à discussão do trabalho realizado por Verheyen et al. (2009), também buscou detectar rotavírus em fontes de água em região rural - no sul da África. Segundo os autores, seus resultados falharam quando havia baixa concentração viral nas amostras.

O fato de não termos encontrado vírus nas amostras fecais do Município de Taquara e, em contraponto haver presença de genoma de rotavírus em 10 amostras de água deste município indica que há maneiras distintas do vírus contaminar cursos d'água. Como propõe Godfrey et al. (2005), a contaminação pode ocorrer devida a tubulações para fluxo de água mal projetados, bem como a contaminação de solo que por sua vez chega até as fontes de água. Esta evidência se sustenta visto que os rotavírus têm grande estabilidade em águas e solo, aproximadamente 120 dias em águas de esgoto e mais de 100 dias no solo na temperatura de 20 a 30°C (U.S. MANUAL ON GUIDELINES FOR WATER REUSE, 1992; JIANG et al., 2001).

Deve ser ressaltado que para as estações de tratamento de esgoto e purificação das águas, o tratamento é voltado à eliminação de coliformes fecais. Portanto, quando há presença de rotavírus na água, ele permanece por todo o processo, não havendo técnicas de eliminação do mesmo durante processo de potabilidade da água (LEE. & KIM, 2002; HOT et al., 2003). Neste estudo, o rotavírus foi empregado como biomarcador de poluentes provenientes de contaminação fecal, seja animal ou humana. O método empregado demonstrou que há presença de genoma de rotavírus nas águas coletadas nas cidades de Rolante, Riozinho e Taquara (Vale do Paranhana). Segundo Robertson et al. (1997), a contaminação viral pode ocorrer de um ponto contaminado até um curso d'água numa distância superior a 1.000 metros. Muitos estudos demonstraram que os vírus podem ser ótimos indicadores de contaminação fecal por diferentes espécies de animais (DERBYSHIRE e BROWN, 1978; JIMÉNEZ-CLAVERO et al., 2005; AHMED et al., 2010; WOLF et al., 2010).

Segundo Verheyen et al. (2009), deve-se atentar mais ainda para a presença de vírus entéricos, dentre eles os rotavírus, pois as técnicas de detecção podem ser prejudicadas quando há baixa concentração viral no material analisado. Por conseqüência, as fontes de água podem estar contaminadas em proporções ainda maiores do que as encontradas nos estudos de detecção viral em ambientes aquáticos.

Em estudos futuros a sensibilidade da técnica molecular adotada será mensurada, bem como a aplicação dos oligonucleotídeos selecionados para VP6 serão testados em RT-PCR em tempo real. Pretende-se seqüenciar as amostras positivas para determinarmos a origem dos rotavírus presentes nas fontes de águas.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALFIERI, A.A. et al., Frequency of group A rotavirus in diarrhoeic calves in Brazilian cattle herds, 1998-2002. **Tropical Animal Health and Production**, v.38, p. 521-526, 2006.

BELLAMY, K. et al. A test for the assessment of 'hygienic' hand disinfection using rotavirus. **Journal of Hospital Infection**, v. 24, n. 3, p. 2011, Jul 1993.

CHARLES, K. J. et al. Assessment of the stability of human viruses and coliphage in groundwater by PCR and infectivity methods. **Journal of Applied Microbiology**, v. 106, n. 6, p. 182, 2009.

EDINA MELEG, KRISZTIÁN BÁNYAI VITO MARTELLA, BAOMING JIANG, BÉLA KOCSIS, PÉTER KISFALI, BÉLA MELEGH, AND GYÖRGY SZÚCS. Detection and quantification of group C Rotavirus in communal sewage. **Appl Environ Microbiol**. v.74, p.3394–3399. 2008.

GLASS, R.I., GENTSCH, J., SMITH, J.C. Rotavirus vaccines: success by reassortment? Global illness and deaths caused by rotavirus disease in children. **Emerg**. 1994.

HIJNEN, W.A.M., BEERENDONK, E.F., MEDEMA, G.J. Inactivation credit of UV radiation for viruses, bacteria and protozoan (oo) cysts in water: a review. **Water Res**. 40, 3-22. 2006.

HOWLEY, P.M. (Eds.), **Fields Virology**, vol. 2, 4th ed. Lippincott Williams & Infect. Dis. 9 (5), 565–572.2001.

KAPIKIAN, A. Z., AND R. M. CHANOCK. Rotaviruses, p. 1353-1494. In B. N. Fields, R. M. Chanock, M. S. Hirsch, J. L. Melnick, B. Roizman, and T. P. Monath (ed.), **Virology**. Raven Press, New York. 1990.

KAPIKIAN, A., HOSHINO, Y., CHANCOCK, R.M., Rotaviruses. In: **Knipe, D.M.**, 2001.

LEITE, P.G., CARVALHO-COSTA, F.A., LINHARES, A.C. Group A rotavirus genotypes and the ongoing Brazilian experience - A Review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.103 ( 8), p.745-753, 2008

LI D, GU AZ, YANG W, HE M, HU XH, SHI HC. An integrated cell culture and reverse transcription quantitative PCR assay for detection of infectious rotaviruses in environmental waters. **J Microbiol Methods**. v. 82(1). p.59-63. 2010.

PARASHAR, U.D., HUMMELMAN, E.G., BRESEE, J.S., MILLER, M.A., GLASS, R.I., PESAVENTO, J.B.; ESTES, M.K.; PRASAD,B.V.V. Structural organization of the genome in rotavirus. In: DESSELBERGER, U.; GRAY, J. (Eds). **Viral gastroenteritis**,.Amsterdam:Elsiever , v.9, p.115-128,2003.

RAPHAEL, R.A., SATTAR, S.A., SPRINGTHORPE, S., Longterm survival of human rotavirus in raw and treated river water. **Can. J. Microbiol**. v.31, p.124-128. 1985.

RZEZUTKA, A., COOK, N., Survival of human enteric viruses in the environment and food. **FEMS Microbiol. Rev**. v.28, p.441-453. 2004.

STRAUB, T.M., CHANDLER, D.P. Towards a unified for detecting waterborne pathogens. **J. Microbiol. Methods**. v.53, p.185–197. 2003



#### **4. CONCLUSÕES**

- Os resultados de detecção de genoma viral devem ser interpretados com cuidado.
- O isolamento viral juntamente com a técnica de PCR é de suma importância para a correta avaliação da qualidade da água que serve a humanos e animais. Pelo resultado encontrado no isolamento viral, percebe-se que a água havia sido contaminada por rotavírus, mas estes já não eram potencialmente infecciosos no momento em que este estudo avaliou as condições da água nas propriedades rurais proximidades nas três cidades do vale do Paranhana.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABAD, F. X. et al. Survival of enteric viruses on environmental fomites. **Applied Environmental Microbiology**, v. 60, n. 10, p. 370410, Oct 1994.

ALFIERI, A.A. et al., Ferquency of group A rotavirus in diarrheic calves in Brazilian cattle herds, 1998-2002. **Tropical Animal Health and Production**, v.38, p.521-526, 2006.

ALFIERI, A.F. et al., G and P genotypes of group A rotavirus strains circulating in calves in Brazil, 1996-1998. **Veterinary Microbiology**, v.99, p.167-173, 2004.

ALTENBURG, B.C.; GRAHAM, D.Y.;ESTES, M.K. Ultrastrutural study of rotavirus replication in cultured cells.**The Journal of General Virology**, v.46, p.75-85, 1980.

AU, K.S.; CHAN, W.K.; BURNS, J.W.; ESTES, M.K. Receptor activity of rotavirus nonstructural glycoprotein NS28. **J. Virol.** 63 (11), 4553–4562. 1989.

BANEJEE, I.; RAMANI, S.; PRIMROSE, B.; TURRIZA-GOMARA M.; GRAY, J.J.; BROWN, D.W.; KANG, G. Modification of rotavirus multiplex RT-PCR for the detection of G12 strains based on characterization of emerging G12 rotavirus strains from South India. **J. Med. Virol.**, v. 79, p.1413–1421, 2007.

BARARDI, C.; EMSLIE K.; VERSEY, G.; WILLIAMS, K. Development of rapid and sensitive quantitative assay for rotavirus based on flow cytometry. **J.Virol. Methods**, v.74, p.31-38. 1998.

BELLAMY, K. et al. A test for the assessment of 'hygienic' hand disinfection using rotavirus. **Journal of Hospital Infection**, v. 24, n. 3, p. 2011, Jul 1993.

BIRCH, C.; RODGER, S.; MARSHALL, J.; GUST, I. Replication of human rotavirus in cell culture. **J.Virol. Methods**, v.11, p. 241-250. 1983.

BISHOP, R. F.; DAVIDSON, G. P.; HOLMES, I. H; RUSK, R. J. Virus particles in epithelial cells of duodenal mucosa from children with acute gastroenteritis. **Lancet ii**:1281-1283. 1983.

BOK-SOON, M.; YOON-JU, N.; VJIN-HO, S.; SUN-YOUNG, B.; KYUNG-IL, M.; SEUNG-REL R.; BYOUNG-GUK, K.; MI-KYUNG, P.; SEUNG-EUN, C.; EUN-HEEY.; SUE-NIE, P.; SOOK-JIN, H.; BYUNG-YOON, A. Assessment of the quantitative real-time polymerase chain reaction using a cDNA standard for human group A rotavirus. **Journal of Virological Methods**. v.137; p. 280-286, November 2006.

BOSCH, A. Human enteric viruses in the water environment. **Int. Microbiol.** v.1, p.191–196. 1998.

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

BRASSARDA, J; SEYERA, K; HOUEB, A; SIMARDA, C.; TROTTIERA, Y.L. Concentration and detection of hepatitis A virus and rotavirus in spring water samples by reverse transcription-PCR. **Journal of Virological Methods** v.123, p.163–169, 2004.

BROWNE, E.P.; BELLAMY, A.R.; TAYLOR, J.A. Membrane-destabilizing activity of rotavirus NSP4 is mediated by a membrane-proximal amphipathic domain. **J. Gen. Virol.** v.81 (Pt 8), p.1955–1959. 2000.

CANDEIAS J. A. N.; RACZ M. L.; TRABULSI L. R.; MURAHOWSKY. J. Relative prevalence of rotavirus diarrhoea in children attending outpatient departments of hospitals and general practitioners in S. Paulo, Brazil. **J. Diarrhoeal Dis. Res.**, v.7, p.24-27. 1989.

CHARLES, K. J. et al. Assessment of the stability of human viruses and coliphage in groundwater by PCR and infectivity methods. **Journal of Applied Microbiology**, v. 106, n. 6, p. 182737, Jun 2009.

CHRISTOVIO, D. A.; CANDEIAS J. A. N.; IARIA S. T. Condições sanitárias das águas de irrigação de hortas do município de S. Paulo. II. Isolamento de vírus entéricos. **Rev. Saude Publ.**, v.1, p.12-17. 1967.

CIMONS, M. Rotavirus vaccine seems headed for approval. **ASM News**, v.64, p.6. 1998.

COLUCHI, N.; MUNFORD, V.; MANZUR, J.;VAZQUEZ, C.; ESCOBAR, M.; WEBER, E.; MÁRMOL, P.; RÁCZ, L. Detection, Subgroup Specificity, and Genotype Diversity of Rotavirus Strains in Children with Acute Diarrhea in Paraguay. **Journal of Clinical Microbiology**,v.40, n.5,p.1709-1714, May 2002.  
countries too. **Lancet**, v.370, p.1739–1740, 2007.

CUNLIFFE, N. A., J. S. BRESEE, AND C. A. HART. Rotavirus vaccines: development, current issues and future prospects. **J. Infect.**v. 45, p.1–9. 2002

CZAJKOWSKA, D. et al. Studies on the survival of enterohemorrhagic and environmental Escherichia coli strains in wastewater and in activated sludges from dairy sewage treatment plants. **Polish Journal of Microbiology**, v. 57, n. 2, p. 16571, 2008.

DONG, Y.; ZENG, C.Q.; BALL, J.M.; ESTES, M.K.; MORRIS, A.P. The rotavirus EDITORIAL LANCET, Rotavirus of man and animals.**Lance I**, p.257-259, 1975.

endoplasmic reticulum-localized non-structural glycoprotein of rotavirus, contains distinct virus binding and coiled coil domains. **EMBO J.** v.15 (17), p.4469–4476. 1996.

enterotoxin NSP4 mobilizes intracellular calcium in human intestinal cells by stimulating phospholipase C-mediated inositol 1,4,5-trisphosphate production. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** v. 94 (8), p. 3960–3965. 1997.

ESTES M.K. Rotaviruses and their replication. In DE Griffin, DM Knipe, PM Howley (eds.), **Fields virology**, 5th ed., Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, p. 1747-1785. 2001.

ESTES, M.; COHEN, J., Rotavirus gene structure and function. **Microbiol. Rev.** v.53 (4), p.410–449. 1989.

ESTES, M.K. Rotaviruses and their replication. In:KNIPE, D.M.;HOWLEY, P.M. (eds). **Fields Virology**. 4ed. Philadelphia, PA:Lippincott Williams & Wilkins, v.54, p.1747-1785, 2001.

ESTES, M.K.; COHEN, Rotavirus gene structure and fusion. **J. Microbiological Reviews**, v.53, p.410-449, 1989.

FARTHING M.J.G. **Viruses and the Gut**. Welwyn Garden City, Hertfordshire: Smith Kline & French .1989

Fields BN, Knipe DM, Howley PM, Chanock RM, Melnick JL, Monath TP, Roizman B & Straus SE (eds). **Fields Virology**. Fifth edition. Lippincott-Raven  
FLEWETT, T. H.; WOODE, G. N. The rotaviruses: **brief review. Arch. Virol.** v. 57, p. 1-23, 1978, 2005.

FLEWETT, T. H.;BRYDEN A.S; DAVIES H.Virus particles in gastroenteritis. **Lancet ii**:1497. 1973.

FRANKHAUSER, R.L.; NOEL, J.S.; MONROE, S.S.; ANDO, T.; GLASS, R.I. Molecular epidemiology of “Norwalk-like viruses” in outbreaks of gastroenteritis in the United States. **J. Infect. Dis.**, v. 178, p. 1571–1578, 1998.

FUJIOKA, R. S.; YONEYAMA, B. S. Sunlight inactivation of human enteric viruses and fecal bacteria. **Water Science Technology**, v. 46, n. 1112, p. 2915, 2002.

GENTSCH, J.R. et al. Review of G and P typing results from a global collection of strains: Implications for vaccine development.**The Journal of Infectious Diseases**, v.174, p.30-36, 1996.

GERBA C.P.; ROSE J.B.; HAAS, C.N.; CRABTREE, K.D. Waterborne rotavirus: A risk assessment; **Water Research**. v.30, Issue 12, p. 2929–2940. December 1996.

GERBA, C.P.; ROSE, J.B.; HAAS, C.N.; CRABTREE, K.D. Waterborne rotavirus: a risk assessment. **Water Res.** v.30, p.2929-2940. 1996.

GLASS, R.I.; PARASHAR, U.D.; BRESEE, J.S.; TURCIOUS, R.; FISCHER, T.K.; WIDDOWSON, M.A.; JIANG, B.;GENTSCH, J.R. Rotavirus vaccines: current prospects and future challenges. **Lancet**, v. 368, p.323–332, 2006.

GODFREY, S., F. TIMO, AND M. SMITH. Relationship between rainfall and microbiological contamination of shallow groundwater in northern Mozambique. **Water AS**. v. 31, p.609–614. 2005.

GOFTI-LAROCHE, L.;GRATACAP-CAVALLIER, B.; DEMANSE, D.; GENOULAZ, O.; SEIGNEURIN, J.M.; ZMIROU, D. Are waterborne astrovirus implicated in acute digestive morbidity (E.M.I.R.A. study)? **J. Clin. Virol.**, v.27, p.74–82, 2003.

GOUVEA, V.; GLASS, R. L.; WOODS, K. T.; CLARK, H. F.; FORRESTER B.; FANG, Z-Y. Polymerase Chain Reaction Amplification and Typing of Rotavirus Nuclei Acid form Stool Specimens. **Journal of Clinical Microbiology**, v.28, n.2, p. 276-282, Feb. 1990.

GRIMWOOD, K.; BINES, J.E. Rotavirus vaccines must perform in low-income GULATI, B.R.; ALLWOOD, P.B.; HEDBERG, C.W.; GOYAL, S.M. Efficacy of commonly used disinfectants for the inactivation of calicivirus on strawberry, lettuce, and a food-contact surface. **J. Food Prot.**,v. 64, p.1430–1434, 2001.

HAAS C. N; ROSE JB; GERGA C.P; STIG R. Risk assessment of viruses in drinking water. **Risk Analysis** v.13, p. 545–552, 1993.

HIJNEM, W.A.M.; BEERENDONK, E.F.; MEDEMA, G.J. Inactivation credit of UV radiation for viruses, bacteria and protozoan (oo) cysts in water: a review. **Water Res**. v. 40, p.3-22. 2006.

HOPKIN, R. S.; GASPARD, G. B.; WILLIAMS, F. P.; KARLIN, R. J.; CUKOR, G. BLACKLOW N. R. A community waterborne gastroenteritis outbreak: evidence for rotavirus as the agent. **Am. J. Public Health**, v.74, p.263-265.1984.

HOT, D.; LEGEAY, O.; JACQUES, J.; GANTZER, C.; CAUDRELIER, Y.; GUYARD, K.; LANGE, M.; ANDREOLETTI, L. Detection of somatic phages, infectious enteroviruses and enterovirus genomes as indicators of human enteric viral pollution in surface water. **Water Res**, v.37, p. 4703–4710, 2003.  
<http://cme.medscape.com/viewarticle/581133>. Acesso em 03/08/2010.

HUANG, H., SCHROEDER, F., ZENG, C., ESTES, M.K., SCHOER, J.K., BALL, J.M. Membrane interactions of a novel viral enterotoxin: rotavirus nonstructural glycoprotein NSP4. **Biochemistry**. v. 40 (13), p.4169–4180. 2001.

HUANG, H.; SCHROEDER, F.; ESTES M.K.; McPHERSON, T.; BALL, J.M. The interaction(s) of rotavirusNSP4C-terminal peptides with model membranes. **Biochem. J.** 380 (3), 723–733. 2004.

HUANG, P. W., D. LABORDE, V. R. LAND, D. O. MATSON, A. W. SMITH, AND X. JIANG.. Concentration and detection of caliciviruses in water samples by reverse transcription-PCR. **Appl. Environ. Microbiol.** v.66, p. 4383–4388. 2000.

HWANG, Y. C.; O. M. LEONG, W. CHEN, AND M. V. YATES. Comparison of a reporter assay and immunomagnetic separation real-time reverse transcription- PCR for

the detection of enteroviruses in seeded environmental water samples. **Appl. Environ. Microbiol.** v.73, p.2338–2340 .2007.

IN WATER, SLURRY, AND SOIL Bulletin. **Veterinary Institute of Pulawy**, v. 52, p. 205209, 2008.

JIANG, S.; R. NOBLE, and W. P. CHIU. Human adenoviruses and coliphages in urban runoff-impacted coastal waters of Southern California. **Appl. Environ. Microbiol.** v. 67, p. 179–184, 2001.

KAPIKIAN, A. Z.; HOSHINO Y.; CHANOCK.R. M.; KNIPE D. M.; HOWLEY P. M.; GRIFFIN D. E.; LAMB R. A.; MARTIN M. A.; ROIZMAN B.; STRAUS D. E. Rotaviruses, **Fields virology Lippincott Williams & Wilkins 4th ed.**, p.1787–1834. Philadelphia 2001.

KAPIKIAN, A.Z. Overview of viral gastroenteritis. **Arch. Virol. Suppl.**,v. 12, KERIN, T. K., KANE E. M., GLASS R. I. GENTSCH, J. R. Characterization of VP6 genes from rotavirus strains collected in The United States form 1996-2002. **Springer Science+Business Media, LLC.** 2007.

KUTSUZAWA T.; KONNO T.; SUZUKI H.; KAPIKIAN A.Z.; EBINA T.; ISHIDA N. Isolation of Human Rotavirus Subgroups 1 and 2 in Cell Culture. **JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY.**, v. 16, p. 727-730, Oct. 1982

LEE, S.H.; KIM, S.J. Detection of infectious enteroviruses and adenoviruses in tap water in urban areas in Korea. **Water Res**, v.36, p.248–256, 2002.

LEPAGE, P. Rotavirus infection in Europe: time for effective prevention? **Pediatr. Infect. Dis. J.** v. 25, p.5–6, 2006.

LI D.; GU, A.Z.; YANG, W.; HE, M.; HU, X.H.; SHI, H.C. An integrated cell culture and reverse transcription quantitative PCR assay for detection of infectious rotaviruses in environmental waters. **J Microbiol Methods.** v. 82(1). p.59-63. 2010.

LI, D.; GU, A.Z.; HE, M.; SHI, H.C.; YANG W. UV inactivation and resistance of rotavirus evaluated by integrated cell culture and real-time RT-PCR assay. **water research** v.43 p.3261–3269, 2009.

LINHARES A. C. Y. B.; GABBAY J. D. P.; MASCARENHAS R. B.; FREITAS. FLEWETT T. H; BEARDS S.G.M. Epidemiology of rotavirus subgroups and serotypes in Belem, Brazil. **Ann. Inst. Pasteur Virol.**, V.139, p.89-99. 1988.

LINHARES A. C.; PINHEIRO F. P.; FREITAS R. B.; GABBAY Y. B.; SHIRLEY J. A.; BEARDS G. M.. An outbreak of rotavirus diarrhea among a non immune isolated South American Indian community. **Am. J. Epidemiol.** v. 113, p.703-710. 1981.

LOCAS, A., C. BARTHE, A. B. MARGOLIN, AND P. PAYMENT. Groundwater microbiological quality in Canadian drinking water municipal wells. **Can. J. Microbiol.** v. 54, p.472–478. 2008.

LORROT M.; BENHAMADOUCHE-CASARI H.; VASSEUR M. Physiopathologie de la diarrhée à rotavirus. **Virologie**, v. 9, p. 9-18, jan./fev. 2005.

LUNDGREN, O.; SVENSSON, L. Pathogenesis of rotavirus diarrhea. **Microbes and Infection**, v.3, p.1145-1156, 2001.

MA, J. F., J. NARANJO, AND C. P. GERBA.. Evaluation of MK filters for recovery of enteroviruses from tap water. **Appl. Environ. Microbiol.** v.60, p. 1974–1977, 1994.

Manual on guidelines for water reuse. EPA/625/R-92/004. **U.S. Environmental Protection Agency**. Center for Environmental Reservation Information, Cincinnati, Ohio, 1992.

MARTINS M. T.; SANCHES P. S.; MARQUES E.; MONTEIRO C. K.; MOLINA A. G. A ten year survey of salmonella and enterovirus in raw and treated water in the great S. Paulo, Brazil. **Water Sci. Technol.**, v.18, p.53-60, 1986.

McNULTY, M. S., ALLAN, G. M. D.; TODD; McFERRAN J. B.; McKILLOP E. R. ; COLLINS D. S.; McCracken R. M. Isolation of rotaviruses from turkeys and chickens: demonstration of distinct serotypes and RNA electropherotypes. **Avian Pathol.** v. 9 , p. 363-375, 1980.

McNULTY, M. S.; Rotaviruses. **J. Gen. Virol.** V. 40, p. 1-18.1978.

McNULTY, M.S.; CURRAN, W.L.; McFERRAN, J. B. The morphogenesis of a cytopathic bovine rotavirus in Madin-Darby bovine kidney cells. **The Journal of General Virology**, v.33, p.503-508, 1976.

MEAD, P.S.; STUTSKER, L.; DIETZ, V.; McCAIG, L.F.; BRESEE, J.S.; SHAPIRO, C.; GRIFIN, P.M.; TAUXE, R.V. Food-related illness and death in the United States. **Emerg. Infect. Dis.**, v. 5, p. 607–625, 1999.

MELEG, E.; BÁNYAI K.; MARTELLA V.; JIANG B.; KOCSIS, B.; MELEGH P.K.B.; SZÜCS G. Detection and quantification of group C Rotavirus in communal sewage. **Appl Environ Microbiol.** v.74(11) p.3394–3399, 2008.

MELEG, E.; BANYAI, K.; MARTELLA, V.; JIANG, B.; KOCSIS, B.; KISFALI, P.; MELEGH, B.; SZUCS, G. Detection and quantification of group C rotavirus in communal sewage. **Appl. Environ. Microb.** v.74, p.3394-3399. 2008.

MEYER, J.C.; BERGMANN, C.C.; BELLAMY, A.R. Interaction of rotavirus cores with the nonstructural glycoprotein NS28. **Virology.** V. 171 (1), p. 98–107. 1989.

MOE, K.; HARPER, G. J. The effect of relative humidity and temperature on the survival of bovine rotavirus in aerosol. **Archives of Virology**, v. 76, n. 3, p. 2116, 1983.

MORRIS, A.P.; SCOTT, J.K.; BALL, J.M.; ZENG, C.Q.; O'NEAL, W.K.; ESTES, M.K. NSP4 elicits age-dependent diarrhea and Ca(2+)mediated I(-) influx into intestinal crypts of CF mice. **Am. J. Physiol.** v.277 (2 Pt. 1),p. G431–G444. 1999.

MORRIS, R. Reduction of microbial levels in sewage effluents using chlorine and peracetic acid disinfectant. **Water Sci. Technol.** V.27, p. 387–393, 1993.

MURAKAMI, Y.; INISHIOKA, N.; HASHIGUCHI, Y.; KUNIYASU, C. Serotypes of Bovine Rotaviruses Distinguished by Serum Neutralization. **Infection and Immunity**, v. 40, p. 851-855, No. 3. June 1983.

MYRMEL, M., E. RIMSTAD, AND Y. WASTESON. Immunomagnetic separation of a Norwalk-like virus (genogroup I) in artificially contaminated environmental water samples. **Int. J. Food Microbiol.** v.62, p.17–26. 2000.

NAKAGOMI, O.; MOCHIZUKI, M.; ABOUDY, Y.; SHIF, I.; SILBERSTEIN, I.; NAKAGOMI, T. Hemagglutination by a Human Rotavirus Isolate as Evidence for Transmission of Animal Rotaviruses to Humans **Journal of Clinical Microbiology**, p. 1011-1013 Apr. 1992.

Nonstructural glycoprotein of rotavirus affects intracellular calcium levels. **J. Virol.** v.68 (1), p.251–257. 1994.

O'BRIEN, J.A., TAYLOR, J.A., BELLAMY, A.R. Probing the structure of rotavirus NSP4: a short sequence at the extreme C-terminus mediates binding to the inner capsid particle. **J. Virol.** v.74 (11), p.5388–5394.2000.

O'MAHONY J.; FOLEY B. MORGAN S.; MORGAN J. G.; HILL C., 1999, VP4 and VP7 Genotyping of Rotavirus Samples Recovered from Infected Children In Ireland over a 3- Year Period. **Journal of Clinical Microbiology**, 37-1699-1703.

O'MAHONY, J.; O'DONOGHUE, M.; MORGAN, G. J.; HILL, C. Rotavirus survival and stability in foods as determined by an optimized plaque assay procedure. **International Journal of Food Microbiology**, v.61, p.177-185. 2000

OLSZEWSKA, H. et al. SURVIVAL OF BOVINE ENTEROVIRUS STRAIN LCR4  
PATTI, A. M. et al. Survival of enteric viruses in the marine environment. *Annali di Igiene*, v. 8, n. 3, p. 3418, May/June 1996.  
p.7–19, 1996.

PAI, C.H.; SHAHRABADI, M.S.; INCE, B. Rapid Diagnosis of Rotavirus Gastroenteritis by a Commercial Latex Agglutination Test. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 22, No. 5., p. 846-850. Nov. 1985

PAUL, P.S.; LYOO Y.S. Immunogens of rotaviruses. **Veterinary Microbiology**, v.37, p.299-317, 1993.

PAYMENT, P. Poor efficacy of residual chlorine disinfectant in drinking water to inactivate waterborne pathogens in distribution systems. *Can. J. Microbiol.* v.45, p. 709–715, 1999.

PAYMENT, P.; TRUDEL, M. Immunoperoxidase method with human immune serum globulin for broad-spectrum detection of cultivable human viruses in environmental samples. **Appl. Environ. Microbiol.** V.50, p.1308–1310, 1985.



PEREIRA , H.G. et al.,An atypical rotavirus detected in a child with gastroenteritis in Rio de Janeiro, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 78, p.245-250, 1983.

PEREIRA H. G.; AZEREDO R. S.; LEITE J. P. G.; CANDEIAS J. A. N.; RACZ M. L.; LINHARES A. C.; GABBAY Y. B.; TRABULSI L. R. Electrophoretic study of the genome of human rotavirus from Rio de Janeiro, Sao Paulo and Para, Brazil. **J. Hyg.**, v.90, p.117-125. 1983.

PESAVENTO, J.B.; ESTES, M.K.; PRASAD,B.V.V. Structural organization of the genome in rotavirus. In: DESSELBERGER, U.;GRAY, J. (Eds). **Viral gastroenteritis, Amsterdam:Elsiever Science**, v.9., p.115-128, 2003.

PINTO, R.; GAJARDO, R.; ABAD F.; BOSCH, A. Detection of fastidious infectious enteric viruses in water. **Environ. Sci. technol.**, v.29, p.2636- 2638. 1995.

PRASAD, B.V.V.; ESTES, M.K. Molecular basis of rotavirus replication. **Structural biology of viruses**, Oxford: Oxford University Press, 1997. p.239-268.

PORTARIA FEDERAL DO MINISTÉRIO DA SAÚDE Nº 2914 DE 12/12/2011.

ROBERTSON, J. B., AND S. C. EDBERGNatural protection of spring and well drinking water against surface microbial contamination. I. Hydrogeological parameters. **Crit. Rev. Microbiol.** v. 23, p.143–178 . 1997.

RZEZUTSKA, A., COOK, N.Survival of human enteric viruses in the environment and food. **FEMS Microbiol. Rev.** v.28, p.441-453. 2004

SAHLSTROM, L. et al. A laboratory study of survival of selected microorganisms after heat treatment of biowaste used in biogas plants. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 16, p. 785965, Nov 2008.

SAID, A.I.; D'SOUZA, D.H.; JAYKUS, L.A. Human enteric viruses as causes of foodborne diseases. **Comp. Rev. Food Sci. Food Safety**,v. 1, p.73–89, 2002.

SAIF, L.J, SMITH, K.L.; LANDMEIER B.J.; BOHL, E.H.; THEIL K.W.; TODHUNTER, D.A. Immune response of pregnant cows to bovine rotavirus immunization; **American Journal of Veterinary Research** ; v. 45(1); p. 49-58. 1984.

SAIR, A.I.; D'SOUZA, D.H.; JAYKUS, L.A. Human enteric viruses as causes of foodborne diseases. **Comp. Rev. Food Sci. Food Safety** v.1, p.73–89, 2002.

SMITH, E.; ESTES, M.; GRAHAM, D.; GERBA, C. A plaque assay for the simian rotavirus SA11. **J.Gen. Virol.** v.43, p.513-519. 1979.

STAUBT, T.M.; CHANDLER, D.P. Towards a unified for detecting waterborne pathogens. **J. Microbiol. Methods.** V.53, p.185–197, 2003.

STEWIEN K. E. Comparative study of two methods for concentrating enterovirus in sewage and determination of coliform/ virus ratios in environmental samples. **Ph.D. thesis. University of São Paulo**, São Paulo, Brazil. 1979.

SUTTMOLIER F.; AZEREDO R. S.; LACERDA M. D.; BARTH O. M.; PEREIRA H. G, HOFFER E. H.; SCHATZMAYR G. An outbreak of gastroenteritis caused by both rotavirus and *Shigella sonnei* in a private school in Rio de Janeiro. **J. Hyg.**, v. 88 p. 285-293. 1982.

TAFAZOLI, F. ZENG, C.Q.; ESTES, M.K.; MAGNUSSON, K.E.; SVENSSON, L. NSP4 enterotoxin of rotavirus induces paracellular leakage in polarized epithelial cells. **J. Virol.** v.75 (3), p.1540–1546. 2001.

TANIGUCHI, K.; URASAWA, S. Diversity in rotavirus genomes. **Virology**, v.6, p.123-131, 1995.

TAYLOR, J.A.; O'BRIEN, J.A.; YEAGER, M. The cytoplasmic tail of NSP4, the endoplasmic reticulum-localized non-structural glycoprotein of rotavirus, contains distinct virus binding and coiled coil domains. **EMBO J.** 15 (17), 4469–4476. 1996.

TIAN, P.; ESTES, M.K.; HU, Y.; BALL, J.M.; ZENG, C.Q.; SCHILLING, W.P. The rotavirus nonstructural glycoprotein NSP4 mobilizes Ca<sup>2+</sup> from the endoplasmic reticulum. **J. Virol.** v.69 (9), p.5763–5772. 1995

TIAN, P.; HU, Y.; SCHILLING, W.P.; LINDSAY, D.A.; EIDEN, J.; ESTES, M.K. The epidemiology of diarrheal diseases in South America. Infectious diarrhea in the young. **Elsevier Biomedical Press, Amsterdam**, In T. Tzipori et al. (ed.). p. 121-143. 198

TREE, J.A.; ADAMS, M.R.; LEES, D.N. Chlorination of indicator bacteria and viruses in primary sewage effluent. **Appl. Environ. Microbiol.** v. 69, p. 2038–2043, 2003.

TREE, J.A.; ADAMS, M.R.; LEES, D.N. Virus inactivation during disinfection of wastewater by chlorination and UV irradiation and the efficacy of F+ bacteriophage as a viral indicator. **Water Sci. Technol.** v.35, p. 227–232, 1997.

University of Liverpool. Disponível em [http://www.liv.ac.uk/.../research/dr\\_cunliffe/index.htm](http://www.liv.ac.uk/.../research/dr_cunliffe/index.htm). Acesso em 03/08/2010.

VAN DER HEIDE R.; KOOPMANS M.P.G.; SHEKARY N.; HOUWERS D.J.; VAN DUYNHOVEN Y.T.H.P.; VAN DER POEL W.H.M. Molecular Characterizations of Human and animal Group A Rotaviruses in The Netherlands. **Journal of Clinical Microbiology**, v.43, p. 669-675. 2005.

VESIKARI T; SARKKINEN H.K.; MÄKI M.; Quantitative aspects of rotavirus excretion in childhood diarrhoea. **Acta Paediatr Scand.** v. 70(5), p.717-21. 1981.

WARD, R., KNOWLTON, D., PIERCE, M. Efficiency of human rotavirus propagation in cell culture. **J. Clin. Microbiol.** v.19, p.748-753. 1984.

Wilhelmi, I., Roman, E., Sanchez-Fauquier, A., Viruses causing gastroenteritis. **Clin. Microbiol. Infect.** 9, 247–262. 2003.